



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ISABELLA JARDELINO DIAS

**EFEITO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE OS
FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida spp***

CAMPINA GRANDE -PB

2021

ISABELLA JARDELINO DIAS

**EFEITO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE OS
FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida spp***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra: Daliana Queiroga de Castro Gomes

Coorientador: Prof. Dr: Ricardo Dias de Castro

CAMPINA GRANDE -PB

2021

É expressamente proibido 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 do trabalho.

D541e Dias, Isabella Jardelino.
Efeito *in vitro* da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre os fatores de patogenicidade de *Candida spp* [manuscrito] / Isabella Jardelino Dias. - 2021.
141 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

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

1. Candida. 2. Fármacos fotossensibilizantes. 3. Terapia com luz de baixa intensidade. 4. Azul de metileno. I. Título

21. ed. CDD 579.55

ISABELLA JARDELINO DIAS


**EFEITO *IN VITRO* DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE OS
FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Candida spp***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia –

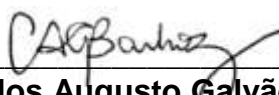
Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: 07/10/2021

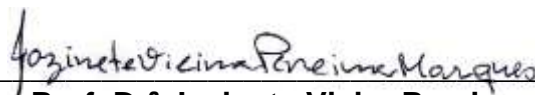
BANCA EXAMINADORA



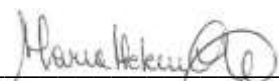
Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo
Faculdade São Leopoldo Mandic - SLMANDIC



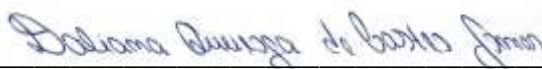
Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



Prof. Drª Jozinete Vieira Pereira
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Prof. Drª Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



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

Aos meus pais, Getulio e Claudia, responsáveis pela minha primeira e principal educação: a construção dos meus melhores valores.

À Mirella por todo apoio e vida, por me ensinar a importância do fortalecimento de si para a construção de um legado pessoal e concreto.

Dedico-lhes esse 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 por toda paciência e obstinação no meu processo cotidiano de amadurecimento.

Aos meus pais, Getulio Dias e Claudia Jardelino, por cumprir com generosidade e distinção a missão de genitores da nossa família. Por cada esforço desmedido, torcendo e lutando comigo. Minha gratidão e felicidade por serem vocês.

A toda minha família, especialmente a meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, por toda esperança recebida, mesmo à distância, durante esses quase dois anos de afastamento social devido a pandemia por Covid-19.

À Mirella, por sua compreensão, parceria e mansidão. Por acentuar a visão e a busca de uma vida plena: centrada em projetos sólidos e na aceitação amorosa da realidade em que vivemos.

A minha orientadora Daliana Queiroga, por sua perseverança em ser e formar profissionais que desempenham a Odontologia com excelência. Por firmar o exercício da profissão como uma missão pessoal, em que vidas são confiadas todos os dias ao seu cuidado. Obrigada pelas inúmeras oportunidades proporcionadas, gratidão eterna por tudo.

Ao meu coorientador Ricardo Dias de Castro e ao Prof^o. Lúcio Castelhana, por toda assessoria metodológica disponibilizada pelos mesmos e por suas equipes, bem como ao Prof^o Paulo Bonan por disponibilizar os microrganismos clínicos utilizados na pesquisa. Agradeço imensamente o acesso largamente concedido às instalações laboratoriais do Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) e do Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), representados pela coordenadora Prof^a. Daniela Pita. Grata por toda formação, implícita até mesmo na cobrança por manifestarmos nosso melhor desempenho.

Aos colegas de turma de doutorado, por todo companheirismo e bom humor durante esses anos. Agradeço especialmente à Andressa Cavalcanti e Marina

Tavares, amizades proporcionadas inicialmente pelos quilômetros percorridos entre João Pessoa e Campina Grande e desaguado na vida profissional docente.

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), pelo exercício de uma ciência transparente e responsável, bem como ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa (PROPESQ) que associado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) auxiliaram financeiramente, por meio de bolsa de dedicação exclusiva, um período parcial de desenvolvimento deste doutorado.

*Homens fortes criam tempos fáceis
Tempos fáceis geram homens fracos
Homens fracos criam tempos difíceis
Tempos difíceis geram homens fortes
(Provérbio Oriental)*

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, com uso de azul de metileno como fotossensibilizador, sobre os fatores de patogenicidade de *Candida* spp. Um ensaio *in vitro* foi realizado sobre a concentração celular em espectrofotômetro, morfologia fúngica quantificada pelas dimensões de área, densidade cromática e números de brotos reprodutivos, ruptura com o ciclo de regeneração da parede celular, bem como a interação dos tratamentos com o Ergosterol, constituinte natural da membrana plasmática dos fungos. A partir da suspensão de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, representados por isolados clínicos de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda e por estirpes ATCC e CBS, foram preparados inóculo na concentração de 1×10^6 e submetidos aos seguintes grupos: G1 - Controle de Crescimento; G2 - Irradiação Vermelha; G3 - Azul de Metileno com exposição de 20 minutos; G4 - TFDa com Tempo de Pré-Irradiação de 15 minutos; G5 - TFDa com TPI de 20 minutos; G6 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 15 minutos; G7 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos; G8 - Nistatina. A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAIP, com comprimento de onda de 660 nm, densidade de potência de $3,57 \text{ W/cm}^2$ e com energia de 5,0 J e densidade de energia de $178,5 \text{ J/cm}^2$. A concentração do Azul de Metileno foi de 0,1%. Os resultados dos ensaios de imagens foram processados no programa ImageJ (1.51p) e, posteriormente, analisados estatisticamente no *Software* SPSS (versão 18), assim como o produto dos demais testes. A análise estatística foi realizada com o teste paramétrico *One-way* ANOVA e *Two-way* ANOVA, com um nível de significância de 5%. Em todos experimentos, os microrganismos clínicos apresentaram maior potencial de resistência aos tratamentos submetidos, quando comparado aos padronizados, justificado pela constante exposição clílica à fármacos e recursos imunológicos do hospedeiro. Quanto a concentração celular, *Candida krusei* expressou as maiores densidades cromáticas entre as microbiotas clínicas tratadas, sendo os únicos microrganismos a apresentarem-se na forma de hifas. *Candida tropicalis* foi a espécie com maior potencial de manutenção do ciclo de recuperação da parede celular. A TFDa foi o tratamento mais efetivo entre os grupos, indicando os menores índices de concentração celular, área, densidade cromática e formação de brotos reprodutivos em cepas clínicas. A Nistatina obteve efeitos antimicrobianos

insatisfatórios quanto aos fatores analisados, principalmente em microrganismos clínicos, entretanto, sendo a única terapêutica a ligar-se ao Ergosterol sintético, podendo desenvolver ação na membrana plasmática do fungo. Espera-se que os resultados apontados pelo estudo auxiliem na consolidação da TFDa como tratamento efetivo para candidose oral e, que sua associação a métodos alopáticos possibilitem uma maior redução microbiana perante as vias microbiológicas de *Candida* spp.

Palavras-chave: *Candida*. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Fármacos Fotossensibilizantes. Azul de Metileno.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy, using methylene blue as a photosensitizer, on the pathogenicity factors of *Candida* spp. An in vitro assay was performed on cell concentration in a spectrophotometer, fungal morphology quantified by area dimensions, chromatic density and numbers of reproductive shoots, rupture with the cell wall regeneration cycle, as well as the interaction of treatments with Ergosterol, a constituent of the plasma membrane of fungi. From the suspension of *Candida albicans*, *tropicalis* and *krusei*, represented by clinical isolates from patients with Acute Lymphocytic Leukemia and by ATCC and CBS strains, inoculums were prepared at a concentration of 1×10^6 and submitted to the following groups: G1 - Growth Control; G2 - Red Irradiation; G3 - Methylene Blue with 20 minutes exposure; G4 - PDTa with a pre-irradiation time of 15 minutes; G5 – TPDa with TPI of 20 minutes; G6 - Association of Nystatin and PDT with 15-minute TPI; G7 - Association of Nystatin and PDTa with TPI of 20 minutes; G8 - Nystatin. The light source used was the InGaAlP laser, with a wavelength of 660 nm, a power density of 3.57 W/cm^2 and an energy of 5.0 J and an energy density of 178.5 J/cm^2 . The concentration of Methylene Blue was 0.1%. The results of the image tests were processed in the ImageJ program (1.51p) and, later, statistically analyzed in the SPSS Software (version 18), as well as the product of the other tests. Statistical analysis was performed using the One-way ANOVA and Two-way ANOVA parametric test, with a significance level of 5%. In all experiments, the clinical microorganisms showed greater resistance potential to the treatments submitted, when compared to the standardized ones, justified by the constant cyclical exposure to drugs and immunological resources of the host. As for cell concentration, *Candida krusei* expressed the highest color densities among the clinical microbiota treated, being the only microorganisms to present in the form of hyphae. *Candida tropicalis* was the species with the greatest potential to maintain the cell wall recovery cycle. PDTa was the most effective treatment among the groups, indicating the lowest indices of cell concentration, area, color density and formation of reproductive buds in clinical strains. Nystatin had unsatisfactory antimicrobial effects regarding the analyzed factors, mainly in clinical microorganisms, however, being the only therapy to bind to synthetic Ergosterol, which can develop action on the plasma membrane of the fungus. It is expected that the results pointed out by the study help in the consolidation of PDTa as an effective

treatment for oral candidiasis and that its association with allopathic methods enable a greater microbial reduction in the microbiological pathways of *Candida* spp.

Keywords: *Candida*. Low-Level Light Therapy. Photosensitizing Agents. Methylene Blue.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Etapas Metodológicas do Estudo.....	26
FIGURA 2 -	Viabilidade Celular demonstrada por Turbidez em Fundo de Placa.....	29
FIGURA 3 -	Inóculos Preparados em Triplicata.....	29
FIGURA 4 -	Grau de Absorbância para Suspensão de 1×10^6 células/mL.....	30
FIGURA 5 -	Modo de Aplicação da Irradiação Laser.....	32
FIGURA 6 -	Microplaca com Grupos Exclusivos de <i>Candida tropicalis</i> Padrão.....	33
FIGURA 7 -	Anteparos Isolando Poços de Triplicatas Irrradiados.....	33
FIGURA 8 -	Lâminas Preparadas em Triplicata por Grupo.....	36
FIGURA 9 -	Controle de Crescimento de Cepas Clínicas (A) submetidas à TFDa com TPI de 15 minutos (B) de <i>Candida krusei</i> . Imagens em BF de Microscópio.....	38
FIGURA 10 -	Controle de Crescimento de Cepas Clínicas de <i>Candida tropicalis</i> Quantificadas quanto à Área (Area), Densidade (Integrated Density) e brotos (Área até 100 pixels).....	38
FIGURA 11 -	Presença de Brotos sugerindo Reprodução Ativa em Controle Negativo.....	38
FIGURA 12 -	Triplicatas com <i>Calcofluor White</i> (A) e Células Fúngicas Decantadas Após Centrifugação (B).....	40
FIGURA 13 -	Imagem em BF e DAPI do Controle de Crescimento (A) e TFDa com TPI de 15 minutos (B) de Cepas Clínicas de <i>Candida albicans</i>	41
FIGURA 14 -	Cepas Clínicas de <i>Candida albicans</i> por DAPI Analisadas em <i>Software Image J</i>	42
FIGURA 15 -	Diluição para Plaqueamento em 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}	43
FIGURA 16 -	Crescimento de Colônias em Diluição de 10^{-5} perante demais Diluições.....	44
FIGURA 17 -	UFCs de <i>Candida albicans</i> na Ausência e Presença de Ergosterol (diluição 10^{-5}).....	44

ARTIGO I

FIGURA 1 - Concentração Celular de Microrganismos Padrão.....	57
FIGURA 2 - Controle de Crescimento de <i>Candida albicans</i> (A), <i>Candida tropicalis</i> (B) e <i>Candida krusei</i> (C) demonstrando a Morfologia Celular. Análise quanto à Área, Densidade Cromática e Reprodução de <i>Candida krusei</i> após a Aplicação de TFDa com TPI de 15 minutos (D). Imagens de Cepas Padronizadas em BF de Microscópio.....	58
FIGURA 3 - Efeito Similar entre Nistatina e o uso de Laser isolado em cepas clínicas.....	60
FIGURA 4 - Reprodução Assexuada de Cepas Padrão.....	61
FIGURA 5 - Reprodução Assexuada de Cepas Clínicas.....	61

ARTIGO II

FIGURA 1 - Concentração Inibitória Mínima da Nistatina de Acordo com as Espécies ($\mu\text{g/mL}$).....	81
FIGURA 2 - Imagens em BF e DAPI do Controle de Crescimento (A) e TFDa com TPI de 15 minutos (B) de Cepas Clínicas de <i>Candida albicans</i>	82
FIGURA 3 - Múltipla Concentração de Fluorescência (Post Hoc Tests/Bonferroni).....	82
FIGURA 4 - Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p -Value/Bonferroni).....	83
FIGURA 5 - Fluorescência da Parede Celular de Cepas Padrão.....	84
FIGURA 6 - Fluorescência da Parede Celular de Cepas Clínicas.....	84
FIGURA 7 - Comparação entre as Razão com Uso de TFDa como Referência (p -Value/Bonferroni).....	85

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Grupos Experimentais e Controles do Estudo.....	30
QUADRO 2 - Parâmetros Energéticos e Técnicos com uso de Laser Diodo de Baixa Potência.....	31
QUADRO 3 - Volume das Substâncias Empregadas por Grupos Experimentais e Controles.....	34

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABELA 1	- Concentração Inibitória Mínima da Nistatina de acordo com as Espécies de <i>Candida</i> ($\mu\text{g/mL}$)	55
TABELA 2	- Múltipla Comparação: Concentração Celular em Espectrofotômetro	56
TABELA 3	- Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni)	56
TABELA 4	- Múltipla Concentração de Área e Densidade Cromática de cepas clínicas (Post Hoc Tests/Bonferroni).....	59
TABELA 5	- Comparação Múltipla: Grupos com uso de Nistatina como referência (p-Value/Bonferroni).....	59
TABELA 6	- Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	Campo Claro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	<i>Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CC	Controle de Crescimento
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Saboraund Dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ETS	Escola Técnica de Saúde
FS	Fotossensibilizador
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LACEC	Laboratório de Cultivo e Análise Celular
LAFECC	Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LTDA	Limitada
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIXEL	Elemento de Imagem
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PROPESQ	Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Oxigênio Singleto

SSP	Espécies
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TPI	Tempo de Pré-Irradiação
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

LISTA DE SÍMBOLOS

C	-	Celsius
cm ²	-	Centímetros Cuadrados
g/L	-	Gramas por Litro
J	-	Joule
mg/mL	-	Miligramas por mililitros
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mW	-	Miliwatts
nm	-	Nanometro
s	-	Segundos
μL	-	Microlitro
μg/mL	-	Microgramas por mililitros
%	-	Por cento
λ	-	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	METODOLOGIA.....	26
3.1	Delineamento do estudo	26
3.2	Local do estudo.....	27
3.3	Microrganismos.....	27
3.4	Considerações éticas.....	28
3.5	Preparo dos inóculos para os experimentos.....	28
3.5.1	<i>Subcultura dos microrganismos.....</i>	28
3.5.2	<i>Viabilidade dos microrganismos.....</i>	28
3.5.3	<i>Concentração dos inóculos.....</i>	29
3.6	Grupos experimentais e controles.....	30
3.7	Concentração inibitória mínima.....	34
3.8	Análise da concentração celular.....	36
3.9	Avaliação da morfologia celular.....	36
3.9.1	<i>Preparo laboratorial das lâminas e visualização em microscópio...</i>	36
3.9.2	<i>Análise da área, translucidez e reprodução assexuada por brotamento.....</i>	37
3.10	<i>Avaliação da estrutura de suporte.....</i>	39
3.10.1	<i>Parede celular fúngica.....</i>	39
3.10.1.1	<i>Preparo laboratorial das lâminas e visualização em microscópio.....</i>	39
3.10.1.2	<i>Presença de quitina na parede celular dos microrganismos.....</i>	41
3.10.2	<i>Membrana plasmática fúngica.....</i>	42
3.10.2.1	<i>Inóculos preparados com Ergosterol.....</i>	42
3.10.2.2	<i>Microdiluição e contagem das Unidades Formadoras de Colônias.....</i>	43
3.11	Análise do dados.....	45
4	ARTIGO I	46
5	ARTIGO II.....	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93

REFERÊNCIAS	94
ANEXO A - Normas: Photodiagnosis ando Photodynamic Therapy.....	101
ANEXO B - Normas: Lasers in Medical Science.....	113

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas apresentam-se como um fator de agravamento em saúde com repercussões globais, expressando ascensão em territórios heterogêneos, inclusive quanto à patamares socioeconômicos (CULLEN; EDGERTON, 2016; HSIEH, 2019; PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016). Estima-se que, de cinco milhões de espécies presentes no meio ambiente, trezentas são capazes de estabelecer doenças em hospedeiros mamíferos. Em humanos, infecções ocasionadas por microrganismos fúngicos determinaram a morte de 1,5 milhões em todo o mundo (SHARMA et al., 2019).

A candidose é a enfermidade fúngica mais comumente relatada na área médica, ocasionando infecções nas mucosas vaginal, gastrointestinal e oral, bem como na pele. Provocada por microrganismos *Candida*, a doença gera processos infecciosos com intensidades variadas, podendo causar complicações sistêmicas (COLLINA et al., 2018; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019; SHI et al., 2021).

A candidose oral é a denominação empregada quando a doença atinge esse respectivo sítio anatômico. Compreende-se que o fungo, essencialmente asporogênico, comporta-se como um agente comensal na cavidade oral de hospedeiros humanos, desenvolvendo sua patogenicidade apenas em situações de ruptura de homeostasia local (ALVES et al., 2018; COLLINA et al., 2018; HSIEH, 2019).

Mais de 40 espécies *Candida* podem ser identificadas na estrutura oral, sendo *Candida albicans* correspondente a 60,8% dos fungos presentes. No entanto, outras espécies atuam com maior potencial de dano na etiopatogenia da doença, mesmo sendo quantitativamente reduzidas no meio, como *Candida tropicalis*, *krusei*, *parapsilosis* e *glabrata*, que maximizam sua ação ao associarem-se para a formação de biofilme (HSIEH et al., 2019; JAMIU et al., 2021; SHARMA et al., 2019; WHALEY et al., 2017).

Visando essa diversidade morfológica e o potencial de dano das espécies, as drogas antifúngicas atuaram, durante anos, de modo eficaz no combate à candidose oral, tornando-a reconhecidamente como uma doença de fácil cura. No entanto, essa perspectiva tem mudado à medida que a prescrição e utilização desordenada de medicamentos, aliada à escassa diversidade farmacêutica disponível no mercado,

desencadearam a deficiência dos atuais tratamentos tradicionalmente aplicados (HSIEH et al., 2019; SHI et al., 2021).

Os fármacos comerciais que agem sobre microrganismos fúngicos são classificados em azóis, equinocandinas, polienos e flucitosinas. Os três primeiros grupos agem especificamente sobre a integridade da membrana plasmática celular do fungo, enquanto que as flucitosinas são os únicos medicamentos que exercem atividade sobre a biossíntese do DNA e RNA (HSIEH et al., 2019; RICHARDSON; JONES, 2007; SHARMA et al., 2019). Esses grupos medicamentosos estão disponíveis de forma sistêmica ou local (tópica). As drogas de uso sistêmico como triazóis, fluconazol e itraconazol, são amplamente prescritas, embora possuam pouca efetividade contra *Candida ssp* e, interação medicamentosa considerável. Já medicamentos tópicos como a Nistatina, Miconazol e Clotrimazol possuem indicação prioritária na Odontologia, especialmente em casos de infecções orais mais leves (LYU et al., 2016).

A Nistatina, um macrólito polieno isolado a partir da estirpe bacteriana *Streptomyces noursei*, é um medicamento popular na área, devido a fatores como aplicabilidade e custo-benefício (LYU et al., 2016). No entanto, a falta de consenso técnico sobre a formulação, dosagem e período ideal de tratamento, além de constantes relatos quanto à resistência a penetração e efeito da droga, têm sido obstáculos veementes no processo de cura mediante a prescrição desse fármaco (NIIMI; FIRTH; CANNON, 2010; SHARMA et al., 2019; WILLIAMS et al., 2011).

Os episódios de resistência farmacológica são agravados quando a doença acomete indivíduos imunocomprometidos que, habitualmente, manifestam sinais e sintomas da candidose oral de forma mais frequente e relevante. Dessa forma, quadros típicos de unidades de tratamento intensivo (UTI), bem como estados críticos como pneumonia, asma, tuberculose, doenças autoimunes, infecção por HIV e neoplasias são, corriqueiramente, associados a candidose oral e, por isso, ao declínio de condições de saúde dos pacientes. Nesses casos, situações de septicemia fúngica por via sanguínea, denominadas de candidemia, tem tornado os índices de mortalidade mais alarmantes (HSIEH, 2019; PIRRONE; PINCIROLI; BERRA, 2016; SHARMA et al., 2019; SHI et al., 2021).

Essas circunstâncias são mais evidentes quando distúrbios que alteram o sistema imunológico acometem indivíduos de baixa faixa etária, visto à natureza da doença, a agressividade dos tratamentos recebidos e a vulnerabilidade própria do

sistema biológico infantil. A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é um exemplo desse agravamento, designando-se como a leucemia mais comum em crianças, sendo responsável por 25% de todas as neoplasias malignas infantis (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; PUCKETT; CHAN, 2021; WARD et al., 2014).

Doenças imunossupressoras, como a LLA, podem deliberar repercussões na saúde bucal com complicações como doença periodontal, mucosite, disgeusia, dores articulares, osteorradionecrose e candidose oral. Devido a fatores como alteração do sistema imunológico, hipossalivação e condições precárias de higiene oral, a elevada disseminação fúngica determina factuais riscos à manutenção da vida por parte daqueles acometidos por essa condição (BABU et al., 2016; PUCKETT; CHAN, 2021; RIBEIRA; ORIOL, 2009).

Dessa forma, a busca por terapêuticas alternativas que apresentem eficácia no tratamento da candidose oral, inclusive em pacientes imunocomprometidos, é o desafio de diversos estudos laboratoriais e clínicos da área. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo promissor reconhecido contra neoplasias, sendo também direcionado para fins antimicrobianos, denominado, assim, de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa). Esse tratamento tem se apresentado dentro dos critérios antifúngicos acima expostos, com ação imediata e específica sobre os microrganismos, afora os recentes indícios de superação dos obstáculos encontrados pelos tratamentos alopáticos convencionais, inclusive, quanto ao estímulo à resistência pelo uso da própria terapêutica (ASNAASHARI et al., 2016; ESLAMI, 2019; HSIEH et al., 2019; NIIMI; SHARMA et al., 2019; SHI et al., 2021).

A TFDa consiste na aplicação de irradiação laser de baixa potência sobre um fotossensibilizador (FS). Nesse caso, o agente químico é um mediador crítico para o sucesso do tratamento ao absorver a energia liberada pelo aparelho e, ao tornar-se excitado, liberá-la para biomoléculas presentes nos tecidos (ALVES et al., 2018; ASNAASHARI et al., 2016; WILSON; ESLAMI, 2019).

Assim, produtos citotóxicos são formados por meio de duas reações distintas. A primeira (tipo I) produz radicais livres que promovem o estresse oxidativo fúngico, comprometendo a patogenicidade do microrganismo ao prejudicar a aderência das células à mucosa do hospedeiro, bem como a formação de biofilme. Na reação do tipo II, a energia é aplicada sobre oxigênios locais, tornando-os ativos, portanto, denominados de oxigênios singletos (ROS). Estudos preliminares apontam que os ROS são, supostamente, capazes de alterar a permeabilidade seletiva da parede

celular do fungo, causando danos as estruturas intracelulares e, por essa via, erradicando os microrganismos (FREIRE, 2016; HSIEH et al., 2019; LI et al., 2016; SHI et al., 2021; STÁJER et al., 2020).

A *Food and Drug Administration* (FDA), agência federal americana responsável pela proteção da saúde pública aprovou o uso de FS como as porfirinas, levulan, metvix e visudyne. Outras substâncias como o azul de toluidina, hipocrelina, B:La³⁺, verde de malaquita, violeta de genciana, azul de metileno, curcumina, eritrosina e rosa-bengala têm sido utilizadas para a obtenção de FS não tóxicos, específicos para cada tipo de microrganismo e com diluição ideal em meio aquoso durante a aplicação da TFDa (HSIEH et al, 2019; TROBOULSI et al, 2011).

O Azul de Metileno (AM) é comumente usado como FS em casos clínicos de candidose oral. Essa eleição é justificada pela estabilidade e compatibilidade de suas propriedades químicas e biológicas no organismo humano, além de demonstrar larga excitação para a redução de leveduras (TROBOULSI et al., 2011).

A associação dessas características ao caráter emergencial de uma terapêutica eficaz para a candidose oral, torna a TFDa um recurso elegível dentro dos parâmetros da Odontologia moderna, principalmente em localidades com recursos financeiros e tecnológicos limitados, em razão do favorável custo-benefício do aparelho. No entanto, apesar da gradativa popularização do uso clínico da TFDa e da compreensão adquirida sobre os mecanismos microbiológicos ativados no hospedeiro, ainda não há um domínio concreto sobre o impacto da terapêutica nos fatores de patogenicidade dos microrganismos, como a promoção de dano à parede celular e membrana plasmática de *Candida ssp*, distinguindo assim da ação de medicamentos alopáticos tradicionais, como a Nistatina (AZIZI et al., 2016; EDUARDO et al., 2015; FREIRE, 2016).

Além disso, é importante ressaltar que os protocolos da TFDa ainda estão em discussão na literatura científica. Dentre esses itens, está o tempo de repouso do FS antes da aplicação da irradiação, chamado de tempo pré-irradiação (TPI). Essa etapa é crucial para o sucesso do tratamento devido ao contato físico do FS com os tecidos e, assim, a difusão deste nas estruturas dos microrganismos (AMARAL et al., 2010; AZIZI et al., 2016; EDUARDO et al., 2015; FREIRE, 2016; GONDIM et al., 2021).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar, *in vitro*, o efeito da TFD sobre os fatores de patogenicidade de *Candida spp*. Espera-se, assim, que

os subsídios científicos gerados evidenciem protocolos técnicos satisfatórios para a aplicação clínica da terapêutica, além de sugerir os mecanismos da TFDa perante as habilidades de dano e autodefesa aprimorados, constantemente, pelos fungos em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

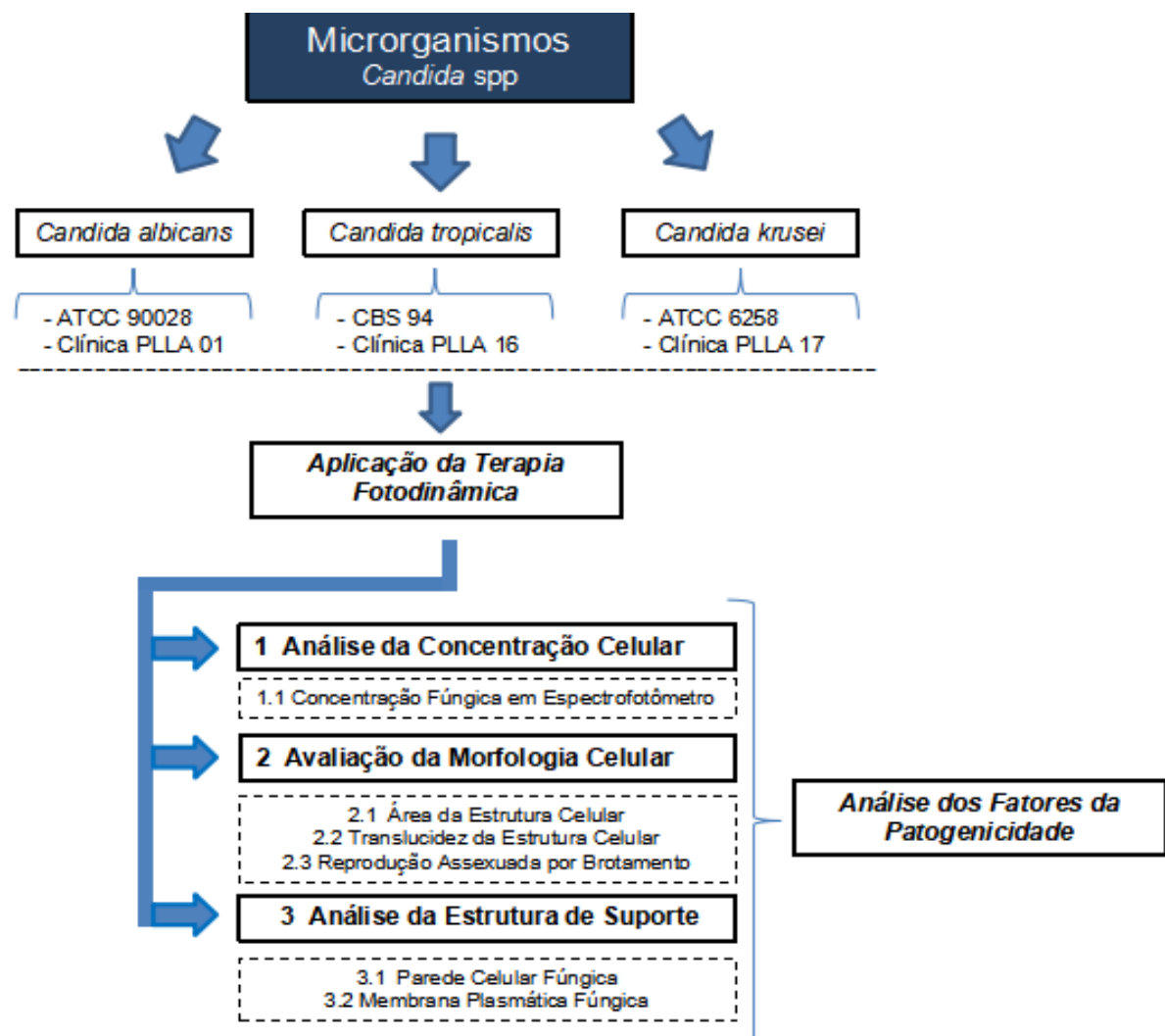
- Quantificar a concentração celular das cepas padrão e clínicas dos grupos;
- Avaliar a morfologia celular pela área e densidade cromática fúngica;
- Examinar a inibição da reprodução assexuada por brotamento dos fungos;
- Analisar a integridade da parede celular fúngica pela proporção de quitina;
- Detectar a ação das terapias na membrana plasmática pelo uso de Ergosterol;
- Investigar o protocolo de tratamento mais eficaz na inativação de *Candida* spp;
- Distinguir as cepas padrão e clínicas com possível resistência aos tratamentos;
- Verificar o efeito das terapêuticas associadas perante os grupos estabelecidos.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Um ensaio laboratorial experimental *in vitro*, com abordagem indutiva e técnica de documentação direta foi realizado sobre o efeito da TFDa frente à patogenicidade de *Candida* spp (HOCHMAN et al., 2005; MARCONI; LAKATOS, 2011). Uma análise estatística comparativa foi aplicada aos resultados das etapas metodológicas descritas no fluxograma a seguir (Figura 1):

Figura 1 - Etapas Metodológicas do Estudo



Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Local do estudo

Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC) da Escola Técnica de Saúde (ETS), ambos pertencentes à Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.3 Microrganismos

Os experimentos foram realizados com microrganismos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. As cepas utilizadas foram representadas por isolados clínicos retirados de pacientes em fase de quimioterapia para tratamento de LLA e por estirpes de referência do tipo *American Type Culture Collection* (ATCC) e Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

O processo de identificação da microbiota clínica foi realizado em estudo anterior (ARAUJO et al., 2005). Essa avaliação efetivou-se por meio de impressão digital molecular, pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com o Kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, Waltham, MA, USA), e pelo método cromógeno CHROMagar *Candida*™ (BD™ CHROMAGAR™ *Candida*, Paris, França). O método de PCR detectou a identidade de *Candida albicans* e *Candida* não *albicans* por meio de primer ACT1-f/ACT1-r e HWP1-f (MONTEIRO et al., 2019).

Para o isolamento em meio nutritivo cromogênico padronizado com CHROMagar *Candida*™, colônias crescidas e com aspecto de fungos leveduriformes foram cultivadas. Esse sistema avaliou a espécie de *Candida* spp conforme a coloração e o morfotipo, sendo assim, a identificação presuntiva realizada conforme as colorações e rugosidades das colônias existentes nas placas após 48h de exposição ao meio cromogênico. A tonalidade verde da colônia indicou a presença de *Candida albicans*, a azul metálica de *Candida tropicalis* e a rosa com aspecto de rugosidade como *Candida krusei* (ARAUJO et al., 2005; BAYONA et al., 2020).

Após a identificação das espécies *Candida* spp, os microrganismos clínicos foram semeados em placas, e estas armazenadas em meio refrigerado, com às estirpes padrão ATCC E CBS. Assim, as culturas de células microbianas foram estocadas e disponibilizadas para os exames experimentais da presente pesquisa.

3.4 Considerações éticas

Para a coleta dos microrganismos clínicos *Candida* spp, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPB aprovou a proposta submetida, com registro na Plataforma Brasil sob número CAAE 30267814.2.0000.5188 e parecer 706.409 (MONTEIRO et al., 2019).

3.5 Preparo dos inóculos para os experimentos

3.5.1 Subcultura dos microrganismos

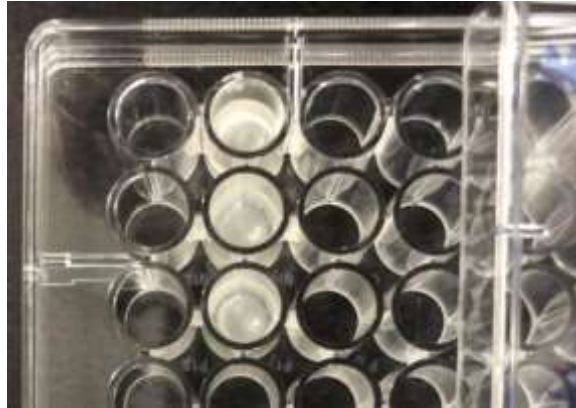
As subculturas (repiques) dos microrganismos foram realizadas na etapa inicial dos experimentos. Nesse processo, cinco colônias com diâmetro de ~1mm foram escolhidas das placas armazenadas e suspensas em 5 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), sendo submetidas ao agitador de vórtex (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) durante 15 segundos e, posteriormente, incubado a 35°C por 24 horas (CLSI, 2002).

Após esse período, o concentrado de microrganismos foi inserido por fricção em placa petri com meio de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para, assim, serem utilizadas nos experimentos.

3.5.2 Viabilidade dos microrganismos

A viabilidade celular foi analisada para dispor do potencial de patogenicidade das cepas fúngicas, para posterior utilização nos experimentos. Dessa forma, uma alíquota de cada microrganismo foi removida das placas de subcultura e suspensa em 1 mL de CSD, sendo em seguida, agitados em vórtex. Em microplaca de microtitulação estéril de 96 poços (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia, SP, Brasil), fundo chato, foi adicionado 300 µL da alíquota e incubada à 35°C por 24 horas. Após esse período, as placas foram visualmente avaliadas, observando se havia atividade celular expressa por crescimento fúngico (turbidez) em fundo de placa (CLSI, 2002) (Figura 2).

Figura 2 - Viabilidade Celular demonstrada por Turbidez em Fundo de Placa

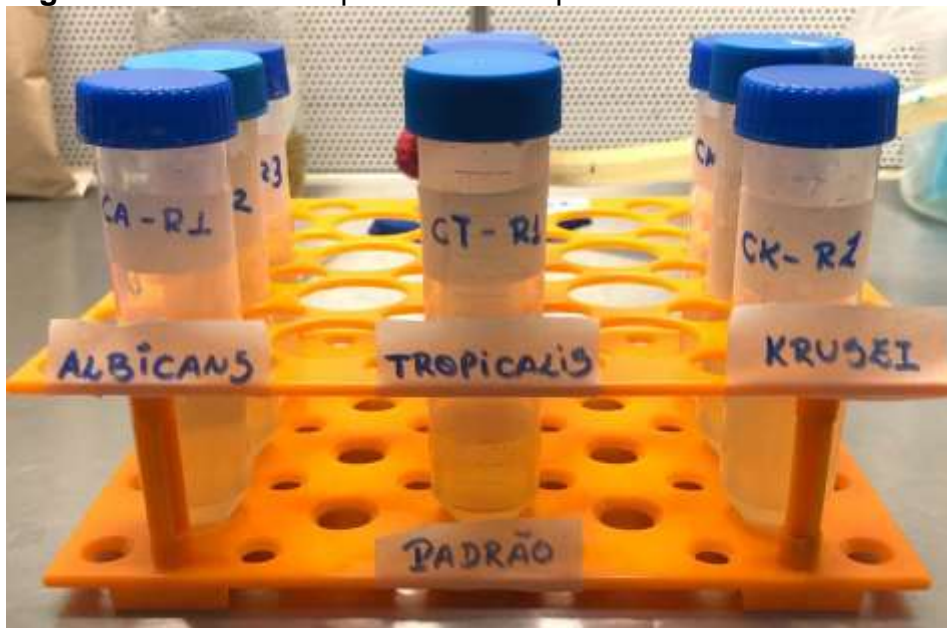


Fonte: Elaborada pelo autor

3.5.3 Concentração dos inóculos

Os inóculos preparados para os experimentos foram realizados em triplicata. Dessa maneira, cinco colônias com diâmetro de ~1mm foram escolhidas das placas de subcultura e suspensas em 5 mL de CSD estéril. Após esse processo, as triplicatas suspensas foram agitadas em vórtex durante 15 segundos (CLSI, 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Inóculos Preparados em Triplicata



Fonte: Elaborada pelo autor

Em seguida, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) com comprimento de onda ajustado em 530 nm, acrescentando CSD à suspensão recém preparada até obter a transmitância equivalente de uma

solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Para essa finalidade, a absorbância referência indicada no espectrofotômetro para o inóculo deveria ser de 0,08 à 0,13 (Figura 4), obtendo, assim, uma suspensão padrão de levedura de 1×10^6 células por mL, concentração essa ideal para os testes de atividade antimicrobiana do presente estudo (CLSI, 2002).

Figura 4 - Grau de Absorbância para Suspensão de 1×10^6 células/mL



Fonte: Elaborada pelo autor

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. Além desses, os experimentos foram submetidos a um controle de esterilização, composto por meio nutritivo de CSD.

Quadro 1 - Grupos Experimentais e Controles do Estudo

Grupo	Intervenção	Tipo	Descrição
1	Controle	Negativo	Controle de Crescimento
2	Experimental	Laser	Irradiação Vermelha
3	Experimental	AM	Exposição de 20 minutos
4	Experimental	TFD	Pré-Irradiação de 15 minutos
5	Experimental	TFD	Pré-Irradiação de 20 minutos
6	Experimental	Associação	Nistatina + TFDa (Pré-Irradiação de 15 minutos)
7	Experimental	Associação	Nistatina + TFDa (Pré-Irradiação de 20 minutos)

8	Controle	Positivo	Nistatina
---	----------	----------	-----------

Fonte: Elaborada pelo autor

A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP *Therapy XT* (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), no feixe de irradiação .vermelha. Segundo informações do fabricante, o comprimento de onda (λ) utilizado foi de 660 nm \pm 10 nm, incidido com potência útil de 100 mW \pm 20%, com diâmetro da ponteira do aparelho (área de spot) correspondendo a 0,028 cm² (DMC, 2016). A densidade de potência utilizada foi 3,57 W/cm², com energia 5,0 J, resultando numa densidade de energia (dose) de 178,5 J/cm² durante a aplicação (Quadro 2).

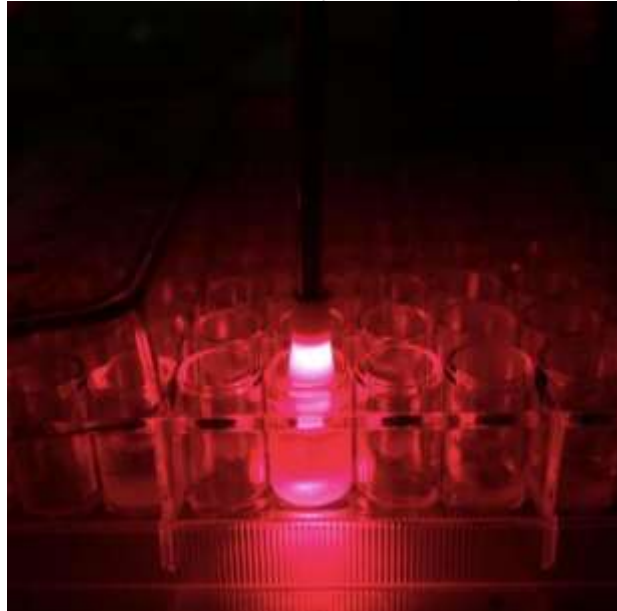
Quadro 2 - Parâmetros Energéticos e Técnicos com Uso do Laser Diodo de Baixa Potência

Parâmetros Técnicos	
Composição	InGaAlP
Energia	5,0 J
Potência	100 mW \pm 20%
Comprimento de Onda	660 nm \pm 10 nm
Modo de Ação	Contínuo
Diâmetro da Ponteira	0,028 cm ²
Densidade de Potência	3,57 W/cm ²
Densidade de Energia	178,5 J/cm ²
Tempo	50 s
Modo de Aplicação	Perpendicular à Microplaca

Fonte: Elaborada pelo autor

A emissão do laser foi contínua e com modo de operação pontual, cuja ponteira do equipamento foi posicionada perpendicularmente à microplaca, no diâmetro de abertura de cada poço (Figura 5).

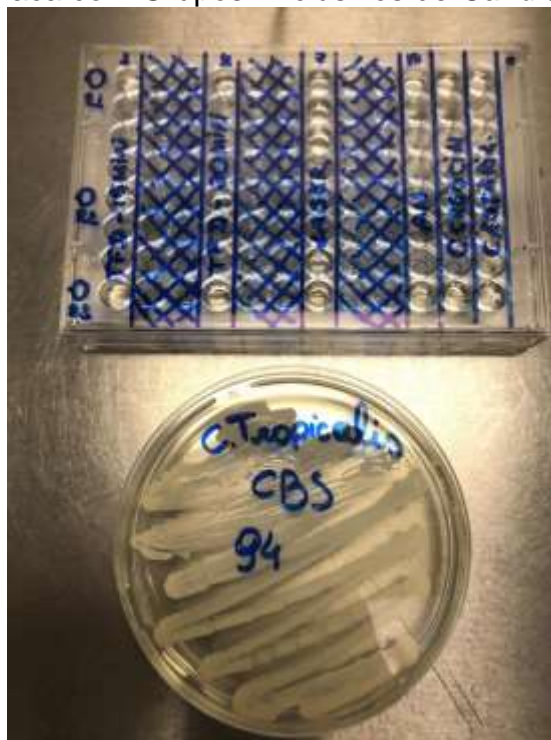
Figura 5 – Modo de Aplicação da Irradiação Laser



Fonte: Elaborada pelo autor

Para os testes de patogenicidade, o laser foi incidido sobre microplacas estéreis de 96 poços, conforme os grupos experimentais e controles pré-estabelecidos. Ressalta-se que, de acordo com a espécie do microrganismo estudado, os ensaios laboratoriais foram realizados em microplacas distintas, com o objetivo de manter a especificidade e pureza de cada cepa (Figura 6).

Figura 6 - Microplaca com Grupos Exclusivos de *Candida tropicalis* Padrão



Fonte: Elaborada pelo autor

Além disso, espaçamentos físicos entre grupos experimentais e controles de um mesmo microrganismo foram preconizados na microplaca (Figura 8 e 9), sendo também confeccionados anteparos de silicone preto (TEKBOND, São Paulo, SP, Brasil) para isolar os poços que receberam carga energética. Esse material que, segundo o fabricante, é capaz de resistir à altas temperaturas (-54 à 232°C) como de esterilização, foi utilizado para criar estruturas de borrachas moldadas a partir dos poços da microplaca. Posteriormente, esses anteparos foram inseridos nos poços adjacentes às triplicatas que receberam irradiação laser, isolando-as (Figura 7). Dessa forma, evitou-se a possibilidade de sobreposição de irradiação entre os grupos submetidos ao laser, como também qualquer absorção mínima pelos demais.

Figura 7 - Anteparos Isolando Poços de Triplicatas Irradiados. Fabricação Própria.



Fonte: Elaborada pelo autor

Ressalta-se que as análises foram realizadas em triplicata para todos os grupos estabelecidos no estudo, conforme indicado na Figura 7 e, que cada poço recebeu inóculo oriundo de reativação distinta dos demais poços da triplicata.

O AM, FS aplicado para sensibilização de *Candida* spp pela TFD, foi manipulado por farmácia de manipulação local e utilizado na concentração de 0,1% (Dilecta, João Pessoa, PB, Brasil). A ambientação escura foi preconizada como meio para manuseio e o TPI do FS, bem como para aplicação da irradiação laser. Destaca-

se que o TPI da pesquisa foi de 15 e 20 minutos, a depender do grupo pré-estabelecido (HOSSEINI et al, 2016).

A Nistatina, utilizada como controle positivo (Roval, João Pessoa, PB, Brasil), foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Amresco, Northfield, OH, EUA) com DMSO e Água Destilada estéril, resultando numa concentração inicial de 1,0 mg/mL. No entanto, antes da utilização do medicamento nos experimentos, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada com o objetivo de promover concentrações específicas de Nistatina para cada microrganismo padrão e clínico. Destaca-se que, durante os ensaios de patogenicidade, as microplacas dos grupos contendo Nistatina, aplicada na CIM ideal, foram incubadas à 35°C por 24 horas, condição hábil para ocorrer a ação máxima do medicamento.

O quadro 3 demonstra o volume das substâncias empregadas nos poços dos testes de concentração celular, morfologia celular e estruturas de suporte, de acordo com os grupos experimentais e controles do estudo.

Quadro 3 - Volume das Substâncias Empregadas por Grupos Experimentais e Controles

Grupo	Descrição	Volume das substâncias (300µL)
1	Controle de Crescimento	100µL de Inóculo + 200µL de CSD
2	Irradiação Vermelha	100µL de Inóculo + 200µL de CSD
3	Exposição de 20 min	100µL de Inóculo + 100µL de AM + 100µL de CSD
4	Pré-Irradiação de 15 min	100µL de Inóculo + 100µL de AM + 100µL de CSD
5	Pré-Irradiação de 20 min	100µL de Inóculo + 100µL de AM + 100µL de CSD
6	Nistatina + TFDa (PI de 15 min)	100µL de Inóculo + 100µL de AM + 100µL de Nistatina
7	Nistatina + TFDa (PI de 20 min)	100µL de Inóculo + 100µL de AM + 100µL de Nistatina
8	Nistatina	100µL de Inóculo + 100µL de Nistatina + 100µL de CSD

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7 Concentração inibitória mínima de Nistatina

O método de Microdiluição em Caldo foi empregado para obter a CIM da Nistatina, perante cada cepa utilizada (CLSI, 2002). Inicialmente, o inóculo foi preparado na concentração de 1×10^6 células por mL e a Nistatina na concentração de 1,0 mg/mL.

A CIM foi realizada em triplicata sendo, primeiramente, inserido 100 µL de CSD em todos os poços da microplaca. Então, 100 µL de Nistatina foi adicionado ao primeiro poço, dando seguimento à microdiluição, com transferência de 100 µL do conteúdo do poço inicial para o adjacente, sendo repetido até o último poço da microplaca. Após a conclusão dessa etapa, inseriu-se 100 µL do inóculo específico em todos os poços, resultando numa concentração final de 60 a 0,4 µL/mL do medicamento, respectivamente, do primeiro ao último poço.

As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C, período este necessário para a Nistatina atingir sua ação antimicrobiana máxima. A obtenção dos resultados ocorreu por observação visual de agregados de células no fundo dos poços (LEITE et al., 2014).

3.8 Análise da concentração celular

A análise da Concentração Celular foi realizada em triplicata, por meio de espectrofotômetro, com o objetivo de quantificar os microrganismos após os tratamentos aplicados. Primeiramente, o inóculo foi preparado na concentração pré-estabelecida e o medicamento controle na CIM e, em seguida, as microplacas foram preenchidas segundo os grupos e os tratamentos aplicados.

Para a leitura de absorbância dos grupos contendo AM, o aparelho foi zerado com uma cubeta contendo AM e CDS, na proporção 1:3, a mesma proporção utilizada nos poços dos referidos grupos. Já para grupos não constituídos por AM, a cubeta de referência (branca) para zeragem do aparelho foi preenchida apenas com CSD. Essa diferenciação no processo de tara, para posterior leitura da concentração celular, tornou a comparação dos resultados possível, excluindo assim os meios presentes e evidenciando apenas os microrganismos.

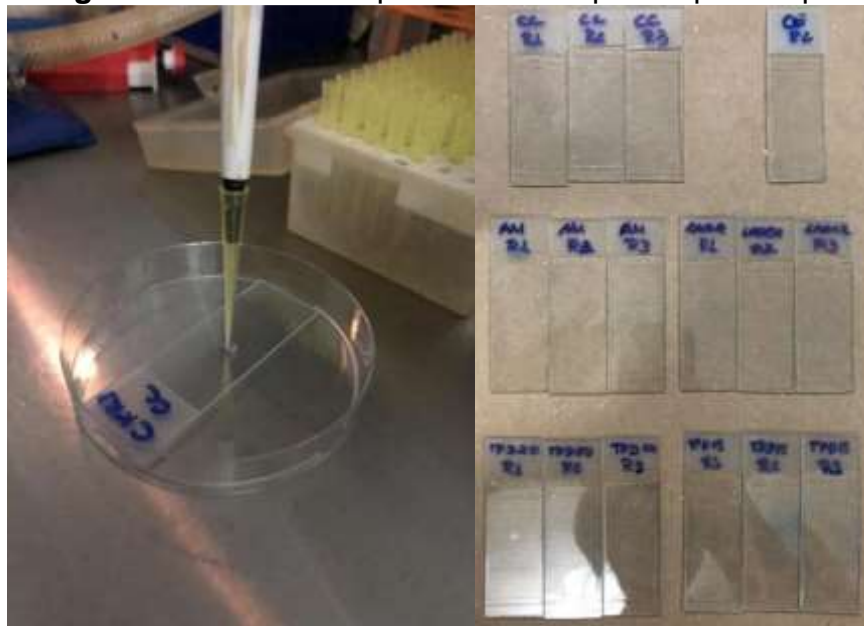
3.9 Avaliação da morfologia celular

3.9.1 Preparo laboratorial das lâminas e visualização em microscópio

Após os inóculos padronizados serem preparados na concentração de 1×10^6 células por mL e os tratamentos realizados, 150 µL de cada triplicata foram removidos e centrifugados por 15 minutos, na velocidade de 1500 rpm (Daiki, Presidente

Prudente, SP, Brasil). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e duas etapas de limpeza foram promovidas, com a adição consecutiva de 75 μ L e 30 μ L de solução salina (NaCl), sendo o composto centrifugado por 10 minutos e removido o sobrenadante após cada uma dessas etapas. Por fim, 50 μ L de NaCl foram adicionados, e a solução centrifugada por 10 minutos com o intuito de formar um volume que dispusesse 10 μ L de volume, removidos preferencialmente do fundo do recipiente. Assim, esse volume foi aplicado sobre lâmina de vidro que, em seguida, foi selada com lamínula, ambas higienizadas por imersão em álcool isopropílico e xileno antes do uso (Figura 8) (LAFHEY; BUTLER, 2005).

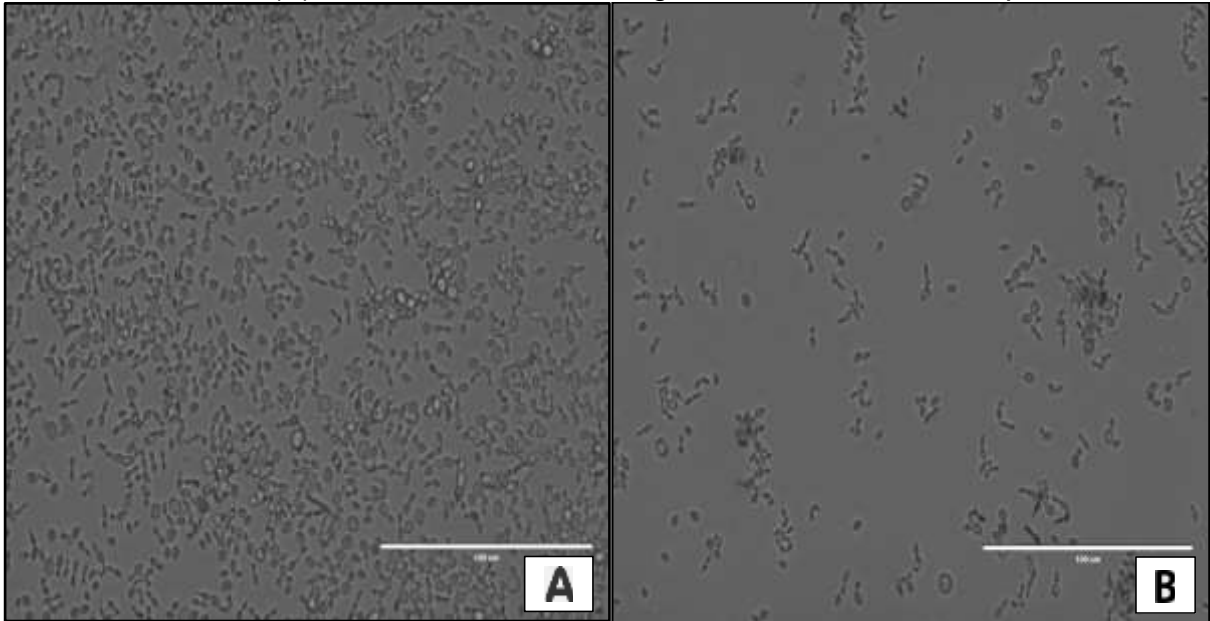
Figura 8 - Lâminas Preparadas em Triplicata por Grupo



Fonte: Elaborada pelo autor

As lâminas foram visualizadas no Microscópio Digital Invertido EVOS FL (AMG, Bothell, WA, EUA) sob campo claro (BF), com ampliação de 40x e intensidade de luz de 20%. Por meio das imagens geradas, pode-se observar a área e densidade cromática das células fúngicas, bem como a presença de brotos (Figura 9).

Figura 9 - Controle de Crescimento de cepas clínicas (A) e submetidas à TFDa com TPI de 15 minutos (B) de *Candida krusei*. Imagens em BF de Microscópio EVOS.



Fonte: Elaborada pelo autor

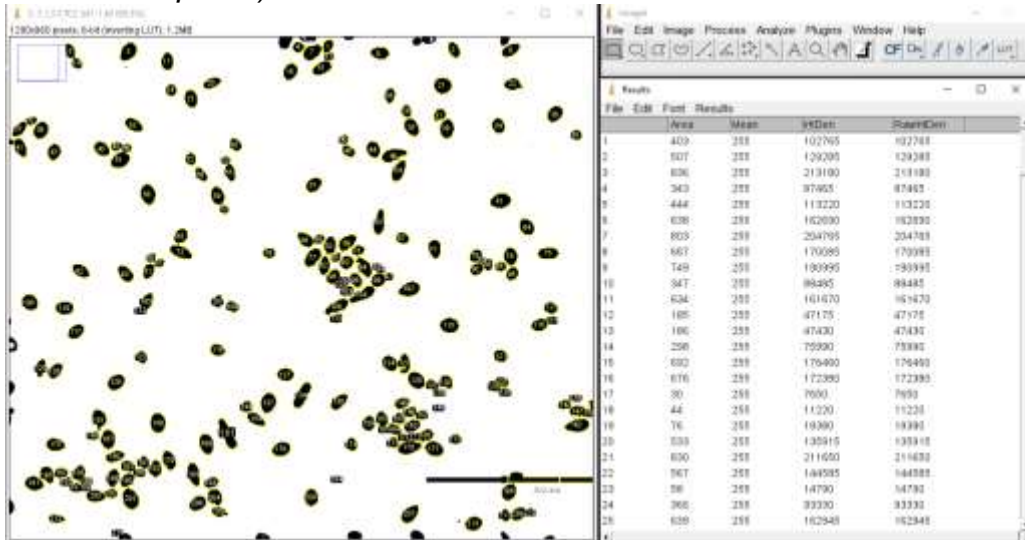
3.9.2 Análise da área, densidade cromática e reprodução assexuada por brotamento

O programa *Image J*, versão 1.5n1, foi utilizado para o processamento das imagens em BF obtidas pelo Microscópio Digital Invertido. Para as análises da área, densidade cromática e incidência de reprodução assexuada, a imagem foi, primeiramente, formatada para se obter uma imagem binária. A função *Analyze Particles* foi acionada para proporcionar o contorno, isolamento e enumeração das células da imagem, excluindo possíveis ruídos que estivessem presentes. Durante o processamento também foi possível realizar a correção manual, caso alguma célula se apresentasse com contornos delineados inadequadamente (HANNICKEL, 2012).

Os resultados disponibilizados pelo programa foram obtidos após a seleção da opção *Measure*. Para os dados de área (*Area*), expressos em *pixels* quadrados, 100 células fúngicas foram escolhidas de cada lâmina, com o propósito de verificar se houve dano estrutural pela redução de área celular após as terapias aplicadas. Além desse parâmetro, a variação de densidade cromática também foi mensurada como indicadora de deterioração celular. Para isso, os valores de *Integrated Density* foram coletados de 100 células de cada lâmina, com área fixa em 400 pixels^2 , de modo que interferências pela variação de área dos fungo fossem evitadas. Já o potencial de inibição de reprodução propiciado pelos tratamentos foi aferido pelo quantitativo de

brotos nas imagens. Esse estudo realizou-se pela proporção do número de brotos presentes na lâmina para cada 100 células fúngicas totais (Figura 10).

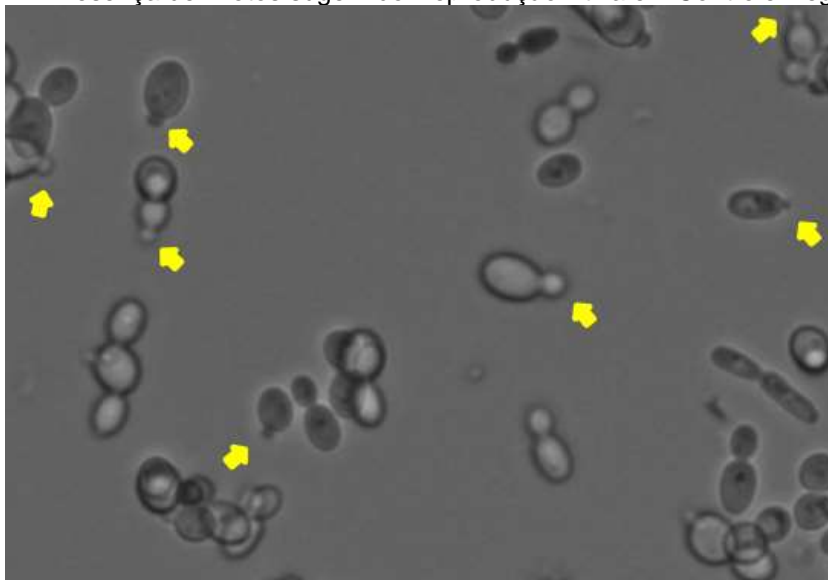
Figura 10 - Controle de Crescimento de Cepas Clínicas de *C. tropicalis* quantificadas quanto à Área (*Area*), Densidade (*Integrated Density*) e Brotos (*Area até 100 pixels*)



Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, a contagem de brotos (gêmulas), indicando reprodução assexuada por brotamento, foi realizada pelo programa que indicou o número de células com área mensurada até 100 *pixels* quadrados, valor correspondente a 25% do tamanho médio dos fungos encontrados nas lâminas, que foi de 400 *pixels* quadrados. (Figura 11) (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2014; TORTORA et al, 2004).

Figura 11 - Presença de Brotos sugerindo Reprodução Ativa em Controle Negativo



Fonte: Elaborada pelo autor

3.10 Avaliação da estrutura de suporte

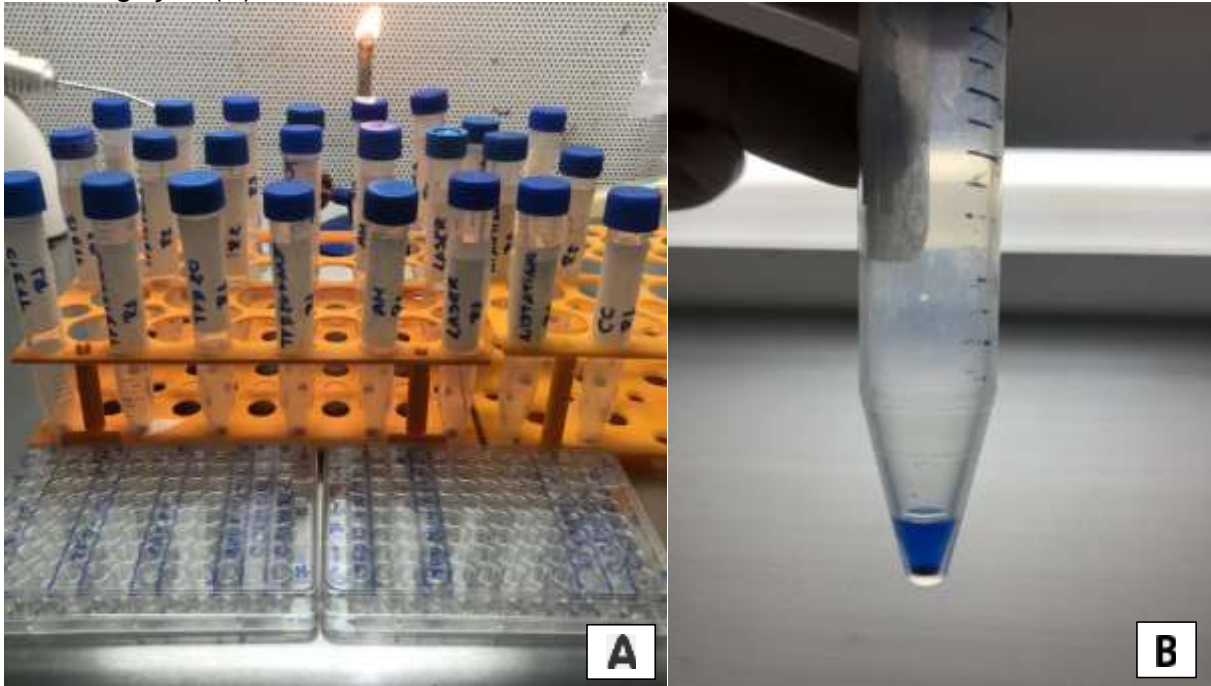
3.10.1 Parede celular fúngica

3.10.1.1 Preparo laboratorial das lâminas e visualização em microscópio

Da mesma forma que realizado para a avaliação da morfologia celular, os inóculos padronizados foram preparados na concentração de 1×10^6 células por mL e os tratamentos executados. Em seguida, 150 μ L de cada triplicata foram removidos e centrifugados por 15 minutos, na velocidade de 1500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e duas etapas de limpeza foram promovidas, com a adição consecutiva de 75 μ L e 30 μ L de NaCl, sendo o composto centrifugado por 10 minutos e removido o sobrenadante após cada uma dessas etapas.

O corante *Calcofluor White* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para detectar a proporção de quitina nos microrganismos, indicando assim, o estado de integridade da parede celular após os tratamentos aplicados. Para melhor visualização do efeito do *Calcofluor White* nas imagens, o produto foi diluído em água estéril, na proporção de 1:10, a partir da concentração original de 1 g/L. Assim, 50 μ L da solução diluída do corante foram adicionados ao composto e esse centrifugado por mais 10 minutos, à temperatura ambiente, para que 10 μ L fossem removidos, preferencialmente do fundo do recipiente. Essa quantidade foi aplicada sobre lâmina de vidro que, em seguida, foi selada com lamínula, ambas higienizadas por imersão em álcool isopropílico e xileno antes do uso (Figura 12) (LAFHEY; BUTLER, 2005).

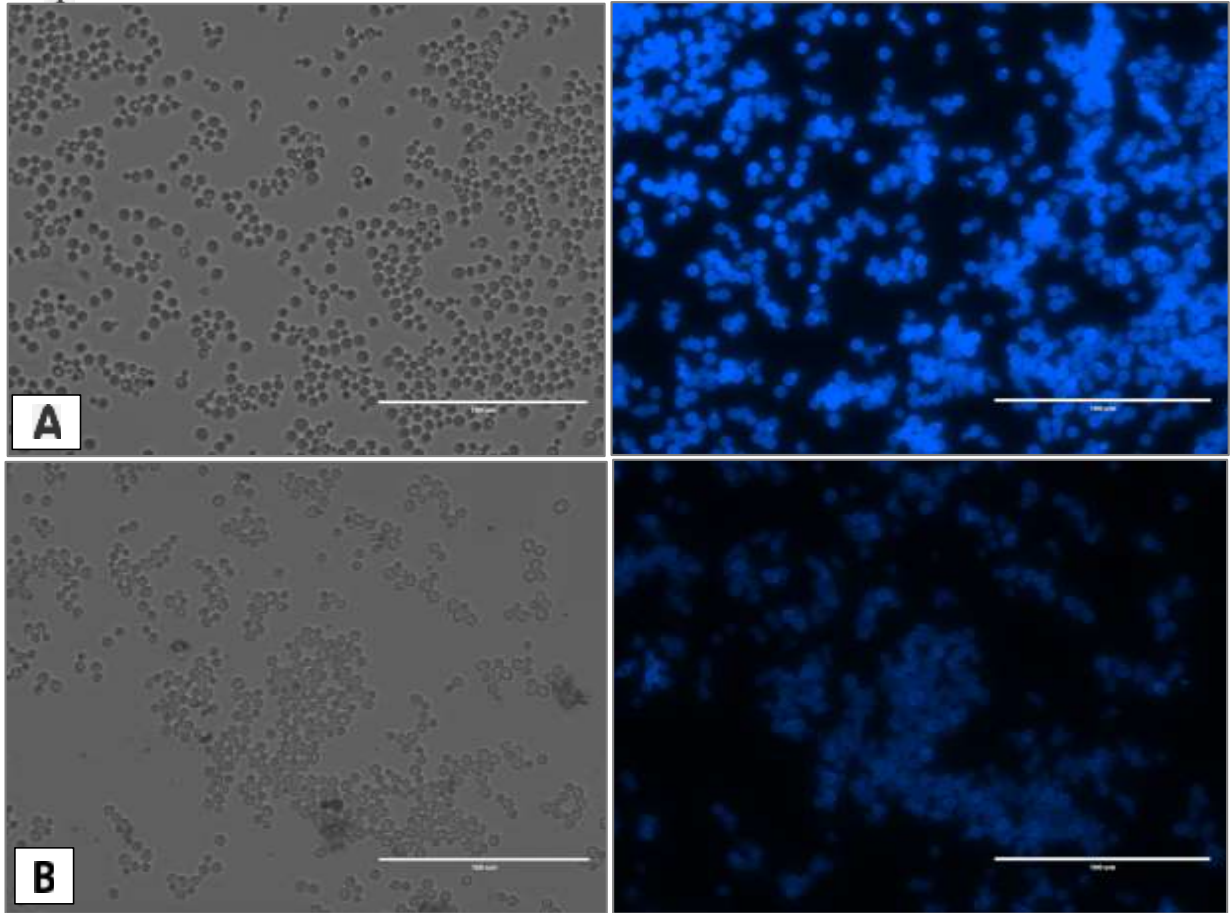
Figura 12 - Triplicatas com *Calcofluor White* (A) e Células Fúngicas Decantadas Após Centrifugação (B)



Fonte: Elaborada pelo autor

As lâminas foram visualizadas no Microscópio Digital Invertido EVOS FL com filtro DAPI, com ampliação de 40x e intensidade de luz de 20%, em ambiente laboratorial escurecido (Figura 13). A fluorescência apresentada pelas células foi o parâmetro utilizado para avaliar a proporção de quitina na parede celular. Dessa forma, quanto maior a fluorescência, maior seria a concentração de quitina, demonstrando integridade do ciclo de recuperação da parede celular fúngica (BRASIL; PINHEIRO; PIMENTEL, 2003; CERNAKOVA; STANISLAVA; BUJDAKOVA, 2017; DELGADO et al. 2014; HAGEAG; HARRINGTON, 1989; HALDANE; ROBART, 1990).

Figura 13 - Imagem em BF e DAPI do Controle de Crescimento (A) e TFDa com TPI de 15 minutos (B) de cepas clínicas de *Candida albicans*.

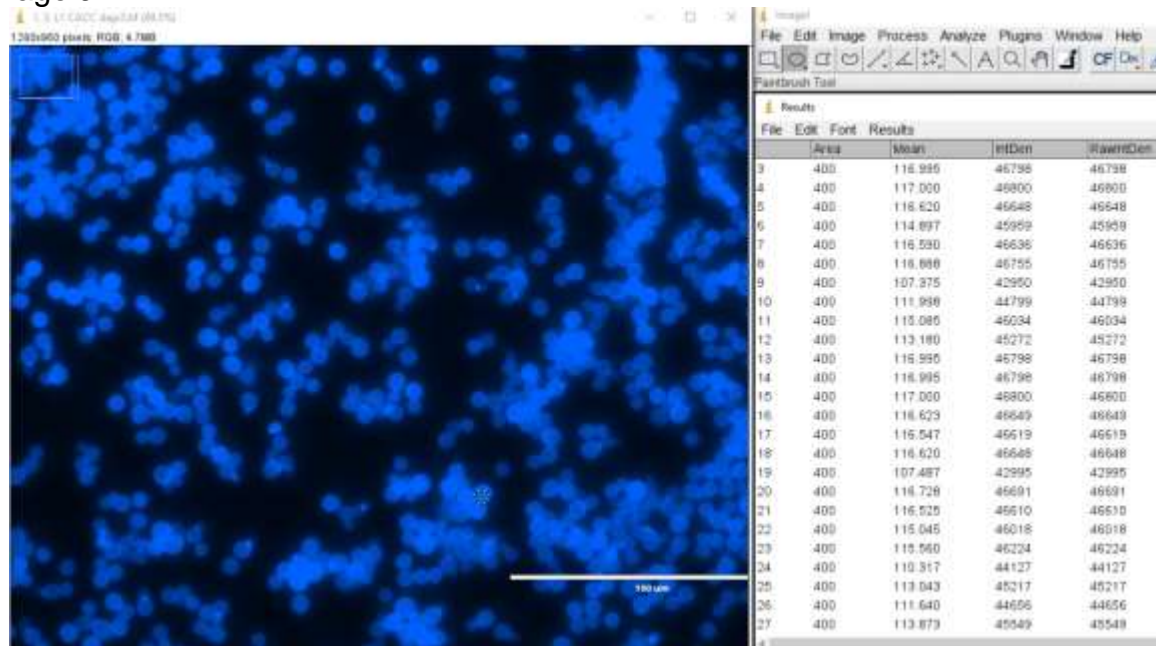


Fonte: Elaborada pelo autor

3.10.1.2 Presença de quitina na parede celular dos microrganismos

O programa *Image J*, versão 1.5n1, foi utilizado para formatar as imagens em 8 bits, obter as variantes binárias e analisar as partículas, dando contorno e numeração às células. Visto que o tamanho médio das unidades fúngicas do estudo foi de 400 *pixels* quadrados, utilizou-se 100 células com essas dimensões para determinar intensidade de fluorescência, de modo que os resultados de *Integrated Density* não tivessem interferência pela variação de área dos fungos (Figura 14)

Figura 14 - Cepas clínicas de *Candida albicans* por DAPI analisadas em Software Image J



Fonte: Elaborada pelo autor

3.10.2 Membrana plasmática fúngica

3.10.2.1 Inóculos preparados com Ergosterol

A ação das terapêuticas na degradação da membrana plasmática fúngica foi avaliada por meio de ensaio com Ergosterol (SigmaAldrich, São Paulo, Brasil) (Figura 17). Para isso, inóculos foram preparados na mesma concentração de microrganismos dos demais testes (1×10^6 células por mL), diferindo entre si apenas pela presença ou ausência de Ergosterol exógeno. No caso dos poços das triplicatas destinados a receber o produto, a concentração ideal do Ergosterol foi de 400 $\mu\text{g/mL}$ dentro do poço, imersos por meio dos 100 μL do inóculo depositado.

Os grupos do experimento foram constituídos pelos mesmos volumes e composições evidenciados nos demais testes (Quadro 3). Da mesma forma, a Nistatina foi empregada na CIM padronizada, anteriormente, para *Candida albicans* ATCC 90028 e Clínica PLLA 01, no caso, únicas cepas utilizadas no presente experimento.

3.10.2.2 Microdiluição e contagem das Unidades Formadoras de Colônias

Após os tratamentos aplicados, o ensaio deu sequência utilizando a técnica de microdiluição, com o objetivo de gerar diluições seriadas em 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} para posterior plaqueamento. Dessa forma, 100 μL do poço de cada triplicata foram removidos e imersos em tubos de ensaio contendo 900 μL de CSD, resultando numa diluição de 10^{-3} . Em seguida, 100 μL da solução formada foram adicionados à 900 μL de CSD, gerando a diluição de 10^{-4} , sendo, então, esse processo repetido até a última diluição proposta (Figura 15).

Figura 15 - Diluição para Plaqueamento em 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}



Fonte: Elaborada pelo autor

Placas foram anteriormente preparadas, de modo que 24 mL de ASD fossem distribuídos homogeneamente em todas as unidades. A partir das diluições mencionadas, 50 μL foram retirados e distribuídos nas respectivas placas padronizadas e incubadas a 35 °C por 24 horas (FREIRES et al., 2014; LIMA et al., 2013).

De acordo com o crescimento de colônias apresentado pelas placas incubadas, a diluição escolhida para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi de 10^{-5} , por critérios de praticidade e confiabilidade (Figura 16).

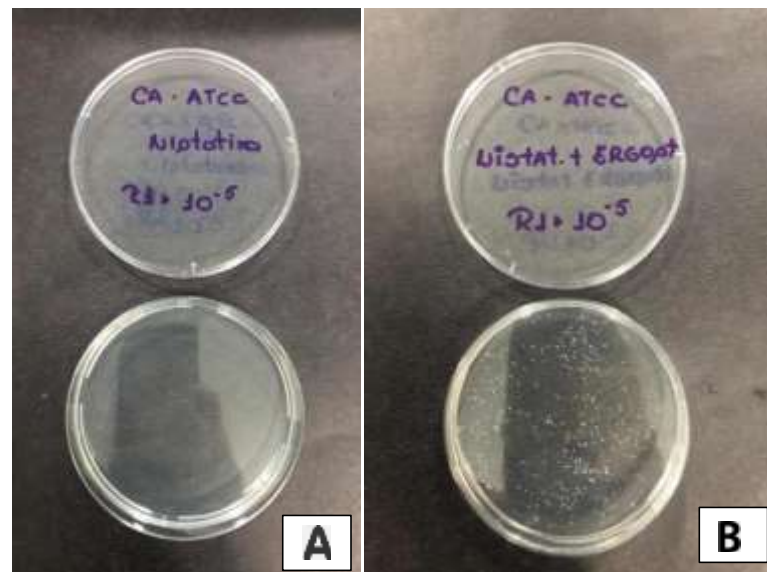
Figura 16 - Crescimento de Colônias em Diluição de 10^{-5} perante demais diluições



Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, nos grupos em que o tratamento tem potencial efeito deletério sobre a membrana plasmática do fungo, as placas com presença de Ergosterol exógeno obtiveram um maior crescimento de UFCs que nas placas com o produto ausente (Figura 17). Esse resultado é esperado devido a ligação do tratamento ao esterol, composto estruturante natural da membrana plasmática de *Candida* (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2014).

Figura 17 - UFCs de *Candida albicans* na ausência (A) e presença (B) de Ergosterol (10^{-5})



Fonte: Elaborada pelo autor

3.11 Análise dos dados

Os dados referentes aos experimentos de Concentração Celular e de Estrutura de Suporte com uso de Ergosterol (Membrana Plasmática) foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel e analisados no *Software* Estatístico SPSS (versão 18). Nesses mesmos programas também foram avaliados os resultados obtidos dos ensaios de Morfologia Celular e de Estrutura de Suporte com Calcofluor White (Parede Celular), após o processamento das imagens no Software ImageJ (1.51p).

A análise estatística foi, primeiramente, realizada com a transformação logarítmica dos dados, seguida pela comparação de mais de dois grupos com o teste paramétrico One-way ANOVA e, nas comparações múltiplas com o Two-way ANOVA. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

4 ARTIGOS I

Apresentação do Artigo I

Após as devidas considerações da banca avaliadora sobre esse trabalho, o artigo sob título “Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre a morfologia de *Candida* spp padrão e isolados de pacientes imunocomprometidos.” será submetido ao periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (ISSN: 1572-1000; Fator de Impacto: 3.631; Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no Anexo A.

Artigo a ser submetido

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE A MORFOLOGIA DE *Candida* spp PADRÃO E ISOLADOS DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS.

Isabella Jardelino Dias^{a*}, Ricardo Dias de Castro^b, Lúcio Roberto Cancado Castellano^c, Kênio Costa de Lima^d, Danielle da Nóbrega Alves^b, Daliana Queiroga de Castro Gomes^a

^a Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, Brasil.

^b Departamento de Clínica e Odontologia Social, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil.

^c Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil.

^d Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Natal, RN, 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: isabellajardelino@gmail.com

Resumo

Antecedentes: O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre a morfologia de *Candida* spp padrão e isolados de pacientes imunocomprometidos.

Métodos: Experimentos *in vitro* foram realizados com *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, representados por isolados clínicos de pacientes com LLA e por estirpes ATCC e CBS. A Concentração Inibitória Mínima da Nistatina foi realizada para posterior análise de concentração e morfologia celular. Os grupos no estudo foram: G1 - Controle de Crescimento; G2 - Irradiação Vermelha; G3 - Azul de Metileno com exposição de 20 minutos; G4 - TFDa com Tempo de Pré-Irradiação de 15 minutos; G5 - TFDa com TPI de 20 minutos; G6 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 15 minutos; G7 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos; G8 - Nistatina. A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm, densidade de potência de 3,57 mW/cm² e com energia de 5,0 J e densidade de energia de 178,5 J/cm². A concentração do Azul de Metileno foi de 0,1%. Os testes foram processados no *software Image J* e SPSS Anova, com significância de 5%.

Resultados: Cepas clínicas de *Candida krusei* obtiveram a concentração mais elevada após os tratamentos ($p < 0,001$). A TFDa foi mais efetiva que o tratamento com Nistatina para microbiotas clínicas, reduzindo a concentração, área, densidade cromática e reprodução assexuada.

Conclusão: A TFDa apresentou-se como um recurso relevante para tratamento, *in vitro*, de fungos resistentes à terapêuticas convencionais.

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

1. Introdução

Estima-se que, de cinco milhões de espécies de fungos presentes no meio ambiente, trezentas são capazes de estabelecer doenças em hospedeiros mamíferos. Em humanos, infecções ocasionadas por esses microrganismos determinaram a morte de 1,5 milhões em todo o mundo [1].

Considerados patógenos oportunistas, leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas nas mucosas vaginal, gastrointestinal e oral, bem como na pele. Em situações que ocasionam doenças, podem se manifestar com intensidades variadas, atingindo até mesmo risco de morte por complicações sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos [1,2-5].

Entre outras repercussões, a vulnerabilidade imunológica propicia a ruptura com a homeostasia corpórea e, assim, o aparecimento de sinais e sintomas clínicos de candidose que, quando localizada no sistema estomatognático, denomina-se de candidose oral. Nesses casos, estruturas anatômicas como o epitélio superficial da mucosa do palato e dorso da língua são os sítios orais mais acometidos [1,4,5].

Visando o potencial de dano das espécies *Candida*, as drogas antifúngicas atuaram durante anos de modo eficaz no combate à candidose oral, tornando-a reconhecidamente como uma doença de fácil cura. No entanto, essa perspectiva tem mudado à medida que a prescrição e utilização desordenada de medicamentos, aliada à escassa diversidade farmacêutica disponível no mercado, desencadearam a deficiência dos atuais tratamentos tradicionalmente aplicados [6-8].

A Nistatina, um macrólito polieno isolado a partir da estirpe bacteriana *Streptomyces noursei*, é um medicamento popular na área, devido a fatores como aplicabilidade e custo-benefício [9]. No entanto, a falta de consenso técnico sobre a formulação, dosagem e período ideal de tratamento, além de constantes relatos quanto à resistência a penetração e efeito da droga, têm sido obstáculos veementes no processo de cura mediante a prescrição do fármaco [1,6,7,10].

Essa condição é maximizada quando a candidose oral atinge indivíduos em estados críticos de saúde como acometidos por pneumonia, asma, tuberculose, doenças autoimunes, infecção por HIV ou neoplasias [1,6,8,11,12]. Além disso, as complicações fúngicas são mais evidentes quando os distúrbios imunocomprometedores expressam-se em pacientes com baixa faixa etária, como ocorre na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). Fatores como natureza da doença,

agressividade dos tratamentos recebidos e vulnerabilidade própria do sistema biológico infantil, elucidam o alto impacto da candidose nesses indivíduos [13,14].

Enfermidades imunossupressoras, como a LLA, podem deliberar repercussões na saúde bucal com complicações como doença periodontal, mucosite, disgelsia, dores articulares, osteorradionecrose e candidose oral. Devido a fatores como alteração do sistema imunológico, hipossalivação e condições precárias de higiene oral, a elevada disseminação fúngica determina factuais riscos à manutenção da vida por parte daqueles acometidos por essa condição [14-16]. Dessa forma, a busca por terapêuticas alternativas que apresentem eficácia no tratamento da candidose oral, inclusive em pacientes imunocomprometidos, é o desafio de diversas pesquisas laboratoriais e clínicas da área. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) tem se apresentado dentro desse critério, com ação imediata e específica sobre os microrganismos, demonstrado pela alta susceptibilidade à terapêutica, embora os protocolos energéticos ainda sejam objetos atuais de estudo [1,7,8,17,18].

A TFDa consiste numa fototerapia composta por uma luz visível não tóxica, com um comprimento de onda específico (vermelho), aplicado sobre um agente químico fotossensibilizador (FS) que, por sua vez, atuará sobre biomoléculas e oxigênios locais, ocasionando possível erradicação dos microrganismos presentes [19].

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar, *in vitro*, o efeito da TFDa sobre a morfologia de *Candida* spp. padrão e isolados de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda.

2. Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos

Os experimentos foram realizados com microrganismos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. As cepas utilizadas foram representadas por isolados clínicos retirados de pacientes em fase de quimioterapia para tratamento de LLA e por estirpes de referência do tipo *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS). O processo de identificação da microbiota clínica foi realizado em estudo anterior [20]. Essa avaliação efetivou-se por meio de impressão digital molecular, pela Reação em Cadeia de Polimerase

(PCR) com o Kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, Waltham, MA, USA), e pelo método cromógeno CHROMagar *Candida*™ (BD™ CHROMAGAR™ *Candida*, Paris, França) [21].

2.2 Viabilidade dos Microrganismos

A viabilidade celular foi analisada para dispor do potencial de patogenicidade das cepas fúngicas, para posterior utilização nos experimentos. Dessa forma, uma alíquota de cada microrganismo foi removida das placas de subcultura e suspensa em 1 mL de CSD, sendo em seguida, agitados em vórtex. Em microplaca de microtitulação estéril de 96 poços (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia, SP, Brasil), fundo U, foi adicionado 300 µL da alíquota e incubada à 35°C por 24 horas. Após esse período, as placas foram visualmente avaliadas, observando se havia atividade celular expressa por crescimento fúngico (turbidez) em fundo de placa [22].

2.3 Concentração dos Inóculos

Os inóculos preparados para os experimentos foram realizados em triplicata. Dessa maneira, cinco colônias com diâmetro de ~1mm foram escolhidas das placas de subcultura e suspensas em 5 mL de CSD estéril. Após esse processo, as triplicatas suspensas foram agitadas em vórtex durante 15 segundos [22]. Em seguida, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) com comprimento de onda ajustado em 530 nm, acrescentando CSD à suspensão recém preparada até obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Para essa finalidade, a absorbância referência indicada no espectrofotômetro para o inóculo deveria ser de 0,08 a 0,13, obtendo, assim, uma suspensão padrão de levedura de 1×10^6 células por mL, concentração essa ideal para os testes de patogenicidade do presente estudo [22].

2.4 Grupos Experimentais e Controles

A partir das suspensões padronizadas de *Candida* spp, foram realizados ensaios de acordo com os seguintes grupos experimentais e controles: G1 - Controle de Crescimento; G2 - Irradiação Vermelha; G3 - Azul de Metileno com exposição de

20 minutos; G4 - TFDa com Tempo de Pré-Irradiação (TPI) de 15 minutos; G5 - TFDa com TPI de 20 minutos; G6 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 15 minutos; G7 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos; G8 - Nistatina. Além desses, os experimentos foram submetidos a um grupo controle de esterilização, composto por meio nutritivo de CSD.

2.5 Terapia Fotodinâmica

A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP *Therapy XT* (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), no feixe de irradiação vermelha. Segundo informações do fabricante, o comprimento de onda (λ) utilizado foi de 660 nm \pm 10 nm, incidido com potência útil de 100 mW \pm 20%, com diâmetro da ponteira do aparelho (área de spot) correspondendo a 0,028 cm² [23]. A densidade de potência utilizada foi 3,57 mW/cm², com energia 5,0 J, resultando numa densidade de energia (dose) de 178,5 J/cm² durante a aplicação. A emissão do laser foi contínua e com modo de operação pontual, cuja ponteira do equipamento foi posicionada perpendicularmente à microplaca, no diâmetro de abertura de cada poço. O AM, FS aplicado para sensibilização de *Candida spp* pela TFD, foi manipulado por farmácia de manipulação local e utilizado na concentração de 0,1% (Dilecta, João Pessoa, PB, Brasil). A ambientação escura foi preconizada para manuseio do AM, tanto no TPI como na aplicação da irradiação laser [24].

2.6 Triplicatas e Anteparos

Para os testes de patogenicidade, os experimentos foram realizados em triplicata para todos os grupos estabelecidos. Além disso, espaçamentos físicos entre grupos experimentais e controles de um mesmo microrganismo foram preconizados na microplaca, sendo também confeccionados anteparos de silicone preto (TEKBOND, São Paulo, SP, Brasil) para essa função. Essas borrachas foram inseridas nos poços adjacentes às triplicatas que receberam irradiação laser, dessa forma, evitou-se a possibilidade de sobreposição de irradiação.

2.7 Concentração Inibitória Mínima de Nistatina

O método de Microdiluição em Caldo [22] foi empregado para obter a CIM da Nistatina, perante cada cepa utilizada. Inicialmente, o inóculo foi preparado na concentração de 1×10^6 células por mL e a Nistatina na concentração de 1,0 mg/mL. A CIM foi realizada em triplicata sendo, primeiramente, inserido 100 μ L de CSD em todos os poços da microplaca. Então, 100 μ L de Nistatina foi adicionado ao primeiro poço, dando seguimento à microdiluição, com transferência de 100 μ L do conteúdo do poço inicial para o adjacente, sendo repetido até o último poço da microplaca. Após a conclusão dessa etapa, inseriu-se 100 μ L do inóculo específico em todos os poços, resultando numa concentração final de 60 a 0,4 μ L/mL do medicamento, respectivamente, do primeiro ao último poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C, de modo que o período necessário para a Nistatina atingir seu efeito máximo foi respeitado. A obtenção dos resultados ocorreu por observação visual de agregados de células no fundo dos poços [25].

2.8 Análise da concentração celular

A análise da Concentração Celular foi realizada em triplicata, por meio de espectrofotômetro, com o objetivo de quantificar os microrganismos após os tratamentos aplicados. Para a leitura de absorvância dos grupos contendo AM, o aparelho foi zerado com uma cubeta contendo AM e CDS, na proporção 1:3, a mesma proporção utilizada nos poços dos referidos grupos. Já para grupos não constituídos por AM, a cubeta de referência (branca) para zeragem do aparelho foi preenchida apenas com 1 mL de CSD. Essa diferenciação no processo de tara, para posterior leitura da concentração celular, tornou a comparação dos resultados possível, excluindo assim os meios presentes e evidenciando apenas os microrganismos.

2.9 Análise da Morfologia Celular

2.9.1 Preparo laboratorial das lâminas e visualização em microscópio

Após os inóculos padronizados serem preparados na concentração de 1×10^6 células por mL e os tratamentos realizados, 150 μ L de cada triplicata foram removidos

e centrifugados por 15 minutos, na velocidade de 1500 rpm (Daiki, Presidente Prudente, SP, Brasil). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e duas etapas de limpeza foram promovidas, com a adição consecutiva de 75 μL e 30 μL de solução salina (NaCl), sendo o composto centrifugado por 10 minutos e removido o sobrenadante após cada uma dessas etapas. Por fim, 50 μL de NaCl foram adicionados, e a solução centrifugada por 10 minutos com o intuito de formar um volume que dispusesse 10 μL de volume aplicados sobre lâmina de vidro [26]. As lâminas foram visualizadas no Microscópio Digital Invertido EVOS FL (AMG, Bothell, WA, EUA) sob campo claro (BF), com ampliação de 40x e intensidade de luz de 20%.

2.9.2 Análise da área, densidade cromática e reprodução por brotamento

O programa *Image J*, versão 1.5n1, foi utilizado para o processamento das imagens em BF obtidas pelo Microscópio Digital Invertido. Para as análises da área, densidade cromática e incidência de reprodução assexuada, a função *Analyze Particles* foi acionada para proporcionar o contorno, isolamento e enumeração de todas células da imagem, excluindo possíveis ruídos que estivessem presentes [27]. Para os dados de área (*Area*) e densidade cromática (*Integrated Density*), expressos em *pixels* quadrados e *pixels*, respectivamente, 100 células fúngicas foram escolhidas de cada lâmina, com o propósito de verificar se houve dano estrutural após as terapias aplicadas. Afim de evitar interferências nos resultados quanto à densidade cromática, o tamanho dos fungos analisados foram fixados em 400 *pixels* quadrados, dimensão médias das unidades celulares encontradas nas imagens. Já o potencial de inibição de reprodução propiciado pelos tratamentos foi aferido por meio do quantitativo de brotos nas imagens. Esse estudo realizou-se pela proporção do número de brotos presentes na lâmina para cada 100 células fúngicas totais.

2.10 Análise de dados

Os dados referentes aos experimentos de Concentração Celular foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel e analisados no *Software* Estatístico SPSS (versão 18). Nesses mesmos programas também foram avaliados os resultados obtidos dos ensaios de Morfologia Celular, após o processamento das imagens no *Software Image J* (1.51p). A análise estatística foi, primeiramente, realizada com a

transformação logarítmica dos dados, seguida pela comparação de mais de dois grupos com o teste paramétrico One-way ANOVA e, nas comparações múltiplas com o Two-way ANOVA. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

3. Resultados

A análise da Concentração Inibitória Mínima da Nistatina foi realizada para a posterior utilização das concentrações específicas nos experimentos da pesquisa, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela. 1 Concentração Inibitória Mínima da Nistatina de acordo com as Espécies de *Candida* ($\mu\text{g/mL}$).

	CIM	
	PADRÃO	CLÍNICO
Candida albicans	7,50	3,75
Candida tropicalis	3,75	3,75
Candida krusei	7,50	3,75

A quantificação de microrganismos dos grupos experimentais e controles foram avaliados pela Concentração Celular em espectrofotômetro. Dessa forma, *Candida krusei* obteve a concentração mais elevada entre as cepas clínicas e padrão, após os tratamentos aplicados, seguido, respectivamente, por *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, com diferença significativa ($p < 0,001$). Além disso, observou-se que a concentração total de fungos foi maior entre as cepas clínicas que padrão (Tabela 2).

Tabela. 2 Múltipla Comparação: Concentração Celular em Espectrofotômetro.

	CONCENTRAÇÃO CELULAR			
	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
Candida albicans	0,47		0,65	
Candida tropicalis	0,65	< 0,001	0,73	< 0,001
Candida krusei	0,77		0,93	
Total	1,89		2,31	

Perante o mesmo experimento, cepas padrão e clínicas apresentaram resultados semelhantes após os tratamentos específicos. Dessa forma, os grupos com aplicação da TFDa obtiveram as menores concentrações de microrganismos, não havendo diferença significativa pela variação do TPI ou associação com Nistatina ($p = 1,00$) (Tabela 3). De modo geral, o uso da Nistatina isolada apresentou redução de concentração inferior e sucessiva à TFDa ($p < 0,001$), diferindo apenas em *Candida albicans* padrão, cujo efeito do fármaco foi relevante (Fig. 1)

Tabela. 3 Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni).

TIPO DE TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO CELULAR			
	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
CC	1,23	< 0,001	1,56	< 0,001
LASER	1,19	< 0,001	1,45	< 0,001
AM	0,80	< 0,001	1,08	< 0,001
TFD 15	0,37	1,00	0,34	1,00
TFD 20	0,35	1,00	0,34	1,00
TFD 15+N	0,30	1,00	0,31	1,00
TFD 20+N	0,32	1,00	0,33	1,00
NISTATINA	0,48	< 0,001	0,78	< 0,001

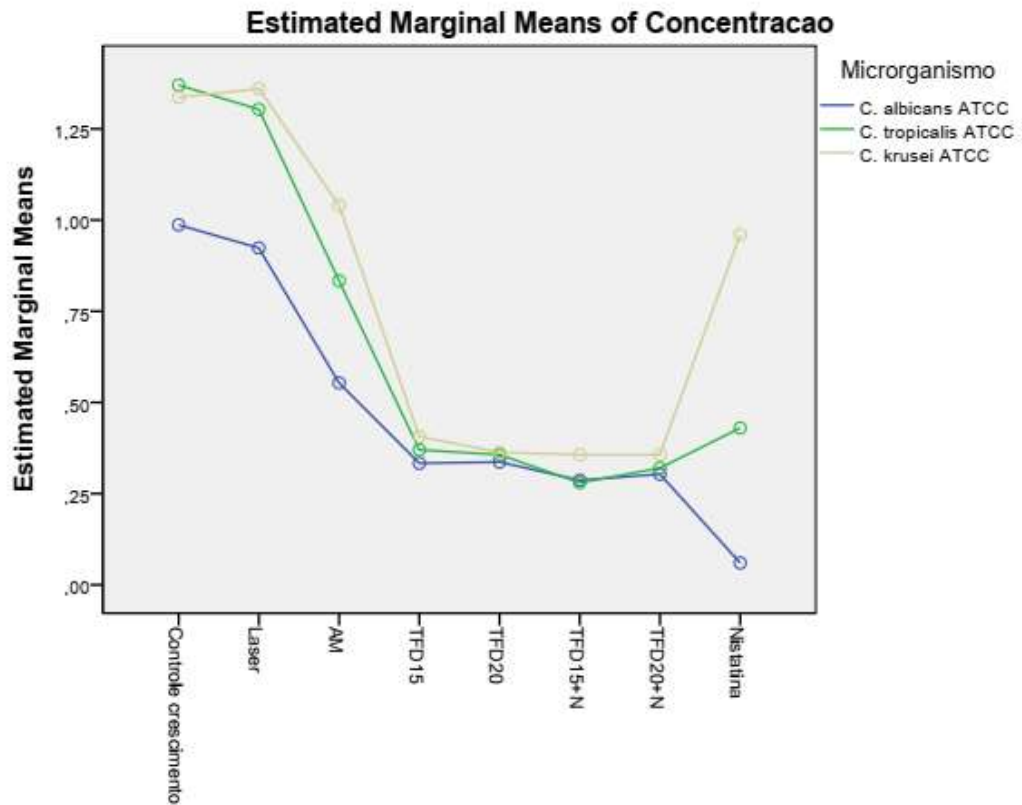


Fig. 1 Concentração Celular de Microrganismos Padrão.

Por meio da avaliação da Morfologia Celular pode-se examinar a redução de área, densidade cromática e reprodução assexuada de *Candida*, bem como a forma celular das cepas. Nas imagens formadas em campo claro (BF) (Fig.2), *Candida albicans* e *tropicalis* apresentaram-se como blastoconídeos e pseudo-hifas, enquanto *Candida krusei*, que além de expressarem-se nas morfologias anteriormente citadas, apresentaram-se também como hifas.

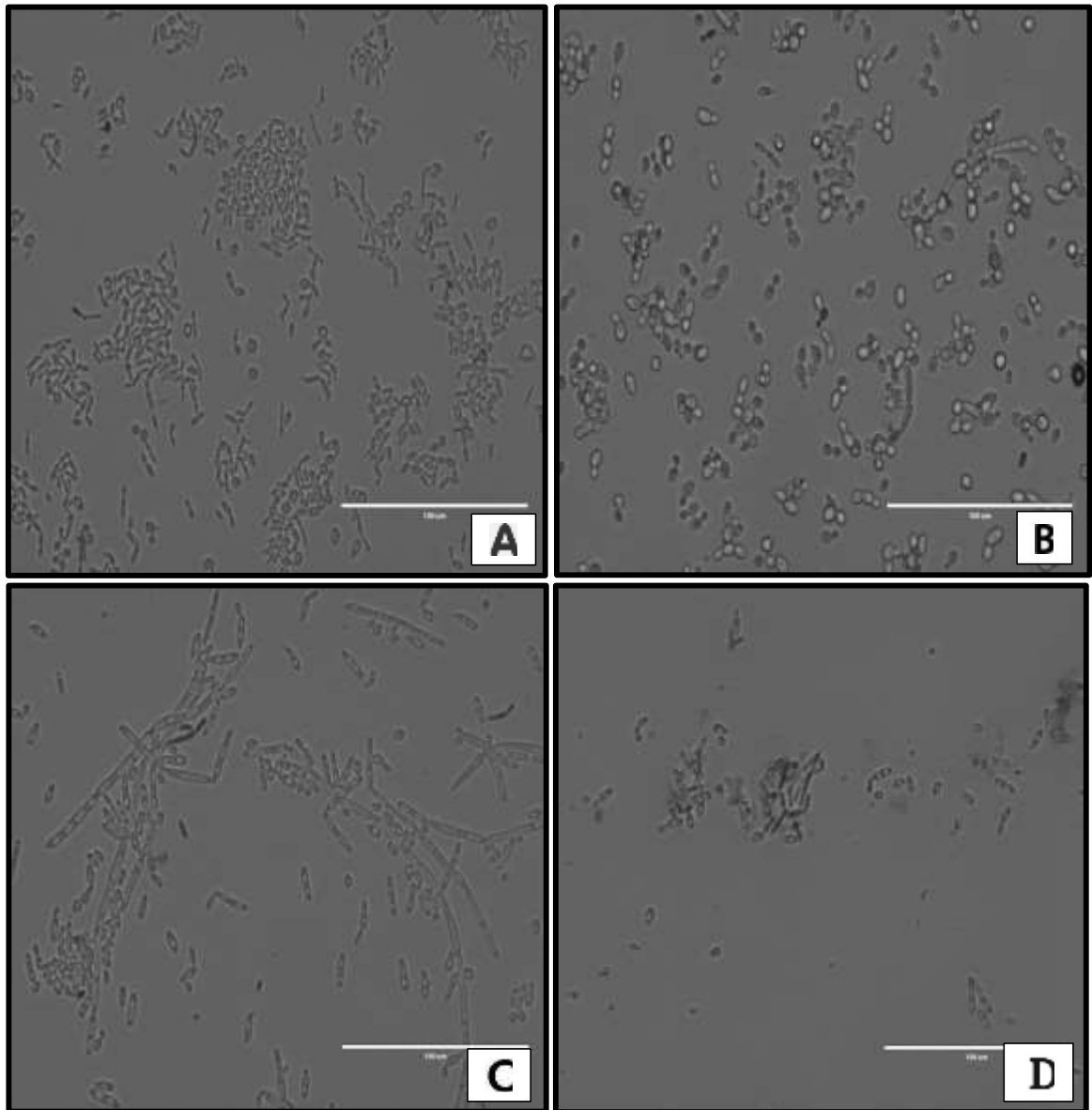


Fig. 2 Controle de Crescimento de *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B) e *Candida krusei* (C) demonstrando a Morfologia Celular. Análise quanto a Área, Densidade cromática e Reprodução de *Candida krusei* após aplicação de TFD com TPI de 15 minutos (D). Imagens de cepas padrão em BF.

Quanto aos demais fatores avaliados pelo teste, a espécie *albicans* clínica indicou as maiores proporções apresentadas quanto a área e densidade cromática, sucedida por *Candida tropicalis* e *Candida krusei* ($p < 0,001$). Já os resultados em cepas padrão foram diferentes destes, sendo *Candida krusei* os maiores valores ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 Múltipla Concentração de Área e Densidade Cromática de Cepas Clínicas (Post Hoc Tests/Bonferroni).

	PADRÃO			CLÍNICO		
	ÁREA	DENSIDADE	p-Value	ÁREA	DENSIDADE	p-Value
<i>Candida albicans</i>	200,9	43033	< 0,001	386,4	97643	< 0,001
<i>Candida tropicalis</i>	308,1	70363		379,4	51282	
<i>Candida krusei</i>	410,9	94722		241,1	60787	

A redução de Área também foi analisada de acordo com aos grupos propostos. As TFDa expressaram os valores mais baixos quanto à Área, sendo a Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos, o tratamento mais pertinente contra cepas padrão ($p < 0,001$), seguido pelos resultados equivalentes de Nistatina isolada e demais grupos com aplicação de TFDa ($p > 0,05$). No que concerne aos microrganismos clínicos, a Nistatina apresentou efeito semelhante a aplicação do laser isolado ($p = 1,00$), sendo este acentuadamente inferior ao dos tratamentos com utilização de TFDa ($p < 0,001$) (Tabela 5) (Fig.3).

Tabela 5 Comparação Múltipla: Grupos com uso de Nistatina como referência
ÁREA

TIPO DE TRATAMENTO	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
CC	592,1	< 0,001	574	0,01
LASER	459,8	< 0,001	502,2	1,00
AM	330,2	1,00	373,8	0,03
TFD 15	240,6	1,00	219,6	< 0,001
TFD 20	203,6	0,38	183,7	< 0,001
TFD 15+N	193,7	0,20	196,1	< 0,001
TFD 20+N	128,3	< 0,001	165,8	< 0,001
NISTATINA	304,8		469,4	

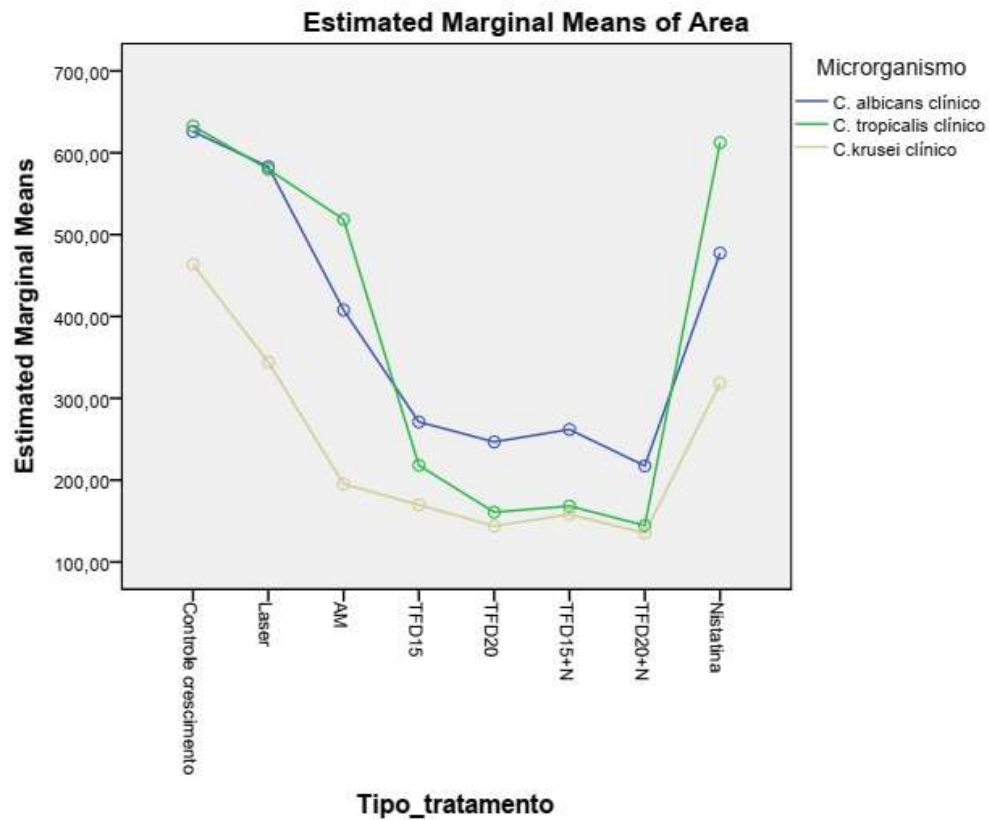


Fig. 3 Efeito Similae entre Nistatina e o uso de Laser isolado em cepas clínicas.

Quanto densidade cromática de microrganismos *Candida*, os grupos tratados com TFDa obtiveram os resultados mais baixos e relevantes, independente do TPI e da associação com o medicamento controle ($p > 0,05$). Entretanto, em cepas padrão, a Nistatina apresentou efeito semelhante às TFDa ($p > 0,05$), sendo esse resultado diferenciado da densidade cromática expressa por cepas clínicas tratadas com o fármaco, cujos valor foi inferior apenas ao Controle de Crescimento e com uso do Laser isolado ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 6 Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni)

TIPO DE TRATAMENTO	DENSIDADE CROMÁTICA			
	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
CC	139268	< 0,001	146262	< 0,001
LASER	112375	< 0,001	127563	< 0,001
AM	81912	< 0,001	56541	0,01
TFD 15	57879	> 0,05	40979	1,00
TFD 20	43581	> 0,05	37088	1,00
TFD 15+N	38107	> 0,05	37486	1,00
TFD 20+N	27490	> 0,05	32249	1,00
NISTATINA	54367	> 0,05	81068	< 0,001

Acerca da intervenção dos tratamentos no ciclo de reprodução assexuada dos fungos, os grupos com TFDa apresentaram a menor proporção de brotos, sendo o resultado semelhante com TPI variado e com a associação com a Nistatina ($p=1,00$). Em síntese, os grupos de Nistatina, AM, Laser e Controle de Crescimento foram numericamente consecutivos às TFDa, para cepas padrão e clínicas (Fig. 4 e 5).

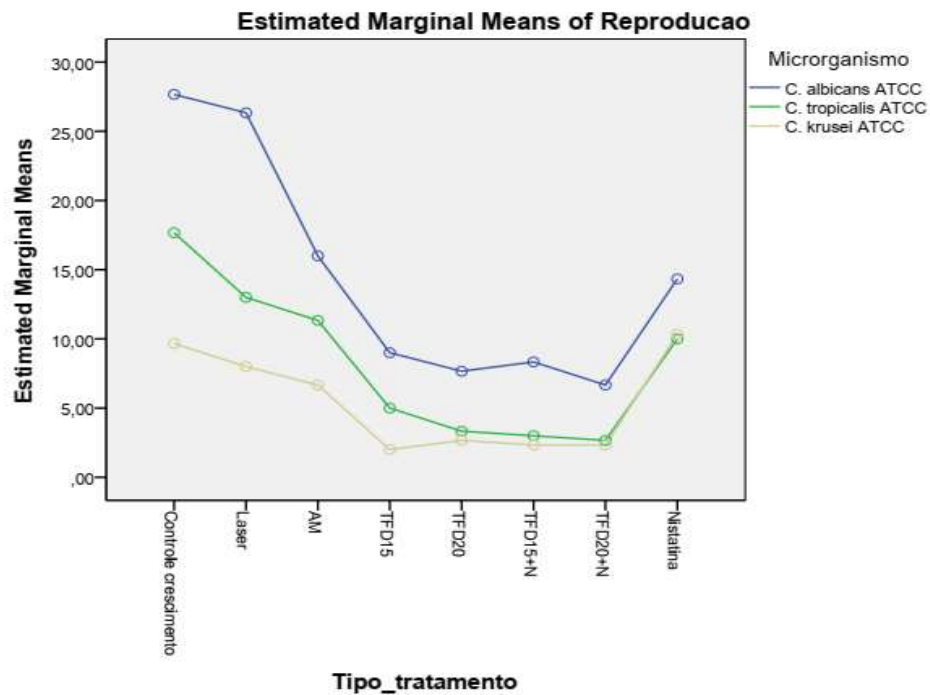


Fig. 4 Reprodução Assexuada de Cepas Padrão.

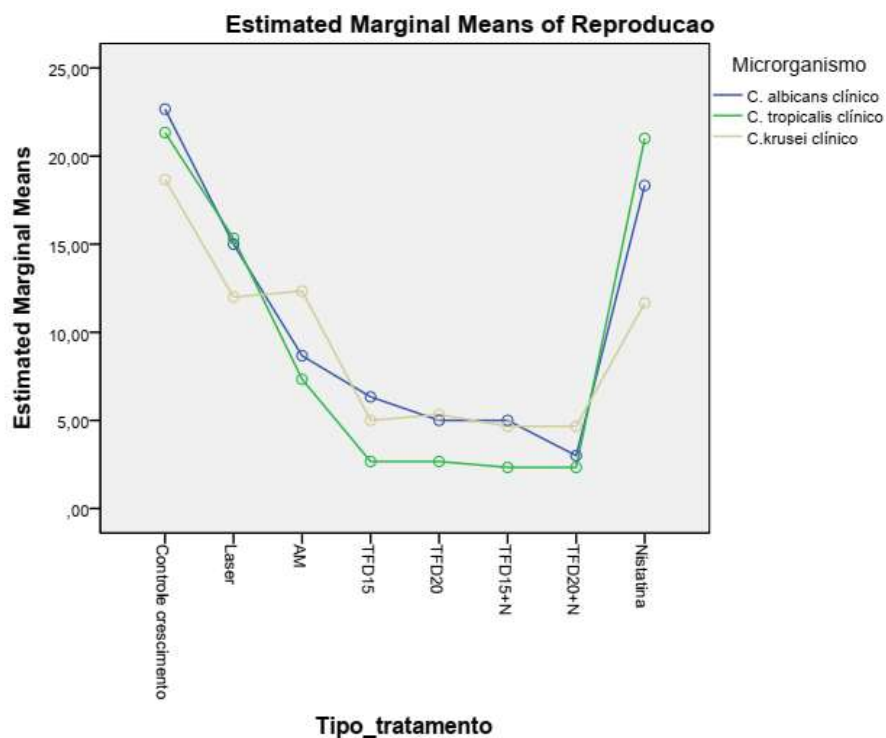


Fig. 5 Reprodução Assexuada de Cepas Clínicas.

3. Discussão

A TFDa apresentou os resultados mais relevantes do estudo quanto à redução de concentração celular e potencial de dano às estruturas morfológicas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*. Esses dados foram consolidados tanto no tratamento de cepas padrão ATCC e CBS como de espécies oriundas de pacientes imunocomprometidos, não dependendo de variação no TPI ou associação com medicamentos alopáticos para expressar a efetividade da terapêutica.

Do mesmo modo, a Nistatina foi avaliada perante os fatores mencionados e demonstrou capacidade inferior de agressão aos microrganismos quando comparado à TFDa, principalmente nos experimentos com cepas clínicas.

Sabe-se que, a habilidade do fungo de desenvolver quadros patológicos varia de acordo com a interação com o hospedeiro. Considerada uma microbiota comum na cavidade oral, *Candida* spp beneficia-se do conhecimento biológico adquirido durante a fase comensal para tornar-se prejudicial e adaptável às defesas imunológicas humanas, em situações de quebra de homeostasia corpórea [28,29]. Além disso, a patogenicidade do microrganismo é influenciada por mutações do seu próprio genoma, sendo esses eventos decorrentes das cíclicas infecções em mamíferos e da atuação de estressores ambientais, como as drogas antifúngicas [30,31].

Dessa forma, o alto nível de plasticidade do genoma proporciona às espécies clínicas um maior potencial de defesa contra tratamentos, bem como a manutenção da própria resistência adquirida [32]. Essa prerrogativa, possivelmente, fundamenta as divergências encontradas entre cepas padrão e clínicas no teste de concentração celular da pesquisa, sendo essas últimas numericamente mais elevadas após as terapêuticas aplicadas.

Ademais, as manifestações de patogenicidade de microrganismos *Candida* também dependem da prevalência e do potencial de dano das espécies presentes. Apesar de *Candida albicans* ser quantitativamente majoritária em quadros clínicos comuns de candidose, outras espécies demonstram atual importância na severidade da infecção. Essa mudança tem sido associada a fatores como prescrições medicamentosas e a ascensão quantitativa de imunocomprometidos [33].

Estudos anteriores [34,35] classificaram as espécies *Candida* de acordo com a incidência em quadros clínicos sistêmicos e o potencial de patogenicidade,

representado pela capacidade de dano e resistência à tratamentos. Assim, três grupos foram estabelecidos, cujas espécies *albicans* e *tropicalis* apresentaram-se com incidência e patogenicidade mais elevadas, seguidas por *glabrata* e *parapsolosis* e, por fim, por *Candida krusei*, presente em apenas 4% das infecções. Esses dados coincidem com os achados dos experimentos de morfologia celular, nos quais estirpes clínicas de *Candida albicans* foram resistentes aos tratamentos ao não expressarem repercussões relevantes quanto à sua integridade celular, retratadas pelos valores mais avançados quanto à área e densidade cromática da estrutura celular.

Embora *Candida krusei* apresente-se, na classificação [34,35] com uma das cepas com menor potencial de patogenicidade, a estirpe expressou os patamares mais elevados quanto à concentração de cepas padrão e clínicas, após os tratamentos da presente pesquisa. Além disso, as estirpes clínicas *krusei* apresentaram resultados superiores a *Candida tropicais* quanto à densidade cromática da estrutura celular, indicando uma modificação efetiva no volume do conteúdo citoplasmático. A justificativa para essa atuação distinta de *Candida krusei*, respalda-se no fato da classificação retratar o comportamento de cepas em indivíduos com imunidade regular, enquanto que o experimento utilizou microbiotas provenientes de estados de imunocomprometimento, cuja predominância da espécie em infecções de pacientes com neoplasia chega a 90% dos casos [34,36], inclusive com maior resistência à tratamentos convencionais [35,37].

A elevada patogenicidade de *Candida krusei* em pacientes imunocomprometidos também foi endossada pela forma celular que os microrganismos se apresentaram nas imagens em campo claro. De modo geral, espécies *Candida* podem identificar-se na forma de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas, tendo cada morfologia uma importância específica nas etapas e, assim, na intensidade da infecção em humanos. Nas imagens referidas, estirpes de *Candida krusei* mostraram-se presentes em todas as formas, determinando a possibilidade de, perante as morfologias respectivamente citadas, iniciar a fixação e disseminação em estruturas corpóreas, introduzir a formação de biofilmes fúngicos e, por fim, agravar estados clínicos pela penetração em profundidade nos tecidos, além de intensificar as etapas anteriores [37,38]. No que se referem às formas morfológicas das demais espécies estudadas, *Candida albicans* e *tropicalis* expressaram-se de modo limitado, apenas como blastoconídeos e pseudo-hifas, sem o potencial de agravamento de infecções próprias de hifas.

Afora as informações desenvolvidas pelo estudo sobre as características de espécies *Candida*, resultados relevantes sobre os tratamentos aplicados também foram obtidos. Desse modo, o teste de concentração celular foi determinante para avaliar o poder de destruição fúngica de cada tratamento, enquanto que, as análises de morfologia celular indicaram o impacto que as terapêuticas incidiram sobre a integridade celular e o ciclo de reprodução dos fungos.

Considerada uma técnica rápida e de baixo custo, a análise de concentração celular em espectrofotômetro tem sido utilizada para quantificar diversos microrganismos em meio laboratorial, de modo preciso e simples [39]. Nessa instância, o método determinou a concentração de cepas existentes após os tratamentos propostos. Assim, a TFDa apresentou a menor densidade celular dentre os grupos, sendo o tratamento mais eficaz para a morte de microrganismos padrão e clínicos de *Candida* spp do estudo.

Em sequência de efetividade, a Nistatina exibiu resultados superiores aos demais grupos, mas não compatíveis com os patamares alcançados pela TFDa. A única cepa em que o fármaco obteve resultados satisfatórios e superiores à TFDa foi *Candida albicans* padrão, não ocorrendo o mesmo com as cepas clínicas da espécie. A resistência de cepas provenientes de pacientes imunocomprometidos, especialmente em intercurso de tratamentos antineoplásicos, são citados na literatura [40], inclusive em publicações anteriores que utilizaram as cepas clínicas do presente experimento [20].

Quanto às análises de área e densidade cromática da estrutura celular dos microrganismos, a mensuração desses dados foi o meio utilizado para aferir as repercussões das terapêuticas em relação à sugestiva modificação do volume citoplasmático por extravasamento de estruturas. Dessa forma, tratamentos com Nistatina e TFDa apresentaram os valores mais reduzidos de área e densidade em cepas padrão, sendo assim, as terapêuticas mais nocivas à integridade de *Candida* spp, não havendo diferença estatística entre as mesmas.

No entanto, fundamentado na prerrogativa que microrganismos padrão são mais susceptíveis à antifúngicos que microbiotas de ambientes orais, principalmente de imunocomprometidos, os resultados acima citados foram discrepantes com os dispostos por cepas clínicas, cuja TFDa foi o tratamento mais promissor e a Nistatina pouco efetivo. Assim, a eficácia do medicamento equiparou-se ao desempenho do

laser isolado, em análise de área, e superior apenas ao AM isolado, quanto à densidade cromática.

Os corantes fenotiazínicos, grupo ao qual o AM está inserido, são utilizados para fins medicinais há mais de um século, sendo o AM inicialmente aplicado para reestabelecer estados de malária [41]. No entanto, devido a sua atividade antimicrobiana reduzida, o emprego da substância isolada foi desestimulado pela descoberta de antibióticos e antifúngicos [42]. A atual reinserção do AM no mercado, agora com função fotossensibilizadora, deu-se pela popularização da TFDa como recurso contra microbiotas resistentes aos fármacos mencionados. Dessa forma, compreende-se que o uso isolado do AM não expressa eficácia antifúngica semelhante a TFDa e, remetendo aos resultados da pesquisa, demonstra a ação insatisfatória da Nistatina quanto tratamento, que, em termos de perda de integridade do arcabouço, foi inferior aos resultados do AM isolado em microrganismos clínicos.

Além desses indícios, a resistência de cepas clínicas de *Candida* spp à Nistatina foi evidenciada pelo efeito semelhante da droga e do laser isolado perante a mensuração de área fúngica. Tema ainda em discussão na literatura, a aplicação do laser de baixa potência, sem a presença de um FS, tem demonstrado atuação estimuladora positiva e até nula sobre o metabolismo de microbiotas e, portanto, sobre o crescimento e reprodução celular [43]. Em estudos *in vitro*, terapêuticas com uso de laser isolado tendem a apresentar efeito semelhante ao do controle de crescimento, ou seja, nulo, devido à ausência de cromóforos no meio [44]. Resultado similar a esse foi encontrado no presente trabalho, cujo efeito do laser isolado não gerou modificação quanto às dimensões do fungo, sendo similares aos parâmetros encontrados no controle de crescimento. Embora esses resultados sejam esperados, o diferencial encontrado foi a similaridade quantitativa dos dados da Nistatina quanto ao laser isolado, demonstrando o baixo potencial do medicamento em promover redução de área no arcabouço fúngico.

Com base no reconhecido mecanismo de atuação da Nistatina, que gera a morte dos fungos pela permeabilização da membrana plasmática e sequestro de Ergosterol [45] e diante dos valores de redução de concentração celular pela aplicação do fármaco no estudo, infere-se que a Nistatina foi eficaz na debelagem de *Candida* spp. No entanto, as cepas clínicas que resistiram ao tratamento pareceram não sofrer repercussões em sua integridade celular, fato não remetido à TFDa que, além de

ocasionar elevada redução de concentração celular, gerou danos à morfologia celular dos microrganismos.

No que se refere à ruptura do ciclo de reprodução celular, a TFDa apresentou a ação mais efetiva contra *Candida ssp*, representado pelo menor número de brotos presentes nas imagens. De modo geral, a variação no TPI e a associação com Nistatina não determinaram diferenças estatísticas entre os grupos com aplicação de TFDa, seja na reprodução assexuada do fungo ou em qualquer outro resultado do estudo.

Dessa forma, a aplicação do FS com um TPI reduzido pode beneficiar o atendimento clínico, tornando-o mais rápido, sem comprometer a eficácia da terapêutica. Além disso, nos testes em que os grupos com associação terapêutica obtiveram efeito estatisticamente similares a TFDa isolada e superiores à Nistatina, a atribuição desses resultados deve ser vinculada às propriedades antimicrobianas comprovadas da própria TFDa [46], cujo desempenho mostrou-se pontual frente à erradicação de *Candida spp*, bem como na fragilização na integridade celular de microrganismos resistentes.

4. Conclusão

Considerado um método inovador, a TFDa evidenciou ser um tratamento relevante ao atuar sobre cepas clínicas e padrão de *Candida albicans*, *tropicais* e *krusei*. Perante as terapêuticas utilizadas no estudo, a TFDa apresentou o resultado mais efetivos na redução de concentração celular, área, densidade cromática e formação de brotos reprodutivos. Em contraste, a Nistatina expressou efeitos insatisfatórios sobre parâmetros de morfologia, principalmente em microrganismos provenientes de imunocomprometidos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof^o Dr^o Paulo Rogério Ferreti Bonan pelo fornecimento dos microrganismos clínicos para o desenvolvimento do trabalho.

Contribuições dos autores

I.J.D. projetou, realizou experimentos, processou dados e escreveu o artigo; R.D.C promover assistência metodológica à pesquisa; L.R.C.C produziu as imagens

microscópicas; K.C.L. realizou a estatística dos dados; D.Q.C.G. analisou os dados, discutiu hipóteses e revisou o manuscrito.

Financiamento

Esse trabalho foi financiado com recursos próprios dos autores.

Conformidade com os Padrões Éticos

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação Ética

Para a coleta dos microrganismos clínicos *Candida* spp, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) aprovou a proposta submetida, com registro na Plataforma Brasil sob número CAAE 30267814.2.0000.5188 e parecer 706.409.

Referências

- [1] J Sharma, S Rosiana, L Razzaq, RS Shapiro, Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens, *Journal of Fungi* 21(2019) 1-28, <https://doi.org/10.3390/jof5010017>.
- [2] GA Collina, F Freire, TPC Santos, NG Sobrinho, S Aquino, RA Prates, DFT Silva, ACRT Horliana, C Pavani, Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy, *Photochemical & Photobiological Sciences* 17(2018) 1355-1364, <https://doi.org/10.1039/c8pp00238j>.
- [3] D Friedman, IS Schwartz, Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens, *Journal of Fungi* 5(2019) 67, <https://doi.org/10.3390/jof5030067>.
- [4] M Legrand, P Jaitly, A Feri, C D'Enfert, K Sanyal, *Candida albicans*: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity, *Trends in Genetics* 35(2019), 292-307, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.005>.
- [5] DJ Morse, MJ Wilson, X Wei, DJ Bradshaw, MAO Lewis, DW Williams, Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria, *Letters in Applied Microbiology* 2(2019) 337-343, <https://doi.org/10.1111/lam.13145>.
- [6] YH Hsieh, WC Chuang, KH Yu, CP Jheng, CL Lee, Sequential Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Encapsulated Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles and Flucytosine Treatment against

- Candida tropicalis*, *Pharmaceutics* 11(2019) 16,
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010016>.
- [7] JC Sardi, L Scorzoni, T Bernardi, *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *Journal of Medical Microbiology* 62(2013) 10-24,
<https://doi.org/10.3390/10.1099/jmm.0.045054-0>.
- [8] H Shi, J Li, C Peng, B Xu, H Sun, The inhibitory activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) on *Candida albicans* biofilms, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 34 (2021),
<https://doi.org/10.3390/10.1016/j.pdpdt.2021.102271>.
- [9] X Lyu, C Zhao, ZM Yan, H Hua, Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis, *Drug design, development and therapy* 16(2016), <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>
- [10] DK Williams, T Kuriyama, S Silva, S Malic, MA Lewis, *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention, *Periodontology* 2000 55(2011) 250-265,
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>.
- [11] M Pirrone, R Pinciroli, L Berra, Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. *Current Opinion in Infectious Diseases* 29(2016) 160-166.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000255>.
- [12] A Melkoumov, M Goupil, F Louhichi, M Raymond, L Repentigny, G Leclair, Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against *Candida albicans*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (2013) 2099-2105,
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt137>.
- [13] D Bhojwani, JJ Yang, CH Pui, Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *Pediatric Clinics of North America* 62(2015) 47-60,
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.004>
- [14] Y Puckett, O Chan, *Acute Lymphocytic Leukemia*, StatPearls Publishing (2021)
- [15] KLG Babu, J Mathew, GM Doddamani, JK Narasimhaiah, LRK Naik, Oral health of children with acute lymphoblastic leukemia: A review, *Journal of Orofacial Science*, 8(2016) 2-11.
- [16] JM Ribera, A Oriol A, Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults, *Hematology/Oncology Clinics of North America* 23 (2009) 1033-1042,
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.002>.
- [17] M Asnaashari, SM Mojahedi, Z Asadi, S Azari-Marhabi, A Malekia, Comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13(2016) 233-237, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.171>

- [18] LM Eslami, The Comparison of Intracanal Medicaments, Diode Laser and Photodynamic Therapy on Removing the Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida Albicans* in the Root Canal System (Ex-vivo Study), *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26(2019) 157-161, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.033>.
- [19] WR Li, QS Shi, HQ Dai, Q Liang, XB Xiel, XM Huang, GZ Zhao, LX Zhang LX, Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*, *Nature*, 6(2016) 1-9, <https://doi.org/10.1038/srep22805>.
- [20] LC Monteiro, ILA Ribeiro, RBFBD Batista, PP Maciel, AMG Valença, ACB Dulgheroff, JR Souza, YW Cavalcanti, LRC Castellano, PRF Bonan, *Candida* on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its susceptibility to nystatin and amphotericin B. *Revista Gaúcha de Odontologia* 67 (2019) 1 - 9. <https://doi.org/10.1590/1981-86372019000183558>.
- [21] CR Araujo, KC Miranda, XS Passos, LKH Souza, LA Lemos, CHA Khrais, CR Costa, MRR Silva, OFL Fernandes, Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno chromagar *Candida*, *Revista de Patologia Tropical* 34 (2005) 37-42. <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2135>.
- [22] CSLI, NCCLS global consensus standard, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada 22(2002) 1- 51.
- [23] DMC, Therapy Xt Manual do Usuário, (2016), Disponível em http://www.dmcgroup.com.br/arquivos/manual/manual_therapy_xt_port.pdf
- [24] N Hosseini, S Yazdanpanah, M Saki, F Rezazadeh, J Ghapanchi, K Zomorodian, Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer, *Journal of Dentistry* 17(2016) 354-360.
- [25] MCA Leite, APB Bezerra, JP Sousa, FQS Guerra, EO Lima, Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/378280>.
- [26] SF Laffey, G Butler G, Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*, *Microbiology*, 151 (2005) 1073–1081, <https://doi.org/10.1099/mic.0.27739-0>.
- [27] A Hannickel, MHPrado Silva, HL Barros, MP Albuquerque, Image J As A Tool For Measurement Of Area Of Magnetite Particles In Three Nanometric Scales, *C&T*, (2012) 16-26.
- [28] CN Ciurea, IB Kosovsk, AD Mare, F Toma, IA Pinteá-Simon, A Man, *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence

- Traits, *Microorganisms*, 8 (2020) 1-17.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>.
- [29] DVS Méthot, S Alizon, What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions, *Virulence* 1(2014) 775-785.
<https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>
- [30] A Forche, D Abbey, T Pisithkul, MA Weinzierl, T Ringstrom, D Bruck, K Petersen, JB Berman, Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*, *MBio*, 2(2011) 01-09. <https://doi.org/10.1128/mBio.00129-11>.
- [31] AC Gerstein, H Lim, J Berman, MA Hickman MA, Ploidy tug-of-war: evolutionary and genetic environments influence the rate of ploidy drive in a human fungal pathogen, *Evolution*, 71 (2017) 1025-1038, <https://doi.org/10.1111/evo.13205>.
- [32] LV Jan, RJ Bennett, MZ Anderson, Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 5(2019) 47-54,
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>.
- [33] CY Koga-Ito, EY Komiyama, CAP Martins, TC Vasconcellos, AOC Jorge, YR Carvalho, RF Prado, I Balducci, Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*, *Mycoses*, 54(2011) 278-285,
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01899>.
- [34] JR Wingard, Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients, *Clinical Infectious Diseases*, 20(1995) 115–125,
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>.
- [35] M Arendrup, T Horn, N Frimodt-Moller, In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model, *Infection*, 30 (2002) 286-291,
<https://doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>.
- [36] V Krcmery Jr, S Spanik, A Kunova, J Trupl, S Grausova, I Krupova, F Mateicka, E Pichnova, E Grey, A Sabo A, Nosocomial *Candida krusei* fungemia in cancer patients: report of 10 cases and review, *Journal of Chemotherapy*, 11(1999) 131-136. <https://doi.org/10.1179/joc.1999.11.2.131>.
- [37] NK Tamura, MFN Negri, LA Bonassoli, TIE Svidzinski TIE, Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2010) 91-93.
<https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000100021>.
- [38] P Uppuluri, AK Chaturvedi, A Srinivasan, M Banerjee, AK Ramasubramaniam, JR Köhler, D Kadosh, JL López-Ribot, Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle, *PLoS Pathogens*, 6(2010) 1643,
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>.

- [39] PF Caligiore-Gei, JG Valdez, Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology, *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (2015) 152-154. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>
- [40] AN Esfahani, Z Golestannejad, F Khozeimeh, P Dehghan, M Maheronnaghsh, M Zarei M, Antifungal effect of Atorvastatin against *Candida* species in comparison to Fluconazole and Nystatin, *Medicine and Pharmacy Reports*, 92(2019) 368-373, <https://doi.org/10.15386/mpr-1209>
- [41] M Wainwright, Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(2019) 12-14, <https://doi.org/10.1039/c8pp00390d>.
- [42] JR Perussi, Photodynamic inactivation of microorganisms, *Química Nova* 30(2007) 1-7, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>
- [43] EL Nussbaum, L Lilge, T Mazzulli, Effects of low-level laser therapy (lllt) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 21(2003) 283-90. <https://doi.org/10.1089/104454703322564497>
- [44] RG Benvindo, GB Alberito, R Carvalho, GRF Bertolini, Effects of photodynamic therapy and of a sole low-power laser irradiation on bacteria in vitro, *Fisioterapia e Pesquisa*, 15(2008) 53-57. <https://doi.org/10.1590/S1809-29502008000100009>
- [45] L Kristanc, B Bozic, ZJ Jokhadar, DM Dolenc, G Gomiscek, The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2(2019) 418-430. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.006>
- [46] F Javed, LP Samaranayake, GE Romanos, Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(2014) 726-734. <https://doi.org/10.1039/c3pp50426c>

5 ARTIGO II

Apresentação do Artigo II

Após as devidas considerações da banca avaliadora sobre esse trabalho, o artigo sob título “Estruturas de Suporte de *Candida* spp padrão e isolados de pacientes com imunocomprometidos após uso de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana” será submetido ao periódico *Laser in Medical Science* (ISSN: 1435-604X; Fator de Impacto: 3.161; Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no Anexo B.

Artigo a ser submetido**Mecanismos de ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Nistatina sobre as Estruturas de Suporte de *Candida* spp Padrão e Isolados de Pacientes Imunocomprometidos.**

Isabella Jardelino Dias¹ • Ricardo Dias de Castro² • Lúcio Roberto Cancado Castellano³ • Kênio Costa de Lima⁴ • Daliana Queiroga de Castro Gomes⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, Brasil.

² Departamento de Clínica e Odontologia Social, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil.

³ Escola Técnica de Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil.

⁴ Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Natal, RN, Brasil.

⁵ 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@gmail.com

Resumo

O estudo teve como objetivo analisar, *in vitro*, o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre estruturas de suporte de *Candida* padrão e isolados de imunocomprometidos. Os testes laboratoriais foram realizados com *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, representados por isolados de pacientes com LLA e por estirpes ATCC e CBS. Para posterior análise da ação na Parede Celular e Membrana Plasmática, a Concentração Inibitória Mínima da Nistatina foi realizada. Os grupos estabelecidos foram: G1 - Controle de Crescimento; G2 - Irradiação Vermelha; G3 - Azul de Metileno com exposição de 20 minutos; G4 - TFDa com Tempo de Pré-Irradiação de 15 minutos; G5 - TFDa com TPI de 20 minutos; G6 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 15 minutos; G7 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos; G8 - Nistatina. A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm, densidade de potência de 3,57 mW/cm² e energia de 5,0 J, com densidade de energia de 178,5 J/cm². A concentração do Azul de Metileno foi de 0,1%. Os testes foram processados nos softwares *ImageJ* e *SPSS*, com significância de 5%. A TFDa foi o tratamento mais efetivo para romper a recuperação da parede celular de cepas padrão e clínicas. Nesse experimento, a Nistatina não apresentou resultados satisfatórios, já na membrana plasmática, foi o único grupo que estabeleceu ligação com o Ergosterol sintético. Assim, a associação da TFD e Nistatina é indicada como tratamento eficaz contra *Candida* spp.

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

Introdução

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas apresentaram-se como um fator de agravamento em saúde com repercussões globais, expressando ascensão em territórios heterogêneos, inclusive quanto à patamares sociais e econômicos [1,2].

Entre essas manifestações, a candidose é a enfermidade fúngica mais comumente relatada na área médica, ocasionando infecções nas mucosas vaginal, gastrointestinal e oral, bem como na pele. Provocada por microrganismos *Candida* a doença gera processos infecciosos com intensidades variadas, atingindo até mesmo a possibilidade de complicações sistêmicas [3-5].

A candidose oral é a denominação empregada quando a doença atinge esse respectivo *locus* anatômico. Compreende-se que o fungo, essencialmente asporogênico, comporta-se como um agente comensal na cavidade oral de hospedeiros humanos, desenvolvendo sua patogenicidade apenas em situações de ruptura com a homeostasia local [2,3,6].

Mais de 40 espécies *Candida* podem ser identificadas na estrutura oral, sendo *Candida albicans* correspondente a 60,8% dos fungos presentes. No entanto, outras espécies atuam com maior potencial de dano na etiopatogenia da doença, mesmo sendo quantitativamente reduzidas no meio, como *Candida tropicalis*, *krusei*, *parapsilosis* e *glabrata*, que maximizam sua ação ao associarem-se em estruturas [2,7,8].

Os fármacos comerciais que agem sobre microrganismos fúngicos são classificados em azóis, equinocandinas, polienos e flucitosinas. Os três primeiros grupos agem especificamente sobre a integridade da membrana plasmática celular do fungo, enquanto que as flucitosinas são os únicos medicamentos que exercem atividade sobre a biossíntese do DNA e RNA [2,7,9].

Esses grupos medicamentosos estão disponíveis de forma sistêmica ou local (tópica). As drogas de uso sistêmico como triazóis, fluconazol e itraconazol, são amplamente prescritas embora possuam pouca efetividade contra *Candida ssp* e, interação medicamentosa considerável. Já medicamentos tópicos como a Nistatina, Miconazol e Clotrimazol possuem indicação prioritária na Odontologia, especialmente em casos de infecções orais mais brandas [10].

No entanto, a resistência farmacológica de antifúngicos tem sido constantemente relatada, como no uso de Nistatina. Essa dificuldade é potencializada

quando a doença acomete indivíduos imunocomprometidos que, habitualmente, manifestam sinais e sintomas da candidose oral de forma mais frequente e relevante. Nesses casos, situações de septicemia fúngica por via sanguínea, denominadas de candidemia, tem tornado os índices de mortalidade mais alarmantes [2,5,7].

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é um exemplo desse agravamento, designando-se como a leucemia mais comum em crianças, sendo responsável por 25% de todas as neoplasias malignas infantis [11,12]. Devido a fatores como imunossupressão, hipossalivação e condições precárias de higiene oral, a elevada disseminação fúngica determina factuais riscos à manutenção da vida por parte daqueles acometidos por debilidades sistêmicas [12-14].

Dessa forma, tratamentos alternativos como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) são, atualmente, propostos como meios eficazes no cuidado de imunocomprometidos. Propriedades como custo moderado e baixa ou inexistente resistência que a TFDa promove ao tratar e erradicar patógenos com alta capacidade de adaptação ao ambiente em que vivem, são as justificativas para a crescente popularização da técnica nas últimas décadas [2].

Ensaio clínicos publicados tem demonstram o efeito fungicida da TFDa sobre *Candida*, relacionando o fotossensibilizador (FS) Azul de Metileno (AM) à irradiação de baixa intensidade. No entanto, é importante ressaltar que tanto os padrões energéticos como os protocolos técnicos da TFDa ainda estão em discussão na literatura científica. Dentre esses itens, está o tempo necessário de repouso do FS antes da aplicação da irradiação, chamado de tempo pré-irradiação (TPI), que é crucial para resultados satisfatórios do tratamento [15-17].

Sabe-se que apesar da compreensão adquirida sobre os mecanismos microbiológicos ativados pela TFDa no hospedeiro, ainda não há um domínio concreto sobre o impacto da terapêutica nos fatores de patogenicidade dos microrganismos, como a promoção de dano à parede celular e membrana plasmática de *Candida ssp*, distinguindo assim da ação de medicamentos alopáticos tradicionais, como a Nistatina [15-17].

Métodos

Microrganismos

Os experimentos com Ergosterol foram realizados com microrganismos *Candida albicans*, enquanto que os ensaios de presença de Quitina com *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. As cepas utilizadas foram representadas por isolados clínicos retirados de pacientes em fase de quimioterapia para tratamento de LLA e por estirpes de referência do tipo *American Type Culture Collection* (ATCC) e Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). O processo de identificação da microbiota clínica foi realizado em estudo anterior [18]. Essa avaliação efetivou-se por meio de impressão digital molecular, pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Invitrogen, Waltham, MA, USA), e pelo método cromógeno CHROMagar *Candida*TM (BDTM CHROMAGARTM *Candida*, Paris, França) [19].

Viabilidade dos Microrganismos

A viabilidade celular foi analisada, dessa forma, 300 µL da alíquota de cada microrganismo foi aplicada em microplaca de microtitulação estéril de 96 poços (CRAL artigos para laboratório LTDA, Cotia, SP, Brasil), fundo U, e incubada à 35°C por 24 horas. Após esse período, as placas foram visualmente avaliadas, observando se havia atividade celular expressa por crescimento fúngico (turbidez) em fundo de placa [20].

Concentração dos Inóculos

Os inóculos preparados para os experimentos foram realizados em triplicata. Dessa maneira, cinco colônias com diâmetro de ~1mm foram escolhidas das placas de subcultura e suspensas em 5 mL de CSD estéril. Após esse processo, as triplicatas suspensas foram agitadas em vórtex durante 15 segundos [20]. Em seguida, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) com comprimento de onda ajustado em 530 nm, acrescentando CSD à suspensão recém preparada até obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Para essa finalidade, a absorvância referência indicada no

espectrofotômetro para o inóculo deveria ser de 0,08 a 0,13 (Figura 6), obtendo, assim, uma suspensão padrão de levedura de 1×10^6 células por mL, concentração essa ideal para os testes de patogenicidade do presente estudo [20].

Grupos Experimentais e Controles

A partir das suspensões padronizadas de *Candida* spp, foram realizados ensaios de acordo com os seguintes grupos experimentais e controles: G1 - Controle de Crescimento; G2 - Irradiação Vermelha; G3 - Azul de Metileno com exposição de 20 minutos; G4 - TFDa com Tempo de Pré-Irradiação (TPI) de 15 minutos; G5 - TFDa com TPI de 20 minutos; G6 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 15 minutos; G7 - Associação de Nistatina e TFDa com TPI de 20 minutos; G8 - Nistatina. Além desses, os experimentos foram submetidos a um grupo controle de esterilização, composto por meio nutritivo de CSD.

Terapia Fotodinâmica

A fonte de luz utilizada foi o Laser InGaAlP *Therapy XT* (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), no feixe de irradiação vermelha. Segundo informações do fabricante, o comprimento de onda (λ) utilizado foi de $660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, incidido com potência útil de $100 \text{ mW} \pm 20\%$, com diâmetro da ponteira do aparelho (área de spot) correspondendo a $0,028 \text{ cm}^2$ [21]. A densidade de potência utilizada foi $3,57 \text{ mW/cm}^2$, com energia $5,0 \text{ J}$, resultando numa densidade de energia (dose) de $178,5 \text{ J/cm}^2$ durante a aplicação. A emissão do laser foi contínua e com modo de operação pontual, cuja ponteira do equipamento foi posicionada perpendicularmente à microplaca, no diâmetro de abertura de cada poço. O AM, FS aplicado para sensibilização de *Candida* spp pela TFD, foi manipulado por farmácia de manipulação local e utilizado na concentração de 0,1% (Dilecta, João Pessoa, PB, Brasil). A ambientação escura foi preconizada como meio para manuseio e o TPI do FS, bem como para aplicação da irradiação laser [22].

Triplicatas e Anteparos

Para os testes de patogenicidade, os experimentos foram realizados em triplicata para todos os grupos estabelecidos. Além disso, espaçamentos físicos entre grupos experimentais e controles de um mesmo microrganismo foram preconizados na microplaca, sendo também confeccionados anteparos de silicone preto (TEKBOND, São Paulo, SP, Brasil), isolando os poços e evitando a sobreposição de irradiação entre os poços submetidos ao laser, como também qualquer absorção mínima pelos demais.

Concentração Inibitória Mínima de Nistatina

O método de Microdiluição em Caldo [20] foi empregado para obter a CIM da Nistatina, perante cada cepa utilizada. Inicialmente, o inóculo foi preparado na concentração de 1×10^6 células por mL e a Nistatina na concentração de 1,0 mg/mL. Após a microdiluição, a concentração da Nistatina era de 60 a 0,4 μ L/mL respectivamente, do primeiro ao último poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C, de modo que o período necessário para a Nistatina atingir seu efeito máximo foi respeitado. A obtenção dos resultados ocorreu por observação visual de agregados de células no fundo dos poços [23].

Análise da Parede Celular Fúngica

Inóculos padronizados foram preparados na concentração de 1×10^6 células por mL, e os tratamentos executados. Em seguida, 150 μ L de cada triplicata foram removidos e centrifugados por 15 minutos, na velocidade de 1500 rpm. O FS *Calcofluor White* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para detectar a presença e proporção de quitina nos microrganismos, indicando assim, o estado de integridade da parede celular após os tratamentos aplicados. Para melhor visualização do efeito do *Calcofluor White* nas imagens, o produto foi diluído em água estéril, na proporção de 1:10, a partir da concentração original de 1 g/L. Assim, 50 μ L da solução diluída do corante foram adicionados ao composto e esse centrifugado por mais 10 minutos, à temperatura ambiente, para que 10 μ L fossem removidos, preferencialmente do fundo do recipiente. Essa quantidade foi aplicada sobre lâmina

de vidro e visualizadas no Microscópio Digital Invertido EVOS FL com filtro DAPI, com ampliação de 40x e intensidade de luz de 20% [24]. O programa *Image J*, versão 1.5n1, foi utilizado para dar contorno e numeração às células. Visto que o tamanho médio das unidades fúngicas do estudo foi de 400 *pixels* quadrados, utilizou-se 100 células com essas dimensões para determinar intensidade de fluorescência, de modo que os resultados de *Integrated Density* não tivessem interferência pela variação de área dos fungos.

Avaliação da Membrana Plasmática Fúngica

Inóculos foram preparados na mesma concentração de microrganismos dos demais testes (1×10^6 células por mL), diferindo entre si apenas pela presença ou ausência de Ergosterol exógeno. No caso dos poços das triplicatas destinados a receber o produto, a concentração ideal do Ergosterol foi de 400 $\mu\text{g/mL}$ dentro do poço, imersos por meio dos 100 μL do inóculo depositado.

Após os tratamentos aplicados, o ensaio deu sequência utilizando a técnica de microdiluição, com o objetivo de gerar diluições seriadas em 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} para posterior plaqueamento. Dessa forma, 100 μL do poço de cada triplicata foram removidos e imersos em falcons contendo 900 μL de CSD, resultando numa diluição de 10^{-3} . Em seguida, 100 μL da solução desse falcon foram adicionados à 900 μL de CSD, gerando a diluição de 10^{-4} , sendo, então, esse processo repetido até a última diluição proposta. Placas contendo ASD foram anteriormente preparadas, de modo que 24 mL de Ágar fossem distribuídos homoganeamente em todas as unidades. A partir das diluições mencionadas, 50 μL foram retirados e distribuídos em placas nutridas com Ágar e incubadas a 35 °C por 24 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) [25,26].

Análise de Dados

Os dados referentes aos experimentos de Estrutura de Suporte com uso de Ergosterol (Membrana Plasmática) foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel e analisados no *Software* Estatístico SPSS (versão 18). Nesses mesmos programas também foram avaliados os resultados obtidos dos ensaios de Estrutura de Suporte com Calcofluor White (Parede Celular) após o processamento das imagens no

Software ImageJ (1.51p). A análise estatística foi realizada pela comparação de mais de dois grupos com o teste paramétrico One-way ANOVA e, nas comparações múltiplas com o Two-way ANOVA. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

Resultados

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima da Nistatina foi realizada para que concentrações específicas fossem utilizadas nos experimentos do estudo (Fig. 1).

	PADRÃO	CLÍNICO
	MIC	MIC
<i>Candida albicans</i>	7,50	3,75
<i>Candida tropicalis</i>	3,75	3,75
<i>Candida krusei</i>	7,50	3,75

Fig. 1 Concentração Inibitória Mínima da Nistatina de acordo com as Espécies ($\mu\text{g/mL}$).

A capacidade de recuperação da parede celular do fungo foi analisada por meio da quantificação da fluorescência nas imagens geradas em filtro DAPI (Fig. 2). Assim, microrganismos *tropicalis* apresentaram, respectivamente, maior fluorescência que *Candida albicans* e *Candida krusei* ($p < 0,001$). Além disso, as cepas clínicas apresentaram valores de fluorescência superiores quando comparadas às cepas padrão (Fig. 3).

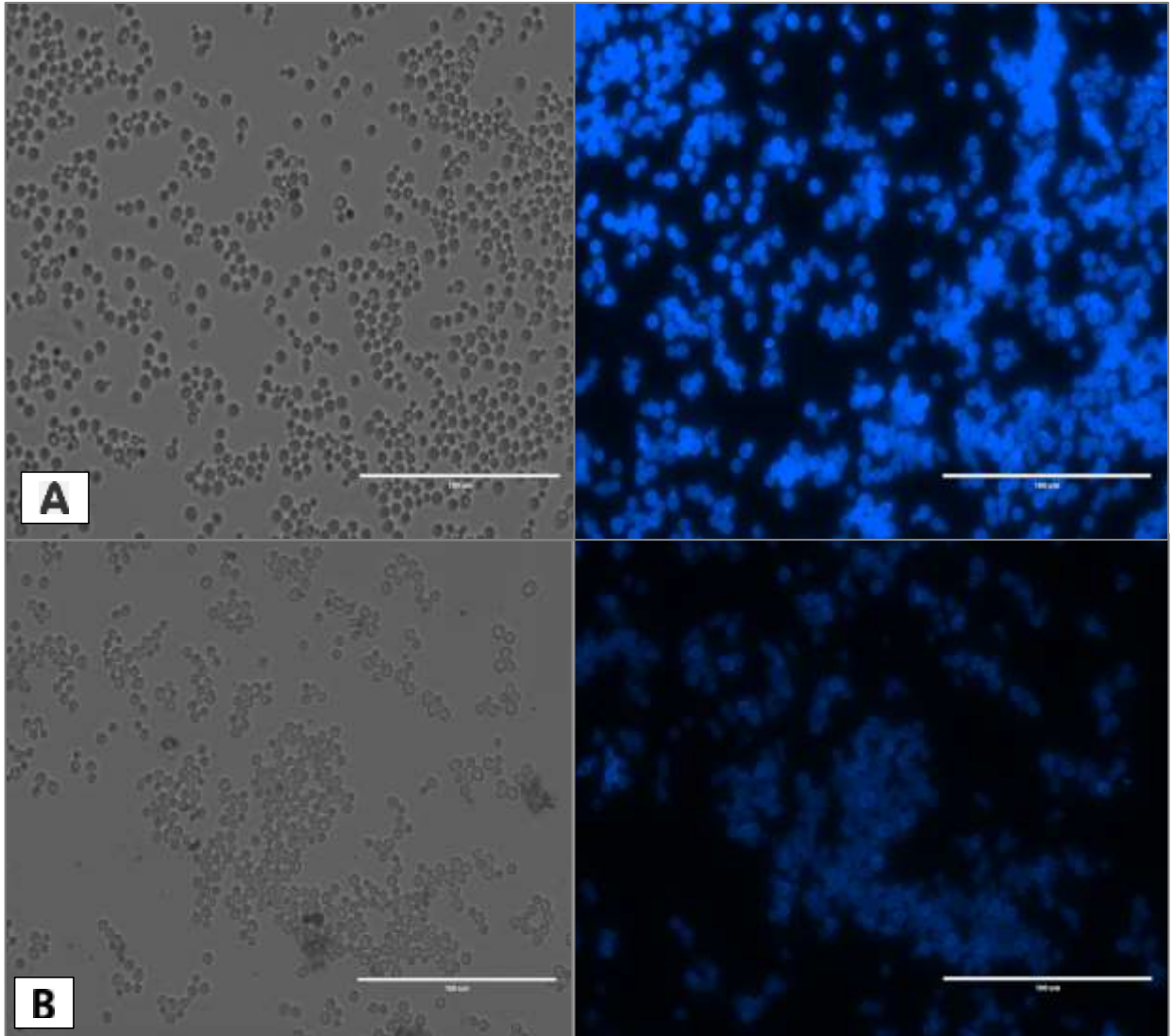


Fig. 2 Imagem em BF e DAPI do Controle de Crescimento (A) e TFDa com TPI de 15 minutos (B) de cepas clínicas de *Candida albicans*.

PAREDE CELULAR

	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
<i>Candida albicans</i>	17004		22543	
<i>Candida tropicalis</i>	27718	< 0,001	26649	< 0,001
<i>Candida krusei</i>	9353		19103	

Fig. 3 Múltipla Concentração de Fluorescência (Post Hoc Tests/Bonferroni).

Segundo o mesmo experimento, cepas padrão e clínicas apresentaram resultados semelhantes após cada tratamento específico. Dessa forma, os grupos com aplicação da TFDa obtiveram os menores graus de fluorescência da parede celular, não havendo diferença significativa pela variação do TPI ou associação com Nistatina ($p = 1,00$) (Fig.4). No entanto, os efeitos proporcionados pela Nistatina isolada na ruptura do ciclo de recuperação da parede celular, foram semelhantes ao uso do laser isolado e do controle de crescimento ($p=1,00$) (Fig. 5 e 6).

TIPO DE TRATAMENTO	PAREDE CELULAR			
	PADRÃO		CLÍNICO	
	MEAN	p-Value	MEAN	p-Value
CC	38988	< 0,001	46465	< 0,001
LASER	31841	< 0,001	43828	< 0,001
AM	12425	< 0,001	21228	< 0,001
TFD 15	6235	1,00	7778	1,00
TFD 20	6416	1,00	6573	1,00
TFD 15+N	7292	1,00	5765	1,00
TFD 20+N	6749	1,00	5268	1,00
NISTATINA	34253	< 0,001	45270	< 0,001

Fig. 4 Comparação Múltipla: Grupos com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni).

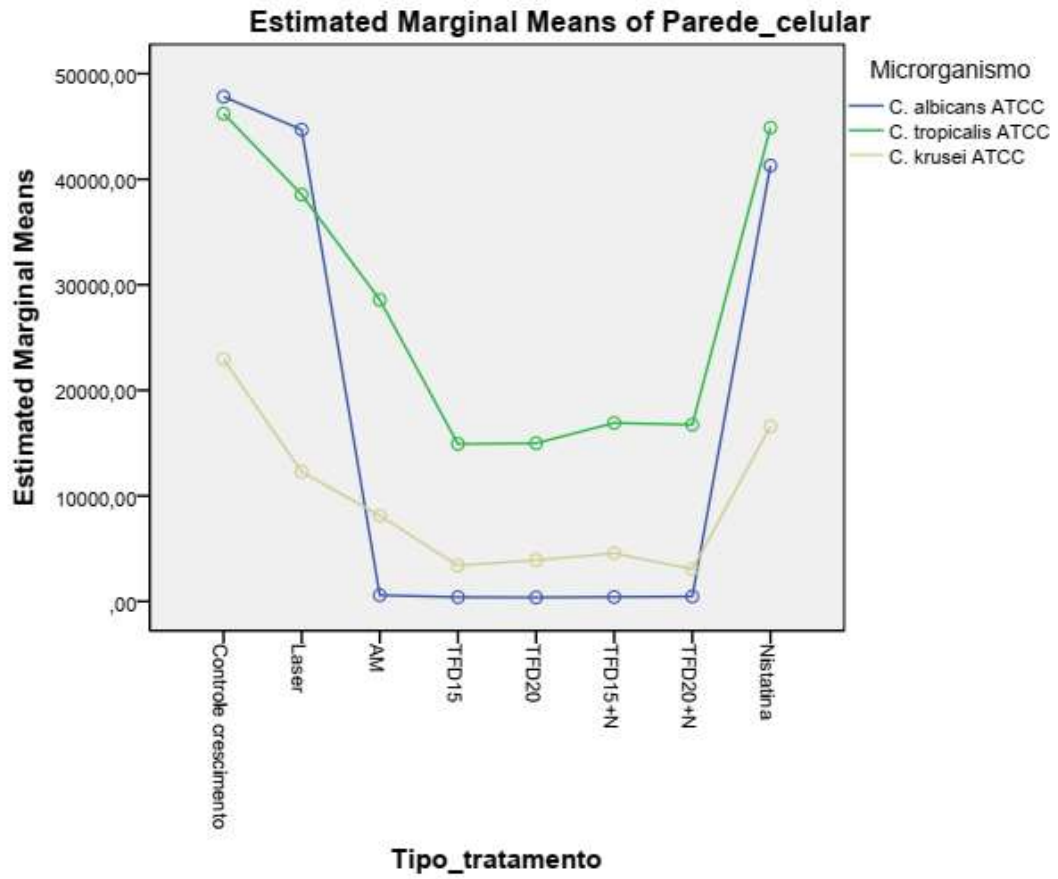


Fig. 5 Fluorescência da Parede Celular de Cepas Padrão.

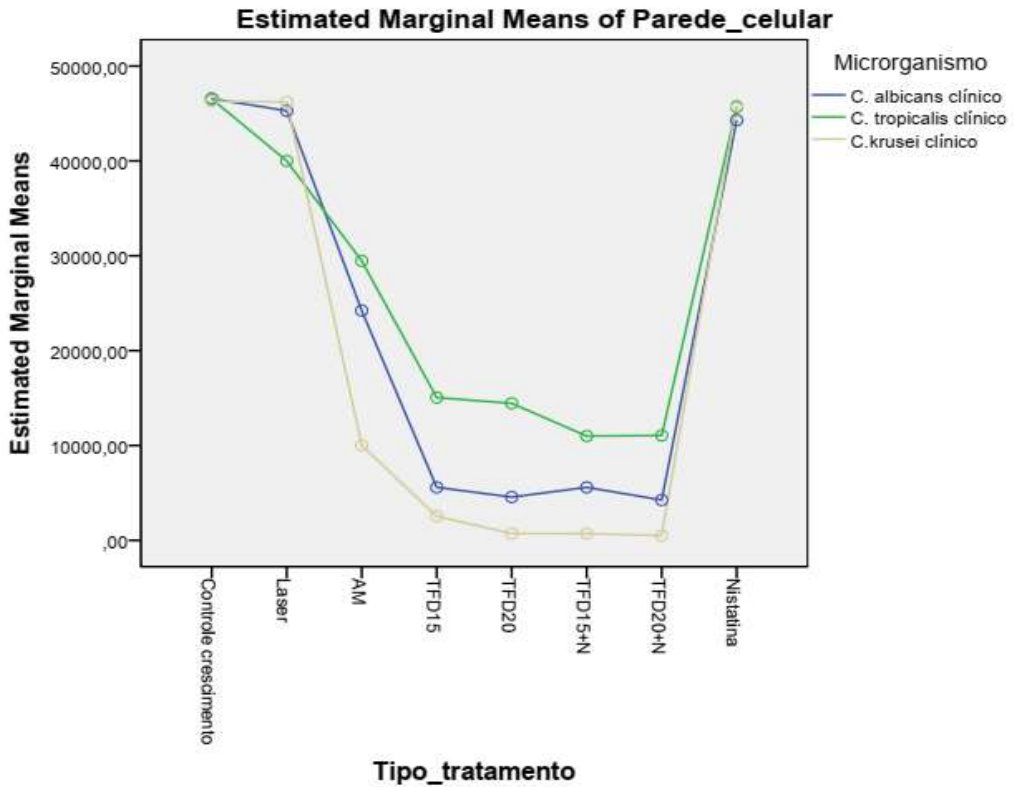


Fig. 6 Fluorescência da Parede Celular de Cepas Clínicas.

O ensaio laboratorial com Ergosterol determinou a possível ação dos tratamentos na membrana plasmática dos fungos. A razão entre a quantidade de UFCs formadas nas placas com a presença e ausência de Ergosterol, indicou o nível de crescimento de microrganismos em cada grupo. Assim, pela comparação múltipla entre os grupos do estudo, a Nistatina isolada expressou a maior razão ($>0,001$) perante os demais, tendo estes resultados inferiores e semelhantes ($p=1,00$) (Fig. 7).

MEMBRANA PLASMÁTICA

TIPO DE TRATAMENTO	<i>Candida albicans</i> (Padrão)				<i>Candida albicans</i> (Clínico)			
	AUSENTE UFC 10 ⁻⁵	PRESENTE UFC 10 ⁻⁵	RAZÃO	p-Value	AUSENTE UFC 10 ⁻⁵	PRESENTE UFC 10 ⁻⁵	RAZÃO	p-Value
CC	1055	1055	1	1,00	23800	23800	1	1,00
LASER	1043	1386	1,32	1,00	6106	7086	1,2	1,00
AM	142	356	2,51	1,00	3015	3926	1,3	1,00
TFD 15	973	6653	6,83	1,00	1190	4953	4,1	1,00
TFD 20	240	1198	4,99	1,00	63	2046	32,4	1,00
NISTATINA	1	546	546	< 0,001	1	957	957	< 0,001

Fig. 7 Comparação entre as Razão com uso de TFDa como referência (p-Value/Bonferroni).

Discussão

A TFDa foi o tratamento mais promissor no processo de ruptura do ciclo de regeneração da parede celular fúngica. Já o desempenho demonstrado pela Nistatina foi irrelevante quanto à ação nessa estrutura, embora tenha sido o único grupo a apresentar ação satisfatória no experimento com Ergosterol e, portanto, na membrana plasmática do fungo.

O constante aperfeiçoamento de *Candida* spp tem tornado o microrganismo capaz de adaptar-se a condições diversas do hospedeiro, sendo essa habilidade denominada de fatores de patogenicidade [15,27]. Nesse processo, o arcabouço fúngico possui característica químico-biológicas que beneficiam e aumentam essa patogenicidade [28].

Sabe-se que o arcabouço fúngico é formado pela parede celular e, mais internamente, pela membrana plasmática. No que se refere a parede celular,

substâncias como β -glucano, quitina e manoproteínas são responsáveis por sua composição, dando ao microrganismo proteção contra forças mecânicas, estabilidade osmótica, poder de adesão e manutenção da morfologia celular [29,30].

De modo particular, a quitina é o principal constituinte vinculado ao processo de reparo da parede celular fúngica, sobretudo quando exposta a agressões estruturais causadas pelo sistema imunológico humano ou por fármacos. Assim, o ciclo de recuperação da integridade da parede celular ocorre por transdução de sinal, indicando a ativação das proteínas Quinase C (PKC) e Quinase Ativada por Mitógeno (MAPKs). Essas substâncias catalizadoras promovem a regeneração da parede celular por modificação do seu equilíbrio estrutural, tornando a quitina presente hiperacumulada e esta, por sua vez, restituindo a própria parede [31].

Portanto, estima-se que, a presença abundante de quitina na parede celular indicaria seguridade na regeneração dessa estrutura, enquanto que sua escassez pode evidenciar o sucesso de um tratamento antifúngico, pelo rompimento do ciclo de regeneração do microrganismo. A partir disso, estima-se que a ação terapêutica da TFDa no experimento foi efetiva quanto à capacidade de romper a reestruturação da parede celular de cepas padrão e clínicas de *Candida* spp, repercutido pela acentuada redução de fluorescência nas imagens analisadas, estatisticamente menor que a dos demais grupos. Essa densidade cromática foi promovida pelo corante *CalcoFluor White*, marcador de quitina em luz ultravioleta, indicando o grau de presença da proteína pela intensidade de fluorescência exposta [32].

Em contraste com esses resultados, estirpes padrão e clínicas tratadas apenas com o medicamento Nistatina expressaram intensa fluorescência nas imagens obtidas em Microscópio Invertido, sendo estas compatíveis em cromaticidade com os microorganismos irradiados apenas com laser, bem como com estirpes que compuseram o Controle de Crescimento, não havendo diferença significativa entre esses grupos. Dessa forma, compreende-se que a ação do fármaco na parede celular apresentou-se ineficaz, compatível com diversos trabalhos da literatura, em que o efeito da irradiação laser de baixa potência sobre a redução da microbiota é praticamente nula [33].

Pela análise de densidade, realizada pelo *software Image J*, também se observou a relação quantitativa entre cepas de origem clínica e padronizada. Nessa perspectiva, fungos clínicos apresentaram-se superiores em fluorescência que estirpes padrão, determinado um maior porcentual de quitina em sua estrutura, sendo

esses dados embasados por diferenças estatísticas. Esse resultado corrobora com o atual conceito que microrganismos de ambientes orais de imunocomprometidos, que passaram por infecções cíclicas e foram submetidos ao constante contato com antifúngicos, podem tornar-se mais resistentes à tratamentos, inclusive quanto à sua alta capacidade de manter a estabilidade do arcabouço fúngico pela manutenção do ciclo de recuperação da parede celular [34,35]. Assim, cepas clínicas apresentaram grau de fluorescência superior às padronizadas, determinado um maior porcentual de quitina em sua estrutura.

Achados do presente estudo também relacionaram os efeitos das terapêuticas frente ao potencial de patogenicidade de cada espécie *Candida*. Assim, perante a resistência apresentada na manutenção estrutural da parede celular após os tratamentos, *Candida tropicalis* apresentou menor dano ao suporte celular, com fluorescência acentuada em relação a *Candida albicans* e *krusei*, respectivamente. Ao analisar os trabalhos publicados sobre a patogenicidade das espécies *Candida*, uma observação extensa faz-se necessária perante a diversidade dos apontamentos encontrados. Em situações clínicas comuns, *Candida albicans* e *tropicalis* aparentam maior incidência e patogenicidade em infecções cotidianas, sendo essa vertente modificada em casos de imunocomprometimento, cuja cepa *krusei* é referenciada com destaque [36,37]. Além disso, o estado geral do paciente com fragilidade imunitária parece influenciar e diferenciar a ação de espécies *Candida*, cuja estirpe *tropicalis* é potencializada em situações de agravamento sistêmico [2].

Embora o experimento sobre a ação das terapêuticas na parede celular do fungo não possa inferir a incidência e nem conclusões sobre os aspectos globais de patogenicidade do fungo, *Candida tropicalis* foi a espécie que apresentou maior resistência contra dano ao ciclo de recuperação da parede celular, podendo ser este um indício sobre o estado avançado da doença sistêmica nos indivíduos, cujas cepas foram coletadas, bem como um indicativo do comportamento particular da espécie referida.

No que concerne ao experimento sobre o efeito dos tratamentos sobre a membrana plasmática fúngica, análises de comparações múltiplas compuseram informações tendo como referência o uso de TFDa e Nistatina. Assim, microrganismos submetidos à TFDa não evidenciaram diferença estatística com os demais grupos, exceto com a Nistatina que expressou os melhores resultados de interação com a

estrutura celular. Portanto, o medicamento de referência foi o único com resultados satisfatório no processo de ligação ao Ergosterol.

Sabe-se que a membrana plasmática de *Candida* spp é composta, principalmente, por Ergosterol, um esterol responsável por manter a integridade e função celular. A atividade da Nistatina está vinculada á interação hidrofóbica com esse composto, reduzindo sua presença na membrana plasmática e, assim, atuando no declínio da barreira física e na morte microbiana [38]. No experimento, a conexão entre o fármaco e o Ergosterol sintético foi predominate, não sendo esse mecanismo de ação atribuído à TFDa que, embora tenha apresentado atividade com o inóculo contendo o esterol, obteve limiares estatísticos semelhantes ao Controle de Crescimento.

A efetividade da TFDa tem sido tema de discussão e, portanto, evidenciada por reconhecidos estudos da literatura [39]. Dessa forma, a diversidade de atuação da Nistatina e da TFDa pode sugerir que a aplicação concomitante das terapêuticas possibilita um maior efeito degenerativo sobre o microrganismo, inclusive em espécies resistentes à antifúngicos sistêmico [40].

Além disso, a variação do TPI na TFDa, nos testes de parede e membrana plasmática celular, não modificou o resultado apresentado. Esses dados são importantes para o cotidiano clínico, cujo tempo de operação do protocolo tem a possibilidade de ser reduzido, sem comprometer a efetividade da terapêutica.

Conclusão

Perante essas evidências, a associação de terapêuticas com uso de Nistatina e TFDa é sugestiva para potencializar processos de erradicação de *Candida* spp, inclusive em pacientes imunocomprometidos. Diante das diferentes formas de interação celular das terapias utilizadas, uma vez que a TFDa agiu eficazmente sobre a parede celular e a Nistatina sobre a membrana plasmática, protocolos clínicos associados podem ser embasados, nos quais a agressão ao microrganismo desenvolva-se de modo simultâneo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Profº Drº Paulo Rogério Ferreti Bonan pelo fornecimento dos microrganismos clínicos para o desenvolvimento do trabalho.

Financiamento

Esse trabalho foi financiado com recursos próprios dos autores.

Conformidade com os Padrões Éticos

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação Ética

Para a coleta dos microrganismos clínicos *Candida* spp, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) aprovou a proposta submetida, com registro na Plataforma Brasil sob número CAAE 30267814.2.0000.5188 e parecer 706.409.

Referências

1. Pirrone M, Pinciroli R, Berra L (2016) Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. *Current Opinion in Infectious Diseases* 29(2): 160-166. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000255>
2. Hsieh YH, Chuang WC, YU KH, Jheng CP, Lee CL (2019) Sequential Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Encapsulated Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles and Flucytosine Treatment against *Candida tropicalis*. *Pharmaceutics* 11(1): 4-11. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010016>
3. Collina GA, Freire F, Santos TPC, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, Silva DFT, Horliana ACRT, Pavani C (2018) Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences* 17(10): 1355 - 1364, <https://doi.org/10.1039/c8pp00238j>
4. Friedman D, Schwartz IS (2019) Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. *Journal of Fungi* 5(3): 67. <https://doi.org/10.3390/jof5030067>
5. Shi H, Li J, Peng C, Xu B, Sun H (2021) The inhibitory activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) on *Candida albicans* biofilms, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 34 (6) (2021) 1 - 6, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102271>
6. Alves F, Carmello JC, Mimal EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC (2018) Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Medical Mycology* 18(10). <https://doi.org/10.1093/mmy/myy083>
7. Sharma J, Rosiana S, Razzaq L, Shapiro RS (2019) Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. *Journal of Fungi*, 21 (5): 17. <https://doi.org/10.3390/jof5010017>
8. Jamiu AR, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH (2021) Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology* 59(1): 1 - 17. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031>

9. Richardson MD, Jones BL (2007) Therapeutic Guidelines in Systemic Fungal Infections. Remedica Publishing.
10. Lyu X, Zhao C, Yan ZB, Hua H (2016) Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug design, development and therapy* 16 (10): 162 - 1171, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>
11. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH (2015) Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America* 62(1): 47 - 60, <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.004>
12. Puckett Y, Chan O (2021) Acute Lymphocytic Leukemia, StatPearls Publishing.
13. Babu KLG, Mathew J, Doddamani GM, Narasimhaish JK, Nair LRK (2016) Oral health of children with acute lymphoblastic leukemia: A review. *Journal of Orofacial Science* 8: 3 – 11. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.181915>
14. Ribeira JM, Oriol A (2009) Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 23(5): 1033 - 1042, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.002>
15. Azizi A, Amirzadeth Z, Rezai M, Rahimi A (2016) Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 158 (5): 267 - 273, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.027>
16. Eduardo CP, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Lee EMR, Aranha ACC (2015) Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* 69 (3): 226 – 235.
17. Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, Hamblin MR (2016) Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 156 (6): 161 – 168. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049>
18. Monteiro LC, Ribeiro ILA, Batista RFBD, Maciel PP, Valença AMG, Dulgheroff ACB, Souza JR, Cavalcanti YW, Castellano LRC, Bonan PRF (2019) *Candida* on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its susceptibility to nystatin and amphotericin B. *Revista Gaúcha de Odontologia* 67: 1 - 9, <https://doi.org/10.1590/1981-86372019000183558>
19. Araujo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JA, Khrais CHA, Costa CR, Silva MMR, Fernandes OFL (2005) Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno Chromagar *Candida*. *Revista de Patologia Tropical*, 34 (1): 37 - 42, <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2135>
20. CSLI (2002) Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada. NCCLS global consensus standard 22(1): 1- 51
21. DMC (2016) Therapy Xt Manual do Usuário. Disponível em http://www.dmcgroup.com.br/arquivos/manual/manual_therapy_xt_port.pdf
22. Hosseini N, Yazdanpanah S, Saki M, Rezazadeh F, Ghapanchi J, Zomorodian K (2016) Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. *Journal of Dentistry* 17(4): 354-360,
23. Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima OQ (2014) Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2135>

24. Laffey SF, Butler G (2014) Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. *Microbiology* 15. <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2135>
25. Freires S, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, Alencar SM, Figueira GM, Rodrigues JAO, Duarte MRT, Rosalen PL, (2014) Coriandrum Sativum L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* Spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS One* 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>
26. Lima IO, Pereira FO, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, Diniz MFFM (2013) Antifungal Activity and Mode of Action of Carvacrol against *Candida albicans* Strains. *Journal of Essential Oil Reserch* 25(2): 138 – 142. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
27. Gacser A (2016) Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence. *Virulence* 7(2) 65–67. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135288>
28. Ximenes PB, Beltrão EIC, Macêdo DPC, Buonafina MDS, Lima-Neto RG, Neves RP (2015) Targeting the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* cell wall using lectins: study of the carbohydrate-binding domain. *Molecules* (Basel, Switzerland) 20(3): 3776–3782. <https://doi.org/10.3390/molecules20033776>.
29. Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189: 1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
30. Gow NAR, Latge JP, Munro CA (2017) The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum* 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
31. Delgado-Silva Y, Vaz C, Carvalho-Pereira, Carneiro C, Nogueira E, Correia A, Carreto L, Silva S, Faustino A, Pais C, Oliveira R, Sampaio P (2014) Participation of *Candida albicans* Transcription Factor RLM1 in Cell Wall Biogenesis and Virulence. *PlosOne* 23(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086270>
32. Lee HS, Kim Y (2020) Aucklandia lappa causa danos à parede celular em *Candida albicans* ao reduzir a quitina e (1,3) - β -D-Gluca. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(7): 967-973. <https://doi.org/10.4014 / jmb.2002.02025>.
33. Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T (2003) Effects of low-level laser therapy (lllt) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 21: 283-90. <https://doi.org/10.1089/104454703322564497>
34. Forche A, Abbey D, Pisithkul T, Weinzierl MA, Ringstrom T, Bruck D, Petersen K, Berman JB (2011) Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *MBio* 2: 1-0. <https://doi.org/10.1128/mBio.00129-11>.
35. Gerstein AC, Lim H, J Berman, Hickman MA (2017) Ploidy tug-of-war: evolutionary and genetic environments influence the rate of ploidy drive in a human fungal pathogen. *Evolution* 71: 1025-1038. <https://doi.org/10.1111/evo.13205>.
36. Wingard JR (1995) Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases* 20: 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>.
37. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Moller N (2002) In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 30: 286-291. <https://doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>.
38. Kristanc L, Bozic B, Jokhadar ZJ, Dolenc DM, Gomiscek G (2019) The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms.

Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 2: 418-430.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.006>.

39. Javed F, Samaranayake LP, Romanos GE, Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(2014) 726-734.
<https://doi.org/10.1039/c3pp50426c>
40. Jordão CC, Klein MI, Carmello JC, Dias LM, Pavarina AC (2021) Consecutive treatments with photodynamic therapy and nystatin altered the expression of virulence and ergosterol biosynthesis genes of a fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 71: 753-775.
<https://doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da análise dos resultados encontrados dos testes laboratoriais do estudo, pode-se concluir que:

- A aplicação da TFDa na microbiota clínica propiciou a menor quantificação de concentração celular, perante os demais grupos do estudo;
- Os experimentos de morfologia celular demonstraram que cepas clínicas submetidas à TFDa obtiveram a redução mais prevalente quanto à área e densidade cromática, inclusive em relação a Nistatina, que expressou resultados insatisfatórios;
- A reprodução assexuada de fungos *Candida* foi retraída pelo uso da TFDa, que apresentou o menor número de brotos das imagens geradas;
- A ruptura do ciclo de recuperação da parede celular foi obtida pela aplicação da TFDa em cepas clínicas, demonstrando elevada efetividade. Nesse aspecto, a Nistatina não demonstrou resultados adequados como terapêutica;
- O grupo com aplicação de Nistatina foi o único que obteve ligação efetiva com o Ergosterol sintético, demonstrando ação na membrana plasmática do fungo;
- A variação do TPI, em 15 e 20 minutos, não influenciou os resultados obtidos, justificando a utilização de protocolos clínicos mais curto;
- A espécie *krusei* apresentou a mais elevada concentração celular após os tratamentos, além de ter sido a única cepa a se expressar como hifa, demonstrando maior potencial de dano. *Candida tropicalis* indicou a maior capacidade em restabelecer a parede celular fúngica;
- A associação entre a TFDa e a Nistatina pode ocasionar métodos celulares diferenciados para erradicar ou, ao menos, fragilizar microrganismos resistentes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. et al. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 609-617, jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myy083>
- AMARAL, R. R. et al. Terapia fotodinâmica na endodontia-revisão de literatura. **Revista da Faculdade Odontologia**, v. 10, n. 2, p. 207 - 2011, feb. 2010.
- ARAUJO, et al. Identificação das leveduras do gênero *candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno chromagar Candida. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37-42, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2135>
- ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MOLLER, N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v.30, p.286-291, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>
- ASNAASHARI, M. et al. Comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.13, n.3, p. 233-237, mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.171>
- AZIZI, A. et al. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, v.2, p. 267-273, mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.027>
- BABU, K. L. G. et al. Oral health of children with acute lymphoblastic leukemia: A review. **Journal of Orofacial Science**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 2016.
- BAYONA, J. V. et al. Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ *Candida* for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 98, n. 4, p. 1-5, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115168>
- BENVINDO, R. G. et al. Effects of photodynamic therapy and of a sole low-power laser irradiation on bacteria in vitro, **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, p, 53-57, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1809-29502008000100009>
- BHOJWANI, D.; YANG, J. J.; PUI, C. H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 47-60, feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.004>
- BRASIL, K. W.; PINHEIRO, R. L; PIMENTEL, I. L. 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, sep. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000500003>

CALIGIORE-GEI, P.L; VALDEZ, J. G. ET al. Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. **Revista Argentina de Microbiología**, v.47, p.152-154, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>

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. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myw137>

CIUREA, C. N. ET al. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v.8, p.1-17, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>.

COLLINA, G. A. et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, n. 18, p.1355, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8pp00238j>

CSLI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada**. NCCLS global consensus standard, 2002.

CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. Unmasking Fungal Pathogens by Studying MAPK-Dependent Cell Wall Regulation in *Candida albicans*. **Virulence**, v.3, n. 7, p. 502-505, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.7819/rbgn.v22i4.4081>

DELGADO-SILVA, Y. et. al. Participation of *Candida albicans* Transcription Factor RLM1 in Cell Wall Biogenesis and Virulence. **Plos One**, v. 9, n. 1, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086270>

DMC. **Therapy Xt Manual do Usuário**. 2016. Disponível em: http://www.dmcgroup.com.br/arquivos/manual/manual_therapy_xt_port.pdf. Acesso em: 30 jul. 2021.

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.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. Impact of Brief and Sequential Exposure to Nystatin on the Germ Tube Formation and Cell Surface Hydrophobicity of Oral *Candida albicans* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. **Medical Principles and Practice**, v. 23, n. 4, p. 307-312, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1159/000362369>

ESLAMI, L. M. The Comparison of Intracanal Medicaments, Diode Laser and Photodynamic Therapy on Removing the Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the Root Canal System (Ex-vivo Study). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 157-161, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.033>

ESFAHANI, A. N. et al. Antifungal effect of Atorvastatin against *Candida* species in comparison to Fluconazole and Nystatin. **Medicine and Pharmacy Reports**, n.92, p.368-373, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15386/mpr-1209>

FORCHE, A. et al. Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. **MBio**, v.2, p.1-9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00129-11>

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049>

FREIRES, I. A. et al. Coriandrum Sativum L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* Spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. **Plos One**, v. 9, n. 6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>

FRIEDMAN, D.; SCHWARTZ, I. S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof5030067>

GACSER, A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence. **Virulence**, v.7, n.2, p.65–67, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135288>

GERSTEIN, A. C. et al. Ploidy tug-of-war: evolutionary and genetic environments influence the rate of ploidy drive in a human fungal pathogen. **Evolution**, v. 71, p. 1025-1038, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/evo.13205>.

GONDIM, L. C. et al. Photodynamic therapy as a coadjuvant in endodontics: Literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 1 - 9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15709>

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology Spectrum**, v.5, n.3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>

HAGEAGE, G. J.; HARRINGTON, B. J. Use of calcofluor white in clinical Mycology. **Laboratory Medicine**, v. 15, n. 2, p. 109 – 112, feb. 1984.

HALDANE, D. J. M.; ROBERT, E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxine, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. **Diagn. Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 337-349, 1990.

HANNICKEL, A. Image J As A Tool For Measurement Of Area Of Magnetite Particles In Three Nanometric Scales. **CT**, p. 16-26, 2012.

HOCHMAN, B. et al. Desenhos de pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 2-9, 2005.

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.

HSIEH, Y. H. Sequential Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Encapsulated Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles and Flucytosine Treatment against *Candida tropicalis*. **Pharmaceutics**, v.1, p. 4-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010016>

JAN, L. V; BENNETT, R. J; ANDERSON, M. Z. Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.47-54, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>.

JAMIU, A.T. et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n.1, p.14–30, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031>

JAVED, F.; SAMARANAYAKE, L. P.; ROMANOS, G. E. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 5, p.726-734, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3pp50426c>

JORDÃO, C. C. et al. Consecutive treatments with photodynamic therapy and nystatin altered the expression of virulence and ergosterol biosynthesis genes of a fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 71, p.753-775. DOI: <https://doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>

KOGA-ITO, C. Y. et al. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. **Mycoses**, v.54, p. 278-285, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01899>

KRCMERY, V. et al. Nosocomial *Candida krusei* fungemia in cancer patients: report of 10 cases and review. **Journal of Chemotherapy**, v. 11, p.131-136, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1179/joc.1999.11.2.131>

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, p. 1073–1081, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27739-0>

KRISTANC, L. et al. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v.2, p.418-430, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.006>

LEE, H. S.; KIM, Y. Aucklandia lappa causa danos à parede celular em *Candida albicans* ao reduzir a quitina e (1,3) - β -D-Gluca. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.7, p.967-973, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.2002.02025>

LEGRAND M. et al. *Candida albicans*: An Emerging Yeast Model to Study Eukaryotic Genome Plasticity. **Trends in Genetics**, v.35, p.292-307, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.005>.

LEITE, M. C. A. et al. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/378280>

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v.189, p.1145–1175, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>

LI, W. R. et al. Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. **Nature**, v. 6, p. 1-9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep22805>

LIMA, I. O. et al. Antifungal Activity and Mode of Action of Carvacrol against *Candida albicans* Strains. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>

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. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>

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*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, p. 2099-2105, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt137>.

MÉTHOT, D.V.C, ALIZON, S. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. **Virulence**, v.1, p.775-785, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>

MONTEIRO, L. C et al. *Candida* on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its susceptibility to nystatin and amphotericin B. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 67, p. 1-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-86372019000183558>

MORSE D. J. et al. Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.2, p.337-343, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13145>.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, n. 01, p.15–25, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10266-009-0118-3>

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of low-level laser therapy (lllt) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.21, p.283-90, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1089/104454703322564497>

PIRRONE, M; PINCIROLI, R; BERRA, L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, p.160-166, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000255>

PERUSSI, R. S. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Química Nova**, v. 30, p.1-7, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>

PUCKETT, Y.; CHAN, O. Acute Lymphocytic Leukemia. **StatPearls Publishing**, jan. 2021.

RIBERA, J. M.; ORIOL, A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, p. 1033-1023, 2009. DOI: <https://doi.org/10.57772/19971>

RICHARDSON, M. D.; JONES, B. L. **Therapeutic Guidelines in Systemic Fungal Infections**. 4. ed. London: Remedica Publishing, 2007.

SARDI J. C., SCORZONI L., BERNARDI T. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.10-24, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/10.1099/jmm.0.045054-0>.

SHARMA, J. et al. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 21, n. 5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof5010017>

SHI, H. et al. The inhibitory activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) on *Candida albicans* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 1-6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102271>

STÁJER, et al. Utility of photodynamic therapy in dentistry: current concepts, **Dentistry Journal**, v. 8, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/dj8020043>

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**, v.40, p. 91-93, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000100021>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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**, p.3043–3045, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01601-10>

UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens**, v.6, p.1643, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>.

WARD, E. et al. Childhood and adolescent cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, p. 83-103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21219>

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging Non-*albicans Candida* Species. **Frontier in Microbiology**, n. 7, v. 1, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>

WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.18, p.12-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8pp00390d>.

WINGARD, J. R. et al. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p.115–125, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>

WILLIAMS, D. W. et al. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 250–265, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>

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. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>

XIMENES, P.B. et al. Targeting the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* cell wall using lectins: study of the carbohydrate-binding domain. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.20, n.3. p.3776–3782, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20033776>.

Anexo A – Normas do periódico Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, A2.

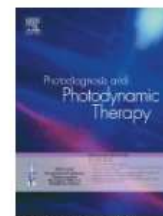


PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY

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

2020: 3.631 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents - Clinical Medicine
Journal Citation Reports - Science Edition
Science Citation Index Expanded
Scopus
ScienceDirect
PubMed/Medline
PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

R. Allison, 21st Century Oncology Greenville, Greenville, North Carolina, United States of America

Emeritus Editor

K. Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, United Kingdom

Associate Editors

H. Barr, Gloucester, United Kingdom
R. Boyle, Hull, United Kingdom
K. Dixon, Goole, United Kingdom
M. Eljamel, Lanark, United Kingdom
L. Freitag, Hemer, Germany
K. Furukawa, Tokyo, Japan
R. Hamblin, Boston, Massachusetts, United States of America
C. Hopper, Bromley, United Kingdom
Z. Huang, Lakewood, Colorado, United States of America
H. Kato, Tokyo, Japan
T. Mang, Orchard Park, New York, United States of America
H. Moseley, Dundee, United Kingdom
L. Turnbull, Hull, United Kingdom
H. Walt, Zurich, Switzerland
H. Wolfson, Jacksonville, Florida, United States of America

Editorial Board

M. Adamek, Katowice, Poland
A. Akopov, St. Petersburg, Russian Federation
D. Allan, Manchester, United Kingdom
E. Allan, Knutsford, United Kingdom
P. Barber, Dundee, United Kingdom
A. Batlle, Buenos Aires, Brazil
K. Berg, Oslo, Norway
G. Downie, Mount Pleasant, Texas, United States of America
R. Fekrazad, Tehran, Iran
L. Gasparyan, Helsinki, Finland
G. Gasser, Zurich, Switzerland
P. Hillemanns, Hannover, Germany
T. Horvath, Brno, Czechia
S. Ibbotson, Dundee, United Kingdom
P. Jichlinski, Lausanne, Switzerland
Juzeniene, Strassen, Luxembourg
N. Kashef, Tehran, Iran
H. Kostron, Innsbruck, Austria
S. Lecleire, Rouen, France
M. Leroy, Suresnes, France
L. Li, Guangzhou, Guangdong, China
A. Makela, Helsinki, Finland
S. Mordon, Loos, France
T. Nakamura, Shimotsuga-gun, Japan
D. Robinson, Rotterdam, Netherlands
P. Ross, Columbus, Ohio, United States of America
A. Sieron, Bytom, Poland
W. Stummer, Münster, Germany
I.B. Tan, Amsterdam, Netherlands
A. Thorpe, Leeds, United Kingdom
R. Waidelich, Munich, Germany
M. Wainwright, Liverpool, United Kingdom
X. Wang, Shanghai, China
A. Woong-Shick, Seocho-gu, South 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 no headings and up to 6 references and 2 tables or figures. An abstract of 150-200 words should also be provided.

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.

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)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- 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 on [Ethics in publishing](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [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, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' 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 [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

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 gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold 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.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 Author Services.

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 article number or 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.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

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](#)
- 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. <https://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 <https://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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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>

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights 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).

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 Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

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.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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) in addition to color reproduction in print. [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 highly encouraged.

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](#). Using citation 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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

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 article number or 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]. Barnaby 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. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

[4] 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:

[5] Cancer Research UK, *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] 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>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

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 <https://www.editorialmanager.com/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

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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 [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold 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 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

Anexo B – Normas do periódico Laser in Medical Science, A2.

Springer Search  Authors & Editors My account



Lasers in Medical Science

[Journal home](#) > [Submission guidelines](#)

Submission guidelines

Contents

- [Instructions for Authors](#)
 - [Types of papers](#)
 - [Manuscript Submission](#)
 - [Editorial Procedure](#)
 - [Title page](#)
 - [Text](#)
 - [Scientific style](#)
 - [References](#)
 - [Tables](#)
 - [Artwork and Illustrations Guidelines](#)
 - [Supplementary Information \(SI\)](#)
 - [Ethical Responsibilities of Authors](#)
 - [Authorship principles](#)
 - [Compliance with Ethical Standards](#)
 - [Conflicts of Interest / Competing Interests](#)
 - [Research involving human participants, their data or biological material](#)
 - [Informed consent](#)
 - [Research Data Policy](#)
 - [After Acceptance](#)
 - [Open Choice](#)
 - [English Language Editing](#)
- [Open access publishing](#)

For authors

[Submission guidelines](#)

[Ethics & disclosures](#)

[Fees and funding](#)

[Contact the journal](#)

[Submit manuscript](#)

Explore

[Online first articles](#)

[Volumes and issues](#)

[Sign up for alerts](#)

Instructions for Authors

Types of papers

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

[Back to top](#) ↑

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit manuscript" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Editorial Procedure

Double-blind peer review

This journal follows a double-blind reviewing procedure. Authors are therefore requested to submit:

A blinded manuscript without any author names and affiliations in the text or on the title page. Self-identifying citations and references in the article text should be avoided.

A separate title page, containing title, all author names, affiliations, and the contact information of the corresponding author. Any acknowledgements, disclosures, or funding information should also be included on this page.

[Back to top](#) ↑

Title page

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

17/08/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by "retrospectively registered"

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

*To be used for all articles, including articles with biological applications***Funding** (information that explains whether and by whom the research was supported)**Conflicts of interest/Competing interests** (include appropriate disclosures)**Availability of data and material** (data transparency)**Code availability** (software application or custom code)**Authors' contributions** (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)*Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals***Ethics approval** (include appropriate approvals or waivers)**Consent to participate** (include appropriate statements)**Consent for publication** (include appropriate statements)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

[Back to top](#) ↑**Text****Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.

<https://www.lancet.com/journal/10133/submission-guidelines>

4/30

- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(Download zip, 190 kB\)](#) 

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

[Back to top](#) 

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].

- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

[Back to top](#) ↑

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

- Article by DOI

Sifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn, Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb, <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org/LTWA](https://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

[Back to top](#) ↑

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

[Back to top](#) ↑

Artwork and Illustrations Guidelines

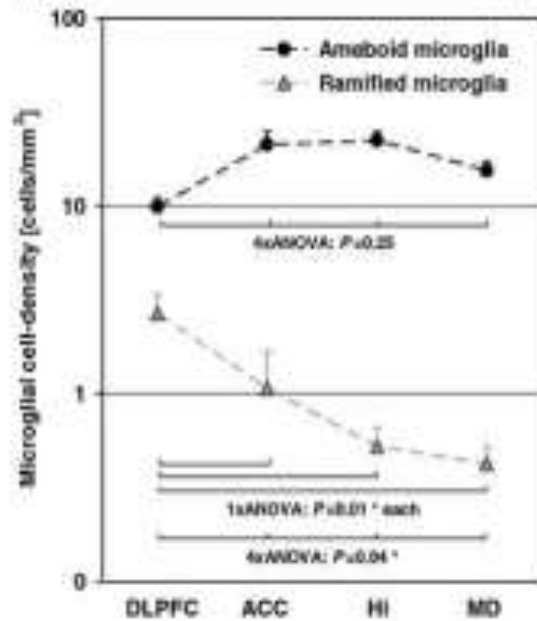
Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

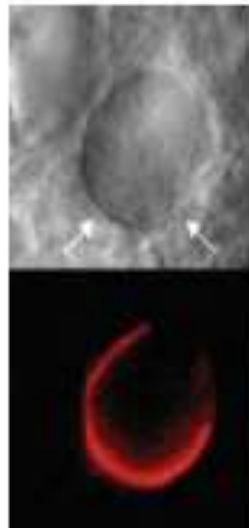
17/08/2021

Lapses in Medical Science | Submission guidelines



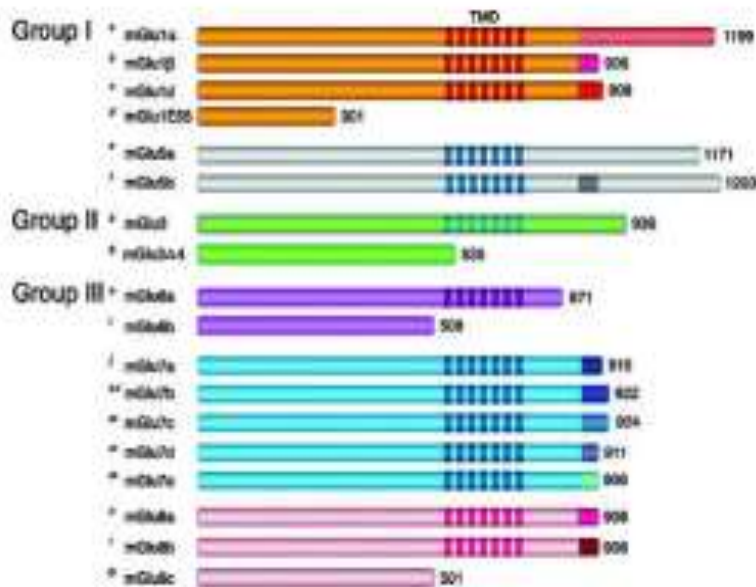
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online

appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

[Back to top](#) ↑

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

17/06/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that large-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

<https://www.garivogt.com/journal/117133/submission-guidelines>

11/01

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

[Back to top](#) ↑

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/web surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and

17/08/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

[Back to top](#) ↑

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors.](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNamara et al., PNAS February 27, 2018.](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name], ...

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

[Back to top](#) ↑

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

[Back to top](#) ↑

Conflicts of Interest / Competing Interests

Authors are requested to disclose interests *that are directly or indirectly related to the work submitted for publication*. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential conflict of interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the 'Declarations' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Conflicts of interests'/'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#) ↑

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filipin^{hi} (KOMP)Wts* RRID:MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR_003070

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date./No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#) ↑

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of

17/08/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as X rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered "informed". However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

17/08/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found

[here](#) (Download docs, 36 kB) ↓

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Consent to participate' and/or 'Consent to publish'. Other declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "Consent to participate":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for "Consent to publish":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

[Back to top](#) ↑

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

[List of Repositories](#)

[Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

[DataCite](#)

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

[Back to top](#) ↑

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

17/06/2021

Lives in Medical Science | Submission guidelines

[Back to top](#) ↑

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

[Back to top](#) ↑

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Getting a fast, free online grammar check.
- Asking a colleague who is proficient in English to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

[Free online grammar check](#)

17/06/2021

Lancet in Medical Science | Submission guidelines

[English language tutorial](#)[Nature Research Editing Service](#)[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 获取快速、免费的在线语法检查。
- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。

[免费在线语法检查](#)[教程](#)[Nature Research Editing Service](#)[American Journal Experts](#)

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- 高速なオンライン [文法チェック](#) を無料で受ける。
- 英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。

17/08/2021

Lives in Medical Science | Submission guidelines

- ・英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- ・プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。Nature Research Editing Service と American Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。Springerの著者は、いずれのサービスも初めて利用する際には10%の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

[無料のオンライン文法チェック](#)

[英語のチュートリアル](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

,

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오.

- ・ 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료들 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- ・ 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- ・ 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다. Springer 저자들이 본 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

[영어 튜토리얼 페이지](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 질자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

[Back to top](#) ↑

17/08/2021

Lasers in Medical Science | Submission guidelines

Open access publishing

To find out more about publishing your work Open Access in Lasers in Medical Science, including information on fees, funding and licenses, visit our [Open access publishing page](#).

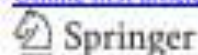
[Back to top](#) ↑

For authors

[Submission guidelines](#) [Ethics & disclosures](#) [Fees and funding](#) [Contact the journal](#) [Submit manuscript](#)

Explore

[Online first articles](#) [Volumes and issues](#) [Sign up for alerts](#)



Publish with us

[Authors & Editors](#)
[Journal authors](#)
[Publishing ethics](#)
[Open Access & Springer](#)

Discover content

[SpringerLink](#)
[Books A-Z](#)
[Journals A-Z](#)
[Videos](#)

Other services

[Instructors](#)
[Librarians \(Springer Nature\)](#)
[Societies and Publishing Partners](#)
[Advertisers](#)
[Shop on Springer.com](#)

About Springer

[About us](#)
[Help & Support](#)
[Contact us](#)
[Press releases](#)
[Imprimatur](#)

Legal

[General term & conditions](#)
[California Privacy Statement](#)
[Rights & permissions](#)
[Privacy](#)
[How we use cookies](#)
[Manage cookies/Do not sell my data](#)
[Accessibility](#)

Not logged in - 187.19.177.52

<https://www.springer.com/journal/11513/submission-guidelines>

20/30