



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ – REITORIA DE PÓS – GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ISABELLA JARDELINO DIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida* spp
SOB A AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA**

**CAMPINA GRANDE - PB
2017**

ISABELLA JARDELINO DIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida*
spp SOB A AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes.

**CAMPINA GRANDE - PB
2017**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

D541a Dias, Isabella Jardelino.

Avaliação in vitro dos fatores de patogenicidade de *Candida* spp sob a ação da terapia fotodinâmica [manuscrito] / Isabella Jardelino Dias. - 2017.
89 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação: Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Departamento de Odontologia".

1. Terapia fotodinâmica. 2. *Candida*. 3. Atividade antibiofilme. 4. Patogenicidade. I. Título.

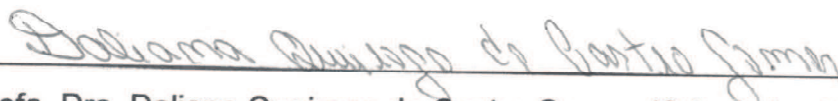
21. ed. CDD 617.6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de
Mestre em Odontologia.

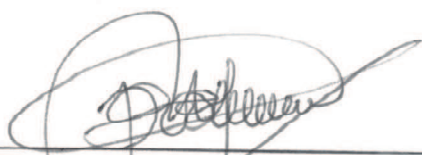
ISABELLA JARDELINO DIAS

Dissertação apresentada em: 19 / 06 / 17 .

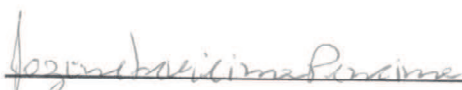
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior (1º Examinador)
Universidade Tiradentes (UNIT)



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira (2º Examinador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, Getulio e Claudia, meus primeiros educadores. Por toda dedicação, fortaleza e amor incansável na construção de meus melhores valores, dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas. Por seu amor manifestar-se acima de todo conceito humano de bem e mal, visando sempre o crescimento de sua criação. Agradeço-o por ser, cotidianamente, doçura no cuidado, fortaleza nas dificuldades e fé nas incertezas.

Aos meus amados pais, Getulio Dias e Claudia Jardelino, por cumprir com imensa generosidade a missão de genitores e mestres de sua família. Por cada esforço desmedido, torcendo e lutando comigo a cada dia. Minha gratidão e felicidade por serem vocês.

A toda minha família, especialmente aos que me iluminaram de modo mais intenso nessa trajetória: vovó Maria Augusta; tios Francisco, Normanda e Raquel; primos Maria Olívia e Rafael; bem como meus amados sobrinhos Cecília, Heitor e Maria Alice. Por todo apoio e alegria que recebi de forma tão abundante.

Aos incríveis amigos Antônio, Thiago, Raysa e Nicinha, por toda acolhida e suporte recebido em Campina Grande e João Pessoa. Por tornarem leves os caminhos mais íngremes, vocês são preciosos em minha vida.

A minha querida orientadora Daliana Queiroga, exemplo de docente, profissional e ser humano. Pela constante assistência e confiança recebida, me proporcionando oportunidades e conhecimentos que sempre serei imensamente grata. Desejo saúde e felicidade de forma plena em sua vida! Nossa amizade e respeito sempre ficarão.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba, representados por Patrícia Meira, Sérgio d'Ávila, Daliana Queiroga, Alessandro Cavalcanti, Ana Cláudia, Ana Flávia, Cassiano Nonaka, Daniela Pita, Edja Costa, Jozinete Vieira, Manuel Antonio, Maria Helena, Pollianna Muniz, Renata Rocha e Rilva Suely. Agradeço pela doação de

seus esforços, seja como modelo profissional, ensinamentos e até mesmo na cobrança por manifestarmos nosso melhor desempenho.

Aos colegas da turma de mestrado: Ana Priscila, Diego, Erick, Ernani, José de Alencar, Liege, Luan, Luana, Niebla, Rodolfo e Tomás. Não poderia deixar de citar cada um de vocês, pois a união sempre foi nossa principal característica. Obrigada pelo bom humor e companheirismo durante esses dois anos.

A querida Sheyla Dornelas, pela amizade partilhada entre os quilômetros semanalmente percorridos de João Pessoa à Campina Grande. Muito obrigada pelo seu apoio, bondade e por manifestar luz a todos ao seu redor.

A professora Edja Costa, coordenadora do Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, bem como aos demais integrantes: Arella, Rennaly e Paolla. Sou imensamente grata pelo aprendizado e assistência metodológica recebida para a execução dessa pesquisa.

A querida Carolina Medeiros, por sua generosidade e disponibilidade em unir forças para concretização dos testes realizados para essa dissertação. Você foi para mim instrumento de providência divina. Que a vida se estenda de retribuições no seu caminho.

A querida Letícia Targino, pela amizade construída ao longo desse tempo. Muito obrigada pela receptividade e ajuda nos momentos mais difíceis. Acredito muito no seu potencial, no dom que transparece por sua constante dedicação.

Meus agradecimentos aos funcionários que formam o corpo universitário da Universidade Estadual da Paraíba, pela cordialidade e manutenção da estrutura física, intelectual e humana da instituição. Especialmente ao Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO), pela oportunidade de formação e pelo exercício de uma ciência transparente e responsável, bem como ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa (PROPESQ), pelo auxílio financeiro proporcionado para a execução desse trabalho.

·

“Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A persistência e a determinação são, por si sós, onipotentes.

(Calvin Coolidge)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar, *in vitro*, o efeito da Terapia Fotodinâmica, com uso de azul de metileno como fotossensibilizador, sobre os principais fatores de patogenicidade de *Candida* spp. O mesmo consistiu em um ensaio experimental com observação direta sobre a atividade antibiofilme, expressa em UFC/mL e pela viabilidade celular, além da análise morfológica, por meio do teste de adesão a substratos abióticos e avaliação da presença de quitina na parede celular. A partir da suspensão de *Candida albicans* e *tropicalis*, cepas clínicas e padronizadas, foram preparados biofilmes maduros. A fonte de luz utilizada foi o laser InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm e dose total de 178,5 J/cm². Os seguintes grupos foram estabelecidos no estudo: (1) irradiado com laser; (2) na presença de azul de metileno por 20 minutos; (3) Terapia Fotodinâmica com pré-irradiação de 20 minutos; (4) controle positivo (Nistatina); (5) controle de crescimento. A atividade antibiofilme foi analisada pelo teste ANOVA-one way e teste de Tukey com nível de significância de 5%. A eficácia da TDF foi expressa como um dos valores mais baixos obtidos em UFC/mL ($p < 0,05$), bem como pela ruptura do ciclo reprodutivo das leveduras, redução do número e volume celular fúngico, indução de transição morfológica, rompimento da integridade celular e comprometimento do ciclo regenerativo dos fungos. Portanto, conclui-se que a efetividade exibida pela Terapia Fotodinâmica, nos fatores de patogenicidade de *Candida*, ratifica conceitos clínicos consolidados, sendo assim, elucidados os mecanismos específicos que o tratamento dispõe para tal finalidade.

Palavras chaves: Terapia fotodinâmica; *Candida*; Patogenicidade.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze, in vitro, the effect of Photodynamic Therapy, using methylene blue as a photosensitizer, on the main pathogenicity factors of *Candida* spp. The same consisted of an experimental study with direct observation on the antibiofilm activity, expressed in CFU/mL and by cell viability, besides the morphological analysis, through the test of adhesion to abiotic substrates and presence of chitin in the cell wall. From the suspension of *Candida albicans* and *tropicalis*, clinical and standard strains, mature biofilms were prepared. The light source used was the InGaAlP laser, with a wavelength of 660 nm and a total dose of 178.5 J / cm². The following groups were established in the study: (1) laser irradiated; (2) in the presence of methylene blue for 20 minutes; (3) Photodynamic Therapy with 20 minute pre-irradiation; (4) positive control (Nystatin); (5) growth control. The antibiofilm activity was analyzed by ANOVA-one way test and Tukey's test with significance level of 5%. The efficacy of TDF was expressed as one of the lowest values obtained in CFU / mL ($p < 0.05$), as well as rupture of yeast reproductive cycle, reduction in fungal cell number and volume, induction of morphological transition, cell integrity and impairment of the fungal regenerative cycle. Therefore, it has concluded that the effectiveness shown by Photodynamic Therapy in the pathogenicity factors of *Candida* ratifies consolidated clinical concepts, thus elucidating the specific mechanisms that the treatment has for this purpose.

Keywords: Photodynamic therapy; *Candida*; Pathogenicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ASD	Àgar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC	Controle de Crescimento
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSD	Caldo Saboraund Dextrose
DMSO	Dimetil Sulfóxido
FS	Fotossensibilizador
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LEAq	Laboratório de Ecologia Aquática
NaCl	Cloreto de Sódio
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PROPESQ	Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa
ROS	Oxigênio Singleto
TFD	Terapia fotodinâmica
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNIT	Universidade Tiradentes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das médias (UFC/mL) de *Candida albicans* ATCC (10231) e *Candida tropicalis* ATCC (750).

Tabela 2: Distribuição das médias de metabolismo de *Candida albicans* ATCC e *Candida tropicalis* ATCC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas metodológicas do estudo.

Figura 2. Micro-organismos *Candida albicans* ATCC (10231), *Candida albicans* clínica, *Candida tropicalis* ATCC (750) e *Candida tropicalis* clínica, semeados após 24h.

Figura 3. Divisão de microplacas conforme os grupos experimentais e controles estabelecidos (*C. tropicalis* 750).

Figura 4. Limites visíveis da irradiação aplicada no primeiro poço da triplicata, preservando o poço adjacente (A) de sobreposição energética.

Figura 5. Biofilme maduro de *Candida* sp formado, visivelmente, no fundo de poços da microplaca (A). Biofilme parcialmente formado e descartado dos experimentos (B).

Figura 6. Microdiluições seriadas em 10 vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) dos grupos 01, 02, 03.

Figura 7. Células fúngicas decantadas após a centrifugação (A) e adição de MTT após remoção do sobrenadante (B). Suspensão fúngica após a adição de Dimetil Sulfóxido (C).

Figura 8. Análise da fluorescência da parede celular de *Candida* sp através do Microscópio Óptico de Fluorescência com auxílio do Software ZEN Lite 2012.

ARTIGO - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida* spp ANTES E APÓS A TERAPIA FOTODINÂMICA

Figura 1. Limites visíveis da irradiação aplicada no primeiro poço da triplicata, preservando o poço adjacente (A) de sobreposição energética.

Figura 2. Biofilme maduro de *Candida* sp formado, visivelmente, no fundo de poços da microplaca (A). Biofilme parcialmente formado e descartado dos experimentos (B).

Figura 3. Atividades antimicrobianas dos grupos experimentais e controles, obtidas a partir das soluções de cultivo de *C. albicans* ATCC (10231) (A) e de *C. tropicalis* ATCC (750) (B), expressa em UFC/mL.

Figura 4. Atividades metabólicas de *C. albicans* ATCC (10231) (A), cepas clínicas de *C. albicans* (B) e cepas clínicas de *C. tropicalis* (C), referentes ao CC e aos tratamentos com Laser e Nistatina, expressas em porcentagem.

Figura 5. Microfotografia de *C. albicans* ATCC (10231) realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 6. Microfotografia de cepas clínicas de *C. albicans* realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 7. Microfotografia de *C. tropicalis* ATCC (750) realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 8. Microfotografia de cepas clínicas de *C. tropicalis* realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 9. Microfotografia de *C. albicans* ATCC (10231) realizadas através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 10. Microfotografia de cepas clínicas de *C. albicans* realizadas através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 11. Microfotografia de *C. tropicalis* ATCC (750) realizadas através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Figura 12. Microfotografia de cepas clínicas de *C. tropicalis* realizadas através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Grupos experimentais e controles do estudo.

Quadro 2. Parâmetros do Laser Diodo.

Quadro 3. Relação entre micro-organismos e grupos da amostra.

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	Delineamento do estudo	20
3.2	Local do Estudo	21
3.3	Considerações Éticas	21
3.4	Micro-organismos	21
3.5	Preparo dos Inóculos para os Experimentos	22
3.6	Grupos Experimentais e Controles	23
3.7	Atividade Antibiofilme	26
3.7.1	Avaliação do Biofilme	28
3.7.2	Viabilidade Celular (MTT)	29
3.8	Análise da Morfologia Celular	30
3.8.1	Adesão a substratos abióticos	30
3.8.2	Presença de quitina na parede celular	30
3.9	Análise de Dados	31
4	ARTIGO	32
4.1	Apresentação	32
4.2	Artigo a ser Submetido	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A	77
	ANEXO B	79

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As infecções de origem fúngica apresentam-se como um problema de saúde pública, podendo atingir populações com patamares heterogêneos de desenvolvimento socioeconômico. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, esses micro-organismos contribuem para o agravamento de quadros sistêmicos comprometedores, elevando os índices de mortalidade local (CULLEN; EDGERTON, 2016, PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016, JORGENSEN et al, 2017).

Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças classificam *Candida* spp como o terceiro patógeno mais comum em pacientes hospitalizados, cujas infecções determinam o óbito de até 50% dos indivíduos acometidos (BENNETT, 2015, ZHAO et al, 2016). Além disso, pacientes com biomateriais implantados, como cateteres vasculares, quando colonizados pelas espécies *Candida*, são mais propensos à septicemia (JORGENSEN et al, 2017).

A implantação de um dano no processo doença é consequente de múltiplos fatores, como a relação entre a microbiota e a defesa do hospedeiro. Compreende-se assim, que populações com deficiências imunológicas são mais susceptíveis a ação oportunista de fungos, como *Candida* spp (RKEIN et al, 2016).

Dessa maneira, portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) ou indivíduos submetidos a terapias antineoplásicas, como quimioterapia e radioterapia, tendem ao desenvolvimento de fenômenos fúngicos que se expressam desde manifestações mucocutâneas leves até estágios letais em pacientes gravemente imunocomprometidos (BENNETT, 2015, CULLEN; EDGERTON, 2016).

Dentre as diversas manifestações de *Candida* spp, repercussões orais severas como periodontite avançada, infecções intrarradiculares persistentes e candidose oral, possuem etiopatogenicidade relacionada ao fungo, seja de modo isolado ou aliado a outras microbiotas (BARBEDO; SGARBI, 2010, BOHORA; KOKATE, 2017, KASIC et al, 2017, DE-LA-TORRE et al, 2017).

A candidose caracteriza-se como a infecção oral mais frequente, destacando-se como principais agentes etiológicos: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* e, predominantemente, *C. albicans*. As manifestações clínicas apresentam-se de modo variável, sugerindo que dois terços ou mais de portadores de prótese total ou parcial removível provisória apresentem algum sintoma relacionado à doença, com elevadas taxas de recorrência mesmo frente às terapias antifúngicas (ENACHE-ANGOULVANT et al, 2010, PEREIRA et al, 2015, LOSTER; TAPPUNI; SHIBOSKI, 2016, SATO et al, 2017, WHALEY et al, 2017).

Diversos medicamentos sintéticos para o tratamento da candidose oral estão disponíveis comercialmente. No entanto, o uso progressivo desses agentes resultou em espécies *Candida* mais resistentes a fármacos convencionais e evolutivamente mais adaptáveis ao hospedeiro por meio de seus mecanismos de patogenicidade, tornando difícil o controle da infecção (WINGETER et al, 2007, KRYSAN, 2015, JABRA – RIZK et al, 2016; ALVES et al, 2017). Desse modo, o desenvolvimento de novas terapias é reconhecidamente a base fundamental para melhoraria da sobrevida dos pacientes, aumentando, assim, a eficácia dos tratamentos (WINGETER et al, 2007, KRYSAN, 2015).

A Terapia fotodinâmica (TFD) apresenta-se como um desses recursos da medicina contemporânea, alinhada às necessidades de meios alternativos de cura frente a crescente resistência fúngica. O mecanismo da TFD consiste na irradiação laser, com um comprimento de onda apropriado, sobre um fotossensibilizador específico. Essa sistemática ocasiona uma transferência energética que promove a produção de radicais livres citotóxicos, capazes de modificar irreversivelmente as atividades metabólicas e causar a morte celular dos micro-organismos alvo (WILSON; PATTERSON, 2008; MIMA et al, 2012, GUEDES-PINTO et al, 2017).

Em geral, os fotossensibilizadores são representados por corantes vitais que, estando em concentrações ideais para inativação microbiana, não apresentam toxicidade às células humanas. Dentre os corantes disponíveis, os mais utilizados na TFD em candidose oral são: azul de metileno, hipocrelina, B:La³⁺, derivados da porfirina, verde de malaquita e violeta de genciana. Nesse termo, o azul de metileno, associado à irradiação de baixa intensidade, tem sido considerado o

fotossensibilizador mais eficaz na erradicação de micro-organismos do gênero *Candida* (WAINWRIGHT, 1998, SOUZA et al, 2009, TRABOULSI et al, 2011, GUEDES-PINTO et al, 2017).

O efeito fungicida da irradiação sobre *Candida* spp é comumente exemplificado na prática clínica pelos bons resultados da TFD nos tratamentos. Porém, há uma acentuada escassez de metodologias laboratoriais que, mimetizando o meio oral, elucidem os mecanismos de ação da TFD sobre os fatores de patogenicidade deste fungo, bem como, suas propriedades biológicas antes e após essa terapia, o que ratifica a importância da execução de pesquisas relacionadas ao tema.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar, *in vitro*, o efeito da TFD, com uso de azul de metileno como fotossensibilizador, sobre os principais fatores de patogenicidade de *Candida* spp.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de inibição do número de unidades formadoras de colônias em biofilme de *Candida* spp.
- Analisar a atividade metabólica de *Candida* spp após a aplicação dos tratamentos.
- Identificar o estado morfológico e as características celulares de *Candida* spp.
- Detectar a atividade antifúngica pela ausência de quitina na parede celular dos micro-organismos após as terapias.
- Investigar o protocolo de tratamento mais eficaz na inativação de *Candida* spp, ATCC e cepas clínicas, segundo os grupos pré-estabelecidos.
- Distinguir as espécies ATCC e clínicas com possível resistência aos tratamentos experimentais e controle.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do Estudo

Foi realizado um ensaio laboratorial experimental, *in vitro*, com observação direta sobre o efeito da TFD frente à patogenicidade da *Candida* spp (MARCONI; LAKATOS, 2011). As etapas metodológicas utilizadas nesse processo estão descritas no fluxograma a seguir:

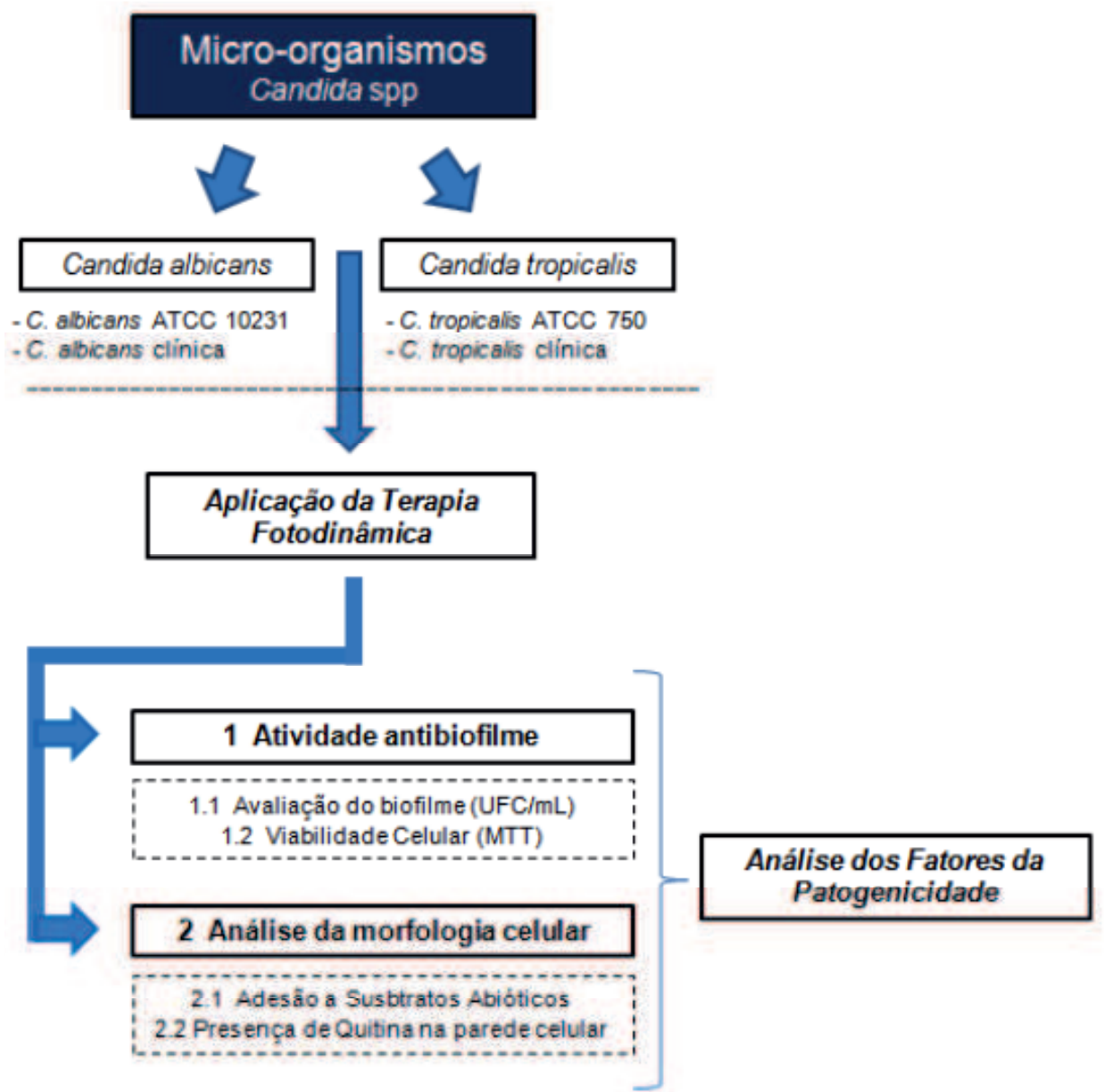


Figura 1. Etapas metodológicas do estudo.

3.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia e no Laboratório de Ecologia Aquática (LEAq) do Departamento de Biologia, ambos pertencentes à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB.

3.3 Considerações Éticas

Os isolados clínicos de *Candida* spp utilizados nos experimentos foram doados e identificados pelo Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os procedimentos de isolamento dos fungos, bem como todos os mecanismos antecedentes a estocagem, seguiram os princípios éticos estabelecidos pelo Código de Helsinque. O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e aprovado com número de registro CAAE 57561416.4.0000.5187 (Anexo A).

3.4 Micro-organismos

Os testes foram realizados em micro-organismos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, representadas por isolados clínicos e estirpes de *American Type Culture Collection* (ATCC). Portanto, quatro tipos de fungos foram utilizados: *Candida albicans* ATCC (10231), *Candida albicans* clínica, *Candida tropicalis* ATCC (750) e *Candida tropicalis* clínica.

O processo de identificação da microbiota clínica foi realizado segundo os critérios estabelecidos por Looder (1970), Hoog e Guarro (1995), Kurtzmann e Fell (1998), bem como de Sidrim e Rocha (2004), cujas bases metodológicas se alicerçaram na macromorfologia, micromorfologia, provas fisiológicas e bioquímicas.

O método de semeadura em placas foi utilizado para analisar o material biológico, que consistiu inicialmente na inoculação dos micro-organismos em placas de Petri descartáveis de dimensão 15x90mm, contendo Ágar Sabouraud Dextrose

(ASD) (Difco Laboratories Ltda, Bordeaux, France). Posteriormente, foi adicionado cloranfenicol (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA) a concentração 100 µg/mL e, em seguida, as placas foram incubadas à 37° C, pelo período de 48h.

As colônias crescidas e com aspecto de fungos leveduriformes foram isoladas em meio nutritivo cromogênico padronizado, CHROMÁgar *Candida* (Difco Laboratories Ltda, Bordeaux, France). Esse sistema avaliou a espécie de *Candida* spp conforme a coloração e o morfotipo, sendo assim, a identificação presuntiva realizada conforme as colorações das colônias existentes nas placas. A tonalidade verde da colônia indicou a presença de *C. albicans*, a azul de *C. tropicalis* e a roxa de espécies não específicas (*Candida* sp). Os meios de culturas foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, e os cultivos realizados a temperatura de 37°C por 48 h.

Outros experimentos também foram executados com o intuito de certificar as espécies de *Candida* spp utilizadas, tais como prova do tubo germinativo (TASCHDJIAN et al, 1960, SIDRIM; ROCHA, 2004), microcultivo de leveduras pela filamentação dos fungos em Ágar Fubá com Tween – 80 (DALMAU, 1929, LODDER, 1970, SIDRIM; ROCHA, 2004), auxanograma com assimilação de carboidratos e nitrogênio (SIDRIM; ROCHA, 2004) e, por fim, o uso da fermentação de carboidrato (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Após a identificação das espécies *Candida* spp, os micro-organismos clínicos foram armazenados a - 80°C em glicerol a 25%, junto às estirpes ATCC. Posteriormente, na etapa de preparação dos testes de patogenicidade, esses fungos foram descongelados para formação de pré-culturas de células microbianas por meio de técnica de sementeira em placa, promovendo assim os meios apropriados de crescimento para os fungos.

3.5 Preparo dos Inóculos para os Experimentos

Os inóculos utilizados na etapa inicial de todos os experimentos da pesquisa foram preparados a partir do crescimento de micro-organismos em ASD (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), incubado a 37°C por 24 horas (Figura 2).



Figura 2. Micro-organismos *Candida albicans* ATCC (10231), *Candida albicans* clínica, *Candida tropicalis* ATCC (750) e *Candida tropicalis* clínica, semeados após 24h.

Após esse período, uma alíquota de crescimento de *Candida*, de cada placa de Petri, foi retirada e diluída em tubos de ensaio distintos, com 5 mL de Caldo Saboraund Dextrose (CSD) (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). A partir disso, a concentração do inóculo foi padronizada por meio de contagem de células na Câmara de Neubauer (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), cuja concentração ideal para os testes de biofilme e viabilidade celular apresentou-se entre 1×10^7 e 1×10^8 UFC/mL; enquanto que para o teste de adesão a substratos abióticos e presença de quitina na parede celular foi de 1×10^6 UFC/mL.

3.6 Grupos Experimentais e Controles

A partir das suspensões padronizadas de *Candida* spp, foram realizados ensaios de acordo com os grupos experimentais e controles descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Grupos experimentais e controles do estudo.

GRUPO	INTERVENÇÃO
1	Irradiado com Laser
2	Azul de Metileno (20 minutos)
3	TFD (Laser + Azul de Metileno 20 minutos)
4	Controle Positivo (Nistatina)
5	Controle Negativo (Controle de Crescimento)

Como detalhado no Quadro 2, a fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP *Therapy XT* (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda (λ) de 660 nm. O feixe de luz vermelho foi incidido com potência útil de 100 mW em uma área de spot correspondendo a 0,028 cm², resultando em uma dose de 178,5 J/cm² durante cada aplicação. A energia total foi de 5,0 J, com a ponta do spot perpendicular à microplaca, e a altura de 0,5 cm das células fúngicas presentes nos poços. A emissão do laser foi contínua com modo de operação pontual.

Quadro 2. Parâmetros do Laser Diodo.

Composição	InGaAlP
Energia	5,0 J
Potência	100 mW
Comprimento de onda	660 nm
Modo de ação	Contínuo
Diâmetro da ponta	0,028 cm ²
Dose	178,5 J/cm ²
Tempo	50 s
Modo de aplicação	Irradiação perpendicular à placa (0,5 cm de altura)

Para os testes de patogenicidade, o laser foi incidido sobre microplacas (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia, SP, Brasil) estéreis de 96 poços,

conforme os grupos experimentais e controles pré-estabelecidos. O ensaio de cada classe de micro-organismo foi realizado em microplacas distintas, de modo que os grupos experimentais que receberam irradiação (Grupos 1 e 3) fossem fisicamente separados entre si, bem como dos grupos que não receberam carga energética (grupos 2, 4 e 5). Dessa forma, evitou-se a possibilidade de sobreposição de irradiação entre os grupos submetidos ao laser, como também qualquer absorção mínima pelos demais (Figura 3).

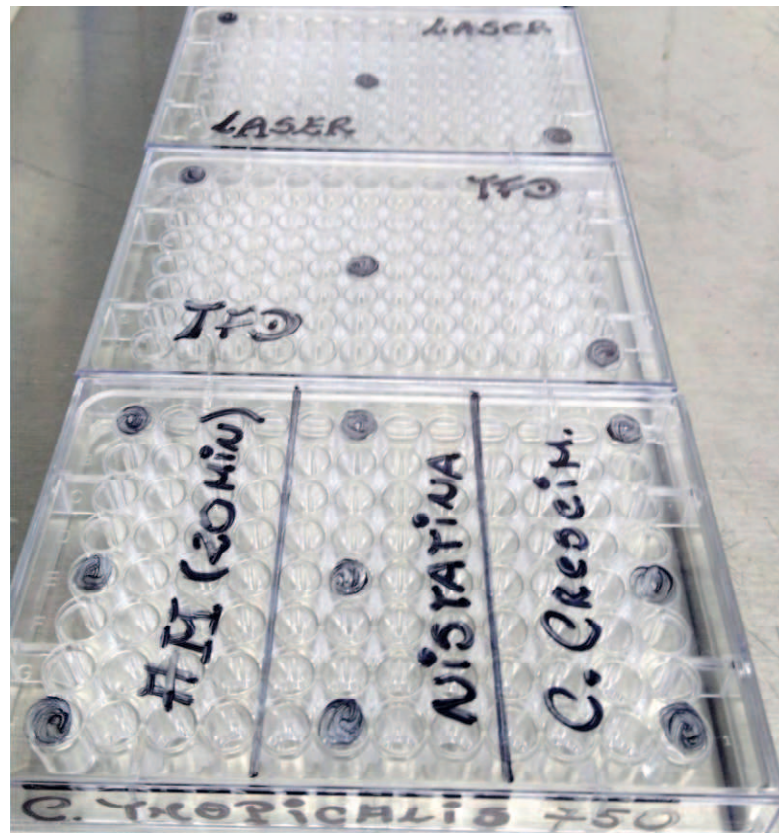


Figura 3. Divisão de microplacas conforme os grupos experimentais e controles estabelecidos (*C. tropicalis* 750).

Os testes foram realizados em triplicata para cada grupo estabelecido, de modo que, a distância entre os poços que receberam irradiação laser foi, aproximadamente, 7,0 cm. O objetivo desse espaçamento foi respeitar os limites visíveis da irradiação e impedir que a aplicação do laser em um grupo influenciasse o adjacente (Figura 4).

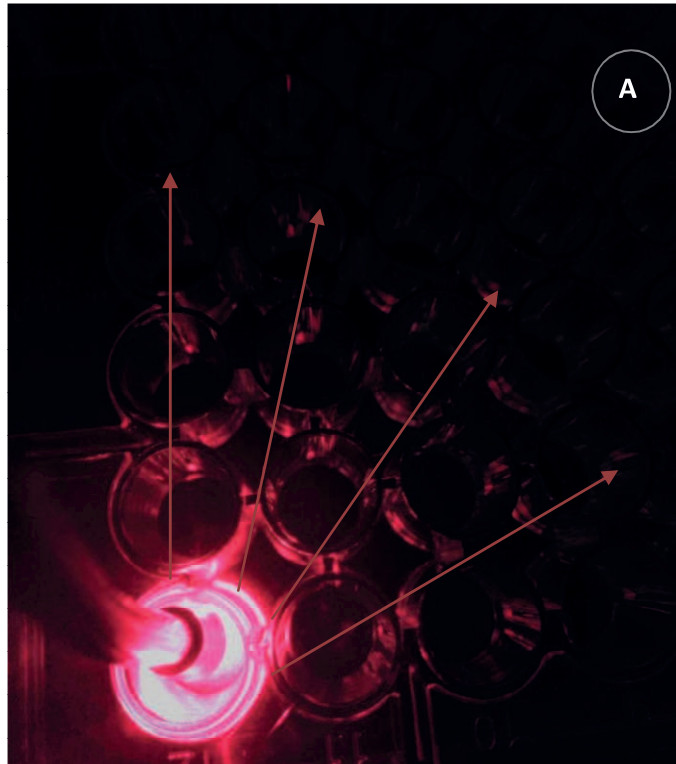


Figura 4. Limites visíveis da irradiação aplicada no primeiro poço da triplicata, preservando o poço adjacente (A) de sobreposição energética.

O Azul de Metileno, como corante aplicado para a sensibilização de *Candida* spp, foi utilizado na concentração de 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os grupos, submetidos ao fotossensibilizador, receberam 100 μ L de volume da substância diluída a 0,01%, inseridos em cada poço da triplicata em ambiente escuro, perdurando por todo o tempo de pré-irradiação (HOSSEINI et al, 2016).

A Nistatina utilizada como controle positivo, possui concentração equivalente a 0,5 mg/mL, sendo aplicado 100 μ L por poço (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a inserção do medicamento, sobre os inóculos dos experimentos, esperou-se o período de 24 horas, incubando-os a 37°C, pra dar continuidade aos respectivos testes, de modo que o período necessário para a Nistatina atingir seu efeito máximo fosse respeitado. No Grupo 5, foi analisada a esterilidade e a capacidade de crescimento do meio de cultura, por meio do controle de crescimento (CC).

3.7 Atividade Antibiofilme

Para os ensaios de Avaliação do Biofilme e Viabilidade Celular, inicialmente, foi realizada a formação de biofilmes fúngicos, de modo que fosse possível a análise da capacidade de redução da microbiota, em biofilmes, pelas terapias aplicadas. A técnica empregada para essa finalidade constituiu na formação de biofilmes maduros em fundo de poços chatos e lisos de microplacas, sem a necessidade de adesão a estruturas resinosas.

Na concentração anteriormente citada, foram introduzidos 100 μ L do inóculo, de cada um dos micro-organismos, em poços de microplacas distintas. Após a aplicação em triplicata, esses compartimentos foram incubados por 48 horas à temperatura de 37° C, sendo assim, o biofilme maduro plenamente constituído, bem como descartada qualquer formação inferior a este padrão (Figura 5).

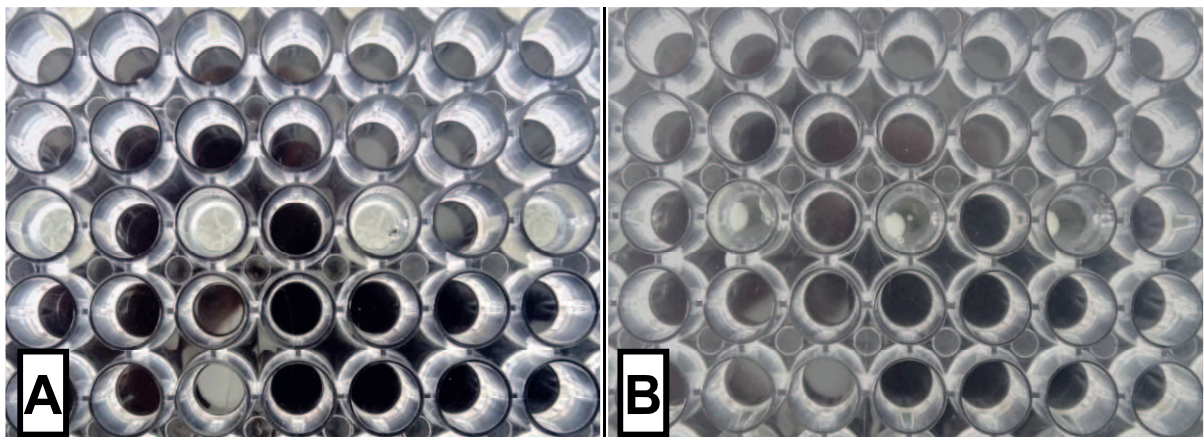


Figura 5. Biofilme maduro de *Candida* sp formado, visivelmente, no fundo de poços da microplaca (A). Biofilme parcialmente formado e descartado dos experimentos (B).

Após esse processo, todos os poços das triplicatas foram lavados cuidadosamente com 100 μ L de solução salina a 0,9%, com a finalidade de remover as células sobrenadantes, não aderidas ao biofilme. Sequencialmente, os tratamentos foram aplicados de acordo com cada grupo pré-estabelecido, sendo depois o biofilme removido por raspagem e aspiração e, então, diluídos em 200 μ L de solução salina a 0,9%.

3.7.1 Avaliação do Biofilme

O volume coletado da suspensão do biofilme foi submetido à microdiluições seriadas em dez vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}). Nesse processo, 180 μ L de solução salina a 0,9% foram adicionados a dez poços de uma microplaca estéril extra e, assim, 20 μ L provenientes do biofilme tratado/controle foram inseridos no primeiro desses poços. Assim, de modo sucessivo, a microdiluição ocorreu até atingir o décimo poço, estando nesse último diluído em dez vezes (Figura 6).

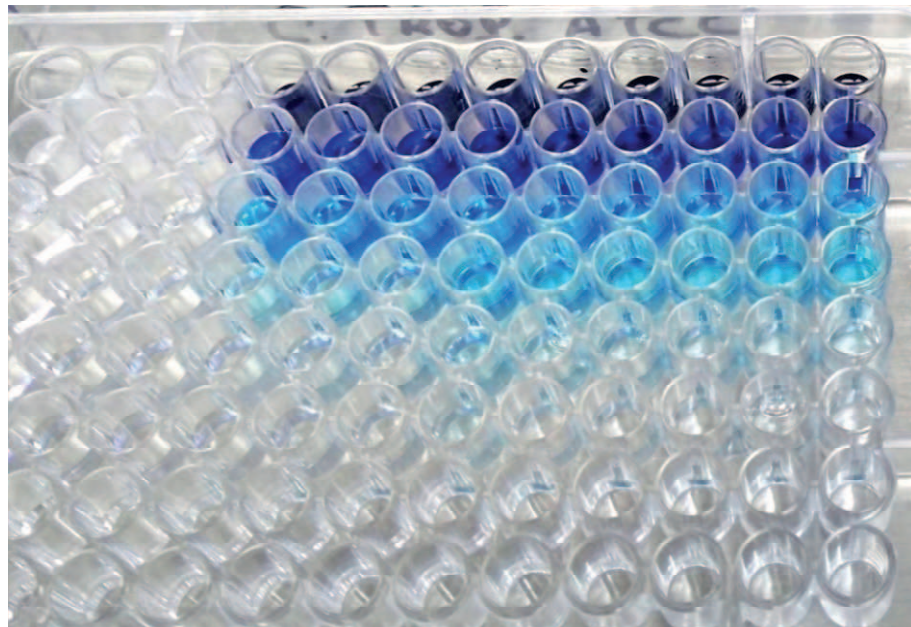


Figura 6. Microdiluições seriadas em 10 vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) dos grupos 01, 02 e 03.

Uma alíquota de 30 μ L das últimas cinco diluições (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) foi inserida em placas de petri, com meio de ASD (Difco Laboratories Ltda, Bordeaux, France) (Figura 7). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e, após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas, com resultados expressos em UFC/mL (FREITAS-FERNANDES et al, 2014).

3.7.2 Viabilidade Celular (MTT)

A avaliação da atividade metabólica foi quantificada pelo método de MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Após o preparo do inóculo e a aplicação dos tratamentos, o volume da suspensão contendo células do biofilme residual foi adicionado a eppendorfs e inseridos na centrífuga K 14 - 0602 (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). Após serem manipulados a 1500 rpm por cinco minutos (Figura 7A), foi retirado o sobrenadante e adicionado 200 μ L de solução de MTT (0,5 mg/mL) (Figura 7B).

A suspensão então foi incubada por três horas a 37°C e, após esse período, foi retirado novamente o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de Dimetil Sulfóxido (Neon Comercial, Suzano, SP, Brasil) e novamente incubados a 37°C durante 15 minutos (Figura 7C). Os cristais de formazan gerados pela redução do MTT metabolizado pelas mitocôndrias das células vivas, indicando assim a presença de metabolismo, foram então determinados por absorbância, a 570 nm, no leitor automático de microplacas de cultura *EZ Read 400 Microplate Reader* (Biochrom, Holliston, MA, EUA) (OLIVEIRA et al, 2014).

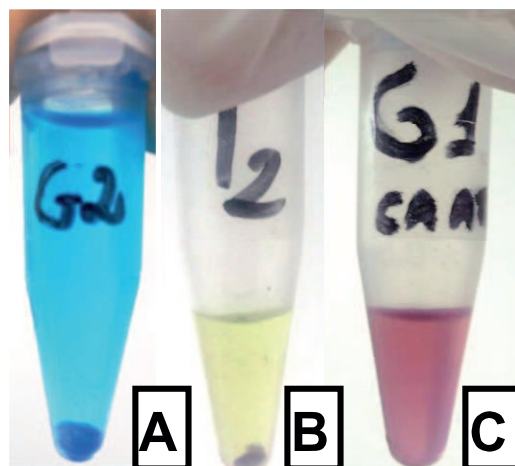


Figura 7. Células fúngicas decantadas após a centrifugação (A) e adição de MTT após remoção do sobrenadante (B). Suspensão fúngica após a adição de Dimetil Sulfóxido (C).

3.8 Análise da Morfologia Celular

3.8.1 Adesão a Substratos Abióticos

Um volume de 300 μL da suspensão fúngica, retirado do inóculo padronizado para o teste (1×10^6 UFC/mL) e tratado segundo os critérios de cada grupo, foi dispensado em câmara de Uttermohl e incubado por duas horas a 37° C (Estufa Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Logo após, o sobrenadante foi removido, permanecendo apenas o material depositado no fundo da câmara. Acrescentou-se 100 mL de solução salina (NaCl) a 0,9% para não ressecar as células fúngicas, prosseguindo com a leitura em Microscópio Óptico Invertido (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) que expressou as características das células fúngicas aderidas. Em paralelo, essas células foram individualmente analisadas para verificar a possibilidade de indução de transição morfológica.

3.8.2 Presença de Quitina na Parede Celular

Após a reativação dos micro-organismos e preparo do inóculo, nos mesmos termos da suspensão produzida para o teste de adesão a substratos abióticos, os tratamentos foram realizados de acordo com cada grupo específico.

Em seguida, o volume de 150 μL de cada triplicata foi removido para centrifugação (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) durante 15 minutos e velocidade de 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e, em seguida, adicionou-se 50 μL de solução *Calcofluor White* (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para detectar a presença e proporção visível de quitina nos micro-organismos, indicando assim, o estado de integridade da parede celular após os tratamentos aplicados. As amostras foram incubadas durante cinco minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foram inseridos 10 μL da suspensão em lâminas de vidro para serem visualizadas sob campo brilhante e UV/DAP, usando o Microscópio Óptico de Fluorescência (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) com auxílio do Software ZEN Lite 2012 (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) (LAFHEY; BUTLER, 2005).

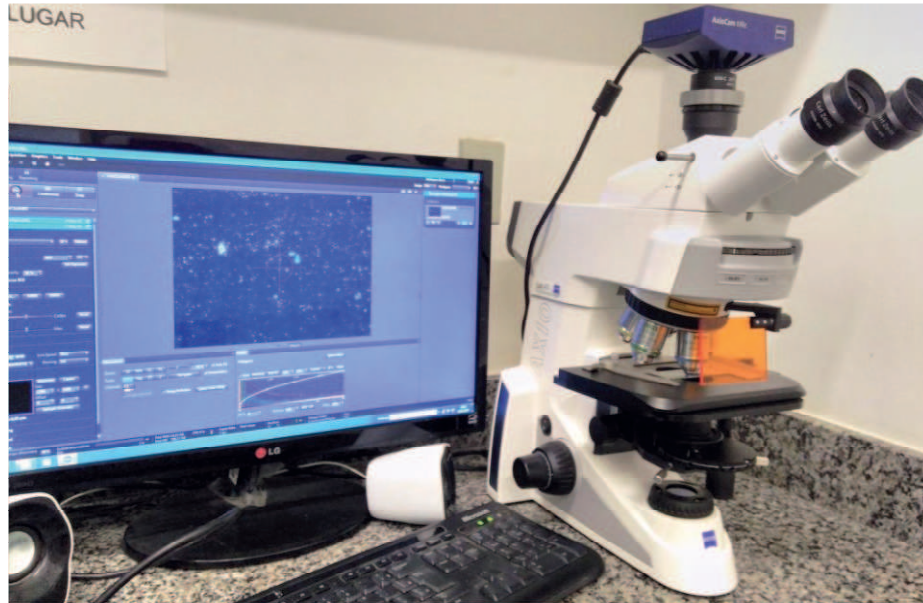


Figura 8. Análise da fluorescência da parede celular de *Candida* sp através do Microscópio Óptico de Fluorescência com auxílio do Software ZEN Lite 2012.

3.9 Análise dos Dados

Os dados referentes à atividade antibiofilme, por meio da contagem de UFC/ml e pela viabilidade celular, foram inseridos em uma plataforma do Microsoft Excel e analisados no Software Estatístico BioEst (versão 5.3). Previamente, foi realizada a transformação logarítmica dos dados, seguida pela comparação de mais de dois grupos com o teste ANOVA-one way e, nas comparações múltiplas dois a dois (teste pós-hoc) com o teste de Tukey. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

4 ARTIGO

4.1 Apresentação

O projeto da presente pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Como resultado da execução deste projeto, um artigo é apresentado nessa dissertação sob título “Avaliação *in vitro* dos fatores de patogenicidade de *Candida* spp antes e após a terapia fotodinâmica”.

Após as devidas considerações da banca avaliadora sobre essa dissertação, o referido artigo será submetido ao periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (ISSN: 1572-1000; Fator de Impacto: 2.412; Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no Anexo B.

4.2 Artigo a Ser Submetido

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida* spp SOB A AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Isabella Jardelino Dias^a

^a Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Autor Correspondente:

Isabella Jardelino Dias.

Universidade Estadual da Paraíba. Rua das Baraúnas, 351. Bairro Universitário. Campina Grande, Paraíba, Brasil. CEP: 58429-500. Telefone: +5583999479708

E-mail: isbellajardelino@yahoo.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo analisar, *in vitro*, o efeito da Terapia Fotodinâmica, com uso de azul de metileno como fotossensibilizador, sobre os principais fatores de patogenicidade de *Candida* spp. O mesmo consistiu em um ensaio experimental com observação direta sobre a atividade antibiofilme, expressa em UFC/mL e pela viabilidade celular, além da análise morfológica, por meio do teste de adesão a substratos abióticos e avaliação da presença de quitina na parede celular. A partir da suspensão de *Candida albicans* e *tropicalis*, cepas clínicas e padronizadas, foram preparados biofilmes maduros. A fonte de luz utilizada foi o laser InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm e dose total de 178,5 J/cm². Os seguintes grupos foram estabelecidos no estudo: (1) irradiado com laser; (2) na presença de azul de metileno por 20 minutos; (3) Terapia Fotodinâmica com pré-irradiação de 20 minutos; (4) controle positivo (Nistatina); (5) controle de crescimento. A atividade antibiofilme foi analisada pelo teste ANOVA-one way e teste de Tukey com nível de significância de 5%. A eficácia da Terapia Fotodinâmica foi expressa como um dos valores mais baixos obtidos em UFC/mL ($p < 0,05$), bem como pela ruptura do ciclo reprodutivo das leveduras, redução do número e volume celular fúngico, indução de transição morfológica, rompimento da integridade celular e comprometimento do ciclo regenerativo dos fungos. Portanto, conclui-se que a efetividade exibida pela Terapia Fotodinâmica, nos fatores de patogenicidade de *Candida*, ratifica conceitos clínicos consolidados, sendo assim, elucidados os mecanismos específicos que o tratamento dispõe para tal finalidade.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; *Candida*; Azul de metileno; Patogenicidade.

1. Introdução

Os micro-organismos *Candida* são os agentes patogênicos mais comuns em humanos e responsáveis por diversas infecções que repercutem de maneira local e sistêmica, proporcionando risco à vida [1-3]. Desde a década de 70, o quantitativo de indivíduos apresentando doenças relacionadas às espécies *Candida* tem expandido de modo constante. Esse aumento global possui relação intrínseca com o maior número de hospedeiros susceptíveis, bem como pela atenção médica em identificar a microbiota fúngica [4].

O gênero *Candida* origina-se da divisão taxonômica dos ascomicetos, caracterizada como uma microbiota branca asporogênica, podendo apresentar-se na forma de blastoconídios, pseudo-hifas e hifas [4]. Diversas espécies são comumente adquiridas por humanos durante o nascimento, sendo a via materna seu principal meio de transmissão. Por não possuírem um reservatório ambiental específico, esses micro-organismos podem ser amplamente difundidos no corpo humano devido à sua capacidade de alojamento, concentrando-se principalmente na mucosa oral, trato digestivo e vulvovaginal [5].

Sabe-se que o envolvimento de cada espécie *Candida* diverge conforme o tipo e local de infecção. Na cavidade oral, mais de 40 espécies estão presentes, sendo a candidose oral um resultado da somatização de todas essas espécies, *albicans* e não *albicans* [6].

Os micro-organismos *Candida albicans* são facilmente encontrados em todos os quadros patológicos orais, representando 60,8% dos fungos dessa localidade [7]. No entanto, são as espécies não *albicans* que apresentam o maior potencial patogênico, destacando-se a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Diversos estudos laboratoriais exemplificam a predominância dessas espécies em diagnósticos críticos de candidose oral, geralmente, designando a presença de uma microbiota fúngica mais resistente [5].

Em um contexto atual, o estudo etiológico de uma doença não se apropria de um conceito simplista. A percepção da multicausalidade que estabelece o processo doença torna a natureza do meio ambiente e da biologia humana, além das propriedades específicas do gênero *Candida*, como determinantes para o estado de saúde do indivíduo [5].

Dessa forma, os aspectos etiológicos da candidose que envolvem especificamente a cavidade oral estão, geralmente, relacionados à ocorrência de função deficitária das glândulas salivares e próteses mal adaptadas. No que se refere às causas sistêmicas, estão intrinsecamente associados a prerrogativas imunossupressoras, tais como uso de drogas antineoplásicas; faixa etária relativa a recém-nascidos e idosos; e modificações endócrinas como diabetes mellitus, insuficiência renal e hipertireoidismo. Fatores oriundos de dieta rica em carboidratos e anemia por deficiência de ferro também são citados [8].

No que se atribui às características particulares de *Candida* spp, seus mecanismos patogênicos contribuem de tal modo para o estabelecimento da candidose oral, que simultaneamente influenciam na própria capacidade do fungo em resistir às medidas imunológicas imediatas e tardias do hospedeiro, bem como às terapêuticas adjuntamente empregadas [9,10].

Desse modo, fatores de patogenicidade como a formação de biofilme, aderência às células da mucosa, conversão de leveduras unicelulares em formas filamentosas e ativação do ciclo de recuperação da parede celular, proporcionam ao fungo um alto potencial de promoção de infecções graves em humanos, bem como resistência à ação de medicamentos alopáticos constantemente utilizados na prática médica [11-13].

Esse fato torna impreterível o desenvolvimento de métodos de tratamento inovadores, que busquem a erradicação do fungo sem intensificar sua resistência à própria terapêutica. Essas características apontam, portanto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) como uma modalidade promissora de combate a uma ampla gama de micro-organismos, como *Candida* spp [14].

A TFD consiste no uso de uma luz visível não tóxica absorvida por um fotossensibilizador (FS) específico que reage com o oxigênio presente no meio. As reações do FS com oxigênio podem ser classificadas em tipo I e II: o primeiro se caracteriza pela atuação do FS como um oxidante, formando radicais ou íons radicais como resultado de um átomo de hidrogênio ou transferência de elétrons; o segundo pela produção de oxigênio singleto por transferência energética do FS excitado [15-17].

A finalidade dessa interação é tratar localmente um tecido à medida que destrói ou inativa o processo infeccioso fúngico, sendo determinante nesse processo, a escolha de um FS ideal. O azul de metileno (AM) é um dos FS mais

utilizados em TFD no mundo, recebendo aprovação regulatória em diversas localidades, seja por seu elevado coeficiente de absorção molar, particularmente na luz vermelha e parte do espectro infravermelho, como pelos bons rendimentos de oxigênios reativos [16-18]. O seu uso exige um tempo de pré – irradiação para penetração nos tecidos orgânicos, que nos estudos de Mima et al [19] e Eduardo et al [20] é de três à trinta minutos.

O presente estudo tem como objetivo analisar, *in vitro*, os principais fatores de patogenicidade da *C. albicans* e *C. tropicalis* inativados pela submissão à TFD, com uso de AM como FS, em relação à nistatina como controle. Espera-se que esses resultados possam embasar, mais solidamente, o atual uso da TFD no cotidiano clínico, evidenciando uma efetiva ação contra processos infecciosos e minimizando os danos à saúde dos indivíduos que são submetidos a terapias antifúngicas.

2 Materiais e Métodos

2.1. Delineamento do Estudo

Foi realizado um ensaio laboratorial experimental, *in vitro*, com observação direta sobre o efeito da TFD frente à patogenicidade da *Candida* spp.

2.2. Micro-organismos

Os testes foram realizados em estirpes *Candida albicans* ATCC (10231), *Candida albicans* clínica, *Candida tropicalis* ATCC (750) e *Candida tropicalis* clínica. A identificação dos micro-organismos clínicos foi realizada segundo os critérios estabelecidos por Looder [21], Hoog e Guarro [22], Kurtzmann e Fell [23], bem como de Sidrim e Rocha [24], cujas bases metodológicas se alicerçam na macromorfologia, micromorfologia, provas fisiológicas e bioquímicas.

Em um dos testes de diferenciação das espécies biológicas, foi realizada a semeadura em placas pela inoculação dos micro-organismos em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda, Bordeaux, France). Posteriormente, foi adicionado cloranfenicol (Sigma Chemichal Corporation, St Louis, MO, USA) a concentração 100 µg/mL e, em seguida, os fungos foram incubados a 37°C por 48 h. As colônias crescidas foram isoladas em meio nutritivo de CHROMÁgar *Candida* (Difco Laboratories Ltda, Bordeaux, France) e a classificação das espécies clínicas

foi determinada pela coloração e o morfotipo dessas colônias. Assim, a coloração verde indicou a presença de *C. albicans*, a azul de *C. tropicalis* e a roxa de outras espécies não específicas (*Candida* sp). Os meios de culturas foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, e os cultivos foram incubados a temperatura de 37°C por 48 h.

Outros experimentos também foram realizados com o intuito de confirmar a identificação das espécies clínicas de *Candida*, como prova do tubo germinativo [24,25], microcultivo de leveduras pela filamentação dos fungos em Ágar Fubá com Tween – 80 [21, 24, 26], auxanograma com assimilação de carboidratos e nitrogênio [24] e, por fim, o uso da fermentação de carboidrato [24].

2.3. Preparo dos Inóculos

Os inóculos utilizados na etapa inicial de todos os experimentos da pesquisa foram preparados a partir do crescimento de micro-organismos em ASD (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), incubado a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente diluídos em 5 mL de Caldo Saboraud Dextrose (CSD) (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). A partir disso, a concentração do inóculo foi padronizada por meio da contagem de células na Câmara de Neubauer (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), cuja concentração ideal para os testes de Biofilme e Viabilidade celular apresentou-se entre 1×10^7 e 1×10^8 UFC/mL; enquanto que para o Teste de adesão a substratos abióticos e Presença de Quitina na parede celular foi de 1×10^6 UFC/mL.

2.4. Grupos Experimentais e Controles

A partir da suspensão padronizada de *Candida*, foram realizados ensaios de acordo com os seguintes grupos: Grupo 1 (L+AM-) = irradiado com laser; Grupo 2 (L-AM+) = tratado com AM durante 20 minutos; Grupo 3 (L+AM+) = TFD (irradiado com laser na presença de AM com tempo de pré-irradiação de 20 minutos); Grupo 4 (L-AM-) = tratado com Nistatina (controle positivo); Grupo 5 (L-AM-) = controle de crescimento (CC) (controle negativo).

A fonte de luz usada foi o Laser InGaAlP *Therapy XT* (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda (λ) de 660 nm. O feixe de luz vermelho foi incidido com potência útil de 100

mW em uma área de spot correspondendo a 0,028 cm², resultando em uma dose de 178,5 J/cm² durante cada aplicação. A energia total foi de 5,0 J, com a ponta do spot perpendicular à microplaca, e a altura de 0,5 cm das células fúngicas presentes nos poços. A emissão do laser foi contínua, durante 50s, com modo de operação pontual.

Para os testes de patogenicidade, o laser foi incidido sobre microplacas (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia, SP, Brasil) estéreis de 96 poços, conforme os grupos experimentais e controles pré-estabelecidos. O ensaio de cada classe de micro-organismo foi realizado em microplacas distintas, de modo que os grupos experimentais que receberiam irradiação (Grupos 1 e 3) fossem fisicamente separados entre si, bem como dos grupos que não receberiam carga energética (Grupos 2, 4 e 5). Dessa forma, evitou-se a possibilidade de sobreposição de irradiação entre os grupos submetidos ao laser, como também qualquer absorção mínima pelos demais.

Os testes foram realizados em triplicata para cada grupo estabelecido, de modo que, a distância entre os poços que receberam irradiação laser foi, aproximadamente, 7,0 cm. O objetivo desse espaçamento foi respeitar os limites visíveis da irradiação e impedir que a aplicação do laser em um grupo influenciasse o adjacente (Figura 1).

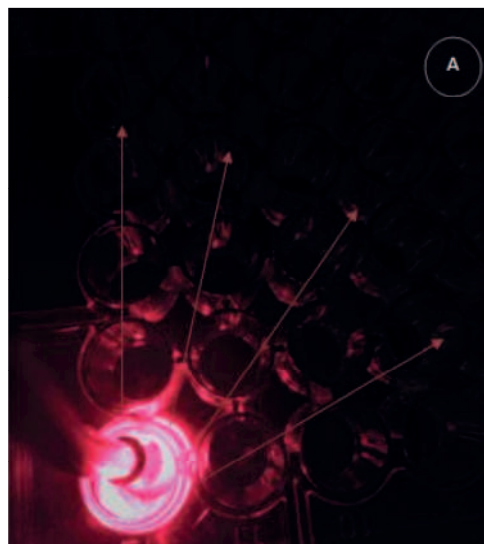


Figura 1. Limites visíveis da irradiação aplicada no primeiro poço da triplicata, preservando o poço adjacente (A) de sobreposição energética.

O AM, como corante aplicado para a sensibilização de *Candida* spp, foi utilizado na concentração de 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os

grupos submetidos ao FS receberam 100 μ L de volume da substância diluída a 0,01%, inseridos em cada poço da triplicata em ambiente escuro, perdurando nessas condições por todo o tempo de pré-irradiação [27].

A Nistatina utilizada como controle positivo, possuiu concentração equivalente a 0,5 mg/mL, sendo aplicado 100 μ L por poço (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a inserção do medicamento, sobre os inóculos nos experimentos, esperou-se o período de 24 horas, incubando-os a 37°C, pra dar continuidade aos respectivos testes, de modo que o período necessário para a Nistatina atingir seu efeito máximo sobre fosse respeitado. No Grupo 5, foi analisada a esterilidade e a capacidade de crescimento do meio de cultura, por meio do CC.

2.5. Atividade antibiofilme

Para os ensaios de Avaliação do Biofilme e Viabilidade Celular, inicialmente, foi realizada a formação de biofilmes fúngicos maduros em fundo de poços chatos e lisos de microplacas, sem a necessidade de adesão a estruturas resinosas.

Na concentração anteriormente citada, foram introduzidos 100 μ L do inóculo, de cada um dos micro-organismos. em poços de microplacas distintas. Após a aplicação em triplicata, esses compartimentos foram incubados por 48 horas à temperatura de 37° C, sendo assim o biofilme maduro plenamente constituído, bem como descartada qualquer formação inferior a este padrão (Figura 2).

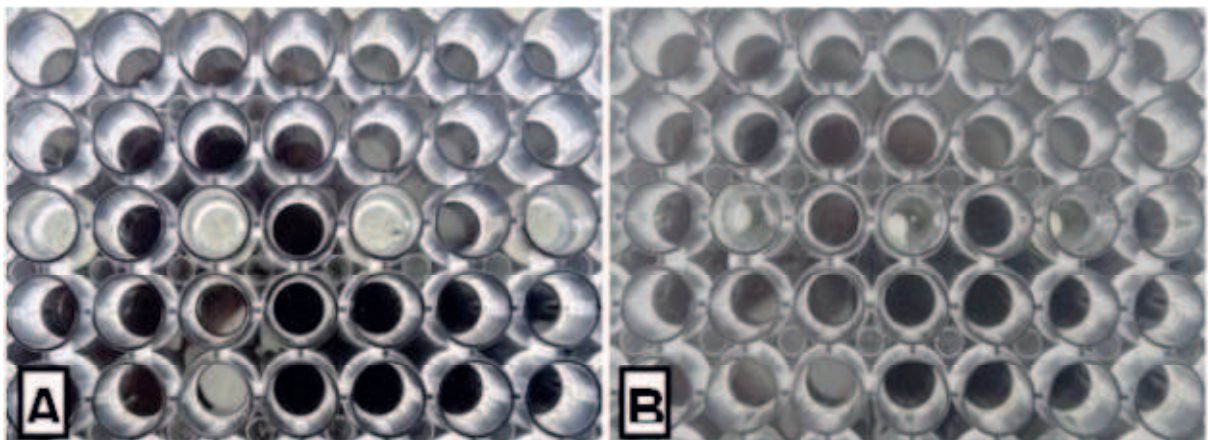


Figura 2. Biofilme maduro de *Candida* sp formado, visivelmente, no fundo de poços da microplaca (A). Biofilme parcialmente formado e descartado dos experimentos (B).

Após esse processo, todos os poços de triplicatas foram lavados cuidadosamente com 100 µL de solução salina a 0,9%, com a finalidade de remover as células sobrenadantes, não aderidas ao biofilme. Sequencialmente, os tratamentos foram aplicados de acordo com os grupos pré-estabelecidos, sendo depois o biofilme removido por raspagem e aspiração sendo, então, diluídos em 200 µL de solução salina a 0,9%.

2.5.1. Avaliação do Biofilme

O volume coletado da suspensão do biofilme foi submetido à microdiluições seriadas em dez vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}). Nesse processo, 180 µL de solução salina a 0,9% foram adicionados a dez poços de uma microplaca estéril extra e, assim, 20 µL provenientes do biofilme tratado/controle foram inseridos no primeiro desses poços. Assim, de modo sucessivo, a microdiluição ocorreu até atingir o décimo poço, estando nesse último diluído em dez vezes.

Uma alíquota de 30 µL das últimas cinco diluições foi inserida em placas de petri, com meio de ASD. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e, após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas, com resultados expressos em UFC/mL [28].

2.5.2. Viabilidade Celular (MTT)

A avaliação da atividade metabólica foi quantificada pelo método de MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Após a preparação do inóculo e a aplicação dos tratamentos, o volume da suspensão contendo células do biofilme residual foi adicionado a eppendorfs e inseridos na centrífuga K 14 - 0602 (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). Após serem manipulados a 1500 rpm por cinco minutos, foi retirado o sobrenadante dos eppendorfs e adicionado 200 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL). A suspensão foi, então, incubada por três horas a 37°C e, após esse período, foi removido novamente o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 200 µL de Dimetil Sulfóxido (Neon Comercial, Suzano, SP, Brasil) e novamente incubados a 37°C durante 15 minutos. A quantidade de formazan gerado pela redução do MTT metabolizado pelas mitocôndrias de células vivas fúngicas, indicando a presença de metabolismo, foi

então determinada por absorvância, a 570 nm, no leitor automático de microplacas de cultura *EZ Read 400 Microplate Reader* (Biochrom, Holliston, MA, EUA) [29].

2.6. Análise da Morfologia Celular

2.6.1. Adesão a Substratos Abióticos

Um volume de 300 μL da suspensão fúngica, retirado de inóculo padronizado para o teste (1×10^6 UFC/mL) e tratado segundo os critérios de cada grupo, foi dispensado em câmara de Uttermohl e incubado por duas horas a 37° C (Estufa Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Logo após, o sobrenadante foi retirado, permanecendo apenas o material depositado no fundo da câmara. Acrescentou-se 100 mL de solução salina (NaCl) a 0,9% para não ressecar as células fúngicas, prosseguindo com a leitura em microscópio invertido (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) que expressou as características das células fúngicas aderidas. Em paralelo, essas células foram individualmente analisadas para verificar a possibilidade de indução de transição morfológica.

2.6.2. Presença de Quitina na Parede Celular

Após a reativação dos micro-organismos e formação do inóculo, nos mesmos termos da suspensão produzida para o teste de adesão a substratos abióticos, os tratamentos foram realizados de acordo com cada grupo específico.

Em seguida, o volume de 150 μL de cada triplicata foi removido para centrifugação (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) durante 15 minutos e velocidade de 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 50 μL de solução *Calcofluor White* (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para detectar a presença e proporção visível de quitina nos micro-organismos, indicando assim, o estado de integridade da parede celular após os tratamentos aplicados. As amostras foram incubadas durante cinco minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foram inseridos 10 μL da suspensão das células coradas em lâminas de vidro e visualizadas sob campo brilhante e UV/DAP, usando o Microscópio Óptico de Fluorescência (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) com auxílio do Software ZEN Lite 2012 (Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) [30]

2.7. Análise Estatística

Os dados referentes à atividade antibiofilme, por meio da contagem de UFC/ml e pela viabilidade celular, foram inseridos em uma plataforma do Microsoft Excel e analisados no Software Estatístico BioEst (versão 5.3). Previamente, foi realizada a transformação logarítmica dos dados, seguida pela comparação de mais de dois grupos com o teste ANOVA-one way e, nas comparações múltiplas dois a dois (teste pós-hoc) com o teste de Tukey. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

3. Resultados

A atividade antibiofilme, expressa pela contagem de UFC/mL, foi determinada pelos resultados obtidos nos grupos experimentais e controles após o cultivo de *C. albicans* ATCC (10231) e *C. tropicalis* ATCC (750), como demonstrado na Figura 3.

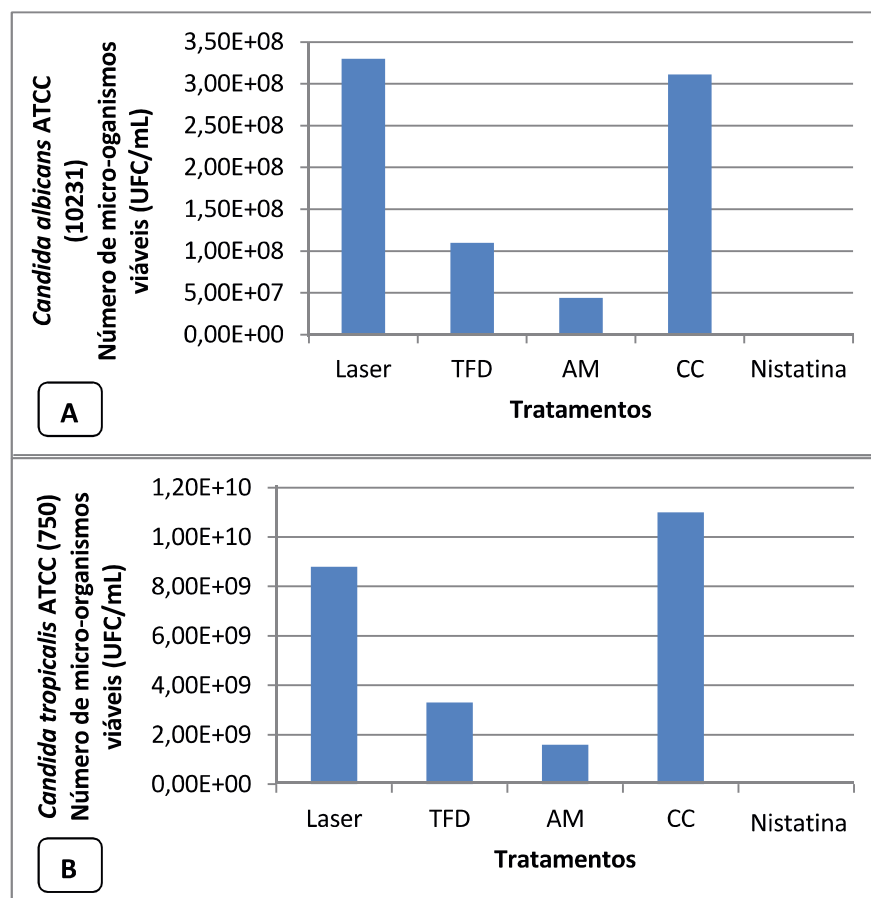


Figura 3. Atividades antimicrobianas dos grupos experimentais e controles, obtidas a partir das soluções de cultivo de *C. albicans* ATCC (10231) (A) e de *C. tropicalis* ATCC (750) (B), expressas em UFC/mL.

No referido teste, foram comparados os resultados das cepas padronizadas (ATCC) de ambas as espécies, representadas na Tabela 1, obtendo diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($p=0,017$ para *C. albicans*; $p=0,034$ para *C. tropicalis*). Em *C. albicans* ATCC (10231), o Grupo 2 apresentou-se como o tratamento, entre os grupos experimentais, com maior redução de UFC/mL em biofilme, não sendo equivalente a nenhum outro. Consecutivamente a essa terapia, o Grupo 3 apresentou os resultados mais efetivos superando aos Grupos 1 e 5, cujos índices não exibiram diferença estatisticamente significativa.

Em *C. tropicalis* ATCC (750), o Grupo 5 exibiu a maior quantidade de UFC/mL em biofilme formado, não havendo valores semelhantes ao mesmo. Por conseguinte, o Grupo 1 obteve o segundo maior índice de UFC/mL, seguido pelos Grupos experimentais 2 e 3. Portanto, esses dois últimos grupos demonstraram os resultados mais efetivos dentre os grupos experimentais, não havendo diferença significativa entre os mesmos.

No que concerne ao Grupo 4, considerado o controle positivo do estudo, apresentou-se com formação nula de UFC/mL e ausência de similaridade com os demais resultados de ambas as espécies.

Tabela 1. Distribuição das médias (UFC/ml) de *C. albicans* ATCC (10231) e *C. tropicalis* ATCC (750).

Grupo	Microrganismo	UFC/ml	p-valor
Laser	<i>C. albicans</i> ATCC	3,30 ($\pm 1,57$) ^{aA}	0,017
Terapia Fotodinâmica	<i>C. albicans</i> ATCC	1,10 ($\pm 1,50$) ^{bA}	
Azul de Metileno	<i>C. albicans</i> ATCC	0,44 ($\pm 2,02$) ^{cA}	
Controle de Crescimento	<i>C. albicans</i> ATCC	3,11 ($\pm 1,43$) ^{aA}	
Nistatina	<i>C. albicans</i> ATCC	0,00 ^{dA}	
Laser	<i>C. tropicalis</i> ATCC	0,88 ($\pm 1,56$) ^{aB}	0,034
Terapia Fotodinâmica	<i>C. tropicalis</i> ATCC	0,33 ($\pm 0,34$) ^{bB}	
Azul de Metileno	<i>C. tropicalis</i> ATCC	0,16 ($\pm 1,21$) ^{bA}	
Controle de Crescimento	<i>C. tropicalis</i> ATCC	1,10 ($\pm 2,62$) ^{cB}	
Nistatina	<i>C. tropicalis</i> ATCC	0,00 ^{dA}	

Minúsculas: relação de significância entre grupos de uma mesma espécie;

Maiúsculas: relação de significância entre grupos de espécies diferentes.

Por meio do experimento de viabilidade celular, o metabolismo fúngico foi avaliado de acordo com os resultados obtidos por *C. albicans* ATCC (10231), cepas clínicas de *C. albicans* e cepas clínicas de *C. tropicalis* (Figura 4). Observa-se que os grupos contendo AM (Grupos 2 e 3) foram excluídos do ensaio, devido às semelhanças de tonalidade entre o FS e os cristais de formazan, possivelmente gerados pela adição do MTT.

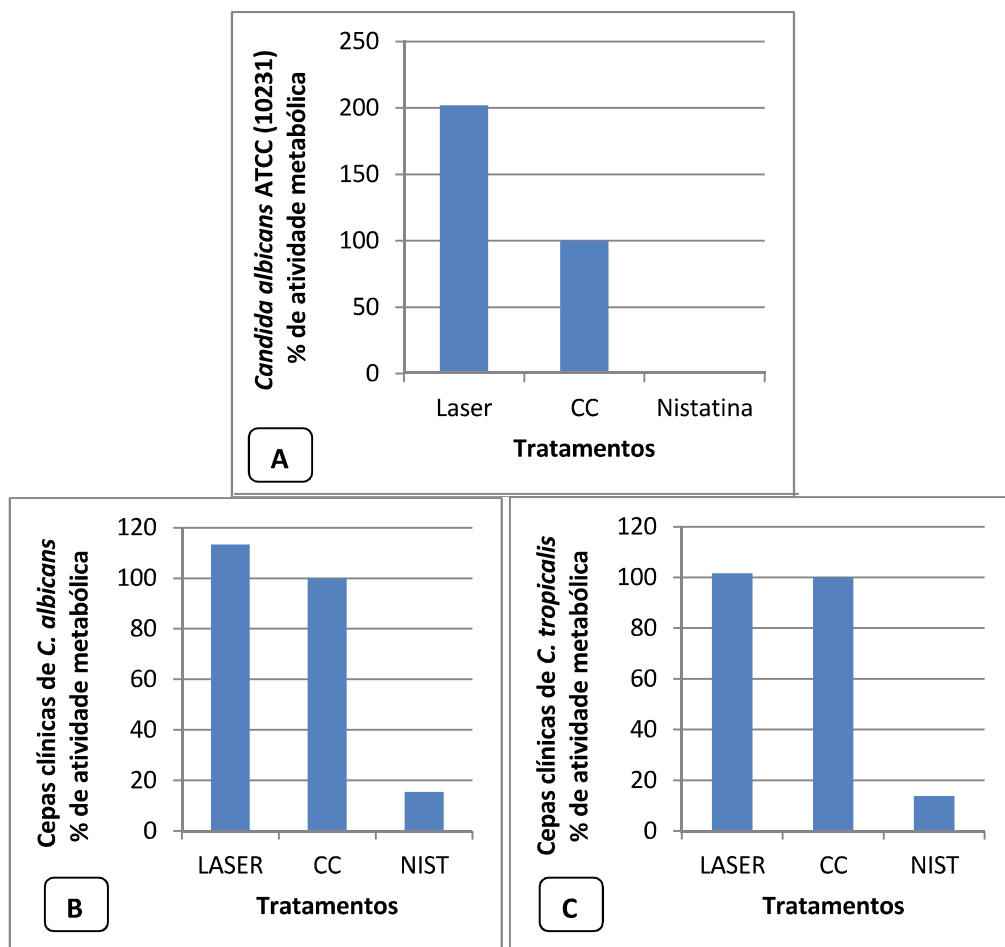


Figura 4. Atividades metabólicas de *C. albicans* ATCC (10231) (A), cepas clínicas de *C. albicans* (B) e cepas clínicas de *C. tropicalis* (C), referentes ao CC e aos tratamentos com Laser e Nistatina, expressas em porcentagem.

Segundo a análise estatística do teste de viabilidade celular (Tabela 2), as estirpes *C. albicans* ATCC (10231) exibiram metabolismo celular mais acentuado no Grupo 1 do que no Grupo 5, apresentando diferença estatisticamente significativa. Em cepas clínicas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, a divergência entre os valores de viabilidade celular dos Grupos 1 e 5 não apresentaram relevância estatística. Nota-se que, no controle positivo (Grupo 4) houve metabolismo nulo em todas as espécies

estudas, já que nas estirpes clínicas o percentual indicado não apresentou significância.

Tabela 2. Distribuição das médias de metabolismo de *C. albicans* ATCC e *C. tropicalis* ATCC.

Grupo	Microrganismo	Metabolismo	p-valor
Laser	<i>C. albicans</i> Cepas Clínicas	0,651 ($\pm 0,10$) ^{aA}	0,018
Controle de Crescimento	<i>C. albicans</i> Cepas Clínicas	0,574 ($\pm 0,16$) ^{aA}	
Nistatina	<i>C. albicans</i> Cepas Clínicas	0,089 ($\pm 0,01$) ^{bA}	
Laser	<i>C. tropicalis</i> Cepas Clínicas	0,250 ($\pm 0,11$) ^{aB}	0,015
Controle de Crescimento	<i>C. tropicalis</i> Cepas Clínicas	0,246 ($\pm 0,23$) ^{aB}	
Nistatina	<i>C. tropicalis</i> Cepas Clínicas	0,034 ($\pm 0,01$) ^{bA}	
Laser	<i>C. albicans</i> ATCC	1,190 ($\pm 0,34$) ^{aC}	0,004
Controle de Crescimento	<i>C. albicans</i> ATCC	0,590 ($\pm 0,18$) ^{bA}	
Nistatina	<i>C. albicans</i> ATCC	0,000 ^{ca}	

Minúsculas: relação de significância entre grupos de uma mesma espécie;
Maiúsculas: relação de significância entre grupos de espécies diferentes.

Por meio do teste de adesão a substratos abióticos, *C. albicans* ATCC (10231), cepas clínicas de *C. albicans*, *C. tropicalis* ATCC (750) e cepas clínicas de *C. tropicalis*, foram avaliadas quanto aos aspectos morfológicos, quantitativos, pela possibilidade de transição morfológica, perda de integridade celular e presença de brotos/tubos germinativos. Em *C. albicans* ATCC (10231) observou-se, no Grupo 5 (Figura 5a), a maior quantidade de micro-organismos dos subgrupos da espécie, apresentando-se na forma de blastoconídios e pseudo-hifas, com volume celular robusto e presença de botões germinativos.

Essas características demonstraram-se atenuadas pela aplicação dos tratamentos, no qual o Grupo 1 (Figura 5b) apresentou evidente diminuição do número micro-organismos, de brotos germinativos e de volume celular fúngico, seguido pelo Grupo 2 (Figura 5c) e atingindo seu ápice no Grupo 3 (Figura 5d). Nesses aspectos, apenas o Grupo 4 (Figura 5e) superou os resultados estabelecidos pelo Grupo 3 (Figura 5d).

A indução de transição morfológica em *C. albicans* ATCC (10231) foi detectada apenas no Grupo 2 (Figura 5c), ocorrendo de modo inverso, com o aparecimento de tubos germinativos e, conseqüentemente, de hifas. No que

concerne à perda de integridade, caracterizada pelo escurecimento das paredes celulares e translucidez citoplasmática, somente no Grupo 3 (Figura 5d) essa propriedade demonstrou-se perceptível, dentre todos os grupos da espécie padronizada.

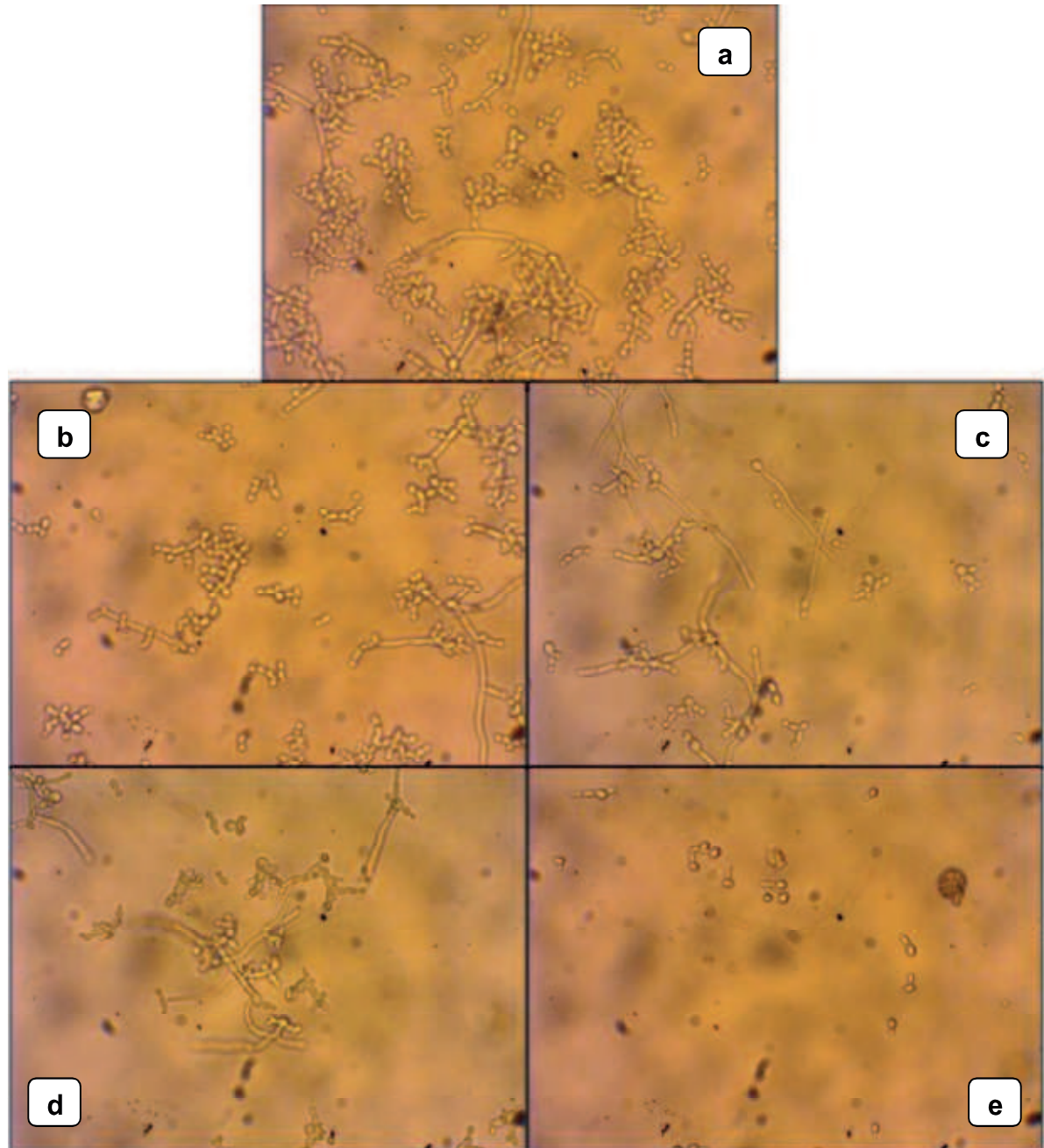


Figura 5. Microfotografia de *C. albicans* ATCC (10231) realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

As cepas clínicas de *Candida albicans* apresentaram-se, no Grupo 5 (Figura 6a), como blastoconídeos numericamente abundantes, de volume celular robusto e com presença de brotos germinativos. Pelas terapias aplicadas, nos

Grupos 1 (Figura 6b), 2 (Figura 6c) e 3 (Figura 6d), observou-se um decréscimo similar nos aspectos celulares anteriormente citados, bem como ruptura da integridade celular. Embora o Grupo 5 (Figura 6e) não tenha apresentado o nítido escurecimento das paredes celulares e translucidez citoplasmática, o mesmo obteve a maior redução de microbiota fúngica dentre os grupos.

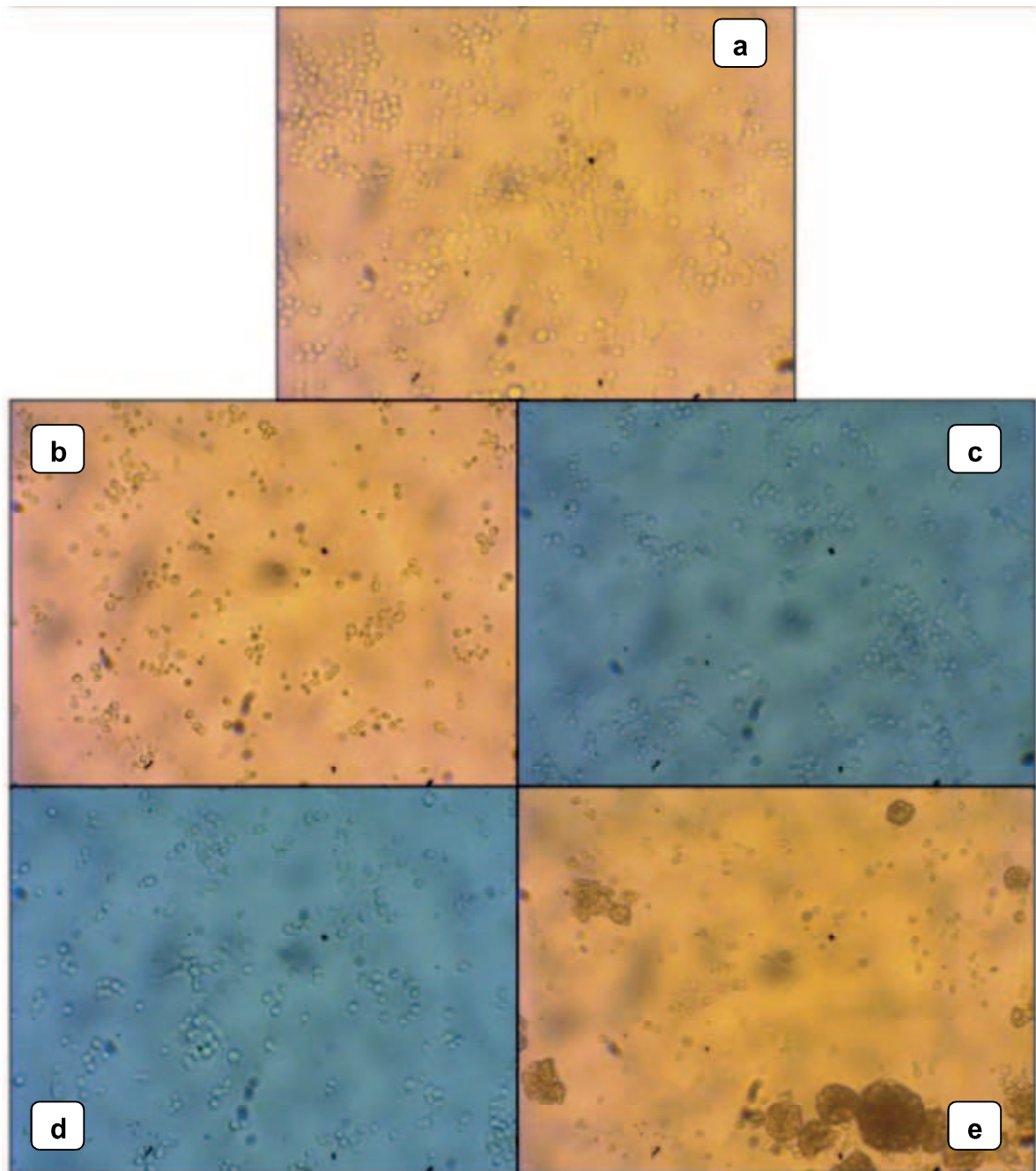


Figura 6. Microfotografia de cepas clínicas de *C. albicans* realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

O teste de adesão a substratos abióticos aplicado a *C. tropicalis* ATCC (750) apresentou, no Grupo 5 (Figura 7a), uma elevada quantidade de micro-

organismos, predominantemente na forma de hifas septadas. Com a aplicação dos tratamentos, o número de células fúngicas reduziu, progressivamente, entre os Grupos 1 (Figura 7b) e 2 (Figura 7c), com a menor proporção exibida pelo Grupo 3, dentre os grupos experimentais. A transição morfológica foi induzida por meio das terapias dos Grupos 2, 3 e 4, ratificada pela presença apenas de pseudo-hifas em sua estrutura. Nessa espécie, a perda de integridade celular foi perceptível nos Grupos 2 e 3, exibindo enegrecimento da parede celular, em maior intensidade, no último grupo. Embora esses resultados não tenham sido equivalentes no Grupo 4, este foi o tratamento com a mais acentuada escassez de microbiota do estudo.

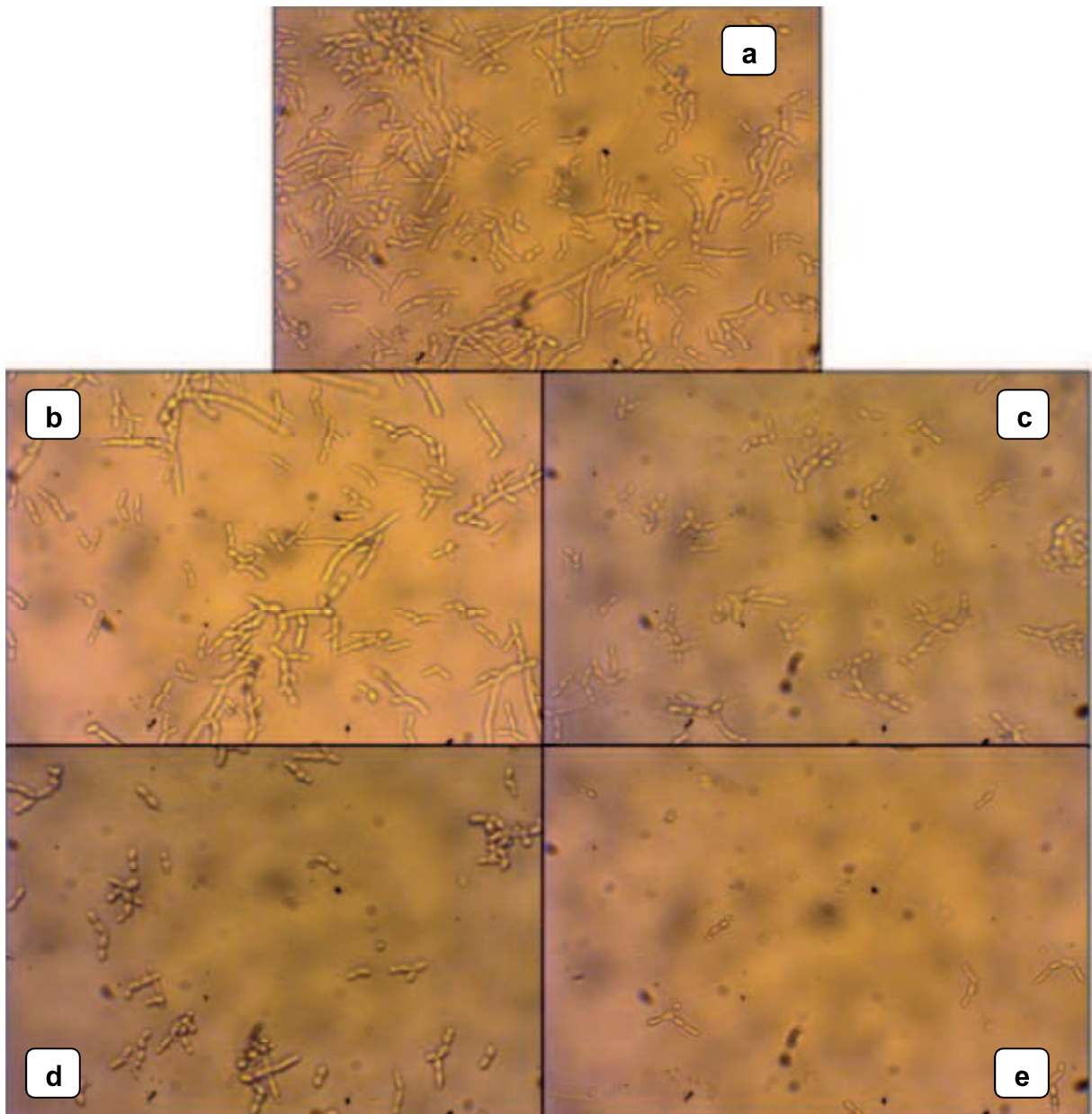


Figura 7. Microfotografia de *C. tropicalis* ATCC (750) realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e)

As cepas clínicas de *C. tropicalis* apresentaram-se, no Grupo 5 (Figura 8a), como a maior proporção de micro-organismos de todo estudo, sendo representadas, majoritariamente, por hifas não septadas. No Grupo 1 (Figura 8b), um declínio de fungos foi visível, ainda representados por hifas em sua totalidade. A partir do Grupo 2 (Figura 8c), além de obter uma maior redução microbiana, a transição morfológica foi induzida, demonstrada pela presença apenas de blastoconídios e pseudo-hifas. Esses resultados foram potencializados no Grupo 3 (Figura 8d), cujos blastoconídios e pseudo-hifas apresentaram-se mais reduzidos, com danos no volume e na integridade da parede celular. O grupo 4 (Figura 8e) também induziu a transição morfológica e diminuiu o número de fungos.

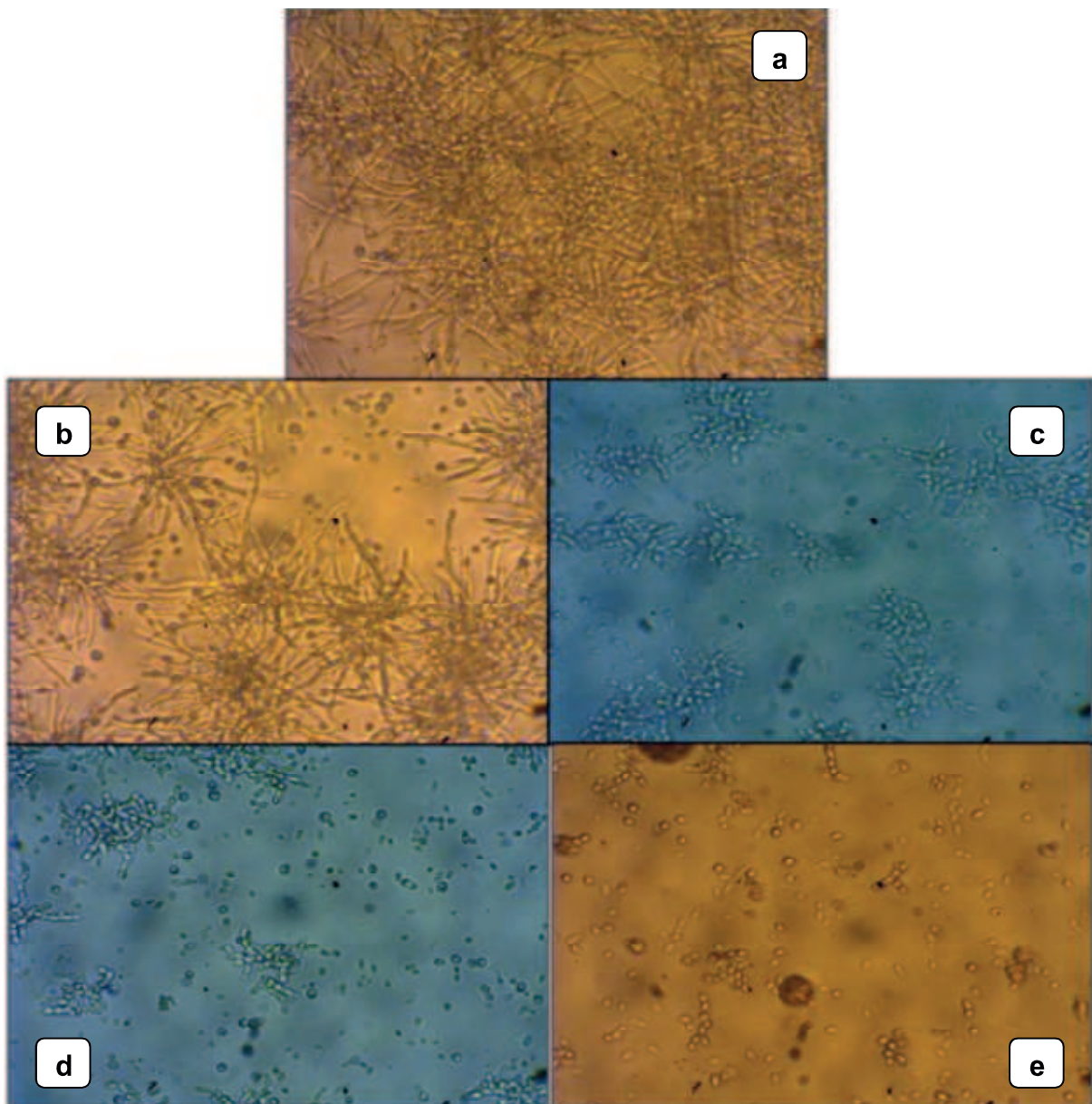


Figura 8. Microfotografia de cepas clínicas de *C. tropicalis* realizadas através de Microscópio óptico invertido (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Por meio do teste de adesão a substratos abióticos, foi analisada a relação entre as proporções de micro-organismos de cada grupo com a resistência apresentada sugestivamente pelos mesmos, após a aplicação dos tratamentos (Quadro 3). Nessa perspectiva, as cepas clínicas de *C. tropicalis* exibiram, em todos os grupos do estudo, a mais elevada quantidade visível de fungos, seguido pelas cepas clínicas de *C. albicans*. Quanto aos micro-organismos padronizados, *C. tropicalis* ATCC (750) exibiu proporções superiores à *C. albicans* ATCC (10231), exceto no Grupo 3, que apresentou-se visualmente similar.

Ressalta-se que, no Grupo 5, a quantidade visível de cepas de clínicas de *C. albicans* foi semelhante a proporção apresentada por *C. tropicalis* ATCC (750) e que, mesmo nessa condição, a estirpe clínica exibiu maior prevalência de micro-organismos que as espécies padronizadas após a aplicação dos tratamentos.

Quadro 3. Relação entre micro-organismos e grupos da amostra.

GRUPO	MICRO-ORGANISMOS
01	<i>C.tropicalis</i> (C.Clín) > <i>C.albicans</i> (C.Clín) > <i>C.tropicalis</i> ATCC > <i>C. albicans</i> ATCC;
02	<i>C.tropicalis</i> (C.Clín) > <i>C.albicans</i> (C.Clín) > <i>C.tropicalis</i> ATCC > <i>C. albicans</i> ATCC;
03	<i>C.tropicalis</i> (C.Clín) > <i>C.albicans</i> (C.Clín) > <i>C.tropicalis</i> ATCC > <i>C. albicans</i> ATCC;
04	<i>C.tropicalis</i> (C.Clín) > <i>C.albicans</i> (C.Clín) > <i>C.tropicalis</i> ATCC = <i>C. albicans</i> ATCC;
05	<i>C.tropicalis</i> (C.Clín) > <i>C.albicans</i> (C.Clín) = <i>C.tropicalis</i> ATCC > <i>C. albicans</i> ATCC;

O ensaio com Microscopia de Fluorescência examinou a presença de quitina na parede celular das estirpes, padronizadas e clínicas, de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Segundo essa análise, os grupos que apresentaram menor fluorescência correspondiam aos tratamentos mais efetivos. Nos micro-organismos *C. albicans* ATCC (10231), especificamente no Grupo 5 (Figura 9a), visualizou-se aglomerações celulares na forma de blastoconídeos e leveduras, com manutenção do arcabouço celular íntegro. Pelo uso das terapias nos Grupos 1 (Figura 9b), 2 (Figura 9c) e 3 (Figura 9d), houve progressiva redução do número de micro-organismos, além de diminuição da quitina na parede celular do fungo. Nesse quesito, o Grupo 3, obteve a menor fluorescência apresentada, inclusive superando os resultados apresentados pelo Grupo 4 (Figura 9e).

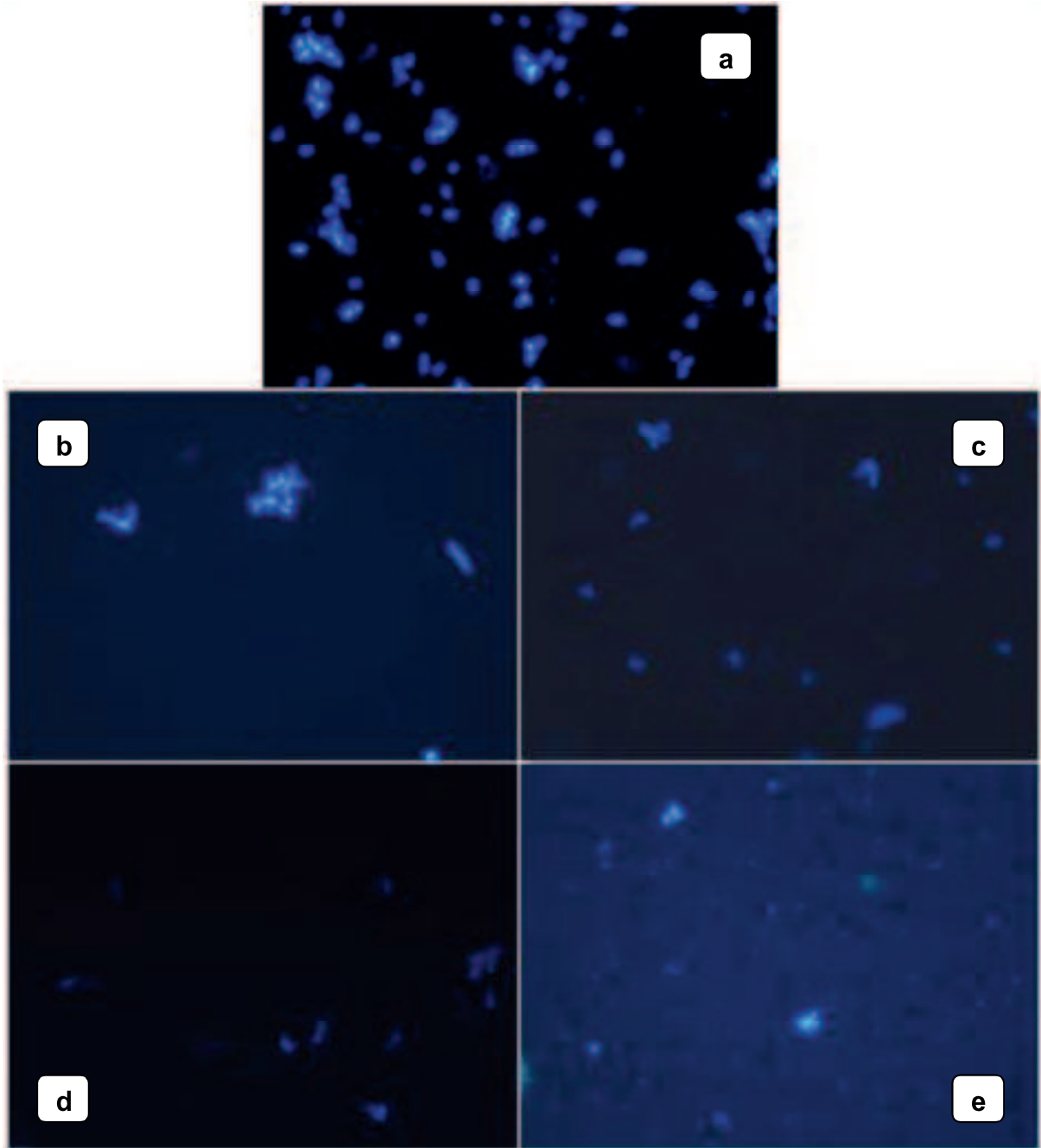


Figura 9. Microfotografia de *C. albicans* ATCC (10231) realizada através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

As cepas clínicas de *C. albicans* apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nas estirpes ATCC (10231). No entanto, o Grupo 5 (Figura 10a) demonstrou intensa fluorescência na parede celular fúngica e uma quantidade superior de blastoconídios e pseudo-hifas, em relação as espécies *albicans* padronizados. Os Grupos 2 (Figura 10c) e 3 (Figura 10 d) apresentaram fluorescências mais tênues, sendo esse resultado destacado no Grupo 3.

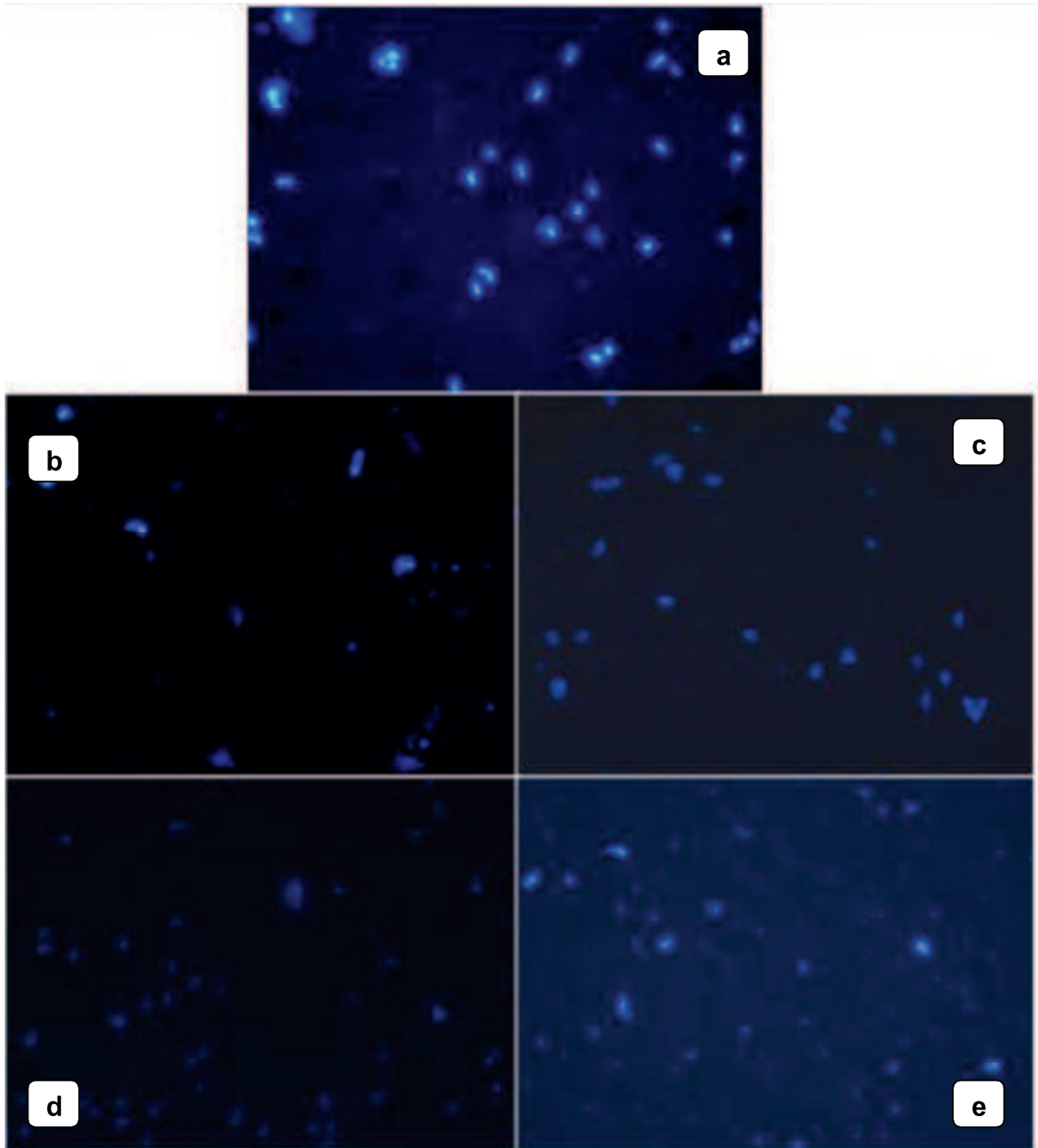


Figura 10. Microfotografia de cepas clínicas de *C. albicans* realizada através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Por sua vez, *C. tropicalis* ATCC (750) exibiu, no Grupo 5 (Figura 11a), elevada fluorescência na parede celular. À medida que os tratamentos dos Grupos 1 (Figura 11b), 2 (Figura 11c), 3 (Figura 11d) e 4 (Figura 11d) foram realizados, houve uma discreta redução no número de micro-organismos, bem como de fluorescência, sendo no Grupo 3, o maior dano ao ciclo de recuperação da parede celular.

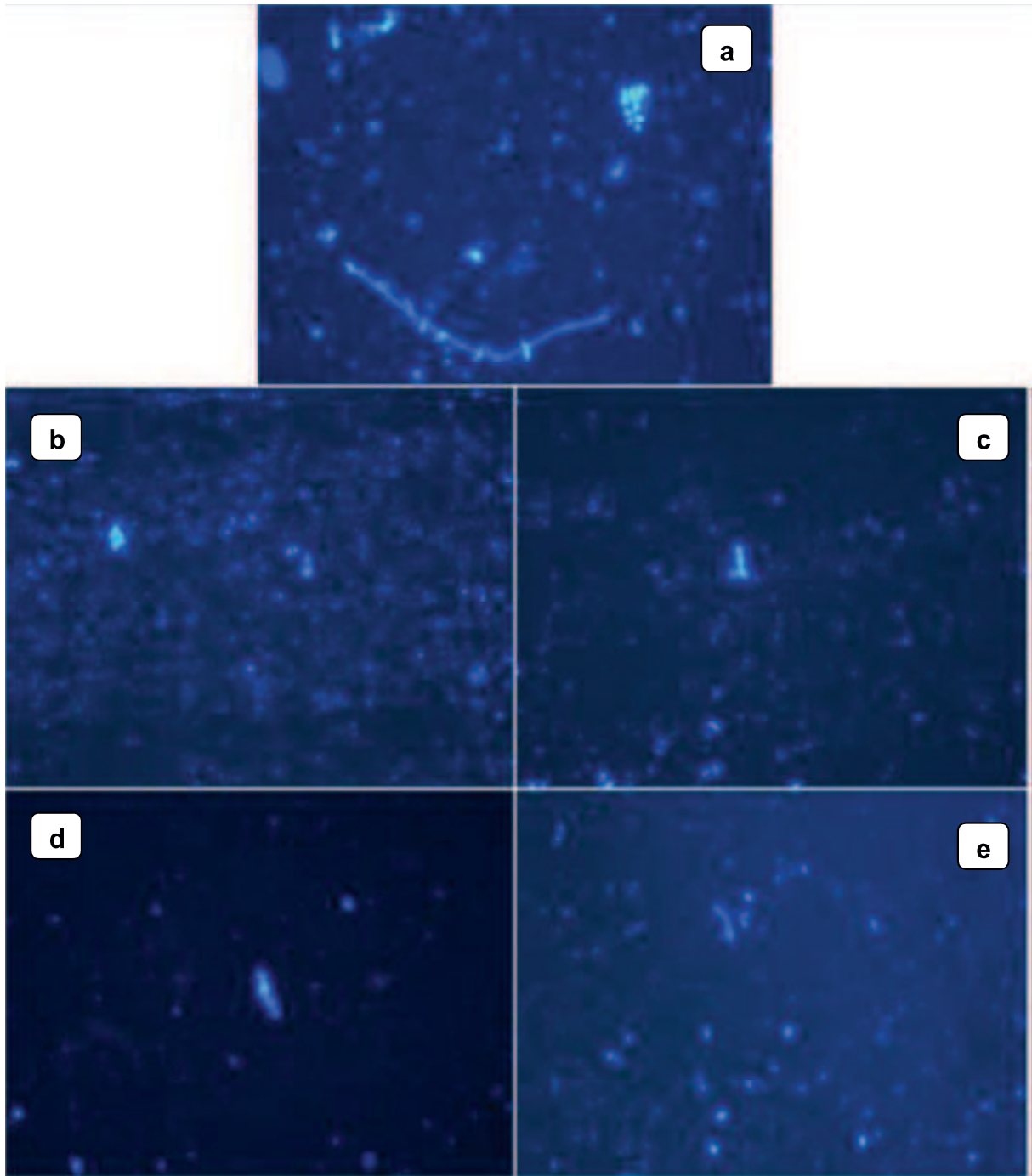


Figura 11. Microfotografia de *C. tropicalis* ATCC (750) realizada através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Pelo uso do Calcofluor White, observou-se no Grupo 5 (Figura 12a) das cepas clínicas de *C. tropicalis*, a maior quantidade de micro-organismos em relação a todos os grupos experimentais e controles da amostra, superando inclusive os aspectos apresentados por *C. tropicalis* ATCC (750). Referindo-se a fluorescência da parede celular, os resultados obtidos pelos Grupos 5 (Figura 12a) e 1 (Figura 12b) foram similares, exibindo intensa coloração. Esse quadro foi modificado,

gradativamente, pelos Grupos 2 (Figura 12c), 3 (Figura 12d) e 4 (Figura 12e), os quais apresentaram escurecimento da parede celular pela perda de quitina, principalmente no Grupo 3.

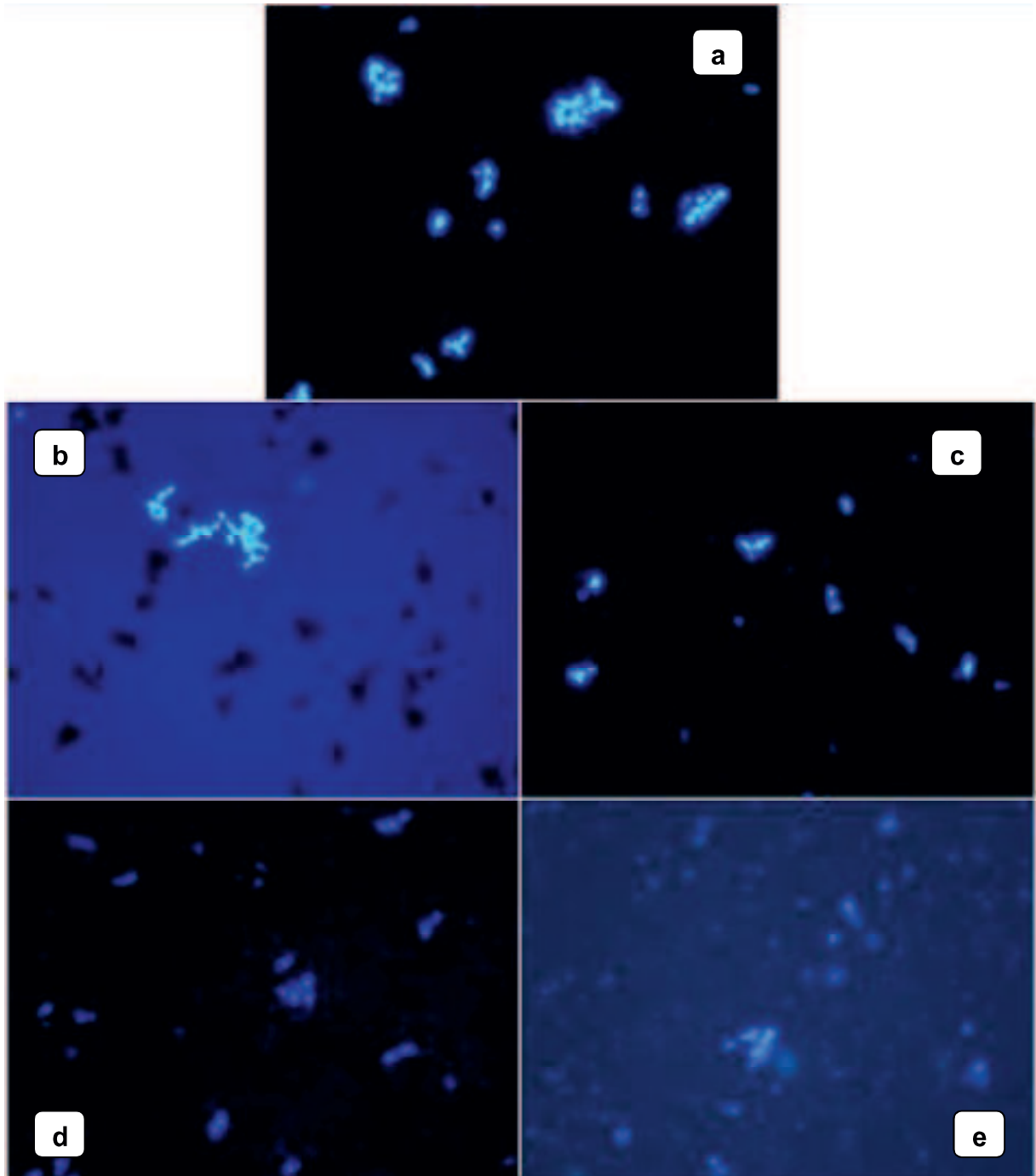


Figura 12. Microfotografia de cepas clínicas de *C. tropicalis*, realizada através de Microscópio óptico de fluorescência (40x). Grupos analisados: CC (a), Laser (b), AM (c), TFD (d) e Nistatina (e).

Ressalta-se que no Grupo 3, *C. tropicalis*, especialmente cepas clínicas, apresentaram menor redução de fluorescência celular que as estirpes *albicans*.

4. Discussão

Baseado na propriedade de adaptar-se facilmente ao hospedeiro humano, *Candida* spp são referidos na literatura por sua propriedade dimórfica, por vezes manifestando-se como um comensal inofensivo, outras como um patógeno oportunista. Essa diversidade de atuação do fungo foi discutida, durante muitas décadas, como um fator estritamente relacionado ao estado imunitário do hospedeiro, sendo esse conceito atualmente ampliado à capacidade de agressão dos micro-organismos por meio dos seus fatores de patogenicidade [3, 5, 18, 31-33].

Em condições cuja microbiota encontra meios para manifestar sua patogenicidade, *Candida* spp tende a associar-se com semelhantes, formando autênticas comunidades sistematizadas, chamadas de biofilme. Essa estrutura apresenta-se como um dos principais mecanismos de patogenicidade do fungo, protegendo-os do sistema imunológico humano e tornando-os tolerantes a altas doses de medicamentos alopáticos convencionais [5, 9, 10, 31, 34, 35]. Dessa maneira, a formação *in vitro* de biofilmes, com a finalidade de avaliar terapêuticas, como a TFD, determina condições patogênicas mais complexas, de modo que a efetividade do tratamento é investigada em condições potentes de organização e resistência fúngica, como as desenvolvidas no presente estudo.

Além disso, em circunstâncias, em que é induzido ao crescimento por um período de 48 horas, o biofilme passa a ser considerado maduro e constituído por redes de microcolônias mais densas. A escolha pela formação desses biofilmes, no presente trabalho, baseou-se em pesquisas recentes sobre TFD e *Candida* spp, como a de Carmello et al [36], Hosseini et al [27] e Suzuki et al [37], que utilizaram biofilmes de 48 horas em seus métodos, buscando promover o reforço das habilidades cooperativas de nutrição, defesa e patogenicidade exibidas, naturalmente, pelo biofilme de 24 horas [32].

Na avaliação do biofilme, pela contagem de UFC/mL, o CC de *C. tropicalis* ATCC (750) apresentou-se superior em duas ordens de grandezas ao controle negativo de *C. albicans* ATCC (10231), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Esses dados corroboram estudos de Asakura et al [38] e Gacser [39], que atribuem a *C. tropicalis* maiores proporções de biofilme que *C. albicans*, sendo o biofilme de ambas, superiores a todas as demais espécies do fungo. Segundo os mesmos autores, esse fato justificaria a alto grau de

patogenicidade que, principalmente, *C. tropicalis* proporciona no hospedeiro humano, exibindo forte adesão às células epiteliais humanas, contraposto a espécies menos danosas e com desenvolvimento limitado de biofilme, como *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

No que se refere aos tratamentos mais eficazes, pela contagem das UFC/mL em biofilme neste estudo, os grupos correspondentes ao AM isolado e TFD, obtiveram os mais baixos índices de micro-organismos de *C. albicans* ATCC (10231) e de *C. tropicalis* ATCC (750). Ao desenvolver uma metodologia similar à encontrada no presente estudo, cujo biofilme maduro foi formado a partir de estirpes *C. albicans* ATCC (10231), com uso de AM como FS e irradiação de 660 nm/80 mW, Sousa et al [40] reduziu as UFC/mL em até duas ordens de grandeza, resultado equivalente ao presente estudo que diminui aproximadamente uma ordem de grandeza, em relação ao CC dessa espécie.

Dessa maneira, a ação supressiva gerada pelas terapias com AM e TFD, supostamente, implicou no rompimento da estabilidade do biofilme maduro, considerado abundante e com elevada habilidade de adesão, nos micro-organismos *C. albicans* e *C. tropicalis* [38,39]. Portanto, compreende-se que, ao inibir o biofilme e reduzir as UFC/mL, os tratamentos aplicados demonstraram aptidão em eliminar a ação colonizadora do fungo. Essa condição relaciona-se intrinsecamente ao comportamento da candidose oral no hospedeiro humano, determinando a extensão do dano e a persistência da infecção, sugerindo que a aplicação dessas terapias poderiam amenizar quadros inflamatórios críticos, mesmo se originados por espécies com elevada carga patogênica como as analisadas no estudo [41, 42].

Salienta-se que os efetivos resultados obtidos pelo AM no referido teste, seja de modo isolado ou pela TFD, justificam sua ampla adesão clínica associada ao laser de baixa intensidade. Essa freqüente escolha dar-se por suas propriedades biologicamente estáveis, baixa toxicidade, boa absorção de luz visível, hidrossolubilidade e por ser facilmente eliminado do organismo [14,18, 43, 44]. O tempo de pré-irradiação indicado para a absorção de energia pelo AM não possui atualmente um protocolo definido, como demonstrado pela diversidade de informações encontradas na literatura, exemplificado pelos trabalhos de Azizi et al [45] e Freire[14], cujo tempo é no mínimo dez minutos, ou de acordo com Mima et al [19] e Eduardo et al [20] que, na ausência de exsudatos ou fluidos é de três minutos e, nas infecções intraorais, é de 30 minutos. No presente estudo, esse tempo foi

estabelecido em 20 minutos devido ao manejo de microbiota fúngica, possivelmente, mais resistente.

O desempenho do laser aplicado de forma isolada não proporcionou inibição das UFC/mL, no teste de biofilme do estudo. Em *C. albicans* ATCC (10231), esse tratamento apresentou valores de UFC/mL estatisticamente similares ao CC, enquanto que em *C. tropicalis* ATCC (750), o CC foi o único grupo a superar os altos índices exibidos pela laserterapia. Cernakova et al [46] ao realizarem um ensaio com duas estirpes padronizadas de *C. albicans*, com aplicação do laser vermelho (660nm), testou em biofilme o efeito do laser sem AM, observando também a ausência de qualquer inibição de micro-organismos.

O teste de viabilidade celular buscou confirmar as propriedades antifúngicas promovidas pelas terapias em biofilme, indicadas anteriormente pela contagem das UFC/mL. Nesse ensaio, a adição do MTT ao inóculo pós-tratado, demonstraria a presença de células metabolicamente viáveis pela formação de cristais formazan, fato que transformaria a coloração originalmente amarela do MTT em um tom azul escuro [38]. Uma das dificuldades encontradas nesse estudo foi a aplicação do MTT aos grupos com AM, seja de modo isolado ou em TFD, devido à coloração azul-arroxeadada do FS. A similaridade entre as tonalidades geradas pelos cristais de formazan e o AM trouxe deficiências na credibilidade dos efeitos demonstrados por esses grupos específicos, determinando uma absorvância com causalidade indefinida e, portanto, culminando na inserção apenas dos resultados obtidos pela laserterapia, Nistatina e CC.

O tratamento apenas com laser em *C. albicans* ATCC (10231), cepas clínicas de *C. albicans* e cepas clínicas de *C. tropicalis*, não surtiu redução na atividade metabólica desses micro-organismos. Ressalta-se que em *C. albicans* ATCC (10231), a porcentagem metabólica apresentada pela aplicação do laser obteve valores mais acentuados que o próprio CC, apresentando diferença significativa entre eles. Esse resultado sugere uma possível proliferação celular estimulada pelo laser, que segundo Ágüida et al [47] é um processo comum em diferentes tipos de células pela aplicação dos lasers de baixa intensidade. Os autores relatam que a oxidação gerada pela laserterapia ativa fenômenos biomoduladores que promovem diversos efeitos, entre eles, a proliferação celular. Portanto, além de não surtir efeito positivo na inibição do metabolismo de *C. albicans* ATCC (10231), o uso isolado do laser estimulou a proliferação da microbiota fúngica.

Os testes de adesão a substrato abióticos realizados, no presente estudo, determinaram a existência de diferenças patogênicas entre *C. albicans* e *C. tropicalis*. A primeira microbiota apresentou-se, no CC, na forma blastoconídios e pseudo-hifas, enquanto que *C. tropicalis* exibiu-se majoritariamente como hifas, manifestando-se em espécies padronizadas (ATCC) como hifas septadas e em cepas clínicas como hifas não septadas (cenocíticas).

No gênero *Candida*, blastoconídios e pseudo-hifas tendem a desempenhar uma menor patogenicidade, sendo mais facilmente eliminados pelos tecidos do hospedeiro, designando assim a ligação inicial da infecção e o estado de disseminação da microbiota fúngica. Enquanto que a forma filamentosa conceituada como hifa, expressa o momento de colonização do fungo, cujo estado de maior patogenicidade caracteriza o aumento da aderência, facilidade de formação do biofilme e de invasão de tecidos humanos [31,48-50]. Compreende-se assim, que cada representação morfológica possui importância no processo de dano da candidose oral, uma vez que são necessárias em fases distintas da infecção [48]. Concebe-se assim, que as espécies *tropicalis* apresentaram maior potencial patogênico que as estirpes *albicans*, consolidado pelos achados morfológicos do referido teste, podendo esses fungos atuar, conjuntamente, no estabelecimento pleno da infecção.

Em ambas as espécies estudadas, seja como estirpes padronizadas ou como cepas clínicas, observou-se no CC a maior quantidade de micro-organismos dentre todos os grupos estudados, destacando a presença de diversos botões germinativos nas espécies *albicans*. Segundo Racusen et al [51] e Basso et al [52], botões germinativos em amostras fúngicas indicam a plena reprodução assexuada das leveduras, ocorrendo a partir de uma única célula mãe que gera, inicialmente, pequenas réplicas. No entanto, a aplicação dos tratamentos com laser, AM e TFD, provocou o rompimento gradativo da reprodução desses micro-organismos, atingindo seu ápice pelo uso da TFD entre os grupos experimentais. Esse dado corrobora com o estudo de Cernakova et al [46], cujo brotamento também foi inibido pela aplicação de TFD com uso do laser vermelho, indicando a capacidade da terapia em romper com o ciclo reprodutivo do fungo, bem como limitar sua propriedade nociva.

A indução de transição morfológica, analisada no mesmo ensaio, relacionou a capacidade dos tratamentos em transformar espécies mais patogênicas

em uma microbiota de menor dano. Esse fenômeno foi visível apenas nas microfotografias dos grupos com AM e TFD, referentes às espécies mais patogênicas do estudo, as estirpes ATCC e clínicas de *C. tropicalis*. No que concerne à *C. albicans*, não se obteve um comportamento similar, exceto pela transição morfológica inversa por meio do uso de AM em microbiota ATCC (10231). Sugere-se que essa modificação anômala, com o predomínio inicial de microorganismos menos patogênicos (leveduras e pseudo-hifas) para o aparecimento posterior de formas mais danosas (hifas), foi desencadeada por uma reação agressiva de autoproteção do fungo, ratificada pelo efeito positivo que a terapia com AM exibiu ao reduzir moderadamente a quantidade de fungos.

Além disso, a transição morfológica inversa em *C. albicans* ATCC (10231), pela aplicação de AM, culminou na formação de tubos germinativos. Segundo Racusen et al [51] e Basso et al [52], essa estrutura é conceituada como critério diferenciador entre hifas verdadeiras e pseudo-hifas, cujas hifas verdadeiras não apresentam constrictões entre a célula-mãe e o filamento, definindo o tubo germinativo como parte integrante de sua constituição. Desse modo, a presença dessas estruturas indicou a participação de uma microbiota com maior potencial patogênico na infecção. Chin et al [4] determinaram que essa troca morfológica de leveduras para hifas verdadeiras contribuem para a formação de biofilmes maduros no processo doença, que segundos os autores, resultam nas formas mais letais de infecção por *Candida*.

Quanto ao mecanismo de rompimento da integridade celular, sinalizado no estudo pelo escurecimento da parede celular e pela translucidez do citoplasma, em todos os grupos experimentais foi perceptível os indicadores de dano ao arcabouço celular, variando apenas a intensidade apresentada. A aplicação do AM proporcionou um moderado impacto na estrutura celular de todas as espécies, havendo resultado similar na laserterapia apenas em estirpes cínicas de *C. albicans*. Nesse aspecto, o uso da TFD apresentou exímio desempenho, atingindo o ápice de deterioração das estruturas celulares dos fungos, dentre os grupos experimentais e controles da amostra.

Ambas as espécies estudadas, exibiram ampla dominância fúngica nos controles de crescimento, em termos quantitativos e de volume celular. De modo geral, a aplicação do laser, AM e TFD, exibiram, respectivamente, uma considerável

e gradativa supressão de micro-organismos, destacando o efeito notório da TFD nesse processo de redução.

Ressalta-se que, embora os tratamentos aplicados tenham exibido o efeito redutor fúngico citado, as cepas clínicas apresentaram-se mais numerosas que as estirpes padronizadas, indicando assim uma possível resistência fúngica. Esse padrão de resistência foi observado até mesmo em cepas clínicas de *C. albicans*, cuja hegemonia morfológica de leveduras, teoricamente, denotaria uma patogenicidade inferior a espécies como *C. tropicalis* ATCC (750), com predomínio morfológico de hifas. Com relação às cepas clínicas de *C. tropicalis*, constatou-se que as mesmas obtiveram a maior proporção de microbiota de todo o estudo e, portanto, a maior resistência aos tratamentos aplicados. Essa conjuntura foi, possivelmente, determinada pela união da forma micelial presente com as propriedades de resistência das cepas clínicas, que, segundo Cernakova et al [50], pode limitar os efeitos da TFD.

Entretanto, nem mesmo essas circunstâncias invalidaram a eficácia dos tratamentos aplicados em cepas clínicas, que embora não tenham apresentado padrões regulares, obtiveram proporções moderadas de redução microbiana e de rompimento com a integridade celular. Desse modo, sugere-se que aplicações sucessivas de TFD são requeridas para que esses resultados apresentem-se mais satisfatórios em linhagens clínicas resistentes, corroborando com protocolos clínicos atuais, como os de Mima et al [54], que indicam até três sessões de TDF para o tratamento de candidose oral.

Portanto, compreende-se assim, que cepas clínicas de *Candida* apresentaram-se com carga fúngica mais elevada que as estirpes padronizadas, indicando assim, a possibilidade de maior resistência dos micro-organismos provenientes de linhagens patógenas em humanos. No entanto, independente da origem fúngica, a espécie *tropicalis* exibiu-se mais resistentes aos tratamentos aplicados, evidenciado pela quantidade de fungos visivelmente mais presente nessa espécie, em relação à microbiota *albicans*, corroborando com os trabalhos de Al-Fattani e Douglas [55] e Wu et al [56].

Todavia, a TFD foi o único tratamento que divergiu parcialmente dos resultados acima citados. Por essa terapêutica, a proporção de micro-organismos demonstrou-se reduzida e equivalente entre as estirpes padronizadas *albicans* e *tropicalis*, sugerindo a capacidade da TFD de sobrepor às resistências fúngicas

manifestadas nos demais tratamentos pelas estirpes *tropicalis*, inclusive com o uso da Nistatina.

Outra propriedade importante no potencial patogênico de *Candida* spp é a capacidade de reparo da parede celular fúngica. Segundo Delgado-Silva [57], a transdução de sinal para catalisar a biossíntese do arcabouço fúngico é desempenhada pela proteína Quinase C (PKC) e pela proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPKs), que promovem respostas reparadoras por meio da modificação do equilíbrio estrutural da parede celular, sendo a primeira etapa a acumulação de grande quantidade de quitina em sua composição.

Esse parâmetro foi utilizado para avaliar o nível de interferência que os tratamentos exerceram sobre o reparo da parede celular fúngica, cujo acúmulo de quitina evidenciaria a ativação do seu ciclo de recuperação e assim, a menor efetividade das terapias aplicadas. Essa análise, fundamentada na proporção de quitina na parede celular, tornou-se possível devido à propriedade particular que o corante *Calcofluor White* possui de ligar-se a essa proteína, sendo considerado um marcador biomolecular de fungos, além de sinalizar o potencial de reparo da parede celular de acordo com a fluorescência apresentada [53, 58, 59, 60].

De maneira geral, as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram redução gradativa na fluorescência da parede celular pela aplicação dos tratamentos com laser, AM e TFD. Portanto, dentre todas as terapêuticas aplicadas nesse estudo, a TFD desempenhou a maior perda de fluorescência da parede celular, demonstrando as mais baixas proporções de quitina em sua estrutura e, conseqüentemente, impedindo o ciclo regenerativo do fungo. A função da parede celular é vital para o desenvolvimento de *Candida*, por isso o dano causado pela TFD nessa estrutura interfere em mecanismos fundamentais do fungo como a estabilidade osmótica, proteção contra forças mecânicas, manutenção da forma celular, adesão e crescimento invasivo no hospedeiro [57].

Pelo teste de fluorescência pode-se também observar que nas espécies *tropicalis*, principalmente cepas clínicas, houve menor redução de fluorescência que a apresentada pelas espécies *albicans*, sendo este resultado visualmente evidente nas microfotografias de TFD. Esse contexto indicou, portanto, uma maior dificuldade da terapia em romper o ciclo de recuperação da parede celular em *C. tropicalis*, corroborando com a possível resistência encontrada, quantitativamente e morfológicamente, nessa espécie pelo teste de adesão a substratos abióticos.

No que concerne ao controle positivo, a Nistatina foi o medicamento padrão de escolha, devido a sua conhecida aptidão em modificar a permeabilidade celular da membrana fúngica, resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático pelo surgimento de poros e danos oxidativos [61,62]. No teste de biofilme, pela contagem das UFC/mL e avaliação do metabolismo, este medicamento obteve estatisticamente valores nulos, caracterizando-se como o melhor método utilizado no ensaio. No teste de adesão a substratos abióticos, a Nistatina apresentou grande eficácia na redução microbiana, com ausência de brotos germinativos e indução de transição morfológica em *C. tropicalis*.

Embora seja amplamente validada como tratamento da candidose oral, não existe um consenso sobre a formulação, dosagem ou duração ideal da Nistatina, o que torna relevante o investimento em pesquisas sobre terapias alternativas, como a TFD [63,64]. Além disso, o medicamento não apresentou capacidade visível de degradação da integridade celular, bem como nenhuma evidência de rompimento do ciclo de recuperação da parede celular, exibindo aspectos semelhantes ao controle de crescimento das espécies.

Constata-se, contudo, que em todos os aspectos os quais a Nistatina não apresentou efetividade, sendo estes essencialmente sobre a parede celular fúngica, a TFD desempenhou notáveis resultados. Sabe-se que o mecanismo da TFD consiste na degradação de células fúngicas pela liberação de oxigênio singlete (ROS) e de radicais livres nos tecidos humanos. Esses radicais desenvolvem estresses oxidativos que comprometem a patogenicidade do fungo, enquanto que os ROS são, supostamente, capazes de alterar a parede celular e causar danos às estruturas intracelulares dos fungos [62]. Essa teoria fundamenta os efeitos da TFD sobre o arcabouço celular fúngico, como encontrados nos teste de morfologia celular do presente estudo.

Compreende-se que entre os fatores de patogenicidade não há relação de dominância e que a contribuição que os mesmos desempenham no estabelecimento do processo doença, ainda deva ser objeto de mais esclarecimentos. Do mesmo modo, a TFD deve acompanhar esses avanços, aprimorando experimentos laboratoriais específicos para cada fator de patogenicidade de *Candida* spp, extrapolando os utilizados por essa pesquisa.

5. Conclusão

Em todos os ensaios realizados, a TFD apresentou efetividade na inativação dos fatores de patogenicidade de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Nos testes antibiofilme, o AM e a TFD obtiveram os mais baixos índices de UFC/mL dentre os grupos experimentais. Este desempenho também foi exercido pela TFD na ruptura do ciclo reprodutivo das leveduras, redução do número e volume celular fúngico, indução de transição morfológica em espécies *C. tropicalis* e rompimento da integridade celular pelo comprometimento da parede celular e do citoplasma fúngico. Além disso, a TFD exibiu a mais evidente perda de fluorescência da parede celular, em ambas as espécies fúngicas, indicando a capacidade da terapia em suspender o ciclo regenerativo do fungo. Dessa maneira, esses resultados associados a outros estudos, ratificam conceitos clínicos atuais sobre a eficácia da TFD no tratamento da candidose oral, sendo, portanto, elucidados os mecanismos específicos que o tratamento dispõe para tal finalidade.

Referências

- [1] S. Ganguly, A. Mitchell, Mucosal biofilms of *Candida albicans*, *Curr. Opin. Microbiol.* 14 (1) (2011) 380-385.
- [2] D. Williams, R. Jordan, X. Q. Wei, C. Alves, M. Wise, M. Wilson, M. Lewis, Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces, *J. Oral Microbiol.* 21(10) (2013) 1-9.
- [3] M. R. Jorgensen, C. Kragelund, P. O. Jensen, M. K. Keller, S. Twetman, Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro, *J. Oral Microbiol.* 9(1) (2016) 1-8.
- [4] V. K. Chin, T. Y. Lee, B. Rusliza, P. P. Chong, Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 17(10) (2016) 1-17.
- [5] M. A. Jabra-Rizk, E. F. Kong, C. Tsui, M. H. Nguyen, C. J. Clancy, P. L. JR Fidel, M. Noverr, *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework, *Infect. Immun.* 84(10) (2016) 2724-2739.
- [6] S. G. Whaley, E. L. Berkow, J. M. Rybak, A. T Nishimoto, K. S. Barker, P. D. Rogers, Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging Non-*albicans* *Candida* Species, *Front. Microbiol.* 7(1) (2017) 1-12.

- [7] J.E. Loster, A. Wieczorek, B. J. W. Loster, Correlation between age and gender in *Candida* species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis, *Clin. Interv. Aging*.11(1) (2016) 1707-1714.
- [8] A. Melkoumov, M. Goupil, F. Louhichi, M. Raymond, L. de Repentigny, G. Leclair, Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against *Candida albicans*, *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (9) (2013) 2099-2105.
- [9] J. Seneviratne, L. P. Samaranayake, Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*.14 (1) (2008) 583-590.
- [10] S. Angeletti, A. Lo Presti, E. Cella, G. Dicuonzo, F. Crea, B. Palazzotti, E. Dedej, M. Ciccozzi, L. De Florio, Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize *Candida* clinical isolates, *J. Microbiol. Methods* 119 (1) (2015) 214-222.
- [11] Y. Chabrier – Roselló, T. H. Foster, N. Pérez-Nazario, S. Mitra, C. G. Haidaris, Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49(1) (2005) 4288-4295.
- [12] C. S. Tsang; F. C Chu, W. K Leung, L. J Jin, S. C Samaranayake, Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Med. Microbiol.* 56(1) (2007) 1393-1398.
- [13] A. M Rkein, Photodynamic therapy, *Dermatol. Clin.* 32(1) (2014) 415-425.
- [14] F. Freire, C. Ferraresi, A. O. Jorge, M. R. Hamblin, Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model, *J. Photochem. Photobiol. B.* 159(1) (2016) 161-168.
- [15] F. F. Sperandio, Y. Huang, M. R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria, *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* 2(8) (2013) 108-120.
- [16] M. R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, *Curr. Opin. Microbiol.* 33(10) (2016) 67-73.
- [17] C. S. A. Caires, C.R.B. Leal, C. A. N. Ramos, D. Bogo, A. R. Lima, E. J. Arruda, S. L. Oliveira, A. R. L. Caires, V. A. Nascimento, Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Lasers Med. Sci.* 20(4) (2013) 1–8.
- [18] H. Shi, H. Zhang, J. Zhang, H. Sun, Effect of 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms: An In Vitro Study, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 40-45.
- [19] E. G. Mima, C. E. Vergani, A. L. Machado, E. M. S. Massucato, A. L. Colombo, V. S. Bagnato, A. C. Pavarina, Comparison of Photodynamic Therapy versus

conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial, *CMI* 18(10) (2012) 380-388.

[20] C. P. Eduardo, M. S. Bello-Silva, K. M. Ramalho, E. M. R. Lee, A. C. C. Aranha, Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic, *Rev. Paul. Cir. Dent.* 69(3) (2015).

[21] I. Lodder, *The Yeast: a Taxonomic study*, Horth Helland Publishing, Amsterdam-London, 1970

[22] G. S Hoog, J. Guarro, *Atlas of clinical fungi*, Baarn: Centralalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, 1995.

[23] C. P Kurtzmann, J. W. Fell, *The yeast: a taxonomic study*, fourth ed., Elsevier, New York, 1998.

[24] J. J. Sidrim, M. F. G Rocha, M. F. G. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*, Guanabara, Rio de Janeiro, 2004.

[25] C. L. Taschdjian, J. J. Burchall, P. J. Kozinn, Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes, *Am. J. Dis. Child.* 99 (1) (1960) 212-215.

[26] L. M Dalmau, Remarques sur la technique mycologique, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 7(1) (1929) 536-545.

[27] N. Hosseini, S. Yadanpanah, M. Saki, F. Rezazadeh, J. Ghapanchi, K. Zomorodian, Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer, *J. Dent.* 17(4) (2016) 354-360.

[28] F. Freitas-Fernandes, Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly (methyl methacrylate) resins: An in vitro study, *J. Prosthet. Dent.* 112(6) (2014) 1349-55.

[29] R. G. Oliveira, C. P. Mahon, P. G. Ascêncio, S. D. Ascêncio, S. O. Bologun, D. T. O. Martins, Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk, *J. Ethnopharmacol.* 155(1) (2014) 387-395.

[30] S. F. Laffey, G. Butler, Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*, *Microbiol.* 151(1) (2005) 1073-1081.

[31] N. K. Tamura, M. F. N. Negri, L. A. Bonassoli, T. I. E. Svidzinski, Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40(1) (2010) 91-93.

[32] M. P. Giolo, T. I. E. Svidzinski, Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia, *J. Bras. Bras. Med. Trop.* 46(3) (2010) 225-23.

- [33] R. V. Lalla, M. C. Latortue, C. H. Hong, A. Ariyawardana, S. D'Amato-Palumbo, D. J. Fischer, A. Martof, O. Nicolatou-Galitis, L. L. Patton, L. S. Elting, F. K. Spijkervet, M. T. Brennan, International Society of Oral Oncology (ISOO): A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support. Care Cancer* 18(8) (2010) 985-992.
- [34] M. Kolpen, C. F. Appeldorff, S. Brandt S, Increased bactericidal activity of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in anaerobic conditions *Pathog. Dis.* 74(2016).
- [35] J. E. Nett, H. Sanchez, M. T. Cain, K. M. Ross, D. R. Andes, Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation, *Eukaryot. Cell.* 10 (12) (2011) 1660-1669.
- [36] J. C. Carmello, F. Alves, E. G. O. Mima, J. H. Jorge, V. S. Bagnato, A. C. Pavarina, Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species using Phorodithazine[®], *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 17 (3) (2017) 194 – 199.
- [37] L. C. Suzuki, I. T. Kato, R. A. Prates, C. P. Sabino, T. M. Yoshimura, T. O. Silva, M. S. Ribeiro, Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 17 (3) (2017) 173 – 179.
- [38] K. Asakura, S. I. Iwaguchi, M. Homma, T. Sukai, K. Higashide, K. Tanaka, Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*, *J. Gen. Microbiol.*, 137 (1991) 2531-2538.
- [39] A. Gacser, Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence, *Virulence* 7 (2) (2016) 65-67.
- [40] A. S. Sousa, R. A. Prates, M. E. Santi, R. G. Lopes, S. K. Bussadori, L. R. Ferreira, A. M. Deana, Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 14 (6) (2016) 111 – 114.
- [41] J. R Oliveira, V. C. Castro, P. G. F. Camargo, C. A. Carvalho, O. A. Jorge, L. D. Oliveira, Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry, *BMC Complement. Altern. Med.* 15 (8) (2013) 208.
- [42] F. Q. B Alenzi, Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy, *Pak. J. Med. Sci.* 32(7) (2016)143-146.
- [43] J. Guedes-Pinto, J. F. S. Martins, A. H. C. Pereira, J. Mittmann, L. J. Raniero, J. Ferreira-Strixino, Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 27 (4) (2017).
- [44] J. P. Lyon, L. M. Moreira, P. C. Moraes PC, Photodynamic therapy for pathogenic fungi, *Mycoses* 54 (2011) 265–271.

- [45] A. Azizi, Z. Amirzadeh, M. Rezai, A. Rahimi, Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 158 (2016) 267-273.
- [46] L. Cernakova, J. Chupakova, Effectiveness of the photoactive dye methylene blue versus caspofungin on the *Candida parapsilosis* biofilm in vitro and ex vivo. *Photochem. Photobiol.* 91 (2015) 1181–1190.
- [47] A. C. G. Henriques, C. Cazal, J. F. L. Castro, Low intensity laser therapy effects on cell proliferation and differentiation. Review of the literature, *Rev. Col. Bras. Cir.* 37(4) (2010) 295-302.
- [48] L. S. Barbedo, D. B. G. Sgarbi, Candidiasis, *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 22(1) (2010) 22-38.
- [49] M. Kishi, F. Aizawa, M. Matsui, Y. Yokoyama, A. Abe, K. Minami, R. Suzuki, H. Miura, K. Sakata, A. Ogawa, Oral health-related quality of life and related factors among residents in a disaster area of the Great East Japan Earthquake and giant tsunami, *Health Qual. Life Outcomes* 13 (2015) 143.
- [50] P. Uppuluri, A. K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A. K. Ramasubramaniam, J. R. Köhler, D. Kadosh, J. L. López-Ribot, Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle, *PLoS Pathog.* 6(3) (2010) 1643.
- [51] L. C. Racusen, K. Solez, R. B. Colvin, S. M. Bonsib, M. C. Castro, T. Cavallo, The Banff 97 working classification of renal allograft pathology, *Kidney Int.* 55 (1999) 713-23.
- [52] F.G. Basso, C. F. Oliveira, C. Kurachi, J. Hebling, C. A. Costa, Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro, *Lasers Med. Sci.* 28 (2) (2013) 367-374.
- [53] L. Cernakova, D. Stanislava, H. Bujdakova, Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by *Candida albicans* strain resistant to fluconazole, *Medical Mycology* 3(1) (2017) 1–6.
- [54] E. G. Mima, C. E. Vergani, A. L. Machado, E. M. S. Massucato, A. L. Colombo, V. S. Bagnato, A. C. Pavarina, Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial, *CMI* 18(10) (2012) 380-388.
- [55] M. A. Al- Fattani, L. J. Douglas, Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance, *Medical Mycology* 55(8) (2006) 999–1008.
- [56] J. Y. Wu, H. Guo, H. M. Wang, G. H. Yi, L. M. Zhou, X. W. He, Y. Zhang, J. Xu, Multilocus sequence analyses reveal extensive diversity and multiple origins of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* from tropical China, *Sci. Rep.* 10(2) (2017).

- [57] Y. Delgado-Silva, C. Vaz, J. Carvalho-Pereira, C. Carneiro, E. Nogueira, E. Correia, L. Carreto, S. Silva, A. Faustino, C. Pais, R. Oliveira, P. Sampaio, Participation of *Candida albicans* Transcription Factor RLM1 in Cell Wall Biogenesis and Virulence, PlosOne (2014).
- [58] G. J. Hageage, B. J. Harrington, Use of calcofluor white in clinical Mycology, Lab. Med. (1984) 109 – 112.
- [59] D. J. M. Haldane, E. Robart, A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13(4) (1990) 337 – 349.
- [60] K. W. Brasil, R. L. Pinheiro, I. C. Pimentel, Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and Calcofluor White methods, An. Bras. Dermatol. 78(5) (2003) 547-551.
- [61] D. E. Levin, Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway, Genetics 189 (2011) 1145–1175.
- [62] L. A. C. Carvalho, M. T. Machini, Hemocidins derived from hemoglobin: structures, properties and perspectives, Quím. Nova 36(7) (2013) 1021-1029.
- [63] X. Lyu, C. Zhao, Z. M. Yan, H. Hua, Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis, Drug. Des. Devel. Ther. 10 (2016) 1161-1171.
- [64] M. Niimi, N. A. Firth, R. D. Cannon, Antifungal drug resistance of oral fungi, Odontology. 98 (1) (2010) 15–25.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio dos ensaios laboratoriais realizados, demonstrou-se que todos os tratamentos eleitos apresentaram, em alguma intensidade, comportamentos adversos aos fatores de patogenicidade de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

No teste de biofilme, as terapias aplicadas com AM e TFD apresentaram os índices mais inferiores de UFC/mL, superando a intensa proteção que o biofilme maduro proporciona aos micro-organismos. Apesar das dificuldades encontradas no experimento de viabilidade celular, cujos grupos com AM foram excluídos da amostra devido a aspectos metodológicos, foi por intermédio dessa análise que se detectou o metabolismo celular mais acentuado das estirpes *C. albicans* ATCC (10231) pelo uso isolado do laser, apresentando diferença significativa com o controle de crescimento. Esse resultado determinou que, além de não surtir efeito positivo na redução da espécie, o laser quando aplicado sem o FS possibilitou a proliferação da microbiota fúngica.

Por sua vez, o teste de adesão a substrato abióticos evidenciou a morfologia e patogenicidade de *C. albicans* e *C. tropicalis*, que se apresentaram, respectivamente, na forma menos patogênica como blastoconídios e pseudo-hifas, bem como na forma mais danosa, como hifas. Além disso, por meio do ensaio pode-se verificar a ação da TFD na ruptura do ciclo reprodutivo assexuado de leveduras ao erradicar brotos germinativos, além da visual redução quantitativa e do volume celular fúngico, transição morfológica de formas mais patogênicas para menos danosas e rompimento da integridade celular, esta última apresentando os melhores resultados dos grupos experimentais e controles pela aplicação da terapia. Entre todos os grupos de tratamento de *C. albicans* e *C. tropicalis*, seja como cepas clínicas ou estirpes padronizadas, a TFD apresentou a maior capacidade de romper com o ciclo de reparo dos fungos, demonstrada pela menor fluorescência exibida pelas paredes celulares.

Compreende-se também que o controle positivo com uso de medicação padrão, foi o único tratamento do estudo que atingiu ou superou os patamares obtidos pela TFD. No entanto, essas terapias também foram susceptíveis à

resistência fúngica, apresentando-se principalmente em cepas clínicas de *C. tropicalis*, seguido por cepas clínicas de *C. albicans*.

De modo geral, a TFD exibiu os mais exímios resultados entre os grupos experimentais, apresentando efeito moderado a aplicação isolada do AM e do laser. Os resultados desse estudo ratificam conceitos firmados, anteriormente, por pesquisas clínicas que evidenciavam o efeito antifúngico da TFD. No entanto, a avaliação específica de cada fator de patogenicidade perante a capacidade da TFD em combatê-los, desponta como um patamar inovador de conhecimento, que propiciará o aperfeiçoamento de terapêuticas voltadas para a erradicação de microbiotas fúngicas resistentes.

REFERÊNCIAS

- ALENZI, F. Q. B. Virulence factors of *Candida species* isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 7, p. 143-146, 2016.
- AL- FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 999–1008, 2006.
- ALVES, F. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, n. 32, v. 4, p. 815-826, 2017.
- ANGELETTI, S. A. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize *Candida* clinical isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 214–222, 2015.
- ASAKURA, K. et al. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2531-2538, 1991.
- AZIZI, A.; AMIRZADEH, Z.; REZAI, M.; RAHIMI, A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 158, p. 267-273, 2016.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiasis. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BASSO, F. G. et al. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 367-374, 2013.
- BENNETT, R. J. The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 28, p. 10-17, 2015.
- BOHORA, A.; KOKATE, S. Evaluation of the Role of Probiotics in Endodontic Treatment: A Preliminary Study. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v.7, n.1, p. 46-51, 2017.
- BRASIL, K. W.; PINHEIRO, R. L.; PIMENTEL, I. C. Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and Calcofluor White methods. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 547-551, 2003.
- CAIRES, C. S. A. et al. Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Lasers in Medical Science**, v. 20, n. 4, p. 1–8, 2017.

- CARMELLO, J. C. et al. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species using Phorodithazine®. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.17, n. 3, p.194 – 199, 2017.
- CARVALHO, L. A. C.; MACHINI, M. T. Hemocidins derived from hemoglobin: structures, properties and perspectives, **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1021-1029, 2013.
- CHABRIER – ROSELLÓ, Y. et al. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 4288 -4295, 2005.
- CERNAKOVA, L.; CHUPAKOVA, J. Effectiveness of the photoactive dye methylene blue versus caspofungin on the *Candida parapsilosis* biofilm *in vitro* and *ex vivo*. **Photochemistry and photobiology**, v.91, p.1181–1190, 2015.
- CERNAKOVA, L.; STANISLAVA, D.; BUJDAKOVA, H. Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by *Candida albicans* strain resistant to fluconazole. **Medical Mycology**, v.3, n.1, p.1–6, 2017.
- CHIN, V. K et al. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1-17, 2016.
- CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. Unmasking fungal pathogens by studying MAPK-dependent cell wall regulation in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 7, n. 5, p. 502-505, 2016.
- DALMAU, L. M. Remarques sur la technique mycologique. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 7, p. 536-545, 1929.
- DE-LA-TORRE, J. In Vitro Antifungal Susceptibility of Oral *Candida* Isolates from Patients Suffering from Caries and Chronic Periodontitis. **Mycopathologia**, v. 183, n. 6, p. 471-485, 2017.
- DELGADO-SILVA, Y. Participation of *Candida albicans* Transcription Factor RLM1 in Cell Wall Biogenesis and Virulence. **PlosOne**, 2014.
- ENACHE-ANGOULVANT, A. et al. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida glabrata*: application to analysis of genetic relationships between bloodstream and digestive system isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4028-4034, 2010.
- EDUARDO, C. P. et al. Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 69, n. 3, p. 226 – 235, 2015.

FREIRE, F. et al. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 159, p. 161-168, 2016.

FREITAS-FERNANDES, F. et al. Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly (methyl methacrylate) resins: An in vitro study. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 112, n. 6, p. 1349-1255, 2014.

GACSER, A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 65-67, 2016.

GANGULY, S.; MITCHELL, A. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 380-385, 2011.

GIOLO, M. P; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 225-23, 2010.

GUEDES-PINTO, J. et al. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.27, n. 4, 2017.

HAGEAGE, G. J.; HARRINGTON, B. J. Use of calcofluor white in clinical **Mycology. Lab Medicine**, p. 109 – 112, 1984.

HALDANE, D. J. M.; ROBERT, E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxine, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 12, n. 4, p. 337 – 349, 1990.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 67-73, 2016.

HENRIQUES, A. C. G; CAZAL, C; CASTRO, J. F. L. Low intensity laser therapy effects on cell proliferation and differentiation. Review of the literature. **Journal of Brazilian College of Surgeons**, v.37, n.4, p. 295-302, 2010.

HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Baarn: Centralalbureau voor Schimmelcultures, 1995

HOSSEINI, N. et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. **Journal of Dentistry**, v. 17, n. 4, p. 354-360, 2016.

JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. **Infection and immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724-2739.

- JORGENSEN, M. R. et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.
- KASIĆ, S. et al., Efficacy of Three Different Lasers on Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Biofilms in Root Canal System. **Photomedicine and Laser Surgery**, n. 4, 2014.
- KISHI, M. et al. Oral health-related quality of life and related factors among residents in a disaster area of the Great East Japan Earthquake and giant tsunami. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 13, p. 143, 2015.
- KRYSAN, D. J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. **Fungal Genet Biol.** v. 78, p. 93-98, 2015.
- KURTZMANN, C. P.; FELL, J. W. **The yeast: a taxonomic study**. 4 ed. New York: Elsevier, 1998.
- LAFFEY, S. F. ; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, p. 1073–1081, 2005.
- LALLA, R. V. et al. International Society of Oral Oncology (ISOO): A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**. v.18, n. 8, p. 985-992, 2010.
- LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v.189, p.1145–1175, 2011.
- LYON, J. P.; MOREIRA, L. M.; MORAES, P. C. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses**, v.54, p. 265–271, 2011.
- LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 1161-1171, 2016.
- LODDER, I. *The Yeast: a Taxonomic study*. **Horth Helland Publishing**, 1970.
- LOSTER, J. E.; WIECZOREK, A.; LOSTER, B. J. W. Correlation between age and gender in *Candida* species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 11, p. 1707 -1714, 2016.
- MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. *Técnicas de Pesquisa*. 7. ed. São Paulo:Atlas, 2011.
- MELKOUMOV, A. et al. Nystatin nanosizing enhances *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n.9, p. 2099-2105, 2013.
- MIMA, E. G. et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, p. 380 -388, 2012.

NETT, J. E. et al. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1660-1669, 2011.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, n. 1, p.15–25, 2010.

OLIVEIRA, J. R. et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 8, p. 208, 2013.

OLIVEIRA, R. G. et al. Evolution of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 387-395, 2014.

PEREIRA, C. A. et al. Photodynamic inactivation of virulence factors of *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 153, p. 82–89, 2015.

PIRRONE, M.; PINCIROLI, R.; BERRA, L. Microbiome, biofilms and pneumonia in the ICU. **Current Opinion in Microbiology**, v. 29, p. 160-166, 2016.

RACUSEN, R. C. et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney International**, v. 55, p. 713-23, 1999.

RKEIN, A. M.; OZOG, D. M. Photodynamic therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p. 415-425, 2014.

SATO, T. et al. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* on the tongue dorsa of elderly people living in a post-disaster area: a cross-sectional survey. **BioMed Central Oral Health**, v. 1, p. 17-52, 2017.

SENEVIRATNE, C. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v.14, p.583 – 590, 2008.

SHI, H.; ZHANG H.; ZHANG J.; SUN H. Effect of 5-Aminolevulinic acid photodynamic Therapy on *Candida albicans* Biofilms: An In Vitro Study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 40-45, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004.

SOUZA, R. C. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2010.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 108-120, 2013.

- SUZUKI, L. C. Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.17, n. 3, p. 173-179, 2017.
- TAMURA, N. K. et al. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 1, v. 40, p. 91-93, 2007.
- TASCHDJIAN, C. L.; BURCHALL, J. J.; KOZINN, P. J. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. **American Journal of Diseases of Children**, v. 99, p. 212-215, 1960.
- TROBOULSI, R. S. et al. Gentian Violet Exhibits Activity against Biofilms Formed by Oral *Candida* Isolates Obtained from HIV-Infected Patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3043–3045, 2011.
- TSANG, C. S. et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p.1393-1398, 2007.
- UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 1643, 2010.
- ZHAO, C. et al. In vitro inhibitory activity of probiotic products against oral *Candida* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 254-262, 2016.
- WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, **FEMS microbiology letters**, v. 160, p. 177-181,1998.
- WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging Non-*albicans Candida* Species.**Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2017.
- WILLIAMS, D. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial. **Journal of oral microbiology**, v. 21, n. 10, p. 1-9, 2013.
- WILSON, B. C.; PATTERSON, S. M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in medicine and biology**, v. 53, p. 61-109, 2008.
- WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 272-276, 2007.
- WU, J. Y. Multilocus sequence analyses reveal extensive diversity and multiple origins of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* from tropical China. **Scientific reports**, v.10, n.2, 2017.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISADOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
PLATAFORMA BRASIL**



Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DA *Candida spp.* ANTES E APÓS A TERAPIA FOTODINÂMICA

Pesquisador Responsável: Daliana Queiroga de Castro Gomes

Orientando: Isabella Jardelino Dias

CAAE: 57561416.4.0000.5187

SITUAÇÃO DO PROJETO: APROVADO.

Data da relatoria: 06/07/2016

Apresentação do Projeto: Projeto intitulado "AVALIAÇÃO IN VITRO DOS FATORES DE PATOGENICIDADE DA *Candida spp.* ANTES E APÓS A TERAPIA FOTODINÂMICA", encaminhado para análise, ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, com fins à obtenção de parecer favorável ao início das atividades propostas, as quais resultarão em Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual da Paraíba – campus I.

Objetivo Geral da Pesquisa: analisar, *in vitro*, os principais fatores de patogenicidade da *Candida spp.* e seus recursos de inativações pela submissão à TFD com uso de azul de metileno como fotossensibilizador, em relação à nistatina como controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Conforme a RESOLUÇÃO 466/12, do CNS/MS, toda pesquisa com seres humanos envolve riscos com graus variados. Segundo o pesquisador responsável, no protocolo enviado para a Plataforma Brasil, Riscos e Benefícios: "Nenhum risco está relacionado aos testes *in vitro* realizados durante a pesquisa. Os resultados deste trabalho poderão ampliar o conhecimento científico sobre o tema em questão, proporcionando subsídios teóricos que viabilizem cuidados clínicos mais satisfatórios para a candidíase e embasamento para estudos futuros mais aprofundados."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa A presente proposta de estudo é de suma importância quanto papel e atribuições das Instituições de Ensino Superior (IES), estando dentro do perfil das pesquisas de construção do ensino-aprendizagem significativa, perfilando a formação profissional baseada na tríade conhecimento-

ANEXO B – Normas do periódico Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Qualis A2.



PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1572-1000

DESCRIPTION

Official Journal of the [European Platform for Photodynamic Medicine](#)

Affiliated with the [International Photodynamic Association](#)

Also affiliated with the [British Medical Laser Association](#) and the [Polish Society for Photodynamic Medicine](#)

INDEXED in MEDLINE/PubMed, SciSearch/Science Citation Index Expanded, Current Contents/Clinical Medicine.

Aims and Scope:

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy** in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer-review process.

AUDIENCE

Professionals in all medical disciplines with an interest in medical and biological applications of lasers and light sources, and photodiagnosis/photodynamic therapy in the treatment of human disease.

IMPACT FACTOR

2015: 2.412 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents / Clinical Medicine

Medline/Index Medicus

National Library of Medicine

SciSearch/Science Citation Index Expanded

ScienceDirect

Scopus

Journal Citation Reports - Science Edition

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

R. Allison, 21st Century Oncology, Greenville, North Carolina, USA

Emeritus Editor

K. Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, UK

Associate Editors

H. Barr, Gloucester, UK

R. Boyle, Hull, UK

K. Dixon, Goole, UK

M. Eljamel, Lanark, UK

L. Freitag, Hemer, Germany

K. Furukawa, Tokyo, Japan

R. Hamblin, Boston, Massachusetts, USA

C. Hopper, Bromley, UK

Z. Huang, Lakewood, Colorado, USA

H. Kato, Tokyo, Japan

T. Mang, Orchard Park, New York, USA

H. Moseley, Dundee, UK

L. Turnbull, Hull, UK

H. Walt, Zurich, Switzerland

H. Wolfson, Jacksonville, Florida, USA

Editorial Board

M. Adamek, Katowice, Poland

A. Akopov, St. Petersburg, Russian Federation

D. Allan, Manchester, UK

E. Allan, Knutsford, UK

P. Barber, Dundee, UK

A. Batlle, Buenos Aires, Brazil

K. Berg, Oslo, Norway

G. Downie, Mount Pleasant, Texas, USA

R. Fekrazad, Tehran, Iran

L. Gasparyan, Helsinki, Finland

G. Gasser, Zurich, Switzerland

P. Hillemanns, Hannover, Germany

T. Horvath, Brno, Czech Republic

S. Ibbotson, Dundee, UK

P. Jichlinski, Lausanne, Switzerland

A. Juzeniene, Oslo, Norway

N. Kashef, Tehran, Iran

H. Kostron, Innsbruck, Austria

S. Lecleire, Rouen, France

M. Leroy, Suresnes, France

L. Li, Guangzhou, China

A. Makela, Helsinki, Finland

S. Mordon, Loos, France

T. Nakamura, Tochigi, Japan

D. Robinson, Rotterdam, Netherlands

P. Ross, Columbus, Ohio, USA

A. Sieron, Bytom, Poland

W. Stummer, Munster, Germany

I.B. Tan, Amsterdam, Netherlands

A. Thorpe, Leeds, UK

R. Waidelich, Munich, Germany

M. Wainwright, Liverpool, UK

X. Wang, Shanghai, China

A. Woong-Shick, Kangham, The Republic of Korea

P. Ziolkowski, Wroclaw, Poland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Scope

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy in all medical specialities. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer review process.

Types of manuscript

Research Papers should report original clinical studies or research not previously published or being considered for publication elsewhere. Work in Progress may also be submitted. See below for the standard layout. Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression.

Review articles, including institutional reviews of recent developments are welcome, and will undergo peer review. Reviews should have an abstract of up to 250 words.

Editorials

Although most Editorials in the journal are commissioned, authors may contact the Editor-in-Chief to request submission of their own Editorial.

Correspondence. Readers are encouraged to write about any topic that relates to photodiagnosis or photodynamic therapy, clinical, scientific, educational, social or economic. Letters should be no longer than 500 words and may include discussions on material previously printed in the Journal.

Case report will be considered if formatted as a research letter with 2 figures maximum. Maximum length is up to 1000 words with up to 6 references and 2 tables or figures. There should be no Abstract and no headings.

Short Communications should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary. No abstract is necessary.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations:

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

*Referees***Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees who are willing to review the article (please obtain confirmation from the referees before submitting your manuscript). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Revised version of the manuscript

On the basis of the comments of the referees and editors, Authors may be asked to revise their manuscript. In order to facilitate the evaluation of the revisions by the referees and editors, upon revision, Authors are asked:

- to indicate all changes to the original manuscript by means of 'track changes'
- to add a letter for the referees, explaining how they dealt with all of the recommendations and questions from the referees. Authors should submit their revised version no later than 9 months after they were informed about the decision that the manuscript needs revision. If no revised manuscript is received 9 months after the decision, the manuscript will be considered as rejected.

PREPARATION*Style*

Please use **no abbreviations**. Headlines and Subheadlines should be liberally employed in the Methods, Results, and Discussion sections. Use short paragraphs whenever possible. Clarity of expression, good syntax and the avoidance of medical jargon will be appreciated by the editors, reviewers and readers.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Open access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- o Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- o An open access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- o Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- o No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

If you need to comply with your funding body policy you can apply for the CC-BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$USD 2,500** excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>

Layout of manuscript

Divide the manuscript into the following sections: Title page, Structured Abstract, Key words (3-6), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References. The editors will consider the use of other sections if more suitable for certain manuscripts.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The **Structured Abstract**, of no more than 250 words, should be written with particular care since this will be the only part of the article studied by some readers. The preferred subheadings are: Background, Methods, Results and Conclusions.

The **Introduction** should be brief and set out the purposes for which the study has been performed along with relevant previous studies only where essential.

The **Materials and Methods** should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well accepted techniques are used.

The **Results** should be presented precisely. Keep discussion of their importance to a minimum in this section of the manuscript.

The **Discussion** should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic.

Tables should be typed with double spacing and each should be on a separate sheet. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Provide a short descriptive heading above each table with footnotes and/or explanations underneath.

Figures should ideally be submitted in high-resolution TIF format, or alternatively in GIF, JPEG/JPG, or EPS format. The figures should be placed in separate files, named purely with the figure numbers (e.g. "Figure1.tif".) The cost of colour figures will be paid by the author.

Legends for Figures should be typed with double-spacing on a separate sheet.

Gene Accession Numbers

For each and every gene accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. Example: (GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Supplementary data

The journal accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use "Highlights" in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/photodiagnosis-and-photodynamic-therapy>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Bamaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc.*, New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Process of submission

Online submission

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy uses an online submission and review system. Authors can upload their article via the Elsevier Editorial System at http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=PDPDT. By accessing the website Authors will be guided stepwise through the uploading of the various files. Editable file formats are necessary. We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Figure files (TIFF, EPS, JPEG) should be uploaded separately. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. For assistance please visit our [Support Center](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>