



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

SOFIA HILUEY DE AGUIAR LEITE

TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA INFECÇÃO SISTÊMICA POR *Candida albicans*: EFICÁCIA EM *Galleria mellonella*

CAMPINA GRANDE  
2023

SOFIA HILUEY DE AGUIAR LEITE

**TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA INFECÇÃO SISTÊMICA POR *Candida albicans*: EFICÁCIA EM *Galleria mellonella***

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

**Área de concentração:** Clínica Odontológica

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão.

**CAMPINA GRANDE**

**2023**

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.

L533t Leite, Sofia Hiluey de Aguiar.  
Terapia fotodinâmica contra infecção sistêmica por *Candida albicans* [manuscrito] : eficácia em *Galleria mellonella* / Sofia Hiluey de Aguiar Leite. - 2023.  
79 p. : il. colorido.  
  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.  
"Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia - CCBS."  
1. *Candida albicans*. 2. Biofilmes. 3. Terapia fotodinâmica.  
4. Resistência a medicamentos. I. Título  
  
21. ed. CDD 617.6

SOFIA HILUEY DE AGUIAR LEITE


**TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA INFECÇÃO SISTÊMICA POR *Candida albicans*: EFICÁCIA EM *Galleria mellonella***

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

**Área de concentração:** Clínica Odontológica

Aprovada em: 16/08/2023.

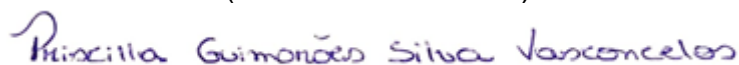
**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Diego Romário da Silva  
Universidade de Cuiabá (UNIC)  
(Examinador externo)



Profa. Dra. Priscilla Guimarães Silva Vasconcelos  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)  
(Examinador interno)

À minha família, em especial minha  
mãe, esposo e irmãs, por todo apoio,  
carinho e encorajamento, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, quem me deu oportunidade de estar aqui e me guia em todas as etapas da minha vida.

À minha querida orientadora, Professora Maria Helena, por toda confiança depositada em mim, por todas as oportunidades que me concedeu durante esses anos e pelas inúmeras contribuições a minha trajetória acadêmica até aqui. Agradeço também pelo cuidado, dedicação e carinho que a senhora dispensa aos orientandos que vão além das orientações e obrigações da Academia. Sou muito grata por tê-la encontrado na graduação e por Deus ter me permitido encontrá-la novamente no mestrado.

À minha mãe, Xênia, ao meu esposo, Mateus e as minhas irmãs, Jade e Liz, que acreditam mais em mim do que eu mesmo e me apoiam sempre. Vocês são o meu tudo, a quem eu dedico todos os esforços e também encontro o conforto que preciso.

Ao meu pai, Jorge (*in memoriam*), por sempre estimular meu pensamento crítico, por acreditar em mim e me dar todo o amor do mundo. Você é minha eterna saudade.

Aos meus sobrinhos, em especial, meus pequenos Jorge e Luísa, que com todo amor e pureza reabastecem minhas energias diariamente.

Agradeço também a minha avó, Marlene, e minha tia, Carla, que torcem por mim e vibram a cada conquista.

Agradeço a Professora Edja Maria por me conceder o espaço do Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD), me acolher maravilhosamente bem, se preocupar com nosso bem estar no laboratório e também com o andamento da pesquisa.

Ao Professor Diego Romário, o qual não mediu esforços para que eu conseguisse concretizar a pesquisa e, mesmo à distância, sempre foi extremamente solícito ao responder todas as minhas dúvidas.

Às meninas do laboratório, que muito me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho. Em especial, minha amiga maravilhosa, Paolla que me acompanhou nos experimentos e compartilhou muito dos meus dias até aqui, e a Leticia que com toda dedicação me mostrou e ensinou o funcionamento

de tudo no laboratório, além de toda amizade dispensada. Com amigos vamos mais longe, sempre!

À Professora Priscilla, por todo auxílio e orientação no laboratório e também por ter aceito participar da minha banca de defesa do mestrado.

À Professora Jozinete Pereira, que além de ser uma professora maravilhosa, esteve sempre presente no laboratório e me acompanhou em muitos dias de experimento, sempre se preocupando e incentivando.

Aos meus queridos amigos e companheiros de vida acadêmica, Alieny e Rhuan, por todos os conselhos, apoio e amizade. Vocês fazem a caminhada mais leve.

Aos meus colegas de turma pela união e apoio, sempre os levarei comigo.

A todos os meus professores do Programa de Pós-Graduação por toda contribuição a nossa formação acadêmica e pelos conselhos valiosos.

A todos os funcionários do departamento, em especial à Ahyanna, a qual escuta nossas preocupações e soluciona sempre com muito bom humor os nossos problemas. À Dione, sempre prestativa e preocupada com meu bem-estar nos dias de laboratório. Seu espírito bondoso melhora o dia de todos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa (PRPGP) da UEPB pela oportunidade de ingressar no mestrado e realizar esse trabalho.

À CAPES pelo fomento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

*Candida albicans* está envolvida com o surgimento de resistência antifúngica e apresenta inúmeros fatores de virulência, sendo a capacidade de formar biofilmes o principal deles. Os biofilmes são altamente tolerantes a ação de drogas antifúngicas, sendo infecções por biofilmes de *C. albicans* mais difíceis de tratar. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) é uma promissora, podendo ser uma coadjuvante importante no tratamento antifúngico. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia da TFDa no tratamento de infecções de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* no modelo *in vivo* de *G. mellonella*. O inóculo de *C. albicans*, cepas ATCC 90028 e isolado clínico A2 foram preparados na concentração de  $2 \times 10^8$ , concentração letal. O isolado clínico A2 foi isolado sob aprovação do comitê de ética, número: 51779315.7.0000.5187. As larvas foram inoculadas com as formas planctônicas e com biofilmes de 48 horas. Larvas de *G. mellonella* foram infectadas e tratadas com Fluconazol, Fotobiomodulação e TFDa. A energia laser utilizada correspondeu a dose de  $15 \text{ J/cm}^2$  com comprimento de onda de 650 nm e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos. As larvas foram observadas após as 4 primeiras horas e em seguida com intervalos de 24 horas, durante 120 horas. Após a curva de sobrevivência, a hemolinfa das larvas foi coletada e plaqueada. As placas foram incubadas por 48 horas e a quantidade de UFC formadas foram contabilizadas. Foram observados resultados significativos para a TFDa e o tratamento com fluconazol na sobrevivência e na diminuição da carga fúngica. A TFDa apresentou ação positiva contra *C. albicans*, inclusive contra biofilmes. O tratamento com luz laser vermelha isoladamente não impactou em maiores sobrevivência das larvas e também não apresentou resultados positivos na redução da infecção por *C. albicans* em *G. mellonella*.

**Palavras-Chave:** *Candida albicans*; biofilmes; terapia fotodinâmica; resistência a medicamentos.



## ABSTRACT

*Candida albicans* is involved in the emergence of antifungal resistance and presents numerous virulence factors, the main one being the ability to form biofilms. Biofilms are highly tolerant to the action of antifungal drugs, with *C. albicans* biofilm infections being more difficult to treat. PDT is a promising antimicrobial therapy and may be an important adjunct in antifungal treatment. The objective of this work was to evaluate the effectiveness of PDT in the treatment of infections of planktonic cells and biofilms of *C. albicans* in the *in vivo* model of *G. mellonella*. The inoculum of *C. albicans*, strains ATCC 90028 and clinical isolate A2 were prepared at a concentration of  $2 \times 10^8$ , a lethal concentration. Clinical isolate A2 was isolated under ethics committee approval, number: 51779315.7.0000.5187. Larvae were inoculated with planktonic forms and 48-hour biofilms. *G. mellonella* larvae were infected and treated with Fluconazole, Photobiomodulation and PDT. The laser energy used corresponded to a dose of 15 J/cm<sup>2</sup> with a wavelength of 650 nm and power of 100 mW continuously, for 2 minutes and 30 seconds. The larvae were observed after the first 4 hours and then at intervals of 24 hours, for 120 hours. After the survival curve, the hemolymph of the larvae was collected and plated. The plates were incubated for 48 hours and the amount of CFU formed was counted. Significant results were observed for PDT and treatment with fluconazole in survival and reduction of fungal burden. PDT showed positive action against *C. albicans*, including against biofilms. Treatment with red laser light alone did not impact greater survival of the larvae and also did not present positive results in reducing *C. albicans* infection in *G. mellonella*.

**Keywords:** *Candida albicans*; biofilms; photodynamic therapy; drug resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 – Etapas do experimento.....	24
Quadro 1 – Grupos de pesquisa considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> .....	32
Quadro 2 – Grupos de pesquisa considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> .....	32
Gráfico 1- Curva de sobrevivência das cepas ATCC 90028 e A2 no estudo piloto.....	34
Gráfico 2 - Curva de sobrevivência: toxicidade do azul de metileno e irradiação laser.....	35
Gráfico 3: Curva de sobrevivência com cepas planctônicas da cepa ATCC 90028.....	36
Gráfico 4: Curva de sobrevivência com células planctônicas da cepa A2.....	36
Gráfico 5: Curva de sobrevivência com biofilme ATCC 90028.....	37
Gráfico 6: Curva de sobrevivência com biofilme - A2.....	38
Figura 1: Quantificação de células de <i>C. albicans</i> nos grupos Planctônicos.....	39
Figura 2: Quantificação de células de <i>C. albicans</i> nos grupos Planctônicos.....	39
<b>Lista de figuras que constam no apêndice A- Etapas do experimento</b>	
<b>Figura 1: a)</b> pote de armazenamento das larvas <i>G. mellonella</i> ; <b>b e c)</b> incubadora B.O.D. de armazenamento das larvas; <b>d)</b> ração preparada semanalmente para alimentação das larvas.....	53
<b>Figura 2: a)</b> Azul de metileno; <b>b e c)</b> laser e suporte para padronizar distância.....	53

**Figura 3: a)** Preparação do inóculos de ATCC 90028 e Cepa A2;  
**b)** Contagem da densidade do inóculo Câmara de Neubauer e Microscópio Óptico.....54

**Figura 4: a)** Preparação do biofilme de ATCC 90028 e Cepa A2 em placa de 24 poços;  
**b)** Incubadora para preparação dos biofilmes.....54

**Figura 5: a)** Larvas separadas por grupo;  
**b)** Inoculação na larva;  
**c e d)** Irradiação da luz laser vermelha, irradiando a larva.....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>G.</i>	<i>Galleria mellonella</i>
<i>mellonella</i>	Matriz extracelular
MEC	
TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
UFC	Unidade formadora de colônia

## LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- ® Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b><i>Candida albicans</i></b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Fatores de virulência relacionados a <i>C. albicans</i></b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Resistência antifúngica</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Terapia fotodinâmica antimicrobiana</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b><i>Galleria mellonella</i></b> .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
<b>4.1</b>	<b>Local de realização da pesquisa</b> .....	24
<b>4.2</b>	<b>Caracterização e sequência metodológica do estudo</b> .....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS (ARTIGO)</b> .....	25
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
	<b>APÊNDICE A – IMAGENS REFERENTES AOS MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
	<b>ANEXO A – NORMAS DO PERIÓDICO</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é uma espécie fúngica e em condições normais coloniza a cavidade bucal de maneira comensal. No entanto, quando há quebra da homeostase por ocasião de anormalidades do sistema imunológico do hospedeiro ou alterações no microbioma, tem-se um supercrescimento fúngico acompanhado de mudança do perfil comensal para patogênico (Kaur, Nobile, 2023; Lopes, Lionakis, 2021), com consequente estabelecimento de infecções superficiais ou invasivas, sendo esta última responsável por alta mortalidade, sobretudo em pacientes imunodeprimidos (Xu *et al.*, 2021; Li *et al.* 2020).

Dentre os fatores de virulência da *C. albicans*, a capacidade de formar biofilme é um dos fatores mais importantes (Pierce *et al.*, 2017). Definidos como aglomerados de células microbianas envolvidas por uma matriz extracelular, os biofilmes funcionam como um casulo protetor e facilitam a adesão, proliferação e disseminação da infecção para o resto do corpo. Adicionalmente, a conformação do biofilme atua como um fator protetor contra a ação dos agentes antifúngicos, tornando as infecções particularmente difíceis de tratar. (Barros *et al.* 2017; Ramage, 2023; Ponde *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2020).

O arsenal antifúngico disponível atualmente é limitado em comparação ao arsenal de antibióticos e engloba 3 classes principais: azóis, polienos e as equinocandinas. No entanto, assim como acontece com a maioria dos antimicrobianos convencionais, devido a utilização muitas vezes indevidas e/ou indiscriminada, os microorganismos resistentes são selecionados e passam a apresentar resistência. No caso da *C. albicans*, antifúngicos tradicionais como o fluconazol, vem sendo cada vez mais associado com casos de resistência microbiana (Chand *et al.*, 2021; Vega-Chacón *et al.*, 2021; Lee, Puumala, Robbins, Cowen, 2020).

Os principais métodos para superar a resistência antifúngica incluem o desenvolvimento de novos medicamentos, aumentando as possibilidades de tratamento e, também, a aplicação de terapias não-farmacológicas, não limitadas por mecanismos de resistência microbiana (Zhang *et al.*, 2020). Dentre as terapias não-farmacológicas, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)

tem sido utilizada como uma estratégia terapêutica para tratar uma variedade de infecções, pois é capaz de suprimir espécies de forma seletiva e, principalmente, sem desenvolver resistência microbiana (Nunes *et al.*, 2023). A TFDa atua danificando aleatoriamente vários componentes da célula-alvo por estresse oxidativo, de maneira que não existe um direcionamento específico do ataque e dessa forma, a adaptação dos microorganismos a esse tipo de terapia é improvável (Bugyna, Kendra, Bujdáková, 2023)

Levando em consideração a principal vantagem da TFDa de não selecionar microorganismos resistentes e, dessa maneira, não induzir resistência microbiana, o impacto prejudicial que as infecções fúngicas podem ter na saúde humana e a necessidade do desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, a investigação da eficácia da TFDa no combate a *C. albicans*, incluindo sua ação contra biofilmes, é imperativa (Zhang *et al.*, 2020). Para isso, os estudos *in vivo* são fundamentais, pois permitem reproduzir a interação com o sistema imunológico do hospedeiro de forma comparável a infecção em humanos (Barros *et al.* 2019).

Respeitando os princípios dos 3R's da experimentação animal, tem-se utilizado sempre que possível modelos alternativos à mamíferos (Hubrecht, Carter, 2019; Russell, Burch, 1959). O modelo *in vivo* de *Galleria mellonella* é um modelo de estudo de animal invertebrado empregado para decifrar os fatores de virulência de microrganismos e testar terapias antimicrobianas, pois apresenta um sistema imunológico comparável ao encontrado em mamíferos (Tao, Duma, Rossez, 2021; Piatek, Sheehan, Kavanagh, 2021).

Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia da TFDa no tratamento de infecções de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* no modelo *in vivo* de *G. mellonella*.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Candida albicans*

A transformação do perfil comensal de *C. albicans* para patogênico está correlacionada com mudanças nas propriedades das células e na produção de fatores de virulência (Rapala-Kozik *et al.*, 2023). Dentre os diversos fatores de virulência, pode-se destacar a capacidade de adesão, invasão e dano à célula hospedeira; o polimorfismo, caracterizado por uma plasticidade na alternância entre diferentes estados morfogênicos; e a capacidade de formar biofilmes (Lopes, Lionaski, 2021).

A adesão às células hospedeiras e às superfícies de dispositivos e instrumentos médicos é considerada uma etapa-chave para a virulência de *C. albicans*, pois é o primeiro passo da infecção e um pré-requisito importante para a invasão nos tecidos (Rapala-Kozik *et al.*, 2023). Para que a adesão aconteça, as adesinas tem papel importante, promovendo a aderência entre as células fúngicas e às células hospedeiras através de ligações covalentes (Bu *et al.*, 2022).

A transição de levedura para hifa acompanha o processo de adesão e é um mecanismo importante para a segunda etapa, a invasão dos tecidos. A hifa é a forma invasiva da *Candida* e possui a capacidade de penetrar no tecido hospedeiro através da endocitose induzida e da infiltração ativa. A endocitose induzida refere-se ao processo mediado pelo hospedeiro, o qual os fungos expressam invasinas que ao ser reconhecidas pelas células epiteliais desencadeiam processos que culminam na endocitose do fungo (Bu *et al.*, 2022; Richardson, Ho, Naglik, 2018).

A infiltração ativa, por sua vez, é realizada pela perfuração da membrana epitelial pela extremidade da hifa, processo dependente apenas da ação fúngica. Em infecções mais avançadas, a penetração ativa pode dar acesso aos vasos sanguíneos através dos quais as células fúngicas atingem locais distantes do corpo e promovem a disseminação da doença (Talapko *et al.*, 2021; Rapala-Kozik *et al.*, 2023; Lopes, Lionakis, 2021).

A capacidade de formar biofilmes na superfície do hospedeiro ou em superfícies abióticas é o fator mais importante da virulência da *C. albicans* (Talapko *et al.*, 2021). O processo de formação do biofilme acompanha o de adesão. Após a fixação das células planctônicas ocorre a proliferação das células aderidas, formando microcolônias. Conforme o biofilme amadurece, a adesão é mantida, o metabolismo de aminoácidos é aumentado e ocorre produção constante de matriz extracelular (MEC) (Ponde *et al.*, 2021).

A MEC envolve células de levedura, hifas e pseudo-hifas, formando um ambiente tridimensional propício para adesão e proliferação de microrganismos. A matriz é complexa e resistente, sendo sua formação essencial para o biofilme, pois fornece além do suporte estrutural, proteção às células microbianas contra ataques do sistema imunológico do hospedeiro, bem como do tratamento antifúngico, dificultando a penetração dos agentes antimicrobianos (Rapala-Kozik *et al.*, 2023; Ponde *et al.*, 2021; Pierce *et al.*, 2017).

Na fase final, com o biofilme já maduro, tem-se a dispersão das células não aderentes, possibilitando a colonização de outras partes do corpo e iniciando novos ciclos de formação de biofilme. A dispersão promove a disseminação da infecção e está fortemente associada a forma invasiva da candidíase (Rapala-Kozik *et al.*, 2023; Tsui, Kong, Jabra-Rizk, 2016).

Notavelmente, as células dispersas do biofilme parecem “pré-condicionadas” para virulência máxima. Diferentemente das formas planctônicas, apresentam maior aderência a substratos e maior capacidade de filamentação, apresentando uma maior facilidade de formar novos biofilmes. Além de apresentar suscetibilidade reduzida a antifúngicos. Dessa forma, é possível inferir que mesmo que a estrutura do biofilme seja desfeita, as células dispersas terão virulência maior e serão mais ameaçadoras ao hospedeiro que as planctônicas (Ponde *et al.*, 2021).

## **2.2 Fatores de virulência relacionados a *C. albicans***

Infecções envolvendo biofilmes são mais agressivas e resistentes aos tratamentos antimicrobianos que as infecções causadas por formas planctônicas

(Pereira, Fontenelle, Brito, Morais, 2021). A tolerância dos biofilmes aos antifúngicos se deve a diversos fatores, incluindo o mecanismo de regulação com bombas de efluxo de drogas; a existência de células persistentes altamente tolerantes as drogas antimicrobianas, e, principalmente, a composição e ação da MEC do biofilme maduro (Costa *et al.* 2020; Kaur, Nobile, 2023).

A regulação positiva de bombas de efluxo modulam a exportação de drogas em *C. albicans* e funcionam como canais que transportam os antifúngicos acumulados para fora da célula, longe de seus substratos-alvo. Em células planctônicas as bombas de efluxo apenas são reguladas quando expostas a drogas antifúngicas, no entanto, em biofilmes são altamente reguladas durante o estágio de adesão e permanecem conforme o biofilme amadurece, em uma regulação constante que independe da presença ou não da droga antifúngica (Kaur, Nobile, 2023; Sandai, Tabana, Ouweini, Ayodeji, 2016).

As células persistentes correspondem a variantes metabolicamente adormecidas que se formam aleatoriamente na camada basal do biofilme e são altamente tolerantes as drogas antimicrobianas (Kaur, Nobile, 2023). A tolerância é atribuída ao fato dessas células não serem afetadas por agentes antimicrobianos que visam células metabolicamente ativas. No entanto, na interrupção do tratamento antifúngico as células dormentes podem reverter seu estado para um metabolicamente ativo e promover o repovoamento do biofilme (Tsui, Kong, Jabra-Rizk, 2016; Cavalheiro, Teixeira, 2018).

A MEC, por sua vez, desempenha um papel preponderante na blindagem das células do biofilme ao tratamento antifúngico. A matriz funciona como uma espécie de "armadilha molecular", dificultando a difusão e a penetração dos antifúngicos no interior do biofilme. Isso resulta em uma concentração local reduzida da droga antifúngica e cria um ambiente favorável para o desenvolvimento de resistência (Pierce *et al.*, 2017; Ponde *et al.*, 2021).

Os microrganismos que estão dentro do biofilme estão expostos a uma quantidade menor de antifúngico e, como resultado, aqueles que possuem características genéticas ou controle de resistência têm uma vantagem seletiva. Ao longo do tempo, a pressão de seleção positiva favorece o crescimento e a sobrevivência de microrganismos resistentes, aumentando a população de

microrganismos resistentes dentro do biofilme e reduzindo a eficácia dos tratamentos antifúngicos subsequentes (Ponde *et al.* 2021; Rapala-Kozik *et al.*, 2023).

### 2.3 Resistência antifúngica

Comparado aos agentes antibacterianos, a disponibilidade de agentes antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas é consideravelmente menor. Uma razão para essa disparidade, encontra-se na natureza eucariótica da célula fúngica. Por serem organismos eucarióticos, os fungos possuem células com estruturas semelhantes às células humanas, e, portanto, identificar alvos de drogas seletivos aos fungos sem causar toxicidade para o hospedeiro é problemático (Tsui, Kong, Jabra-Rizk, 2016; Lee, Puumala, Robbins, Cowen, 2020).

As principais classes de drogas antifúngicas utilizadas no tratamento de infecções por *C. albicans*, são os azóis, polienos e as equinocandinas, sendo os azóis, a classe mais utilizada. A via de ação dos azóis compreende a inibição da síntese do principal componente da parede celular fúngica, o ergosterol, levando à morte do fungo (Ramage *et al.*, 2023; Volkova *et al.*, 2021).

A nistatina e a anfotericina B, pertencentes a classe dos polienos, promovem a formação de poros na membrana celular, que levam ao vazamento de íons e consequente morte fúngica. As equinocandinas, representadas por caspofungina e a micafungina, por sua vez, representam a classe mais atual de droga antifúngica e sua atuação danifica a integridade estrutural da parede celular. Dentre as drogas antifúngicas, as equinocandinas é a classe que apresenta os melhores resultados no combate a infecções por biofilmes (Ramage *et al.*, 2023; Tsui, Kong, Jabra-Rizk, 2016).

Na tentativa de contornar os efeitos deletérios causados pelas drogas antifúngicas, as células de *C. albicans* modificam inúmeras atividades para se adaptar ao estresse induzido pela droga. Dependendo do mecanismo de ação, as células fúngicas podem aumentar a regulação por bombas de efluxo, substituir o ergosterol por outro esterol; adquirir mutações para uma maior

resistência e modular diversas outras atividades para defesa e sobrevivência (Zolin, Fonseca, Zambom, Garrido, 2021; Kaur, Nobile, 2023).

De inúmeras maneiras, *C. albicans* já demonstrou capacidade de resistir a maioria dos medicamentos antifúngicos disponíveis, levando a máxima de que o desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos por microrganismos é inevitável e a busca por novas terapias é emergencial (Zolin, Fonseca, Zambom Garrido, 2021).

## 2.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana consiste na administração de um fotossensibilizador não tóxico, seguida de irradiação por luz visível com comprimento de onda capaz de ativá-lo na presença de oxigênio molecular. Ao absorver a luz, os fotossensibilizadores transferem energia para o oxigênio molecular, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS) altamente reativos e tóxicas para as células microbianas (Figueiredo-Godoi *et al.*, 2019).

As EROs, como oxigênio singleto e radicais hidroxila levam a morte das células microbianas através da oxidação de uma diversidade de biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, provocando danos extensos aos componentes celulares dos microrganismos no entanto, não existe um alvo específico direcionado a ser danificado pelas EROs e, portanto, a adaptação dos microrganismos a esse mecanismo é mais difícil (Bugyna, Kendra, Bujdáková, 2023; Grizante-Barião *et al.*, 2022). Além disso, o alcance curto das EROS faz com que elas operem apenas localmente nas células-alvo que captam o fotossensibilizador, tornando a ação da TFDa altamente seletiva para os microrganismos tratados (Figueiredo-Godoi *et al.*, 2019).

A capacidade das EROs de causar danos generalizados nas células-alvo, sem que os microrganismos desenvolvam resistência direcionada a um único alvo molecular específico, é uma vantagem importante da TFDa como terapia antimicrobiana, pois não induz resistência microbiana (Carmello *et al.* 2016; Figueiredo-Godoi *et al.*, 2019). Essa vantagem vem ganhando interesse científico como uma estratégia terapêutica não medicamentosa para tratar uma

variedade de infecções, podendo também ser uma estratégia promissora no combate a infecções causadas por *C. albicans* multirresistentes (Bapat, Nobile, 2021).

## 2.5 *Galleria mellonella*

A regra dos “3Rs” da Regulamentação Fundamental Internacional aborda três princípios éticos no uso de animais em pesquisa e refere-se a: substituição, redução e refinamento em pesquisa, tendo como objetivo garantir o bem-estar animal. Dentre os princípios tem-se o da substituição, que incentiva os pesquisadores a substituir, sempre que possível, os modelos tradicionais de roedores por modelos alternativos não-mamíferos (Hubrecht, Carter, 2019; Russell, Burch, 1959).

Em contrapartida, modelos não mamíferos também são informativos para decifrar os fatores de virulência necessários durante as interações hospedeiro-patógeno (Tao, Duma, Rossez, 2021). Existe uma ampla gama de semelhanças estruturais e funcionais entre a resposta imune de insetos e a resposta imune inata de mamíferos. Eles possuem um sistema imunológico altamente bem-sucedido que identifica rapidamente patógenos e parasitas e os mata diretamente ou os imobiliza (Piatek, Sheehan, Kavanagh, 2021).

A resposta imune inata dos insetos consiste em resposta imune celular e resposta imune humoral. A resposta imune celular é mediada por células fagocíticas denominadas hemócitos, enquanto a resposta humoral é orquestrada por moléculas efetoras solúveis que imobilizam ou matam o patógeno e incluem proteínas do tipo complemento, melanina e peptídeos antimicrobianos (Smith, Casadeval, 2021). Embora os insetos não possuam uma resposta imune adaptativa, essa característica não representa uma desvantagem para o modelo, mas sim uma vantagem, pois permite o estudo de interações parasita-hospedeiro e mecanismos de imunidade inata relacionados sem a interferência de respostas adaptativas (Cutuli *et al.*, 2019).

Como resultado, tem-se que uma grande variedade de insetos agora que podem ser usados como modelos *in vivo* para avaliar a virulência microbiana ou

para avaliar a eficácia e toxicidade de compostos antimicrobianos polpando a utilização de modelos murinos. Dentre os modelos invertebrados, destaca-se a *G. mellonella* por suas vantagens de criação e experimentação e por seu sistema imune (Piatec, Sheehan, Kavanagh, 2021).

*G. mellonella* pertence à ordem Lepidoptera da família Pyralidae. Está distribuída em todo o mundo e disponível comercialmente para pesca ou alimentação de répteis e aves. Apresentando um ciclo de vida rápido, leva de 8 a 12 semanas sob condições favoráveis para completar um ciclo. Seu desenvolvimento é dividido em: ovo; larva, pupa e mariposa adulta (Tao; Duma; Rossez, 2021).

O sistema imunológico de *G. mellonella* é um sistema circulatório aberto do qual a hemolinfa é o elemento chave e compreende: barreira física, resposta celular e resposta humoral. A cutícula representa a barreira física que impede a entrada de patógenos (Durieux *et al.*, 2021). A resposta celular é mediada por hemócitos, células análogas aos fagócitos humanos. Enquanto a resposta humoral promove a imobilização ou morte do patógeno através do seu papel na melanização e coagulação da hemolinfa (Tsai; Loh; Proft, 2016; Tao; Duma; Rossez, 2021).

Foram identificados pelo menos seis tipos de hemócitos em *G. mellonella*: prohemócitos, plasmatócitos, células granulares, coagulócitos, esferulócitos e oenocitóides. A concentração destes na hemolinfa varia durante a vida do inseto e em resposta a patógenos (Pereira *et al.*, 2021; Wojda *et al.*, 2020). Com a penetração de micro-organismos, as células granulares atacam e em seguida o processo promove a fixação de plasmócitos resultando em encapsulamento ou nodulação que se assemelham às reações de defesa celular humana (Tao, Duma, Rossez, 2021).

Como hospedeiro modelo, as larvas de *G. mellonella* são amplamente propostas para o estudo da patogênese, mecanismos de virulência, resposta imune e para avaliação do potencial de compostos antimicrobianos. Elas apresentam várias vantagens, incluindo baixo custo de manutenção, facilidade na criação e obtenção de amostra considerável para estudos de alto rendimento (Cutuli *et al.*, 2019; Firacative *et al.*, 2020; Tao; Duma; Rossez, 2021).

O sucesso do uso de *G. mellonella* como modelo reprodutível para experimentos de virulência depende fortemente da padronização de métodos de manutenção e reprodução para produzir a menor variabilidade genotípica e fenotípica. Esse objetivo é melhor alcançado pela manutenção de culturas larvais em um ambiente controlado de laboratório com uma dieta regular e consistente, resultando em larvas de qualidade confiável para experimentos de virulência (Firacative et al., 2020).

Alguns fatores podem interferir no desenvolvimento da larva, como a umidade e a temperatura do ambiente, sendo a temperatura entre 29 a 33°C considerada ótima (Cutuli *et al.*, 2019). A composição do alimento também pode ter impacto no desenvolvimento larval podendo afetar a pupação, volume de hemolinfa, densidade de hemócitos e até mesmo, em conjunto com outros fatores ambientais, a suscetibilidade à infecção (Durieux et al., 2021).

A melanização, por sua vez, consiste em um mecanismo da resposta humoral da larva e pode ser descrita como a síntese e deposição de melanina para encapsular patógenos no local da ferida, seguida de coagulação e opsonização da hemolinfa e é análoga à formação de abscessos em infecções de mamíferos (Tsai; Loh; Proft, 2016).

Geralmente, a melanização começa com manchas pretas distintas nas larvas de cor creme, que vão intensificando com a progressão da infecção. Quando a infecção é controlada pelo sistema imunológico, a melanização é interrompida e elas sobrevivem. No entanto, quando ocorre a continuação da melanização e esta é concluída, tem-se a morte da larva logo em seguida (Tao, Duma, Rossez, 2021).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) no combate a infecção por células planctônicas e biofilme de *C. albicans* no modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar se a TFDa impactou na sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectada por células planctônicas e biofilme de *C. albicans* e reduziu o número de UFC na infecção por *C. albicans*;

Comparar a patogenicidade de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* na *G. mellonella*;

Comparar a eficácia dos tratamentos: antifúngicos, fotobiomodulação e TFDa na infecção por *C. albicans* em *G. mellonella*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

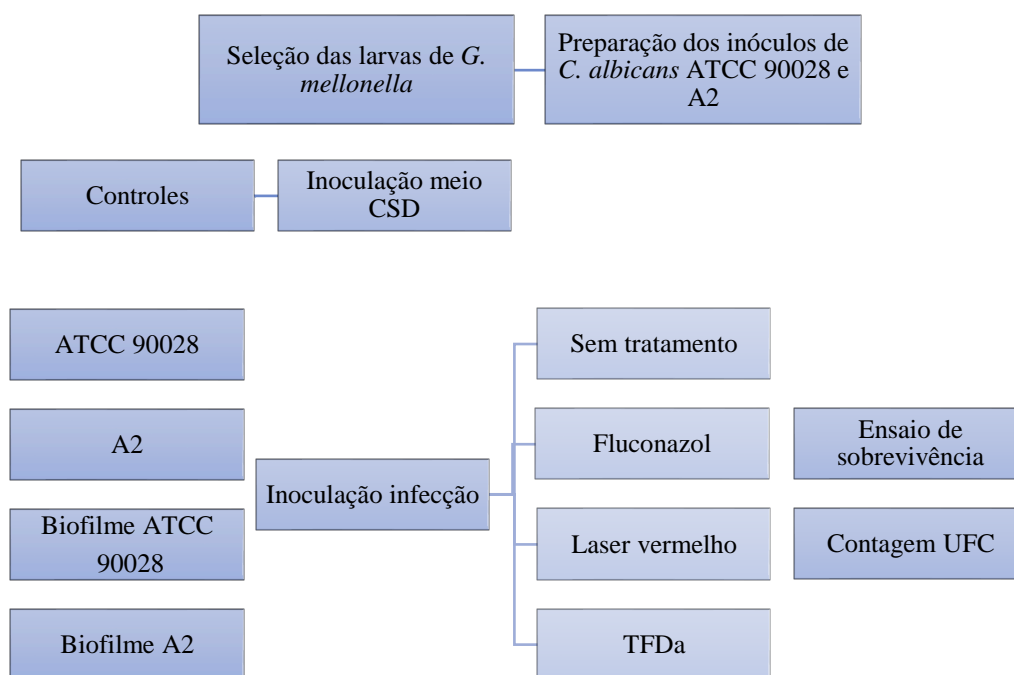
### 4.1 Local de realização da pesquisa

Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD) do departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, campus I, Campina Grande, Paraíba.

### 4.2 Caracterização e sequência metodológica do estudo

Estudo experimental *in vivo*, com observação direta em laboratório. A sequência metodológica encontra-se no fluxograma 1.

**Fluxograma 1:** Etapas do experimento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## 5 RESULTADOS (ARTIGO)

O projeto de pesquisa desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta dissertação: “Terapia fotodinâmica no tratamento antifúngico em modelo de *Galleria mellonella*”.

O referido artigo será submetido ao periódico Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (ISSN online: 1873-1597; Fator de impacto [2023]: 3.3; Qualis CAPES: Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos estão apresentadas no Anexo A.

### **Terapia fotodinâmica no tratamento antifúngico em modelo de *Galleria mellonella***

S. H. A. LEITE<sup>1</sup>, M. H. C. V. Catão<sup>1</sup>, D. R. SILVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade de Cuiabá (UNIC)

Autor correspondente:

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em

Odontologia Rua Baraúnas, 351 – Bairro Universitário – Campina Grande –

PB – Brasil CEP 58429-500 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: mhcvcatao@gmail.com

## RESUMO

**Objetivo:** investigar a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) no combate a infecção por biofilme e por células planctônicas de *C. albicans* no modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*. **Métodos:** Foram preparados inóculos na concentração de  $2 \times 10^8$  de *C. albicans* ATCC 90028 e isolado clínico A2 de células planctônicas e também foi utilizado para a preparação de biofilmes. As larvas foram inoculadas com o conteúdo aspirado dos biofilmes e com concentrações de células planctônicas. Em seguida foram tratadas com antifúngico, terapia fotodinâmica antimicrobiana e luz laser vermelho. A energia laser utilizada correspondeu a dose de  $15 \text{ J/cm}^2$  com comprimento de onda de 650 nm e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos. Os tratamentos foram analisados durante 120 horas, no intervalo das primeiras 4 horas e em seguida, com intervalos de 24 horas. Ao final dos ensaios de sobrevivência, 3 larvas aleatórias de cada grupo foram lisadas, diluídas em series e plaqueadas em meio seletivo para quantificação da carga fúngica. **Resultados:** A TFDa e o fluconazol apresentaram os melhores resultados na curva de sobrevivência e na diminuição da viabilidade fúngica observadas pela quantificação de UFC/ml de *C. albicans*. Os tratamentos com luz laser vermelho não impactaram em maior sobrevivência ou redução da concentração de UFC/ml. **Conclusão:** A TFDa possui ação contra células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* comparativa com o tratamento padrão com fluconazol. A luz laser vermelha isoladamente não apresentou resultados positivos, indicando que isoladamente a luz laser vermelha não apresentou resultados antimicrobianos. **Palavras-chave:** *Candida albicans*; Terapia fotodinâmica; Resistência a Medicamentos; Modelos Animais.

## INTRODUÇÃO

Os fungos foram amplamente subestimados como uma ameaça à saúde pública impactando em um limitado grupo de medicamentos para tratar infecções fúngicas. No entanto, o surgimento de células fúngicas resistentes levantou a problemática da resistência antifúngica e despertou para a necessidade do

desenvolvimento de novas drogas e terapias (Lee, Puumala, Robbins, Cowen, 2020).

A resistência antifúngica acontece principalmente por adaptação à pressão de seleção de drogas, de modo que o uso frequente e prolongado de antifúngicos para tratar infecções resulta na seleção de microrganismos resistentes. É o que acontece com *Candida spp*, principal causa de infecções fúngicas em todo o mundo, e, especialmente com *C. albicans*, espécie mais envolvida com infecções invasivas e também com o desenvolvimento de resistência antifúngica (Rapala-Kozik *et al.*, 2023; Whaley *et al.*, 2017; Sandai, Tabana, Ouweini, Ayodeji, 2016).

Por esses motivos, *C. albicans* tornou-se a espécie de *Candida* mais estudada (Poon, Hui, 2023; Kabir, Hussain, Ahmad, 2012) e já demonstrou mecanismos de evasão a ação da maioria das drogas antifúngicas disponíveis, principalmente a classe dos azóis. Os mecanismos envolvendo essa resistência são múltiplos e complexos, no entanto a capacidade de *C. albicans* formar biofilmes é a principal desta, visto que, os biofilmes são inerentemente tolerantes a terapia antimicrobiana (Vega-Chacón *et al.*, 2021; Tsui, Kong, Jabra-Rizk, 2016).

Em comparação com os antibióticos, a disponibilidade de antifúngicos atualmente é bastante reduzida. Além dos azóis, existem apenas mais duas classes antimicrobianas principais usadas contra infecções invasivas de *C. albicans*, os polienos e as equinocandinas, sendo estas também vulneráveis ao desenvolvimento de resistência antifúngica (Vega-Chacón *et al.*, 2021).

De maneira a contornar essa realidade, tem-se buscado desenvolver novas estratégias para tratar infecções fúngicas de forma eficaz, visto que, o desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos por microrganismos parece ser inevitável. Dessa forma, o ideal no desenvolvimento de novos tratamentos é que estes não sejam limitados por mecanismos de resistência (Zolin, Fonseca, Zambom, Garrido, 2021).

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) pode ser uma modalidade promissora. A TFDa tem sido utilizada para o combate de infecções multirresistentes e tem demonstrado ser bem-sucedida. O sucesso

deve-se, principalmente, ao seu mecanismo de ação, que atua danificando diversos componentes da célula microbiana simultaneamente e por esse motivo não possibilita a formulação de mecanismos de resistência microbiana (Freire, Ferraresi, Jorge, Hamblin, 2016; Carmello et al., 2016).

Com a finalidade de avaliar o sucesso de um tratamento antimicrobiano estudos *in vivo* são importantes. O modelo de *G. mellonella* é um importante modelo de estudo *in vivo* e indicativo para experimentos de virulência e terapêuticos, apresentando respostas imunológicas comparáveis aos de mamíferos (Tao, Duma, Rossez, 2021). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar a eficácia da TFDa no combate a infecção por biofilme e por células planctônicas de *C. albicans* no modelo *in vivo* de *G. mellonella*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostra**

A amostra foi composta por larvas de *G. mellonella*, de aparência saudável, na cor creme, pesando entre 250 a 300mg, distribuídas em diferentes grupos, de acordo com a infecção e o tratamento. Cada grupo foi composto por 10 larvas. As larvas foram mantidas em incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 30°C, durante o experimento, sendo removidas exclusivamente para a aplicação de inóculo, antifúngico, bem como para aplicação do azul de metileno e para irradiação a laser.

Com o objetivo de facilitar a manipulação das larvas durante a inoculação, as placas de vidro contendo os grupos de larvas de *G. mellonella* foram deixados sobre uma placa térmica de gelo artificial durante cinco minutos, dessa forma, a redução no nível de movimentação das larvas proporcionada por esta técnica permitiu um melhor manuseio durante as aplicações.

### **Cultivo das larvas *G. mellonella***

A criação e manutenção das larvas foi realizada uma vez por semana, constituindo-se por limpeza e alimentação das mesmas (Apêndice A, figura 1), seguindo o protocolo sugerido por Jorjão et al. (2018). As larvas foram alimentadas com dieta artificial contendo 100g cera de abelha, 193g de fubá, 94g de levedo de cerveja, 80g de farinha de soja, 48g de leite em pó desnatado, 207g de mel e 100ml de água (Silva et al., 2019).

### **Cepas de *C. albicans***

Foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, uma padronizada (ATCC 90028) e uma cepa de *C. albicans* isolada de lesões de candidíase oral de pacientes da clínica-escola da Universidade Estadual da Paraíba, sob aprovação do comitê de ética da instituição com o número 51779315.7.0000.5187. Ambas disponíveis em estoque do Laboratório de Análises e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, campus I, Campina Grande, Paraíba.

### **Energia laser e concentração do fotossensibilizador**

A energia laser utilizada correspondeu a dose de 15 J/cm<sup>2</sup> com comprimento de onda de 650 nm (vermelho visível) e potência de 100 mW de modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos. O aparelho utilizado foi o THERAPY XT (D.M.C. equipamentos LTDA®). O azul de metileno (ACS científica®) (Apêndice A, figura 2, a) foi usado como fotossensibilizador neste estudo, na concentração de 1500 µM e foram preparados dissolvendo o corante em solução fisiológica. A quantidade inoculada por larva foi de 5 µL (Paziani, 2019).

Com o objetivo de padronizar a distância na irradiação com a luz laser, foi adaptado um suporte para fixação do aparelho laser utilizado (Apêndice A, figura 2, b, c).

## **Preparo de antifúngico**

O fluconazol (Fagron®) foi o antifúngico sistêmico selecionado para a realização do tratamento da infecção fúngica. Foi utilizada a concentração de 80 mg/kg de peso corporal, seguindo a concentração ideal encontrada em estudo de Campos (2022). Para o preparo das soluções, a quantidade de antifúngico correspondente à dosagem desejada foi diluída em água destilada estéril.

## **Estudo piloto**

O estudo piloto foi realizado com a *C. albicans* ATCC 90028 e com a cepa clínica A2 para confirmar o potencial letal das concentrações estabelecidas no estudo de Campos (2022). Considerando para infecção das larvas os níveis de superinfecção  $2 \times 10^8$  células para ambas as cepas, as larvas foram injetadas com 5  $\mu$ l de inóculo na última pró-pata e foram observadas durante 48 horas.

As concentrações utilizadas em estudo prévio por Paziani (2019) para o azul de metileno e energia laser também foram previamente testadas. As larvas foram inoculadas com 5  $\mu$ l de azul de metileno na concentração de 1500  $\mu$ M e observadas por 48 horas. Outro grupo foi submetido a irradiação com luz no comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), potência de 100 mW, dose de 15 J/cm<sup>2</sup>, modo contínuo, durante 2 minutos e 30 segundos; e observados durante 48 horas.

## **Preparação de suspensões planctônicas padronizadas de *C. albicans***

Uma cultura de cada cepa de *C. albicans* foi reativada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Merck®), e incubada por 48 horas a 35°C. Em seguida, as células foram suspensas em meio Caldo Sabouraud Dextrose (BIOLOG®). A concentração da suspensão fúngica foi determinada em Câmara de Neubauer (KASVI®) com obtenção de uma densidade celular final de  $2 \times 10^8$  células/ml



para a cepa ATCC 90028 e cepa clínica A2 (Apêndice A, figura 3) (CAMPOS *et al.* 2022).

### **Formação de biofilmes de *C. albicans***

Os biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos conforme descrito por Silva (2019) e Sardi *et al.* (2017) em microplacas de 24 poços. Um inóculo entre  $10^7$  e  $10^8$  células/mL em meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) (Sigma-Aldrich®) suplementado com Dextrose (Dinâmica Química®), foi distribuído em cada poço e incubados a 37 °C por 24 h (Apêndice A, figura 4). Após esse período, o meio YNB foi trocado e incubado por mais 24h, então o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o biofilme lavado 3 vezes com solução de NaCl 0,9%. Foram preparados biofilmes da cepa ATCC 90028 e da cepa clínica A2.

### **Avaliação da viabilidade de células planctônicas e de biofilme em *G. mellonella***

Os biofilmes formados após 48 horas foram desestruturados com um raspador e aspirados para formação do inóculo de biofilme (BENADUCCI *et al.* 2016). Os inóculos do biofilme e das formas planctônicas foram inoculados através da última propata esquerda da larva, utilizando uma microseringa Hamilton (Hamilton, EUA) no volume de 5 µL e então submetidos aos tratamentos com antifúngico, fotobiomodulação e TFDa (Apêndice A, figura 5). Os grupos de *G. mellonella* foram incubados a 37°C por 120 horas e a viabilidade das larvas foi monitorado.

### **Tratamento da infecção**

Os tratamentos das infecções por *C. albicans* ATCC 90028, A2 foram realizados de acordo com o quadro 1.

**Quadro 1** - Grupos de pesquisa de acordo com a cepa de *C. albicans* a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de *G. mellonella*.

<b>Cepa <i>C. albicans</i></b>	<b>Modelo de tratamento</b>
ATCC 90028	Sem tratamento
	Tratamento com fluconazol
	Tratamento laser vermelho
	TFDa
A2	Sem tratamento
	Tratamento com fluconazol
	Tratamento laser vermelho
	TFDa
Biofilme ATCC 90028	Sem tratamento
	Tratamento com fluconazol
	Tratamento laser vermelho
	TFDa
Biofilme A2	Sem tratamento
	Tratamento com fluconazol
	Tratamento laser vermelho
	TFDa

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com o propósito de controlar fatores que possam trazer prejuízos à viabilidade da larva como trauma pela inoculação, toxicidade ao meio de cultura ou contaminação do meio foi incluído o grupo controle negativo, o qual foi inoculado com 5µl do meio de cultura utilizado para o cultivo dos inóculos: Caldo Saboureaud Dextrose.

Os intervalos de tempo utilizados para os tratamentos após inoculação estão descritos no quadro 2.

**Quadro 2** - Grupos de pesquisa considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento em larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*.

Modelo de tratamento	Fluconazol	Azul de metileno	Irradiação com laser vermelho
Sem tratamento	-	-	-
Tratamento com fluconazol	1 hora após inoculação da infecção	-	-

Tratamento laser vermelho	-	-	1 hora após inoculação da infecção
TFDa	-	1 hora após a inoculação da infecção	30 minutos após a inoculação com azul de metileno

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### Curva de Sobrevivência de *G. mellonella*

Após o ensaio *in vivo*, os animais foram acondicionados em placas de Petri e incubados a 37°C no escuro. As placas foram observadas após 4 horas e depois em intervalos de 24 horas, durante o tempo total de 120 horas. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque por uma pinça metálica. O número de larvas mortas foi anotado em formulário próprio para realização da curva de sobrevivência (TSAI, LOH, PROFT, 2016).

### Quantificação de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella*

A carga fúngica foi determinada finalizados as 120 horas de observação. 3 larvas de cada grupo foram selecionadas e lisadas em 1 ml de solução salina estéril. Diluições em série foram plaqueadas no volume de 20 µL em Candida Chromogenic Agar (KASVI®). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) (Vega-Chacón *et al.*, 2021).

### Análise Estatística

Todas as análises de sobrevivência foram realizadas com GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e analisadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). Os dados da quantificação de UFC/ml para formação de biofilme e carga fúngica na hemolinfa foram analisados por análise de variância

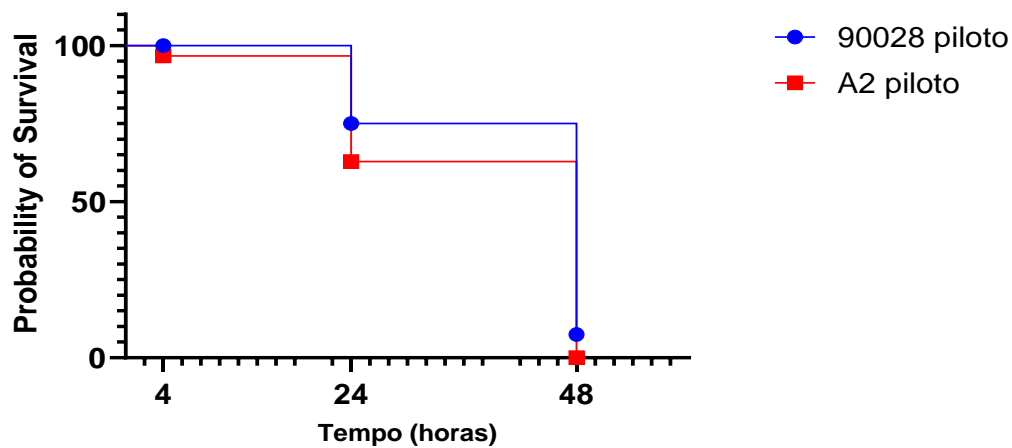
(ANOVA) e teste post-hoc de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

### Estudo piloto

A infecção por *C. albicans* na *G. mellonella* na concentração  $2 \times 10^8$  confirmou seu potencial letal, provocando a morte de 92,5% para a cepa ATCC 90028 e de 100% para a cepa clínica A2 após 48 horas (Gráfico 1).

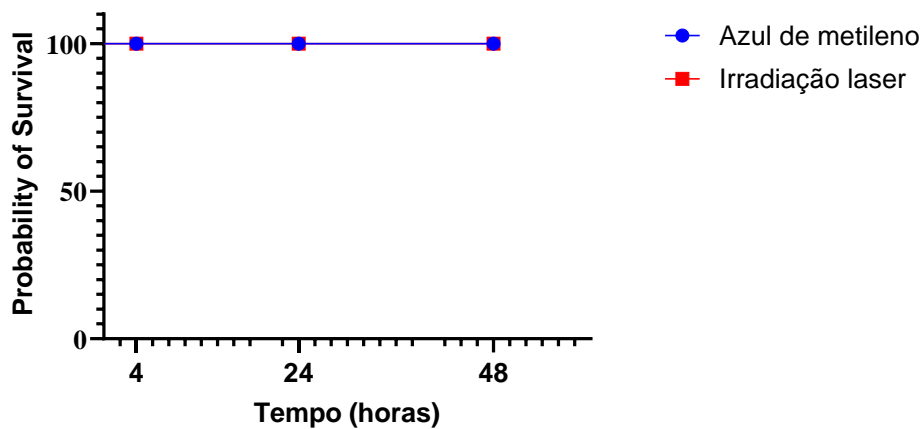
**Gráfico 1:** Curva de sobrevivência das cepas ATCC 90028 e A2 no estudo piloto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As concentrações de azul de metileno e de irradiação com luz laser vermelho demonstraram-se seguras e as larvas apresentaram 100% de sobrevivência ao final de 48 horas (Gráfico 2).

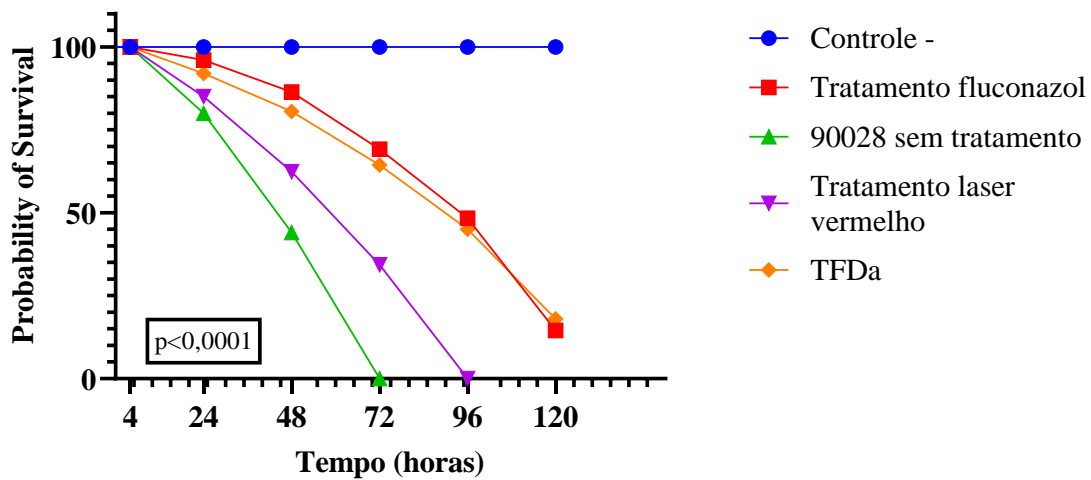
**Gráfico 2:** Curva de sobrevivência - toxicidade do azul de metileno e irradiação laser.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A concentração dos inóculos utilizada no estudo piloto foi repetida no experimento para avaliar e comparar a eficácia dos tratamentos antimicrobianos. O grupo controle teve 100% de viabilidade ao final de todos os experimentos. No experimento envolvendo as células planctônicas de *C. albicans* ATCC 90028 (Gráfico 3) foi encontrada diferenças significativas na curva de sobrevivência entre o grupo controle e todos os outros grupos estudados. O tratamento fluconazol e a TFDa apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, para os grupos experimentais, em todos os intervalos de horas avaliados e apresentaram 14,51% e 18,03% de sobrevivência ao final das 120 horas, respectivamente. Os grupos sem tratamento e tratamento com luz laser vermelha tiveram taxa de sobrevivência igual a 0 ao final da observação e tiveram diferenças significativas apenas em relação aos grupos: controle, TFDa e tratamento com fluconazol.

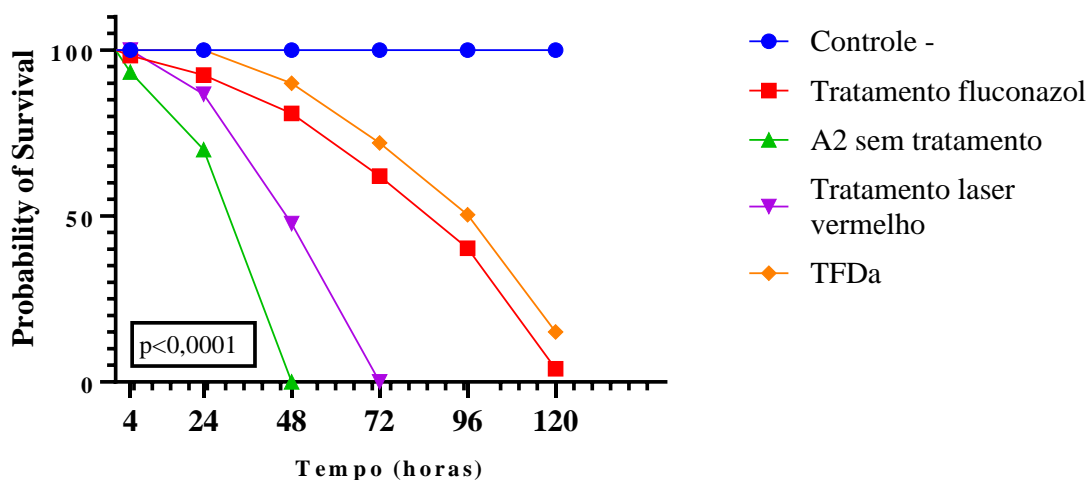
**Gráfico 3:** Curva de sobrevivência com cepas planctônicas *G. mellonella* ATCC 90028



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

No experimento envolvendo a infecção planctônica de *C. albicans* A2 (Gráfico 4) todas os grupos tiveram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle, no entanto entre os grupos experimentais só foi possível observar diferença significativa entre o grupo TFDa e os grupos: sem tratamento e luz laser vermelho. A taxa de sobrevivência para a TFDa foi de 15,12%, em comparação com 4,03% do tratamento com fluconazol, e de 0% para os demais grupos experimentais.

**Gráfico 4:** Curva de sobrevivência com células planctônicas da cepa A2

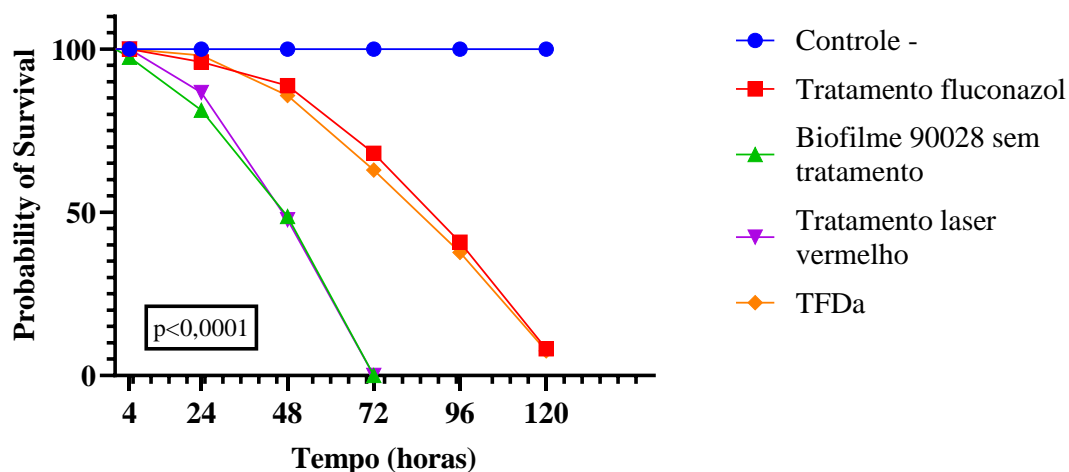


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A curva de sobrevivência quanto a infecção causada por biofilme de *C. albicans* 90028 (Gráfico 5) indica sobrevivência de 8,16% para o tratamento com

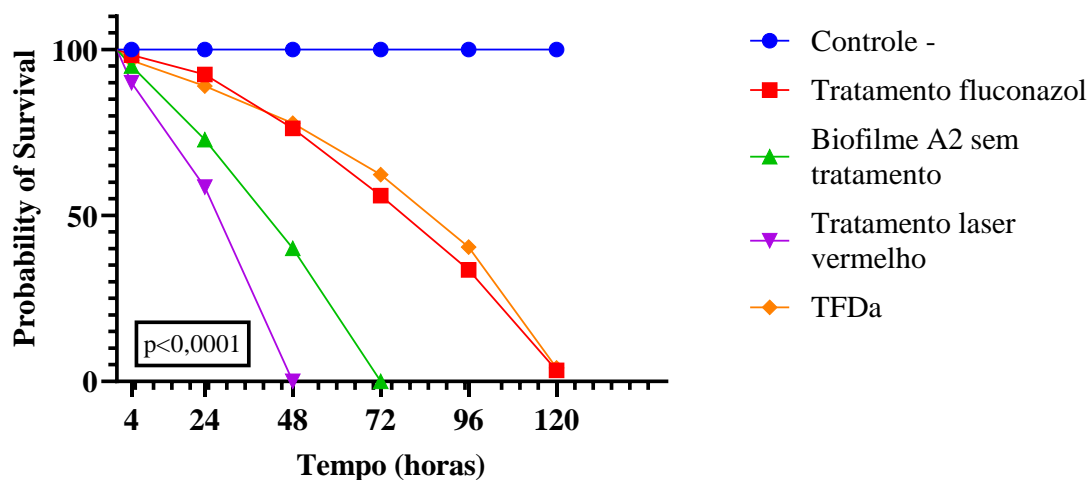
fluconazol e de 7,54% para o tratamento com TFDa, ao final do período de observação. Os demais grupos experimentais apresentaram taxas nulas de sobrevivência para o mesmo período observado. Neste experimento apenas foi possível ver diferenças estatisticamente significativa dos grupos tratamento com fluconazol e TFDa com o grupo sem tratamento.

**Gráfico 5:** Curva de sobrevivência com biofilme de *C. albicans* ATCC 90028



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Na experimentação com biofilmes de *C. albicans* A2 (Gráfico 6) foi observado menores taxas de sobrevivência, apresentando a TFDa 4,04% e o tratamento com fluconazol 3,35%. Estatisticamente, todos os grupos apresentaram diferenças significativas com o grupo controle, no entanto, entre os grupos, apenas a TFDa apresentou diferença significativa em relação ao tratamento luz laser vermelho e ao grupo sem tratamento.

**Gráfico 6:** Curva de sobrevivência com biofilme – *C. albicans* A2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

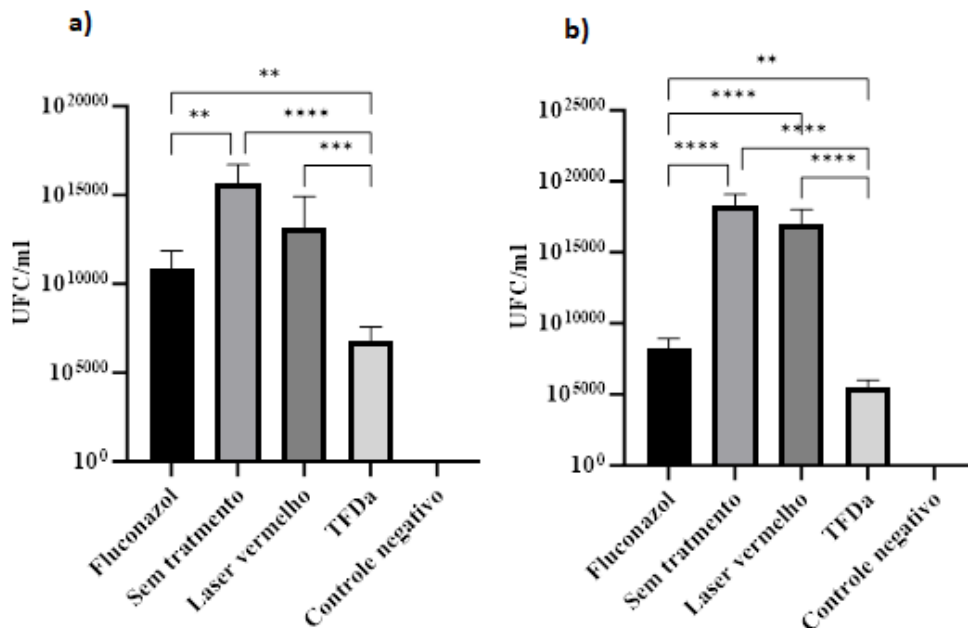
Em todas os experimentos o tratamento com TFDa e o tratamento com fluconazol apresentaram resultados comparáveis e não foi possível estabelecer uma diferença estatisticamente significativa entre eles em nenhuma das infecções. O tratamento com laser vermelho isolado apresentou resultados semelhantes aos da infecção sem tratamento.

Na comparação entre as infecções planctônicas e de biofilmes, a infecção com biofilmes apresentou taxas de sobrevivência menores, no entanto, não foi possível estabelecer uma diferença estatisticamente significativa entre elas.

A quantificação de *C. albicans* ao final de 120 horas mostrou uma quantidade maior de carga fúngica nos grupos sem tratamento e no grupo de tratamento com laser vermelho (Figura 1 e 2). O grupo fluconazol e TFDa reduziu a quantidade de células fúngicas em comparação ao grupo sem tratamento em todos os experimentos, com diferença estatisticamente significativa. A TFDa teve melhores resultados na infecção planctônica de *C. albicans* cepa A2 (figura 1-b). O tratamento com fluconazol isolado teve melhores resultado para redução da concentração de UFC/ml em ambas as infecções por biofilme enquanto que a TFDa teve os melhores resultados na redução da concentração de UFC/ml nas infecções por formas planctônicas (Figura 2- a; b).



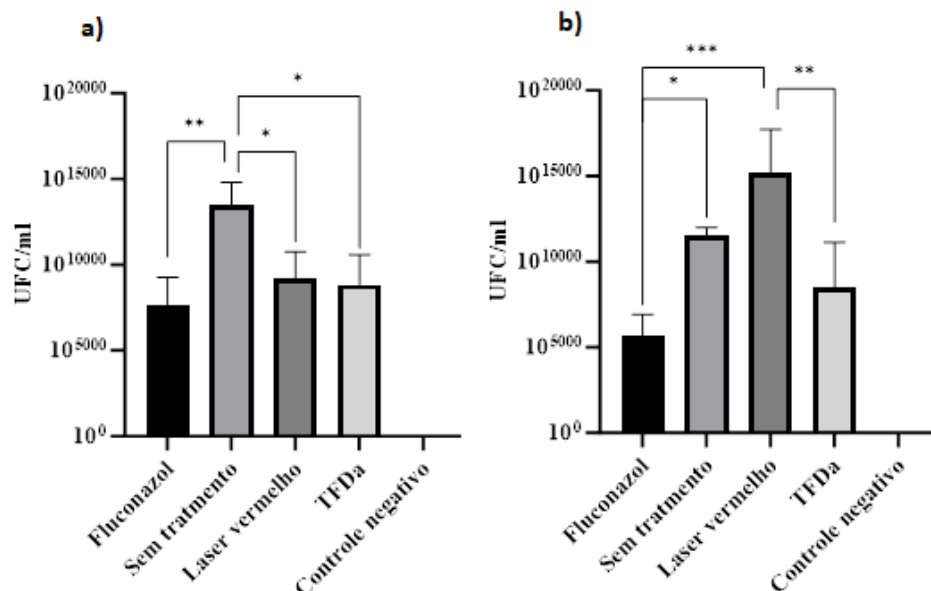
**Figura 1:** Quantificação de células de *C. albicans* nos grupos planctônicos



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

- a) Concentração de UFC/ml nas infecções por *C. albicans* ATCC 90028, planctônica.  
 b) Concentração de UFC/ml nas infecções por *C. albicans* A2, planctônica  
 \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* refere-se aos valores de  $p < 0,05$ .

**Figura 2:** Quantificação de células de *C. albicans* nos grupos biofilmes



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

- a) Concentração de UFC/ml nas infecções por Biofilme de *C. albicans* ATCC 90028.  
 b) Concentração de UFC/ml nas infecções por Biofilme de *C. albicans* A2.  
 \*, \*\*, \*\*\* refere-se aos valores de  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Como observado pelas curvas de sobrevivência e pela quantificação da concentração de UFC/ml ao final da observação, a TFDa pode ser uma estratégia terapêutica clinicamente útil e eficaz contra *C. albicans* e biofilmes, apresentando resultados significativos na sobrevivência e diminuição das cargas fúngicas por infecção de biofilmes e células plactônicas de *C. albicans* avaliadas neste estudo. No entanto, a luz laser isoladamente não teve o mesmo impacto positivo na sobrevivência ou na diminuição da carga fúngica das infecções.

Esses resultados corroboram com Bapat e Nobile (2021) e Bapat, Singh e Nobile (2021) em seus estudos com *Candida auris* e *C. albicans*, respectivamente, os quais observaram que a TFDa apresenta eficácia contra infecção fúngica, inclusive contra biofilmes e a luz vermelha visível isoladamente, sem associação com fotossensibilizador, não apresentou o mesmo potencial de combater a infecção fúngica como a TFDa.

Merigo et al. (2017) também observaram a eficácia da TFDa e da luz isoladamente contra *C. albicans*. Os autores compararam comprimentos de ondas e dosagens diferentes de irradiação e concluíram que apenas acontecia inibição de crescimento de *C. albicans* quando as luzes eram combinadas com fotossensibilizadores, ou seja, apenas a TFDa apresentava eficácia. Meccatti et al. (2022), por sua vez, utilizaram o LED azul e a curcumina como fotossensibilizador e encontraram também eficácia da terapia fotodinâmica, mostrando que outros tipos de TFDa podem ser úteis contra *C. albicans*.

Grizante-Barião et al. (2022) compararam a eficácia *in vitro* e *in vivo* de diferente fotossensibilizadores. Dentre os fotossensibilizadores avaliados, apenas um apresentou eficácia *in vivo*. Dessa forma, os autores constataram que a eficácia antifúngica da TFDa tem relação com o tipo de fotossensibilizador utilizado, uma vez que estruturas diferentes podem variar em muitas propriedades e impactar a eficácia da TFDa. Os resultados encontrados pelos autores reforçam a importância da busca por novas estruturas de fotossensibilizadores a fim de obter os melhores resultados da TFDa contra microrganismos multirresistentes.

Chibebe et al. (2013), no entanto, apresentaram achados opostos aos encontrados nesse estudo. As larvas tratadas apenas com TFDa ou apenas com fluconazol não apresentaram sobrevivência larval significativamente prolongada, enquanto que a combinação da TFDa com fluconazol aumentou significativamente a sobrevivência das larvas. Os autores sugerem que os resultados encontrados por eles quanto a ineficácia da TFDa contra *C. albicans* também possam ter relação com a cepa multirresistente e sugerem que os mecanismos de defesa antimicrobiana utilizadas para combater o antifúngico também atuam contra a TFDa. Entretanto, essa teoria colocaria em suspeição a principal vantagem da TFDa na terapia antimicrobiana e necessita de mais estudos investigando a eficácia da TFDa contra cepas multirresistentes.

Alves *et al.* (2018) apresentaram resultados contrários em relação ao combate da TFDa às infecções por biofilmes. Nesse estudo a TFDa apresentou bons resultados tanto no tratamento de infecção por células planctônicas como por biofilmes, enquanto no estudo dos autores os tratamentos de TFDa contra biofilmes foram menos eficazes que nas células planctônicas. Entretanto, a virulência do biofilme em comparação com as células planctônicas, nessa pesquisa, não apresentou diferenças significativas e o perfil de virulência foi semelhante para ambas as infecções, o que pode ter influenciado no resultado da TFDa.

Biofilmes podem ter perfis de formação de biomassa e virulência diferentes a depender da cepa envolvida. Fatores associados a colonização, proliferação e sobrevivência podem ser afetados de acordo com o perfil do biofilme formado. Fato constatado por Barros *et al.* (2017) em seu estudo sobre o perfil temporal da formação de biofilmes, expressão gênica e análise de virulência, no qual a formação de biofilmes de duas cepas de *C. albicans* apresentaram perfis de virulência distintos.

Outros fatores que podem interferir na virulência do biofilme e podem justificar os achados desse estudo quanto às diferenças das sobrevivências das larvas infectadas com células planctônicas versus biofilmes, diz respeito a forma como esse biofilme foi formado. Os biofilmes evoluem de forma semelhante, seja *in vivo* ou *in vitro*, no entanto, modelos *in vivo* de biofilmes amadurecem mais rapidamente e desenvolvem paredes substancialmente mais espessas podendo

apresentar maior resistência (Sandai, Tabana, Ouweini, Ayodeji, 2016). Dessa forma, por mais que os biofilmes não tenham apresentado diferenças significativas quanto a virulência, estes podem apresentar perfil mais resistente e virulento em uma formação *in vivo*.

A forma de inserção dos biofilmes na larva também pode ser um fator que impacte na sua virulência. As metodologias para inocular biofilmes no modelo de *G. mellonella* envolveram: aspiração do biofilme formado após 48 horas e posterior inoculação, metodologia utilizada nesse estudo; mas também já foi documentado a formação do biofilme em fios de titânio pré incubados com *C. albicans*, para posteriormente serem implantados nas larvas (Mannala, *et al.*, 2023) e formação de biofilme microbiano em cerdas de escova a serem, também, implantadas na larva (Benthall *et al.*, 2015).

A implantação de dispositivos contaminados com biofilmes pode ter a vantagem de não promover a dispersão das células do biofilme formado. No entanto, a implantação de um dispositivo na larva pode por si só ser um fator prejudicial para a saúde e interferir nos resultados de sobrevivência. Além disso, mesmo que ocorra dispersão das células do biofilme formado, normalmente as células dispersas provenientes do biofilme apresentam comportamento mais virulento que as células planctônicas (Ponde *et al.*, 2021).

Como confirma o estudo de Oliveira *et al.* (2020) sobre a dinâmica da formação de biofilmes, o qual observou que células dispersas de biofilmes diminuíram as curvas de sobrevivência em comparação com suas equivalentes planctônicas. Dessa forma, a metodologia utilizando a aspiração do biofilme e posterior inoculação pode sim trazer boas evidências de sua virulência.

Diante dos resultados encontrados, é possível perceber que o modelo de estudo animal *G. mellonella* foi eficiente e indicativo para avaliar patogenicidade da *C. albicans* e atividade terapêutica da TFDa, bem como, para avaliar diferenças na virulência entre biofilmes e células planctônicas. Os estudos com *G. mellonella* são importantes pois permitem a observação de fatores que não são possíveis de serem replicados *in vitro*.

Como indicativo para futuros estudos, aspectos como a inclusão de cepas multirresistentes são importantes na avaliação da eficácia de terapias

antifúngicas, bem como são importantes estudos que comparem diferentes fotossensibilizantes e fontes de luz a fim de selecionar aqueles com as melhores propriedades e melhores resultados para TFDa. A busca por maiores informações relacionadas a infecções por biofilmes é igualmente importante, visto seus inúmeros mecanismos de resistência antimicrobiana.

Ademais, este estudo trouxe inovação na pesquisa ao avaliar ação da TFDa contra infecção por biofilmes de *C. albicans in vivo* no modelo hospedeiro *G. mellonella*.

## CONCLUSÃO

A TFDa tem ação antifúngica contra infecções por *C. albicans*, em formas planctônicas e por biofilmes, semelhantes ao tratamento padrão com fluconazol. O tratamento isolado de luz laser vermelho não foi eficiente no combate a infecções por *C. albicans*, nesse estudo. A avaliação da ação da TFDa contra infecção por biofilmes de *C. albicans in vivo* no modelo hospedeiro *G. mellonella* foi inovadora e pode auxiliar outros estudos envolvendo biofilmes no modelo *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ALVES, F. et al. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 34, n. 4, p. 357-367, 2018.

BARROS, P. P. et al. Temporal profile of biofilm formation, gene expression and virulence analysis in *Candida albicans* strains. **Mycopathologia**, v. 182, p. 285-295, 2017.

BAPAT, P. S.; NOBILE, C. J. Photodynamic therapy is effective against *Candida auris* biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 713092, 2021.

BAPAT, P.; SINGH, G.; NOBILE, C. J. Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against *Candida albicans* biofilms. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 500, 2021.

BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms in vitro and in vivo using *Galleria mellonella* as an alternative model. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 290, 2016.

BENTHALL, G. et al. Avaliação da eficácia antibiótica contra infecções causadas por culturas planctônicas ou de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* em *Galleria mellonella*. **Jornal internacional de agentes antimicrobianos**, v. 46, n. 5, pág. 538-545, 2015.

BUGYNA, L.; KENDRA, S.; BUJDÁKOVÁ, H. *Galleria mellonella*—A Model for the Study of aPDT—Prospects and Drawbacks. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1455, 2023.

CAMPOS, L. T. et al. **Atividade antifúngica do fluconazol em modelo experimental In vivo de *Galleria mellonella*: um estudo para padronização**. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2022.

CARMELLO, J. C. et al. In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415-422, 2016.

CHIBEBE, J. J. et al. Fotoinativação seletiva de *Candida albicans* no modelo de infecção do hospedeiro não vertebrado *Galleria mellonella*. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, pág. 1-9, 2013.

FREIRE, F., FERRARESI, C., JORGE, AOC, HAMBLIN, MR. Terapia fotodinâmica da infecção oral por *Candida* em um modelo de camundongo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 161-168, 2016.

GRIZANTE BARIÃO, P. H. et al. In vitro and in vivo photodynamic efficacies of novel and conventional phenothiazinium photosensitizers against multidrug-resistant *Candida auris*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1807-1818, 2022.

JORJAO, A.L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

LEE, Y., PUUMALA, E., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

MANNALA, G. K. et al. *Galleria mellonella* as an alternative in vivo model to study implant-associated fungal infections. **Journal of Orthopaedic Research**, 2023.

MECCATTI, V. et al. Curcuma longa L. extract and photodynamic therapy are effective against *Candida* spp. and do not show toxicity in vivo. **International Journal of Dentistry**, v. 2022, 2022.

MERIGO, E. et al. Effect of different wavelengths and dyes on *Candida albicans*: In vivo study using *Galleria mellonella* as an experimental model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 34-38, 2017.

OLIVEIRA, L. T. et al. Dynamics of mono-and dual-species biofilm formation and interactions between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 551256, 2020.

PAZIANI, M. H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197-203, 2019.

POON, Y.; HUI, M. Efeito inibitório dos sobrenadantes de lactobacilos no biofilme e filamentação de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 14, p. 1105949, 2023.

PONDE, N. O. et al. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

RAPALA-KOZIK, M. et al. Living together: The role of *Candida albicans* in the formation of polymicrobial biofilms in the oral cavity. **Yeast**, 2023.

ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Descoberta antifúngica. **Current Opinion in Microbiology**, v. 69, p. 102198, 2022.

SANDAI, D., TABANA, Y. M., EL OUWEINI, A., & Ayodeji. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 11, 2016.

SILVA, D. R. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.

TAO, Y.; DUMA, L.; ROSSEZ, Y. *Galleria mellonella* as a good model to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1483, 2021.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

VEGA-CHACÓN, Y. et al. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 231-243, 2021.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

ZOLIN, G. V. S., FONSECA, F. H. D., ZAMBOM, C. R., GARRIDO, S. S. Histatin.5 metallopeptides and their potential against *Candida albicans* pathogenicity and drug resistance. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1209, 2021.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados apontam para uma ação positiva da TFDa contra *C. albicans*, inclusive contra biofilmes em infecção *in vivo* de *G. mellonella*. Em virtude da crescente preocupação com resistência antifúngica, explorar essa terapia é importante. O modelo *in vivo* de *G. mellonella* é oportuno para estudar infecções e terapias, devendo ser explorado sempre que possível em substituição ao modelo murino.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, F. et al. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 34, n. 4, p. 357-367, 2018.
- BARROS, P. O. et al. Two sporulated *Bacillus* enhance immunity in *Galleria mellonella* protecting against *Candida albicans*. **Microbial pathogenesis**, v. 132, p. 335-342, 2019.
- BARROS, P. P. et al. Temporal profile of biofilm formation, gene expression and virulence analysis in *Candida albicans* strains. **Mycopathologia**, v. 182, p. 285-295, 2017.
- BAPAT, P. S.; NOBILE, C. J. Photodynamic therapy is effective against *Candida auris* biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 713092, 2021.
- BAPAT, P.; SINGH, G.; NOBILE, C. J. Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against *Candida albicans* biofilms. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 500, 2021.
- BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms in vitro and in vivo using *Galleria mellonella* as an alternative model. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 290, 2016.
- BENTHALL, G. et al. Avaliação da eficácia antibiótica contra infecções causadas por culturas planctônicas ou de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* em *Galleria mellonella*. **Jornal internacional de agentes antimicrobianos**, v. 46, n. 5, pág. 538-545, 2015.
- BU, Q. et al. Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2951, 2022.
- BUGYNA, L.; KENDRA, S.; BUJDÁKOVÁ, H. *Galleria mellonella*—A Model for the Study of aPDT—Prospects and Drawbacks. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1455, 2023.
- CAMPOS, L. T. et al. **Atividade antifúngica do fluconazol em modelo experimental In vivo de *Galleria mellonella*: um estudo para padronização**. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2022.
- CARMELLO, J. C. et al. In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415-422, 2016.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.
- CHAND, P. et al. Synergism of zinc oxide quantum dots with antifungal drugs: potential approach for combination therapy against drug resistant *Candida albicans*. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 3, p. 624564, 2021.

CHIBEBE, J. J. et al. Fotoinativação seletiva de *Candida albicans* no modelo de infecção do hospedeiro não vertebrado *Galleria mellonella*. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, pág. 1-9, 2013.

COSTA, A. C. B. P. et al. *Candida albicans* Mrv8, is involved in epithelial damage and biofilm formation. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 5, p. foaa033, 2020.

CUTULI, M. A. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 527-541, 2019.

DURIEUX, M. F et al. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 818-834, 2021.

FIGUEIREDO-GODOI, L. M. A. et al. Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 66-73, 2019.

FIRACATIVE, C. et al. Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 130, 2020.

FREIRE, F., FERRARESI, C., JORGE, AOC, HAMBLIN, MR. Terapia fotodinâmica da infecção oral por *Candida* em um modelo de camundongo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 161-168, 2016.

GRIZANTE BARIÃO, P. H. et al. In vitro and in vivo photodynamic efficacies of novel and conventional phenothiazinium photosensitizers against multidrug-resistant *Candida auris*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1807-1818, 2022.

GU, W. et al. In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 74-80, 2018.

HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and humane experimental technique: implementing change. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 754, 2019.

JORJAO, A.L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

KARAMAN, M.; ALVANDIAN, A.; BAHAR, I. H. *Galleria mellonella* larva model in evaluating the effects of biofilm in *Candida albicans*. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 51, n. 1, p. 32-40, 2017.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102237, 2023.

LEE, Y., PUUMALA, E., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LI, Y. et al. The effect of Ginkgolide B combined with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans* based on common resistance mechanisms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 56, n. 2, p. 106030, 2020.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2021.

MANNALA, G. K. et al. *Galleria mellonella* as an alternative in vivo model to study implant-associated fungal infections. **Journal of Orthopaedic Research®**, 2023.

MECCATTI, V. et al. Curcuma longa L. extract and photodynamic therapy are effective against *Candida* spp. and do not show toxicity in vivo. **International Journal of Dentistry**, v. 2022, 2022.

MERIGO, E. et al. Effect of different wavelengths and dyes on *Candida albicans*: In vivo study using *Galleria mellonella* as an experimental model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 34-38, 2017.

NUNES, I.P.F. et al. Evaluation of dual application of photodynamic therapy—PDT in *Candida albicans*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103327, 2023.

OLIVEIRA, L. T. et al. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 551256, 2020.

PAZIANI, M. H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197-203, 2019.

PEREIRA, I. L. et al. Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e585101321534-e585101321534, 2021.

PEREIRA, R., FONTENELLE, R. O. S., BRITO, E. H. S., MORAIS, S. M. R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PIERCE, C. G. et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

PIATEK, M.; SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. *Galleria mellonella* identification: met: the versatile host for drug discovery, in vivo toxicity testing and characterising host-pathogen interactions. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1545, 2021.

PONDE, N. O. et al. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

- POON, Y.; HUI, M.. Efeito inibitório dos sobrenadantes de lactobacilos no biofilme e filamentação de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 14, p. 1105949, 2023.
- RAJENDRAN, R. et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 87-93, 2016.
- RAMAGE, G. et al. Our current clinical understanding of *Candida* biofilms: where are we two decades on?. **APMIS**, 2023.
- RAPALA-KOZIK, M. et al. Living together: The role of *Candida albicans* in the formation of polymicrobial biofilms in the oral cavity. **Yeast**, 2023.
- RICHARDSON, J. P.; HO, Jemima; NAGLIK, Julian R. *Candida*–epithelial interactions. **Journal of fungi**, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.
- ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Descoberta antifúngica. **Current Opinion in Microbiology**, v. 69, p. 102198, 2022.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Methuen, 1959.
- SANDAI, D., TABANA, Y. M., EL OUWEINI, A., & Ayodeji. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 11, 2016.
- SARDI, Janaina de Cássia Orlandi et al. Espécies frutíferas endêmicas inexploradas do Brasil: propriedades antibiofilme, percepções sobre o modo de ação e toxicidade sistêmica de quatro *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280-287, 2017.
- SERRANO, I. et al. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 505, 2023.
- SILVA, D. R. et al. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.
- SMITH, D. F. Q.; CASADEVALL, A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 3, p. ftab013, 2021.
- TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.
- TAO, Y.; DUMA, L.; ROSSEZ, Y. *Galleria mellonella* as a good model to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1483, 2021.
- TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

VEGA-CHACÓN, Y. et al. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 231-243, 2021.

VOLKOVA, A. et al. Effects of early-life penicillin exposure on the gut microbiome and frontal cortex and amygdala gene expression. **Iscience**, v. 24, n. 7, p. 102797, 2021.

XU, M. et al. Zinc oxide nanoparticles prime a protective immune response in *Galleria mellonella* to defend against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 766138, 2021.

ZHANG, M. et al. Antifungal activity of ribavirin used alone or in combination with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by reduced virulence. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 1, p. 105804, 2020.

ZOLIN, G. V. S.; FONSECA, F. H. D.; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. HISTATIN 5 metalloptides and their potential against *Candida albicans* pathogenicity and drug resistance. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1209, 2021.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WOJDA, I. et al. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. **Pathogens and disease**, v. 78, n. 9, p. ftaa057, 2020.

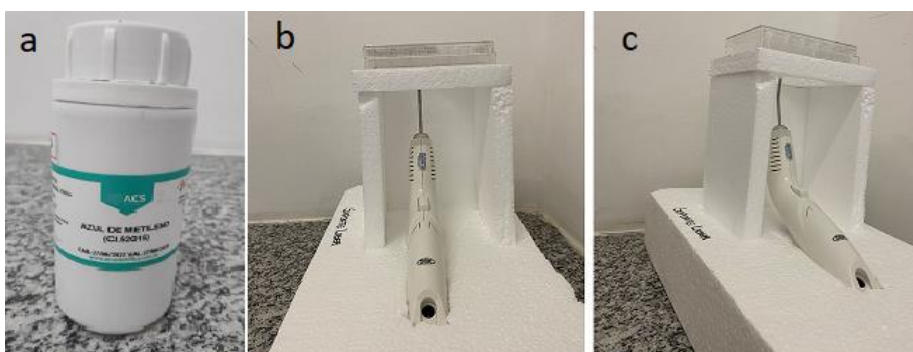
## APÊNDICE A – IMAGENS REFERENTES AOS MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultivo das larvas *G. mellonella*



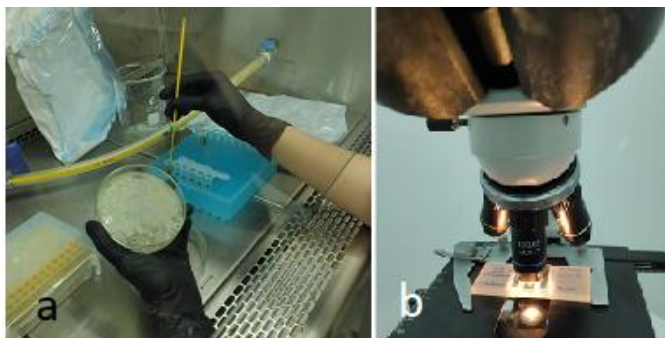
**Figura 1:** a) Pote de armazenamento das larvas *G. mellonella*; b e c) Incubadora B.O.D. de armazenamento das larvas; d) Ração preparada semanalmente para alimentação das larvas.

### Fotossensibilizador e aparelho laser



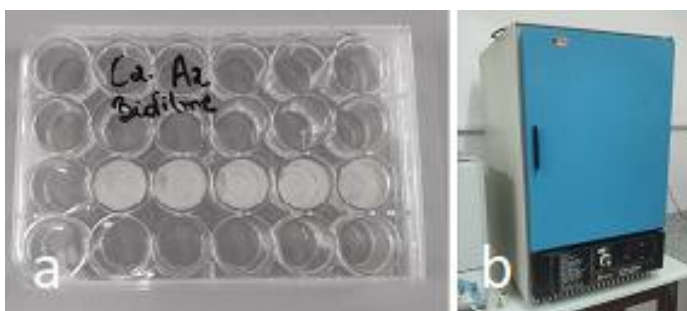
**Figura 2:** a) Azul de metileno; b e c) Equipamento laser e suporte para padronizar a distância entre luz e amostra.

### Preparação de suspensões planctônicas padronizadas de *C. albicans*

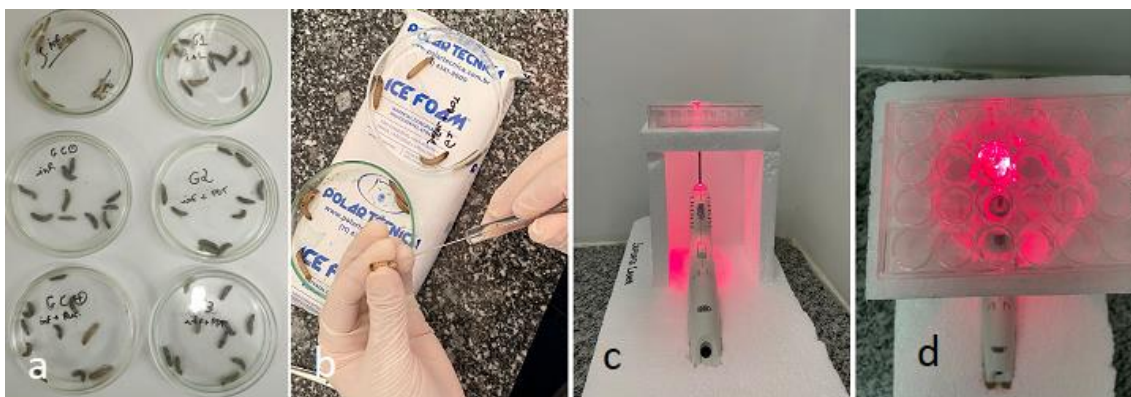


**Figura 3:** a) Preparação do inóculo de *C. albicans* ATCC 90028 e Cepa A2;  
b) Contagem da densidade do inóculo Câmara de Neubauer e Microscópio Óptico

### Formação de biofilmes de *C. albicans*



**Figura 4:** a) Preparação do biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 e A2 em placa de 24 poços;  
b) Incubadora para preparação dos biofilmes.



**Figura 5:** a) Larvas separadas por grupo;  
b) Inoculação na larva;  
c e d) Irradiação da luz laser vermelha, irradiando a larva.



## **ANEXO A – NORMAS DO PERIÓDICO**

### **PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY**

Qualis A2, Fator de impacto: 3.3.

### **AUTHOR INFORMATION PACK**

#### **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.

## **ABSTRACTING AND INDEXING**

Current Contents - Clinical Medicine

Journal Citation Reports - Science Edition

Science Citation Index Expanded

Scopus

PubMed/Medline

PubMed/Medline

## **EDITORIAL BOARD**

### **Editor-in-Chief**

**Ron Allison**, 21st Century Oncology Greenville, Greenville, North Carolina, United States of America

## **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.

### **Declaration of generative AI in scientific writing**

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's AI policy for authors.

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

### **Disclosure instructions**

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

### **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 compliance, your article may be checked by Crossref Similarity Check and other originality or duplicate checking software.

#### **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).

#### **Preprint posting on SSRN**

In support of Open Science, this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server SSRN once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to SSRN, please consult the SSRN Terms of Use and FAQs.

### **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. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of

reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Reporting sex- and gender-based analyses**

Reporting guidance For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/ sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

### **Definitions**

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such



as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

### **Author contributions**

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The CRediT taxonomy includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. More details and an example.

### **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.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

### **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, it is recommended to state this.

**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.

### **Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

### **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 lowercase 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: <https://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 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.

#### 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, it is recommended to 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.

#### Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

#### 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.

#### 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. Kikinzon, 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, which may also include 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).

### Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a Research Elements journal.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the Research Elements 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 email 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. 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.