



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

ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA

**ESTUDO DE GENES DE *Candida albicans* COM FUNÇÃO
DESCONHECIDA QUANTO À FORMAÇÃO DE BIOFILME,
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E INTERAÇÃO
PATÓGENO- HOSPEDEIRO**

2015

ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA

**ESTUDO DE GENES DE *Candida albicans* COM FUNÇÃO
DESCONHECIDA QUANTO À FORMAÇÃO DE BIOFILME,
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E INTERAÇÃO PATÓGENO-
HOSPEDEIRO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Costa, Anna Carolina Borges Pereira da
Estudo de genes de *Candida albicans* com função desconhecida
quanto à formação de biofilme, características biológicas e interação
patógeno- hospedeiro / Anna Carolina Borges Pereira da Costa. - São
José dos Campos : [s.n.], 2015.
169 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.
Orientadora: Graziella Nuernberg Back Brito.

1. *Candida albicans*. 2. Biofilme. 3. Antifúngicos. 4.
Patogenicidade. I. Brito, Graziella Nuernberg Back, orient. II.
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio
de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 25 de maio de 2015
E-mail: carol_biolog@yahoo.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito (Orientadora)

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

Prof. Dr. Adolfo José da Mota

Faculdade de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Adj. Ricardo Sérgio Couto de Almeida

Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

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

Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

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

São José dos Campos, 25 de maio de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Simone e Roberto, meu irmão Gustavo e meu tio Alaor por todo apoio, carinho e incentivo. Muito obrigada.

Ao meu marido Rogério pelo apoio, amizade, incentivo e amor. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito pelos conhecimentos transmitidos, paciência, empatia, sensibilidade, amizade e comprometimento. Profissional e pessoa admirável. Muito obrigada!!!

I am very thankful to my supervisor Dr. Duncan Wilson for all shared knowledge, patience, friendship, empathy and careful consideration. It was a great opportunity to work with such a brilliant and humble researcher. I also want to thank Duncan's wife, Anna, for hospitality and friendship. Thank you all for making my stay in Germany so sweet.

Ich möchte mich auch bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bernhard Hube für die grossartige Gelegenheit bedanken, in seinem Labor gearbeitet haben zu können, sowie für sein mit mir geteiltes Wissen, seine Geduld, Einfühlungsvermögen, Zuversicht und Rücksichtnahme. Danke, dass Deine Tür immer offen stand und Du mich in Deine faszinierende Forschung eingebunden hast. Ich möchte mich auch bei Prof. Hubes Abteilung dafür bedanken, mich mit offenen Armen empfangen zu haben und mir ein Gefühl von zu Hause gegeben zu haben. Nochmals vielen Dank!

Thank all of you for believing me. I'm very grateful!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara do Instituto de Ciência e Tecnologia do Câmpus de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na coordenação da Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito e atual coordenação pelas Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e Profa. Dra. Ana Lia Anbinder.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida no início deste caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida (processo 2011/21346-7).

À CAPES e ao Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) pela bolsa concedida para realização do doutorado sanduíche no Departamento de Mecanismos de Patogenicidade Microbiana do Hans-Knöll-Institute (HKI) associado a Friedrich-Schiller-University (FSU), em Jena, Alemanha sob supervisão do Prof. Dr. Bernhard Hube (processo 12417/12-2).

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge pela orientação parcial, conhecimentos transmitidos e desafios gerados.

Ao Carlos Guedes, pela paciência e competência em nos ajudar quanto aos processos da FAPESP.

À Rebeca Mendonça do DAAD e Vânia Escobar da CAPES pela ajuda e orientações quanto ao processo do doutorado sanduíche.

Aos secretários da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka e Ivan Oliveira Damasceno por serem sempre solícitos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À minha amiga, mais que amiga, Dra. Cristiane Aparecida Pereira Correia, por compartilhar sonhos e conhecimentos. Muito obrigada pelo incentivo, amizade e carinho.

Aos amigos feitos em Jena, Carla Arce, Ricardo Ruiz Machado e Paulo Cristaldo, pelo convívio, amizade e ajuda. Muito obrigada.

À minha amiga Inês Correia pelo convívio no laboratório, amizade e carinho. Muito obrigada.

Às amigas e alunas Nádia Domingues, Tamara Rodrigues de Andrade Carneiro, Adeline Lacerda Jorjão e Sarah Barbosa pela ajuda e companheirismo na realização dos experimentos. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida docente da Universidade Estadual de Londrina pelos conselhos e incentivo. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Adolfo José da Mota docente da Universidade Federal do Amazonas pelos conselhos, conhecimento compartilhado e incentivo. Muito obrigada.

À Dra. Renata Falchete do Prado pela ajuda e conhecimentos transmitidos. Muito obrigada.

À pós-doutoranda Daniela Campos Granato por me ajudar a entender a metodologia do projeto e incentivo. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ivan Balducci por toda ajuda e conhecimentos transmitidos quanto a análise dos resultados.

I am very grateful to the secretary of the laboratory in Jena Mrs. Petra Flemming for the help and support given during my stay in Germany. Thank you so much.

Aos técnicos de laboratório Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela amizade e auxílio.

Às bibliotecárias, em especial Silvana Alvarez e Ana Paula Mattozo Durante, pela disponibilidade em atender sempre que necessário.

À todos os colegas do laboratório, Guilherme Rodrigues Teodoro, Simone Furgeri Godinho Vilela, Jonata Rafael de Oliveira, Rodnei Dennis Rossoni, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Anna Carolina Chipoletti dos Santos, Fernanda Malagutti Tomé Matsumoto,

Michelle Peneluppi Silva, Mirian Marcolan de Mello, Rafaella Braga Santos, Fernanda Freire, Isabel Chaves Silva Carvalho e aos demais colegas do Programa de Biopatologia Bucal, pela convivência e amizade.

I also want to thank all students and technicians of my group in Jena, specially François Mayer, Pedro Miramón, Volha Skrahina, Sarah Höfs, Melanie Polke, Stephanie Wisgott, and Prof. Dr. Ilse Denise Jacobsen for the help, shared knowledge, friendship and patience.

I need to thank the Leibniz- Institute for Natural Product Research and Infection Biology- Hans Knoell Institute (HKI), em Jena. Alemanha, for the opportunity.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos e a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

"A gente se diverte com os outros. Ama com os outros. Viaja com os outros. Mas quando fica doente, tem muita coisa que precisa encarar sozinho. A cirurgia. O medo. A iodoterapia. O risco é sobre o seu pescoço e ninguém pode trocar com você. Nem sua mãe, que provavelmente está sofrendo mais ainda. Depois de um câncer, a gente descobre que certas vivências são solitárias, como nascer e morrer. Cada um tem um caminho, e por melhores que sejam seus amigos, eles não podem tirar você do seu. Mas não é culpa do câncer. Ele só faz a gente perceber a nossa condição humana. Sempre um "tíquinho" solitária".

Natalia Ibanez

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 <i>Candida albicans</i> | 19 |
| 2.2 Biofilme de <i>Candida albicans</i> | 22 |
| 2.3 Fatores de virulência de <i>Candida albicans</i> | 33 |
| 2.4 Interação patógeno- hospedeiro | 38 |
| 2.5 Modelos experimentais de candidose | 43 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 50 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 4.1 Construção das cepas mutantes de <i>Candida albicans</i> | 51 |
| 4.2 Desenvolvimento do biofilme | 56 |
| 4.2.1 Quantificação de células viáveis..... | 57 |
| 4.2.2 Atividade metabólica (XTT)..... | 57 |
| 4.2.3 Quantificação de células desprendidas do biofilme..... | 58 |
| 4.3 Análise da biomassa (peso seco) | 58 |
| 4.4 Construção das cepas complementadas de <i>Candida albicans</i> | 60 |
| 4.5 Avaliação do comportamento do biofilme frente ao etanol, farnesol e zinco | 64 |
| 4.6 Crescimento sob limitação de nutrientes e agentes estressantes | 64 |
| 4.7 Ensaio de filamentação | 66 |
| 4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 67 |
| 4.9 Curva de crescimento | 68 |

| | |
|---|------------|
| 4.10 Testes antifúngicos em células planctônicas e biofilmes.... | 68 |
| 4.11 Quantificação de quitina em biofilme..... | 70 |
| 4.12 Extração e quantificação da concentração de β-1,3 glucana..... | 71 |
| 4.13 Células epiteliais bucais: aderência, invasão e dano..... | 71 |
| 4.14 Patogenicidade em ovo embrionado de galinha..... | 74 |
| 4.15 qPCR: interação com células epiteliais e biofilme..... | 74 |
| 4.16 Análise estatística..... | 77 |
| 5 RESULTADOS..... | 79 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 128 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 152 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 154 |
| APÊNDICE..... | 169 |

Costa ACBP. Estudo de genes de *Candida albicans* com função desconhecida quanto à formação de biofilme, características biológicas e interação patógeno- hospedeiro [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Candida albicans é um fungo oportunista capaz de causar infecções superficiais e até sistêmicas. A maioria das infecções é mediada pela formação de biofilme que confere resistência aos agentes antifúngicos e ao sistema imune, porém os mecanismos de desenvolvimento do biofilme e patogenicidade ainda não foram completamente elucidados. No presente estudo foram selecionados 9 genes de *C. albicans* com função desconhecida, dentre 34 cepas mutantes que apresentaram fenótipo alterado para formação de biofilme. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços ou discos de poliestireno e avaliados em diferentes tempos de desenvolvimento. A seguir foram construídas 4 cepas complementadas que foram avaliadas quanto à susceptibilidade a agentes estressantes, crescimento sob limitação de nutrientes e testes de filamentação. A arquitetura dos biofilmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os biofilmes também foram avaliados quanto à quantidade de β -1,3-glucana e quitina. Para os modelos de infecção, células epiteliais bucais (TR-146) foram utilizadas para análise de aderência, invasão e dano. A patogenicidade das cepas foi avaliada em ovos embrionados de galinha durante 7 dias, após a inoculação das cepas. Células planctônicas e biofilmes foram submetidos a testes antifúngicos com os agentes fluconazol, anfotericina B e caspofungina. A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada para verificar a expressão dos genes *MRV8* e *NDT80* em células fúngicas em interação com células epiteliais e *MRV8*, *MRV1* e *MRV6* em células crescidas em biofilme. Os resultados foram analisados por teste *t* de Student, ANOVA, Tukey e testes de Log-rank (Mantel-Cox) ($p < 0,05$). Foram construídas 4 cepas complementadas para os genes selecionados *ORF19.823*, *ORF19.7170*, *ORF19.6847* e *MRV8*. A função de *ORF19.823* ainda permanece desconhecida, pois não foi observado fenótipo significativo para a cepa mutante quanto aos testes realizados. A cepa mutante para *ORF19.7170* causou menos dano as células epiteliais, porém o resultado não foi significativo e o gene foi dispensável para a formação de biofilme. *ORF19.6847* mostrou participação no acúmulo de biomassa no biofilme e dano epitelial e significativa redução da produção de β -1,3-glucana. O gene *MRV8* apresentou o fenótipo mais significativo com clara

participação na formação de biofilme de 24 h, acúmulo de biomassa, organização da arquitetura do biofilme, modulação da resposta a caspofungina em altas concentrações, dano epitelial e tamanho das microcolônias com recuperação do fenótipo pela cepa complementada. O gene *MRV8* destacou-se como alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com mecanismos específicos contra as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Biofilme. Antifúngicos. Patogenicidade.

COSTA ACBP. Study of unknown function genes of *Candida albicans* as to biofilm formation, biological characteristics, and host-pathogen interaction [doctorate]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Candida albicans is an opportunistic fungi capable of causing superficial and systemic infections. Most of infections are mediated by biofilm formation which confers resistance to antifungal agents and immune system, but the mechanisms of biofilm development and pathogenicity were not thoroughly elucidated yet. In the presente study, 9 unknown function genes of *C. albicans* were selected among 34 mutant strains that presented altered phenotype for biofilm formation. The biofilms were formed on 96-well microtitre plates or on polystyrene disks and evaluated in different time intervals. Next, 4 complemented strains were constructed and evaluated for susceptibility to stressor agents, growth under nutrient limitation and filamentation tests. The biofilm architecture was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The biofilms were also assessed as the quantity of β -1,3-glucan and chitin. For the infection models, buccal epithelial cells (TR-146) were used for adherence, invasion and damage assays. The pathogenicity of the strains was evaluated in embrionated chicken eggs for 7 days, after inoculation of the strains. Planktonic cells and biofilms were submitted to antifungal tests with fluconazole, amphotericin B, and caspofungin. Quantitative polymerase chain reaction was performed to verify the expression of MRV8 and NDT80 genes in fungal cells in interaction with epithelial cells and MRV8, MRV1, and MRV6 genes in cells grown in biofilm. The results were submitted to the Student *t* test, ANOVA, Tukey's test, and Log-rank test (Mantel-Cox) ($p < 0.05$). Four complemented strains were constructed for the selected genes ORF19.823, ORF19.7170, ORF19.6847, and MRV8. The function of the ORF19.823 is still unknown, because the mutant strain did not show any significative phenotype for the tests performed. The mutant strain for the ORF19.7170 caused less damage on epithelial cells, but the result was not significant and the gene was dispensable for biofilm formation. ORF19.6847 showed participation in biomass accumulation in the biofilm and epithelial damage and significative reduction of β -1,3-glucan production. MRV8 gene showed the phenotype more significative with clear participation for 24 h biofilm formation, biomass accumulation, organization of biofilm architecture, modulation of response to caspofungin at high concentrations, epithelial damage and the size of microcolonies

with phenotype recovered by the complemented strain. The MRV8 gene stood out as a promising target for developing new antifungal drugs with specific mechanisms against the C. albicans and C. dubliniensis species.

Key-words: Candida albicans. Biofilm. Antifungal Agents. Pathogenicity.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma levedura comensal encontrada na superfície das mucosas (Ganguly, Mitchell, 2011). Entretanto, esta levedura é um patógeno oportunista comum que pode causar uma variedade de infecções severas e recorrentes na mucosa, como também infecções invasivas e fatais, em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (Samaranayake LP et al., 2009; Ganguly, Mitchell, 2011).

As infecções de mucosa são caracterizadas por candidose bucal e vaginal decorrentes de fatores de risco como uso de agentes imunossupressores, antibióticos, estrogênios, xerostomia, uso de prótese e má higienização bucal (Jorge et al., 1993; Naglik et al., 2008; de Souza et al., 2009).

Para causar infecção, *C. albicans* dispõe de fatores de virulência como aderência as células do hospedeiro, hidrofobicidade, mudança morfológica (dimorfismo), secreção de aspartil proteinase, produção de fosfolipase e capacidade de formação de biofilme (Schaller et al., 2005; Nobile, Mitchell, 2006; Costa et al., 2012a).

Infecções agudas de mucosa bucal como candidose pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica são decorrentes de formação de biofilme patogênico constituído por uma mistura heterogênea de blastoconídeos, pseudohifas e hifas embebidas em substâncias poliméricas extracelulares que formam poros e canais (Costa et al., 2012b). As células organizadas em biofilme apresentam características fenotípicas que as diferenciam das células em suspensão, como susceptibilidade reduzida às células e substâncias do sistema imune e

aos antifúngicos convencionais (Kuhn et al., 2002; Samaranayake LP et al., 2009).

A formação do biofilme ocorre, inicialmente, com a aderência das leveduras ao substrato, seguida por coagregação das células e colonização que caracterizam a fase inicial (1-11 h) (Seneviratne et al., 2008a; Nobile, Mitchell, 2006). A presença das leveduras é importante para o ancoramento do biofilme a superfície (Douglas LJ, 2002). A seguir, ocorrem crescimento e proliferação das células permitindo a formação da camada basal, ancoragem das células e produção de material da matriz extracelular, caracterizando a fase intermediária (12-30 h), e finalmente, ocorre maturação com o crescimento de pseudohifas e concomitante extensão das hifas a partir de tubos germinativos com posterior disseminação das células que definem a fase de maturação (31-72 h) (Douglas LJ, 2002; Nobile, Mitchell, 2006; Seneviratne et al., 2008a; Ramage et al., 2009).

Os mecanismos moleculares de regulação da formação de biofilme iniciam-se com a aderência conferida pelos genes da família *ALS*, *HWP1*, *EAP1* e *CSH1* (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009; Karkowska-Kuleta et al., 2009). A seguir, ocorre a transição morfológica de levedura para hifa mediada principalmente pelo gene *EFG1* e outros, como *CPH1*, *TEC1*, *SUV3*, *NUP85*, *UME6*, *MDS3* e *KEM3* (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2009). As células são envolvidas pela matriz extracelular decorrente da expressão dos genes *ADH1*, *GCA1* e *GCA2* (Blankenship, Mitchell, 2006; Finkel, Mitchell, 2011). O dano celular causado pelo estabelecimento do biofilme deve-se a expressão de genes para as enzimas hidrolíticas aspartil proteinase secretoras (SAPs) e fosfolipases (PLBs) (Zhu, Filler, 2010). Os 1061 genes alvos envolvidos na formação do biofilme são regulados pelos fatores de transcrição codificados pelos genes *BCR1*, *TEC1*, *EFG1*, *NDT80*, *ROB1* e *BRG1* (Nobile et al., 2012).

Embora, os mecanismos moleculares de desenvolvimento do biofilme sejam bem descritos, Nett JE et al. (2009) avaliaram o perfil de transcrição de biofilme de *C. albicans* formado *in vivo* em cateter venoso central e descreveram que 44% dos genes "up" regulados no biofilme intermediário e 40% dos genes "down" regulados no biofilme maduro apresentam função desconhecida. Além disso, sabe-se que *C. albicans* possui 6524 genes, dos quais aproximadamente 73% ainda não foram caracterizados. Como um importante patógeno humano, este elevado número de genes não caracterizados poderia contribuir para a patogênese, como genes de fatores de virulência. Assim, estes dados despertam interesse para o estudo de genes com função desconhecida que são únicos para *C. albicans* ou estão presentes em outros patógenos fúngicos identificados e caracterizados por estudos prévios de perfis de transcrição durante infecção *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, e aqueles com características funcionais e estruturais interessantes identificados em análise *in silico* (Fradin et al., 2005; Thewes et al., 2007; Zakikhany et al., 2007; Wilson D et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo diplóide e assexual que produz blastoconídeos, pseudohifas e hifas semelhantes ao micélio dos ascomicetos mostrando septos com um simples poro (McCullough, Savage, 2005; Klis et al., 2009). Este fungo também é denominado dimórfico, pois se encontra como blastoconídeo na fase infectante e filamentosos na fase parasitária. Embora a invasão tecidual seja desencadeada pelas hifas, as duas formas são encontradas nos tecidos infectados (Jayatilake, 2011).

O blastoconídeo é esférico e oval medindo cerca de 2- 5 µm (Jayatilake, 2011). O crescimento da levedura ocorre por brotamento assimétrico, em que o septo surge antes do brotamento aparecer e o núcleo divide-se na constrição do brotamento dando origem a uma célula filha. As leveduras podem formar pseudohifas e hifas em um processo reversível (Berman, 2006, Giacometti et al., 2011). A forma vegetativa unicelular é favorecida a 30 °C e pH ácido (4,0) (Kim, Sudbery, 2011).

As hifas de *C. albicans* são mais estreitas que as pseudohifas assemelhando-se as hifas dos fungos filamentosos, formam-se a partir da evaginação e alongamento contínuo do tubo germinativo, onde o núcleo migra e divide-se dentro do tubo germinativo. A formação desta estrutura é limitada aos estágios mais recentes do ciclo celular (Berman, 2006). O crescimento direcional da hifa é direcionado por uma estrutura chamada *Spitzenkörper* que são estruturas filamentosas presentes na ponta da hifa em crescimento que direcionam a entrega de vesículas secretoras contribuindo para o crescimento polarizado

(Whiteway, Bachewich, 2007). A diferenciação em formas filamentosas é favorecida por fatores do ambiente como incubação a 37 °C, presença de soro, pH neutro ou pH alcalino, concentração aumentada de CO₂, embebimento em substrato e presença de N- acetilglicosamina, devido à expressão dos genes *EFG1*, *CPH1*, *MYO5* e *HGC1* (Berman, 2006; Whiteway, Bachewich, 2007; Kim, Sudbery, 2011; Mayer et al., 2012a).

As pseudohifas representam a forma de crescimento entre leveduras e hifas, formando cadeias de brotamentos alongados com constrictões nos septos e colônias rugosas em condições de pH de 5,5 e temperatura igual a 35 °C (Kim, Sudbery, 2011). O núcleo também se divide na constrictão do brotamento (Berman, 2006; ten Cate et al., 2009). As pseudohifas coexistem entre leveduras e hifas em culturas vegetativas e durante infecções. A ausência da estrutura *Spitzenkörper* e a posição nuclear no cruzamento da junção mãe-filha sugere que o crescimento da pseudohifa esteja mais próximo da levedura do que da hifa (Whiteway, Bachewich, 2007).

C. albicans é capaz de produzir clamidoconídeos que são estruturas formadas em condições adversas do ambiente mostrando morfologia esférica, refringentes, com parede grossa ligada a pseudohifa ou hifa. O clamidoconídeo difere do blastoconídeo por seu tamanho grande, forma esférica e aparência refringente em microscópio de luz (Jayatilake, 2011). Os mecanismos moleculares para sua formação são mediados pela expressão dos genes *SUV3*, *SCH9* e *ISW2* (Whiteway, Bachewich, 2007).

A célula de *C. albicans* é composta por uma membrana citoplasmática formada por uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas e citoplasma composto por organelas como núcleo, mitocôndrias e ribossomos. O citoplasma também contém vários vacúolos cheios de componentes secretores, numerosos microtúbulos e microfilamentos, como actina e septina. O aparelho de Golgi parece não estar claramente identificado, mas foram demonstradas vesículas

similares associadas com retículo endoplasmático, chamadas plasmalemassomos. Também foram encontradas vesículas na parede celular, chamadas lomassomos. Estas duas parecem ter função secretora (Jayatilake, 2011).

No núcleo são abrigados 8 pares de cromossomos (chr1, chr2, chr3, chr4, chr5, chr6, chr7 e chrR) contendo 13,3- 13,4 milhões de pares de bases e 6524 genes, dos quais 19,2% são únicos para a espécie *C. albicans* (Braun et al., 2005; Kim, Sudbery, 2011; Wilson D et al., 2014). O genoma de *C. albicans* apresenta algumas particularidades, pois cromossomos homólogos mostram divergências substanciais, em que muitas vezes genes estão presentes em 2 alelos diferentes (Braun et al., 2005). Outra particularidade é o códon CUG que é traduzido em serina ao invés de leucina (Kim, Sudbery, 2011). Além disso, um grande número (acima de 73%) dos genes identificados no genoma de *C. albicans* é classificado como genes com função desconhecida, dos quais 19% destes não compartilham sequências homólogas significativas com outros seres vivos (Braun et al., 2005; d' Enfert et al., 2005).

Externamente a membrana citoplasmática situa-se a parede celular responsável por manter a integridade da célula e interagir com o ambiente externo, composta, principalmente, por manoproteínas, β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina (Chaffin, 2008). A parede celular de *C. albicans* é composta por uma camada interna de β -1,3-glucana sendo a principal estrutura polissacarídica de característica ramificada e elástica que reflete a conformação helicoidal ligando-se a β -1,6-glucana e quitina. Algumas moléculas de quitina podem estar ligadas a β -1,6-glucana. β -1,6-glucana funciona como ligantes flexíveis entre as proteínas e são mais rígidas que a camada de β -1,3-glucana (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009). Proteínas da parede celular (*cell wall proteins*- CWPs) estão ligadas de forma covalente aos componentes polissacarídicos de duas formas. A forma mais abundante reflete a classe de proteínas fixadas a β -1,6-glucana por meio de glicofosfatidilinositol (*Glycophosphatidylinositol*-

GPI). A segunda forma é a ligação com proteínas com repetições internas (*proteins with internal repeats*- Pir) ligadas a β -1,3-glucana que auxiliam na arquitetura da parede celular. Além disso, também existem as proteínas que não estão fixadas a matriz polissacarídica (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009).

As proteínas da parede celular apresentam importantes funções para a adaptação e virulência, como: manter a integridade da parede celular, evitar detecção por dectina-1, promover a formação de biofilme, mediar a aderência as células do hospedeiro e a dispositivos médicos abióticos, promover a invasão das camadas epiteliais, proteger contra o ataque do sistema imune inato, promover a aquisição de ferro e propriedades relacionadas com permeabilidade e carga (Klis et al., 2009). Existe por volta de 20 CWPs que podem estar fixadas a parede celular como as 8 adesinas da família *ALS*, *HWP1*, *EAP1* e *PGA30* (Klis et al., 2009). Além destas, existem também CWPs não fixadas covalentemente a parede celular apresentando função enzimática, como as enzimas hidrolíticas que tem a capacidade de hidrolisar complexos substratos e transportá-los para dentro da célula como fonte de nutrientes. Podem agir como fatores de virulência degradando os tecidos do hospedeiro, facilitando a colonização ou invasão, como as proteínas da família da aspartil proteinase secretoras, quitinase, proteínas para biossíntese de β -1,6-glucana e enzimas com atividade para glucanase (Chaffin, 2008).

2.2 Biofilme de *Candida albicans*

O biofilme de *C. albicans* é constituído por uma mistura heterogênea de blastoconídeos, pseudohifas e hifas embebidas em substâncias poliméricas extracelulares que formam poros e canais, mostrando características fenotípicas que se diferenciam da planctônica,

sendo implicado nas candidoses bucais (Seneviratne et al., 2008a; Costa et al., 2011).

A formação do biofilme ocorre, inicialmente, com a aderência das leveduras ao substrato, seguida por coagregação das células e colonização que caracterizam a fase inicial (0-11 h) (Seneviratne et al., 2008a; Nobile, Mitchell, 2006). A presença das leveduras é importante para o ancoramento do biofilme a superfície (Douglas LJ, 2002). A seguir, ocorrem crescimento e proliferação das células permitindo a formação da camada basal, ancoragem das células e produção de material da matriz extracelular, caracterizando a fase intermediária (12-30 h), e finalmente, ocorre maturação com o crescimento de pseudohifas e concomitante extensão das hifas a partir de tubos germinativos com posterior disseminação das células que definem a fase de maturação (31-72 h) (Douglas LJ, 2002; Nobile, Mitchell, 2006; Seneviratne et al., 2008a; Ramage et al., 2009).

Os mecanismos moleculares de regulação da formação do biofilme já foram descrito por alguns autores (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2009; Nobile et al., 2009; Nailis et al., 2009). A aderência é o primeiro passo para a formação do biofilme e é conferida pelos genes da família *ALS* responsáveis por aderência e agregação a outros micro-organismos e são expressos por leveduras e hifas. O gene *HWP1* codifica uma adesina expressa somente por hifas, o gene *EAP1* confere aderência a poliestireno e o gene *CSH1* confere aderência relacionada com hidrofobicidade da superfície celular da levedura, além de outras adesinas menos conhecidas (Chaffin, 2008; ten Cate et al., 2009; Karkowska-Kuleta et al., 2009). Após aderência, segue-se a maturação com a formação de hifas e expressão do gene *EFG1* envolvido na regulação da transição morfológica e habilidade de formar estrutura aderente ao poliestireno, poliuretano e vidro. Outros genes também são requeridos para a diferenciação morfológica como *CPH1*, *TEC1*, *SUV3*, *NUP85*, *UME6*, *MDS3* e *KEM3* (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et

al., 2009). A produção de matriz extracelular é mediada pela expressão dos genes *ADH1*, *GCA1* e *GCA2* (Blankenship, Mitchell, 2006; Finkel, Mitchell, 2011). Após o estabelecimento do biofilme, ocorrem invasão e dano celular por meio da expressão de genes para as principais enzimas histolíticas, aspartil proteinase secretoras (*SAPs*) e fosfolipases (*PLBs*) (Zhu, Filler, 2010). O último processo do biofilme é a dispersão das células para a formação de outras comunidades regulada negativamente pelos genes *UME6* e *SUR7* e positivamente pelos genes *PES1* e *NRG1* (Bernardo, Lee, 2010; Uppuluri et al., 2010b; Finkel, Mitchell, 2011). A mudança de expressão ou atividade destes genes durante a maturação do biofilme parece ser controlada em resposta ao acúmulo de moléculas do *quorum-sensing* (Uppuluri et al., 2010b; Finkel, Mitchell, 2011). Os genes relacionados à filamentação e aderência são regulados principalmente pelos fatores de transcrição *EFG1*, *BCR1* e *TYE1* (Ganguly, Mitchell, 2011; Dwivedi et al., 2011).

Nobile et al. (2012) avaliaram 165 reguladores transcricionais quanto à formação de biofilme de *C. albicans*, dos quais 6 mutantes foram selecionados para estudo da rede de circuito de controle transcricional: *bcr1Δ/Δ*, *tec1Δ/Δ*, *efg1Δ/Δ*, *ndt80Δ/Δ*, *rob1Δ/Δ* e *brg1Δ/Δ*. Foi demonstrado que 1061 genes foram regulados por pelo menos um dos 6 reguladores de biofilme. Além disso, foi observado que os 6 reguladores controlam a expressão dos outros reguladores: os 6 reguladores ligam-se as regiões promotoras de *BCR1*, *TEC1*, *EFG1* e *BRG1*; Tec1, Efg1, Ndt80 e Rob1 ligam-se a *ROB1*; Efg1 e Ndt80 liga-se a *NDT80*; sendo que a regulação entre os reguladores é positiva. Bcr1, Efg1, Ndt80, Rob1 e Brg1 são ativadores e repressores de seus genes alvos, enquanto que Tec1 age somente como ativador de genes envolvidos com a formação de biofilme. Assim, considerando todos os genes alvos dos 6 reguladores, a rede de genes do biofilme compreende 15% do genoma de *C. albicans*.

O biofilme de *C. albicans* pode ser formado sobre superfície biótica como tecidos e órgãos do hospedeiro e sobre

superfícies inanimadas, como dispositivos médicos e odontológicos com aderência facilitada devido à presença de saliva e soro (Douglas LJ, 2002; Dongari- Bagtzoglou et al., 2009; da Silva et al., 2010; Estivil et al., 2011).

A organização em biofilme apresenta vantagens que incluem proteção no ambiente, resistência à remoção física e química, cooperação metabólica e regulação da expressão de genes baseados na comunidade. As principais implicações clínicas devem-se a redução da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e proteção contra as defesas do hospedeiro (Jabra-Rizk et al., 2004; Ramage et al., 2009).

As células do biofilme de *C. albicans* têm habilidade de comunicar-se e coordenar o comportamento da comunidade via secreção de moléculas de sinalização em um fenômeno definido como *quorum-sensing* (Ramage et al., 2009). O *quorum - sensing* beneficia o biofilme, pois previne a superpopulação desnecessária, controla a competição por nutrientes e tem importantes implicações no processo infeccioso particularmente para disseminação e estabelecimento de outros sítios de infecção (Ramage et al., 2005). As principais moléculas identificadas são o farnesol e o tirosol. O farnesol foi identificado originalmente como um inibidor da morfogênese inibindo a transição de levedura para hifa promovendo a dispersão das células (Ramage et al., 2009; Finkel, Mitchell, 2011). Possui também outras funções importantes como promoção da resistência ao estresse oxidativo, ativação da formação de clamidoconídeos em condições favoráveis para o seu desenvolvimento, inibição da aderência das leveduras a superfície, germinação das leveduras em biofilme maduro e redução da produção de IL-12 pelo hospedeiro. O tirosol apresenta efeito contrário ao farnesol, induzindo a transição de levedura para hifa nos primeiros estágios de desenvolvimento do biofilme. A morfogênese e conseqüentemente a secreção de moléculas do *quorum-sensing* é influenciada pela densidade de células na população, em que em concentrações menores que 10^6 células/ mL ocorrem transição de leveduras para hifas e acima desta

concentração ocorre predominância de leveduras (Kruppa, 2009; Ramage et al., 2009).

O uso do farnesol para controlar a formação de biofilme de *C. albicans* surge como um novo mecanismo de ação que poderá ser utilizado como opção terapêutica, como descrito por Hisajima et al. (2008) que verificaram o efeito protetor do farnesol em candidose bucal experimental induzida em camundongo imunossuprimido, mostrando redução das lesões e células de *C. albicans* e análise histológica com poucos micélios e células inflamatórias devido à prevenção da invasão do fungo na mucosa.

Outras moléculas também foram descritas com efeito na população. Feniletil álcool e triptofol agem inibindo a filamentação, porém em concentrações mais altas de células, enquanto que a substância autoreguladora morfogênica (MARS) induz a morfogênese da hifa. Assim como o farnesol, o ácido farnesóico inibe a transição de levedura para hifa (Kruppa, 2009). Outra molécula recentemente relacionada ao *quorum-sensing* é uma proteína-reguladora dependente de zinco codificada pelo gene *ZAP1* que funciona como repressora da maturação do biofilme através da regulação negativa da produção de β -1,3- glucana solúvel, o componente mais prevalente da matriz extracelular (Nobile et al., 2009).

A secreção de moléculas sinalizadoras também pode influenciar a morfogênese de *Candida* em biofilmes heterotípicos como descrito por Martins et al. (2007). Os autores investigaram o efeito de cinco sinalizadores menos conhecidos, álcool isoamil, 2- feniletanol, 1- dodecanol, E- nerolidol e E,E- farnesol, secretados por células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, o qual foi coletado o sobrenadante das culturas e avaliados quanto ao controle da morfogênese. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes das duas espécies tiveram atividade inibitória para a transição morfológica das formas leveduriformes para a forma filamentosa de *C. albicans* e

pseudohifa de *C. dubliniensis*, com atividade inter e intraespécie, porém não houve restrição do crescimento.

As camadas mais internas do biofilme maduro criam um ambiente pobre em oxigênio o que requer a expressão de determinados genes para a manutenção da estrutura. Assim, Bonhomme et al. (2011) observaram que o gene *TYE7*, que codifica um ativador transcricional de genes glicolíticos em crescimento planctônico e biofilme, é requerido para a coesividade do biofilme. Este gene regula negativamente a transição de levedura para hifa induzida por condições de hipóxia que quando deletado forma um biofilme menos aderente, fácil de ser removido, enfraquecido e com maior número de formas filamentosas em condições de hipóxia que a cepa selvagem mostrando que Tye7p mantém a produção de ATP por expressar genes glicolíticos necessários à adaptação a hipóxia gerada durante a maturação do biofilme, destacando-se como um alvo atrativo para o desenvolvimento de antifúngicos.

Na etapa final da formação do biofilme é descrito a dispersão das células do biofilme constituída predominantemente por leveduras brotantes, entretanto foi descrito recentemente que a dispersão pode ser iniciada nos primeiros momentos da formação do biofilme de *C. albicans* com declínio na fase intermediária, porém sem cessação completa após 48 h (Uppuluri et al., 2010a). Estes dados também dependem do meio de cultura utilizado e metodologias de formação do biofilme. A dispersão das células apresenta implicações clínicas importantes, pois constituem fonte de infecções para outros sítios por cepas com virulência aumentada como demonstrado por Uppuluri et al. (2010a), o qual estudou as células dispersas de biofilme formado sob fluxo contínuo observando que estas foram mais aderentes ao poliestireno e às células endoteliais, formaram um biofilme mais complexo e foram mais patogênicas para camundongos após indução de candidemia que as células planctônicas. Além disso, estudos demonstraram que as células dispersas foram mais resistentes que as

células planctônicas aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina, porém menos resistentes que a organização em biofilme, mostrando que o tratamento de infecções causadas por biofilme de *C. albicans* vai além da erradicação da comunidade sésil (Baillie, Douglas, 1998a, 1998b).

Em outro estudo realizado por Uppuluri et al., (2010b) foi investigada a função do gene *NRG1* de *C. albicans*, uma proteína ligadora de DNA com um domínio de zinco, que funciona como regulador negativo de filamentação, quanto ao desenvolvimento do biofilme. A cepa super expressando Nrg1p formou um biofilme monocamada constituído por leveduras e pseudohifas aderidas ao substrato e menos robusto que o biofilme formado pela cepa de *C. albicans* SC5314. Em adição, este biofilme teve pelo menos 10 a 18 vezes mais células dispersas. Os resultados indicaram que a regulação da expressão de *NRG1* poderia potencialmente levar ao controle do biofilme e apontaram o gene *NRG1* como um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

As substâncias da matriz extracelular são secretadas durante a fase de maturação com função de proteger as células da fagocitose, manter a integridade do biofilme e limitar a difusão de substâncias (Douglas LJ, 2003; Seneviratne et al., 2008a). A matriz extracelular é constituída por polissacarídeos, como glicose, manose, ramnose e N-acetilglicosamina, proteínas, hexosaminas, fósforo e ácido urônico (Al-Fattani, Douglas, 2006; Lal et al., 2010; Martins et al., 2010).

Assim o tratamento das infecções causadas por biofilme de *C. albicans* fica dificultado em virtude da proteção das células contra os mecanismos do sistema imune e antifúngicos convencionais (Douglas LJ, 2002). A suscetibilidade reduzida do biofilme aos antifúngicos convencionais é um fenômeno multifatorial que envolve as características do biofilme, como a heterogeneidade da população do biofilme, restrição da penetração dos antimicrobianos devido ao material da matriz

extracelular, diminuição da taxa de crescimento das células dentro do biofilme e diferença de expressão de genes (Nobile, Mitchell, 2006; Bonhomme, d'Enfert, 2013).

O biofilme de *C. albicans* apresenta resistência intrínseca aos azóis, devido à expressão de bombas de efluxo codificadas pelos genes da superfamília de proteínas ABC (cassete-ligadora de ATP) e MFS (facilitador maior). ABC codifica os genes *CDR1* e *CDR2* e MFS codifica *MDR1*. A superexpressão destes genes ocorre na fase intermediária e madura, porém se inicia na fase inicial da formação do biofilme (Prasad, Kappor, 2005; Chandra et al., 2005).

Kuhn et al. (2002) relataram diminuição da suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* formados *in vitro* aos antimicrobianos fluconazol, voriconazol, clorexidina, anfotericina B, nistatina, terbinafina e ravuconazol em relação às células planctônicas. Mas por outro lado, foi demonstrado que o antifúngico caspofungina pode ser usado para prevenção e redução de biofilme de *C. albicans*, demonstrado no tratamento de biofilme formado *in vivo* em cateter colocado em camundongo. Os resultados mostraram que o tratamento reduziu, aproximadamente, 4 log₁₀ de células do biofilme e 99% de células disseminadas para os rins. A prevenção da formação do biofilme reduziu quase 3 log₁₀ de células e a disseminação para os rins, indicando que a caspofungina constitui importante agente na prevenção e tratamento de infecções causadas por biofilmes de *C. albicans* e disseminação para órgãos distantes (Lazzell et al., 2009).

Assim como as células sésseis, as células provenientes do biofilme rompido também apresentam susceptibilidade reduzida aos antifúngicos em relação às células planctônicas, como demonstrado por Nett JE et al. (2010) que obtiveram redução de 50% de células de *C. albicans* provenientes de biofilme formado sobre prótese acrílica usada para indução de estomatite protética em ratos quando na presença de no mínimo 256 µg/ mL de anfotericina B, fluconazol e micafungina.

Outro fato que contribui para a redução da suscetibilidade aos antifúngicos é a presença de células "persistentes" que representam uma menor população do biofilme. Estas células são protegidas das defesas do hospedeiro pela matriz extracelular e após a exposição ao antimicrobiano podem repovoar o biofilme, representando outro mecanismo de resistência (d'Enfert, 2009). Sugere-se que as células "persistentes" não sejam programadas para a morte celular, favorecendo a tolerância aos agentes antimicrobianos e a escassez de nutrientes no biofilme (Jabra-Risk et al., 2004).

O crescimento em biofilme também contribui para a evasão do sistema imune por diferentes mecanismos, como a expressão de proteínas de superfície, como Pra1p e Gpd2p, que se ligam aos fatores H e FHL1 mimetizando as células do hospedeiro resultando em proteção contra o sistema complemento e o uso da citocina IL-17A que parece aumentar a formação de biofilme de *C. albicans in vitro* (Mathé, Van Dijck, 2013). Além disso, a presença de células do sistema imune, como células mononucleares do sangue periférico, durante o desenvolvimento do biofilme aumenta significativamente a espessura e atividade metabólica do biofilme em resposta à secreção diferenciada de citocinas anti-inflamatórias (Chandra et al., 2007).

Existem diversos modelos de formação de biofilme descritos na literatura que permitem estudar sua complexidade estrutural, expressão gênica, comportamentos frente a diferentes substratos, condições de estresse, como comportamento a diferentes agentes antifúngicos e outros compostos químicos (Martins et al., 2010; Estivil et al., 2011; Costa et al., 2013a). Seneviratne et al. (2009) desenvolveram um modelo de biofilme de *Candida* crescido no fundo da placa de 96 poços de poliestireno em meio de cultura *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado com 100 mM de glicose para a avaliação de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, o qual foi observado que $1-7 \times 10^5$ células/mL aderem à superfície de poliestireno em 1,5 h. A fase de aderência

mostrou valores altos para a atividade metabólica para as duas espécies alcançando o valor máximo após 48 h e declinando depois. *C. albicans* formou um biofilme grosso e complexo composto por blastoconídeos, pseudohifas e hifas embebidas em matriz polissacarídica extracelular. O biofilme formado por *C. glabrata* foi fino, desigual e bastante compacto, formado por blastoconídeos embebidos em matriz polissacarídica extracelular. Após 48 h, os biofilmes atingiram a maturidade e alcançaram um platô de $0,3-2,2 \times 10^8$ células/mL e declinaram e desintegraram a 72 h. Foi demonstrado que biofilme de *C. albicans* de 48 h e 72 h apresentaram 7,6% e 28% de células mortas, respectivamente (Seneviratne et al., 2008b). A formação de biofilme por esta metodologia foi avaliada pelos métodos de contagem de células viáveis, atividade metabólica, microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura rendendo resultados importantes para a compreensão das comunidades (Seneviratne et al., 2009)

Nett JE et al. (2009) avaliaram a expressão gênica de biofilmes de *C. albicans* formados *in vivo* em cateter venoso central inserido em camundongos, mostrando que para os biofilmes na fase intermediária e de maturação houve super expressão de 124 genes, os quais estão envolvidos na síntese de carboidratos e processamento (10%), transcrição e síntese de proteínas (13%) e produção de energia e metabolismo (12%). Embora os mecanismos moleculares de regulação da formação do biofilme sejam bem descritos, neste estudo foi observado que 44% dos genes "*up*" regulados no biofilme intermediário e 40% dos genes "*down*" regulados no biofilme maduro apresentam função desconhecida, destacando a necessidade de estudos que descrevam a função destes genes para compreensão do biofilme, fornecimento de ferramentas diagnósticas e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Finkel et al. (2012) estudaram os sinais regulatórios envolvidos na primeira fase de desenvolvimento do biofilme que

correspondem à aderência das leveduras ao substrato utilizando uma nova metodologia chamada *nanosttring profiling*, mais sensível que o método microarray e que usa sondas que se ligam diretamente aos RNAs. Os autores observaram que 29 fatores de transcrição controlam grupos diferentes de genes envolvidos no crescimento de hifas, virulência, secreção de proteínas e parede celular, captura de zinco e produção da matriz extracelular. Cinco destes fatores de transcrição, Ace2p, Bcr1p, Cas5p, Snf5p e Met4p, controlam genes ligados à via que regula Ace2p e morfogênese polarizada apresentando papel na formação de biofilme. Também foi destacado o importante papel de Bcr1p na primeira fase de desenvolvimento do biofilme no controle do gene de aderência *ALS1* crucial para a aderência célula-substrato.

Como descrito nos estudos acima, a formação de biofilme por *C. albicans* depende da regulação de vias e expressão de genes envolvidos nos principais processos de desenvolvimento que são aderência, filamentação, produção de matriz extracelular e dispersão de células. Porém, tem sido observada a superregulação de genes envolvidos em processos metabólicos durante a formação de biofilme (Bonhomme et al., 2011). Tomando estes achados como base, foi verificado o impacto da via metabólica da biossíntese do glicerol mediada pelo gene *RHR2* que codifica a proteína glicerol-3-fosfatase na formação de biofilme. A cepa mutante para este gene apresentou deficiência para aderência ao silicone, acúmulo de biomassa, formação de biofilme em modelo de rato para cateter venoso central e menor expressão dos genes das adesinas Als1p, Als3p e Hwp1p. Para explicar estes efeitos os autores levantaram 4 hipóteses: primeiro, a falta do gene *RHR2* levaria ao aumento da pressão osmótica induzindo a expressão de *HOG1*, porém alterações nesta via não causam deficiência na aderência, mas afeta a filamentação. Segundo, talvez os níveis de glicerol sejam percebidos por um ou mais fatores de transcrição requeridos para a aderência e formação de biofilme. Terceiro, o papel do glicerol deve-se a sua

participação na estrutura de glucosilfosfatidilinositol que ancora adesinas na superfície celular. Por último, talvez o glicerol seja importante para gerar o turgor necessário para a penetração no tecido. Os autores destacaram o papel da síntese de glicerol para a expressão das principais adesinas envolvidas na formação de biofilme e o achado de uma importante via metabólica como alvo terapêutico que pode causar prejuízos para ambas as funções fisiológicas e regulatórias (Desai et al., 2013).

2.3 Fatores de virulência de *Candida albicans*

C. albicans é a espécie mais virulenta do gênero expressando diversos fatores de virulência que contribuem para colonização, formação de biofilme, infecção e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Inicialmente, a interação com as células do hospedeiro e substratos inanimados é mediada por adesinas que são componentes da parede celular representado por quitina, glucanas, lipídios, proteínas e manoproteínas (Mishra et al., 2007; Chaffin, 2008). Nas células do hospedeiro, os receptores para estas adesinas estão localizados na superfície das células ou matriz extracelular, como colágeno, vitronectina, fibronectina, laminina e tenascina-C, ou podem ligar-se a alguns peptídios e moléculas do soro, como os componentes do sistema complemento (C3d, iCEd, C4BP, fator H e FHL-1) (Chaffin, 2008).

A aderência pode ser mediada pela expressão dos 8 genes da família *ALS* (*ALS1-7* e *ALS9*), pertencentes à família das imunoglobulinas. Estas aglutininas interagem de forma específica com as moléculas do hospedeiro. Als1p, Als3p e Als5p medeiam à aderência a colágeno, fibronectina, laminina, células endoteliais e epiteliais. Als6p, Als9p, Als4p e Als5p contribuem para a interação com colágeno, laminina,

endotélio e coagregação célula-célula, respectivamente (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Além disso, estas adesinas agem em conjunto com outras adesinas, em que Als1p e Eap1p medeiam à ligação célula-substrato e Als3p e Hwp1p medeiam à ligação célula-célula (Finkel, Mitchell, 2011). A adesina Als3p, expressa somente por hifas, apresenta características multifatoriais mediando à aderência as células endoteliais e epiteliais bucais, gelatina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno tipo IV, laminina e película salivar. Esta adesina ainda é responsável pela formação de biofilme e constitui importante invasina, pois se liga a N-caderina e E-caderina na superfície das células epiteliais e endoteliais promovendo a endocitose das hifas. Almeida et al. (2008) descreveram outra função da adesina Als3p na aquisição de ferro a partir de estoques intracelulares na forma de ferritina destacando seus múltiplos atributos como fator de virulência.

Green et al. (2006) avaliaram a expressão de genes *ALS* por cepas isoladas de pacientes com HIV em modelo de candidose bucal em ratos com hipossalivação mostrando que houveram diferenças no perfil de expressão entre as aglutininas e para o tempo de infecção, onde o gene *ALS2* foi expresso para todas as cepas e o início da infecção foi marcado pela expressão do gene *ALS1* seguida pelos outros genes da família das aglutininas, porém não foi observada a expressão do gene *ALS7* para a infecção em ratos.

Outra adesina importante expressa somente por hifas é a Hwp1p que medeia aderência as células epiteliais bucais, induz reposta de anticorpo salivar e sistêmico e contribui para a formação de biofilme (Ramage et al., 2009; Naglik et al., 2011). A interação de Hwp1p com as aglutininas Als1p e Als3p tem papel complementar na formação do biofilme *in vitro* e *in vivo*, o qual ocorre coagregação das células pela ligação Hwp1p- Als3p (Nobile et al., 2008).

As adesinas Eap1p e Csh1p medeiam à aderência a objetos inanimados, onde a primeira contribui para a formação de biofilme

sobre substrato de poliestireno e a segunda é responsável pela hidrofobicidade da parede celular da levedura conferida por proteína manosilada que medeia aderência as células do hospedeiro e superfícies inanimadas de forma inespecífica (de Souza et al., 2009; Klis et al., 2009; Ramage et al., 2009).

Outras proteínas da superfície da célula codificadas pelos genes *HYR1*, *ECE1*, *IFF4*, *MP65*, *PHR1* e *HGC1* também estão relacionadas à aderência as células do hospedeiro, porém suas funções exatas ainda não foram bem descritas (Wilson D et al., 2009; Naglik et al., 2011; Finkel, Mitchell, 2011). Vitkov et al. (2002) levantaram a hipótese de que a aderência às células do epitélio bucal também pode ser mediada por fímbrias, as quais estão integradas as adesinas. As fímbrias de *C. albicans* são compostas por 80-85% de carboidratos (D- manose) e 10-15% de proteínas.

A aderência é o primeiro passo para a formação do biofilme, o qual constitui importante fator de virulência de *C. albicans*, como demonstrado por Hasan et al. (2009) que mostraram que cepas com maior capacidade de formação de biofilme foram mais virulentas em candidose sistêmica induzida em camundongos, visto por mortalidade mais rápida (1-4 dias) que cepas com baixa formação de biofilme (8-10 dias).

Após a aderência às células do hospedeiro, ocorrem invasão e dano decorrentes da mudança morfológica com formação de filamentos, embora leveduras possam ser encontradas em tecido com lesão (Jayatilake, 2011). A mudança morfológica confere habilidade de gerar variantes permitindo uma melhor adaptação seletiva, como capacidade de filamentar dentro do fagossomo e romper o macrófago e adaptação a novas condições do ambiente, porém não é capaz de matar neutrófilo (Mishra et al., 2007; Seider et al., 2010). Além disso, a hifa age como um aparato invasivo gerando força física detectando sítios adequados para invasão como brechas e microporos em epitélio

susceptível por um processo chamado tigmotropismo, definido como um mecanismo de orientação da hifa por contato físico especialmente em superfície sólida e rígida (Jayatilake, 2011).

A filamentação é desencadeada pela expressão dos genes *EFG1*, *TEC1*, *SUV3*, *CPH1*, *NUP85*, e *UME6*, o qual o gene *EFG1* também age como fator de transcrição para estes genes agindo na ativação e repressão (Ramage et al., 2009; Whiteway, Bachewich 2007). Foi demonstrado que o gene *TPK2* também participa da extensão da pseudohifa (Giacometti et al., 2011). O gene *EED1* expresso somente por *C. albicans* e *C. dubliniensis*, mostrou-se necessário para formar hifa e manter esta morfologia impedindo que ocorra o processo reversível de transição hifa- levedura. Este gene também age como regulador positivo de *ECE1*, *SOD5* e *HYR1* (Martin et al., 2011). O transportador de sódio presente na membrana de *C. albicans* codificado pelo gene *DUR31* também foi recentemente descrito mostrando ser importante para a alcalinização do meio extracelular que contribui para a autoindução de formação de hifas (Mayer et al., 2012a).

A filamentação leva a invasão e conseqüentemente ao dano, devido à pressão física exercida sobre as células e produção de enzimas histolíticas. Dentre as enzimas histolíticas, a mais conhecida é a aspartil proteinase secretora expressa pelo multigene *SAP* que possui 10 membros, *SAP1-8*, liberadas no espaço extracelular e *SAP9* e *SAP10* ancoradas as proteínas GPI localizadas na membrana citoplasmática e membrana citoplasmática e parede celular, respectivamente (Schaller et al., 2005; Albrachet et al., 2006). Essas proteínas têm como função degradar imunoglobulinas e componentes do complemento, clivar transferrina humana, α -1-antitripsina, α -2-microglobulina, auxiliar na colonização e penetração nos tecidos do hospedeiro e evasão do sistema imune (Mishra et al., 2007). Dalle et al. (2010) observaram que pepstatina A, um inibidor de aspartil proteinase, reduziu a invasão em células

epiteliais bucais e enterócitos, mostrando que as Saps podem estar envolvidas na penetração ativa e indução de endocitose.

Embora sejam semelhantes, as Saps apresentam substratos diferentes e condições de expressão diferentes. Sap9p e Sap10p são constitutivamente expressas quebrando proteínas em aminoácidos básicos e dibásicos sem exclusividade (Schaller et al., 2005; Schild et al., 2011). Sap2p é expressa por *C. albicans* a 30-37 °C em meio contendo proteínas como única fonte de nitrogênio, degradam extrato córneo humano, colágeno, laminina, fibronectina, mucina, proteínas de defesa como lactoferrina salivar, α -2-microglobulina, enzimas da explosão respiratória de macrófagos e quase todas as imunoglobulinas incluindo IgA secretora (Schaller et al., 2005). Sap1p e Sap3p são requeridas para a infecção na mucosa expressas somente por células opacas e Sap4p-6 para infecção sistêmica (Schaller et al., 2005; Albrachet et al., 2006). Os transcritos de Sap8p são mais expressos a 25 °C (Schaller et al., 2005). Kuriyama et al. (2003) descreveram que cepas isoladas de lesões de candidoses foram mais proteolíticas que as cepas isoladas de indivíduos saudáveis, porém não houve diferença proteolítica entre as cepas isoladas de diferentes lesões (candidose pseudomembranosa, eritematosa crônicas e agudas e hiperplásica), destacando que as Saps constituem importante fator de virulência para casos de candidose bucal, sendo mais proteolíticas para cepas isoladas de lesões.

A fosfolipase também é uma enzima histolítica localizada intracelularmente nas pontas das hifas ou por toda a superfície da levedura implicada na adesão as células epiteliais, dano na membrana da célula, penetração, invasão do epitélio bucal humano reconstituído, e talvez interação com as vias de transdução de sinal no hospedeiro (Schaller et al., 2005; Mishra et al., 2007). Esta enzima é codificada por quatro genes da mesma família, *PLA*, *PLB*, *PLC* e *PLD* (Schaller et al., 2005).

Além das fosfolipases, existem as lipases e esterases que hidrolisam ligações ester de mono, di e triacilgliceróis ou mesmo fosfolípidios. A lipase hidrolisa substratos insolúveis e a esterase age em substratos solúveis. Existem 10 genes para *LIP* responsáveis por codificar estas enzimas (Schaller et al., 2005).

Uma manoproteína denominada fator hemolítico participa da aquisição de ferro a partir de hemácias lisadas, permitindo o crescimento em soro do hospedeiro (Mishra et al., 2007). Outras enzimas com função de fosfatase ácida, trealose, glicoamilase, hialuronidase, condroitin sulfatase e metalopeptidases, são manoproteínas catalíticas que agem nos substratos do hospedeiro causando dano (Mishra et al., 2007).

2.4 Interação patógeno- hospedeiro

A aderência de *C. albicans* às células epiteliais é o primeiro passo crítico para o processo de infecção (Zhu, Filler, 2010; Naglik et al., 2011). As células epiteliais estão em constante contato com *C. albicans* e portanto constituem a primeira linha de defesa contra o fungo (Naglik et al, 2011). Leveduras e hifas vivas e mortas podem penetrar as células epiteliais bucais por endocitose através da interação de invasinas fúngicas, Als3p e Ssa1p, com proteínas da superfície epitelial desencadeando o engolfamento para dentro da célula em um mecanismo mediado por actina dependente somente da célula epitelial. Ou pode ocorrer por penetração ativa que requer a viabilidade da hifa que invade entre ou através das células epiteliais vivas ou mortas por pressão física e auxílio de invasinas, Als3p e Saps, dependendo somente do fungo. A penetração ativa ocorre mais tardiamente e a endocitose é

induzida no início da infecção, nas primeiras 4 h (Dalle et al., 2010; Naglik et al., 2011).

Após a invasão, leveduras e hifas são reconhecidas pelas células epiteliais e as hifas induzem ativação completa das respostas efetoras, uma vez que a forma filamentosa é reconhecida pelo hospedeiro como patogênica (Moyes, Naglik, 2011; Gow, Hube, 2012). O reconhecimento do fungo pelas células do hospedeiro, células epiteliais, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células T, ocorre através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogene Associated Molecular Patterns*- PAMPs) que são moléculas de superfície como mananas, manoproteínas, β -glucanas e quitina, por receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors*- PRRs) do hospedeiro. A resposta imune epitelial é desencadeada pelo reconhecimento da transição de levedura para hifa e aumento da carga fúngica. O reconhecimento das leveduras leva a ativação de NF- κ B e ativação fraca, antecipada e transiente do fator de transcrição c-Jun e das vias MAPK (p38, ERK1, ERK2 e JNK) insuficiente para alcançar o limiar e assim desencadear a síntese de citocinas. Quando há alta carga de hifas colonizando o epitélio, esta morfologia é reconhecida resultando em contínua ativação de NF- κ B, forte ativação da resposta secundária de MAPK, ativando p38 e ERK1 e ERK2. A ativação de p38 leva a ativação do fator de transcrição c-Fos, que em conjunto com os heterodímeros p65/p50 de NF- κ B, resultam em superexpressão de citocinas e mediadores inflamatórios. Ao mesmo tempo a ativação de ERK1 e ERK2 resulta na estabilização da fosfatase MKP1, que se liga a p38 e JNK desativando-os, agindo como parte da alça de *feedback* negativo para prevenir o potencial deletério da super-reação do sistema imune (Naglik et al., 2011; Gow, Hube, 2012). A ativação induz a produção de citocinas (IL-1 α/β , IL-6, G-CSF e TNF α) e quimiocinas (RANTES, IL-8 e CCL20), além de metaloproteases (remodelação do epitélio e das funções da barreira) e peptídios antimicrobianos, como LL-37 e β -defensinas. As β -defensinas

são peptídios antimicrobianos capazes de limitar o super crescimento e colonização de *Candida*, cuja expressão pode ser inibida pela formação da hifa por mecanismos ainda não descritos (Lu et al., 2004). Sugere-se que o farnesol possa diminuir a proliferação e induzir apoptose em células epiteliais bucais (Albuquerque, Casadevall, 2012).

A ativação e dano nas células epiteliais e endoteliais é mediada pela capacidade de filamentação associada com a captura de nutrientes da célula hospedeira, como demonstrado por Citiulo et al. (2012). A hifa invasora de *C. albicans* é capaz de adquirir zinco dentro da célula endotelial através da secreção de um "zincoróforo" codificado pelo gene *PRA1* que sequestra zinco da célula hospedeira e reassocia com a parede da hifa via co-expressão de um transportador de zinco, *Zrt1* (Citiulo et al., 2012).

As citocinas e quimiocinas secretadas pelas células epiteliais recrutam neutrófilos, células dendríticas e células T. Os neutrófilos reconhecem *C. albicans* através de seus receptores CR3 e Fcγ e moderadamente através de receptores *Toll-like* (TLR). Neutrófilos fagocitam células opsonizadas, seguida de degranulação e morte e também através dos recém-descobertos *Neutrophils Extracellular Traps* (NETs) que são formas especializadas de neutrófilos com fibras de cromatina cobertas com serina proteases, proteínas antimicrobianas e outros constituintes que capturam e matam *C. albicans* (Netea et al., 2008; Moyes, Naglik, 2011). Por outro lado, *C. albicans* produz enzimas como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase e tioredoxina contra as espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos (Wilson D et al., 2009).

Mayer et al. (2012b) identificaram e descreveram a função do gene para uma nova proteína de choque térmico pequena de *C. albicans* nomeada *HSP21*. As proteínas de choque térmico (Hsps) agem em condições de estresse celular como elevação da temperatura, estresse oxidativo ou falta de nutrientes, os quais podem resultar em

desnaturação proteica e agregação não específica, levando a morte celular. O estudo da cepa mutante *hsp21Δ/Δ* revelou sua importância na evasão do sistema imune, adaptação ao estresse térmico e oxidativo, bem como patogenicidade. As cepas mutantes foram mais suscetíveis à morte por neutrófilos, causaram menos danos às células epiteliais e endoteliais *in vitro* e foram significativamente menos patogênicas para o modelo de ovo embrionado de galinha e durante candidemia induzida em camundongo.

Os macrófagos reconhecem *C. albicans* opsonizada e não opsonizada por seus receptores TLR2, TLR4 e dectina-1 resultando em resposta inflamatória como secreção de TNF α , produção de superóxido e aumento da atividade fungicida (Filler, 2006). Gantner et al. (2005) observaram que o macrófago só se liga aos blastoconídeos e tubos germinativos, pois estas estruturas apresentam cicatriz de brotamento de nascimento expondo β -glucana que é então reconhecida pela dectina-1. Esta ligação resulta na produção de TNF α , ácido araquidônico e aumento da expressão de COX2 (Filler, 2006). TNF α é liberado no sítio de fagocitose estimulando a membrana a fazer fagocitose matando a célula por processos oxidativos e não-oxidativos (Netea et al., 2008). Macrófagos têm dificuldade em destruir blastoconídeos *in vitro*, pois estes inibem a fusão dos lisossomos aos fagossomos e também podem produzir hifas que penetram na membrana da célula matando o fagócito. Além disso, o aumento da expressão do gene *SOD5* pelo fungo, que codifica uma superóxido dismutase extracelular, contra-ataca a queima oxidativa das células fagocíticas sobrevivendo ao ataque de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Filler, 2006; Seider et al., 2010; Jacobsen et al., 2012).

Luo et al. (2010) demonstraram que a proteína da parede celular Hyr1p expressa em hifas de *C. albicans* mediou à resistência a morte por neutrófilos humanos e neutrófilos e macrófagos derivados de células de leucemia promielocítica humana (HL-60) *in vitro*, o qual se

sugeriu que seja possível que Hyr1p contribua para a resistência a morte por fagócitos prevenindo o contato com estas células ou interferindo nos mecanismos de morte oxidativos ou não-oxidativos. Por ser expresso na superfície das hifas e, então, exposto ao sistema imune, os autores também avaliaram seu potencial como candidato a vacina. A vacinação com Hyr1p recombinante significativamente protegeu camundongos contra candidose disseminada hematogenicamente e o tratamento com anti-rHyr1p policlonal aumentou a atividade dos neutrófilos de camundongos por agir diretamente neutralizando os efeitos *in vitro* de rHyr1p.

Além dos mecanismos celulares inatos de defesa, o hospedeiro também conta com a participação do sistema complemento para destruir *C. albicans*. O micro-organismo pode ativar as três vias do sistema complemento: via alternativa, via clássica e via da lectina, culminando com a deposição do fragmento C3b e formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Em contrapartida, Gropp et al. (2009) relataram que Sap1p-3 degradaram os componentes C3b, C4b e C5, inibiram as vias alternativas e clássicas e conseqüentemente a formação do MAC, reduziram a deposição de C3b e geração de C5a. Além disso, também foi observado que a quebra do fragmento C3b ocorreu devido ao recrutamento do fator H e fator I fixados a superfície de *C. albicans*.

A resposta imune específica contra *C. albicans* começa com o reconhecimento do micro-organismo pelas células dendríticas através dos receptores de manose (MR), DC-SIGN e dectina-1 que reconhecem leveduras e dectina-2, CR3 e FcγRII e FcγRIII que reconhecem hifas, ou seja, promovendo uma resposta específica de acordo com a morfologia do fungo (Netea et al., 2008). Em adição, a proteína manosilada (MP65), por exemplo, também pode ser capturada pelas células dendríticas, processada e apresentada para o linfócito T CD4 no linfonodo local iniciando a imunidade adaptativa, a qual leva a formação de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e célula T supressora (Pietrella et

al., 2010; Naglik et al., 2011). Linfócitos Th1 protegem contra infecção bucal e gastrointestinal secretando IFN- γ e IL-2 que induzem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Molero et al., 1998; Naglik et al., 2011). Linfócitos Th17 secretam IL-17A, IL-17F e IL-22 que estão associadas à defesa da mucosa contra candidose bucal. IL-17A e IL-17F agem sobre células epiteliais e neutrófilos induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos, metaloproteases e outros mediadores inflamatórios e também podem aumentar ou diminuir a carga de *C. albicans* através de várias vias e direcionar a resposta por IgA que inibe a aderência de *C. albicans* às células epiteliais, fazendo uma ponte entre as respostas adaptativas e inatas. IL-22 tem efeito similar a IL-17 sobre células epiteliais, mas também pode controlar o crescimento de leveduras e a integridade da camada epitelial durante a infecção (Naglik et al., 2011; Moyes, Naglik, 2011).

2.5 Modelos experimentais de candidose

Para compreensão da etiopatologia da candidose, controle da doença, desenvolvimento de novos antifúngicos e diagnósticos são requeridos estudos de interação patógeno - hospedeiro em modelos experimentais *in vivo*.

O modelo experimental mais simples é o epitélio bucal humano reconstituído (*Reconstitued Human Oral Epithelium*- RHE) formado por células em multicamada que simulam o que acontece no epitélio de modelos mais complexos por reter certo grau de defesa inata pelas células epiteliais. As multicamadas são formadas sobre membrana de policarbonato (Jayatilake et al., 2010). Zakikhany et al. (2007) utilizaram o modelo RHE para estudar o comportamento de cepas mutantes de *C. albicans* durante o curso da infecção analisado por

métodos histológicos, microscópicos, celular e molecular, relatando que houve formação de hifa e subsequente aderência ao epitélio nas primeiras 3 h. A invasão ocorreu nas próximas 12 h levando ao moderado dano tecidual e em 24 h foi observada destruição severa dos tecidos. Os autores também observaram que o gene *EED1* ainda desconhecido foi superregulado na infecção em RHE, o qual foi essencial para a manutenção da extensão da hifa.

O uso de modelo mamífero, em particular camundongo, é considerado padrão ouro para o estudo da interação patógeno-hospedeiro (Jacobsen et al., 2011). Este animal apresenta como vantagens baixo custo, sistema imune mais semelhante ao do ser humano, é facilmente obtido em grande número, disponibilidade, existência de linhagens geneticamente modificadas, não possui *Candida* spp. como constituinte da microbiota bucal e resposta imune secundária contra este organismo (Samaranayake YH, Samaranayake LP, 2001; Naglik et al., 2008). Concomitantemente, o rato também é um modelo útil para o estudo de candidose bucal experimental, apesar de poder apresentar leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal (Naglik et al., 2008). Porém para o estabelecimento de infecção persistente deve-se interferir na fisiologia dos animais provocando mudanças na ecologia da cavidade bucal com o uso de antibióticos e indução de sialoadenectomia para ratos e indução de imunossupressão para camundongos (Totti et al., 2004; Green et al., 2006; Junqueira et al., 2009; Costa et al., 2013b).

Takakura et al. (2003) desenvolveram um modelo de candidose bucal experimental através da indução de imunossupressão e administração de tetraciclina que inspirou diversos trabalhos com o intuito de estudar o processo da doença e testar novas terapias (Kamagata-Kiyoura et al., 2004; Takakura et al., 2004; Ishibashi et al., 2007; Hisajima et al., 2008; Yanagi et al., 2008; Taguchi et al., 2010; Costa et al., 2012a; Hayama et al., 2012). Costa et al. (2012a) utilizaram o modelo proposto por Takakura et al. (2003) para avaliar a ação da terapia fotodinâmica

mediada por eritrosina e LED verde sobre a candidose bucal, obtendo redução da viabilidade das células e ausência de efeitos adversos sobre os tecidos. O modelo foi útil para análises de viabilidade das leveduras, análise macroscópica e histológica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Hayama et al. (2012) utilizaram o mesmo modelo para avaliar a combinação do composto RC21v3, inibidor da bomba de efluxo Cdr1p, com fluconazol e itraconazol para tratamento de candidose bucal causada por cepa de *C. albicans* resistente aos azóis, demonstrando que houve efeito sinérgico entre o inibidor e os antifúngicos levando a redução das lesões macroscópicas e viabilidade das células.

A necessidade de estudar a patogenicidade de infecções fúngicas e testar novos compostos antifúngicos tem despertado o interesse por modelos de hospedeiros invertebrados, pois estes não necessitam de aprovação ética, são relativamente simples e baratos, podem ser usados em grande escala e apresentam correlação entre os fatores de virulência requeridos para causar doença em camundongos e matar *Galleria mellonella*, por exemplo, formando uma ponte entre estudos *in vitro* e em mamíferos (Mylonakis, 2008).

Borghi et al. (2014) avaliaram o potencial patogênico de cepas de *C. albicans* produtoras e não produtoras de biofilme no modelo invertebrado *G. mellonella* no estágio larval. Foi observado que a sobrevivência da larva foi dependente do número de células fúngicas injetadas, sendo a concentração de 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC)/ larva o resultado mais significativo. O grupo infectado por cepas produtoras de biofilme apresentaram significativa redução de sobrevivência. Os autores confirmaram que o modelo de infecção em *G. mellonella* mostrou-se uma ferramenta útil para análise da patogenicidade de cepas de *C. albicans* clinicamente isoladas com diferentes habilidades de formação de biofilme.

Caenorhabditis elegans é um verme de vida livre que apresenta vantagens para o *screening* de novos compostos antimicrobianos e simultânea avaliação de toxicidade (Okoli et al., 2009; Desalermos et al., 2012). Okoli et al. (2009) verificaram a sobrevivência de *C. elegans* infectado por *C. albicans* frente a 3228 compostos, dos quais 19 destes conferiram aumento da sobrevivência de *C. elegans*. Este teste também possibilitou a avaliação da toxicidade de diferentes concentrações dos compostos.

O uso de *G. mellonella* apresenta como vantagens em relação ao *C. elegans* a indução de candidose usando concentração de inóculo conhecida, pois para *G. mellonella* o inóculo é injetado e para *C. elegans* ele deve ser ingerido, incubação de 25-37 °C e fácil manutenção em qualquer laboratório (Fuchs et al., 2010; Desalermo et al., 2012).

G. mellonella apresenta algumas desvantagens, pois em camundongo a infecção sistêmica leva a rápida indução de várias citocinas, infiltração neutrofílica nos órgãos afetados e finalmente choque séptico progressivo. Esta imunopatologia é a principal diferença entre modelos murinos e insetos, visto que os modelos de insetos produzem resposta imune defensiva à infecção por *C. albicans* baseadas em células fagocíticas e superregulação de peptídeos antimicrobianos, mas não desenvolvem choque séptico (Jacobsen et al., 2011). Uma maneira possível de fazer uma ponte entre o hospedeiro invertebrado e mamífero é usar ovo embrionado de galinha como uma alternativa de modelo de infecção (Jacobsen et al., 2010). A diferença primordial entre o modelo mamífero e o ovo embrionado de galinha é que o primeiro é imunocompetente e o ovo pode ser considerado imunocomprometido, devido à incompleta maturação do sistema imune (Jacobsen et al., 2010, 2011).

A inoculação de micro-organismos no ovo embrionado de galinha é normalmente feita na membrana cório-alantóide (MCA) formada por uma estrutura multicelular com as três camadas embrionárias:

ectoderma, mesoderma e endoderma (Jayatilake et al., 2010). Após a fertilização do ovo de galinha, os capilares aparecem dentro de 48 h e então ocorre o rápido crescimento do saco vitelínico nos próximos 6 - 8 dias. A MCA desenvolve-se nos primeiros 11 dias, representando a primeira metade do período de 21 dias do ovo de gestação, substituindo o saco vitelínico na realização das funções excretoras e respiratórias. Até 10 dias, o suprimento de oxigênio é feito quase que exclusivamente via MCA. As proteínas de coagulação do sangue, fibrinogênio e protrombina não aparecem até 12 ou 13 dias, moléculas do complemento e linfócitos verdadeiros não aparecem até o dia 17 e resposta de células T não ocorrem até o dia 20. A resposta inflamatória da MCA é limitada aos pseudoeosinófilos. Não existem células equivalentes ao macrófago humano ou linfócito ou anticorpos na MCA. Os ovos fertilizados com 7-10 dias são utilizados para os testes de patogenicidade, sendo que nesta fase apresentam sistema imune imaturo (Gow et al., 2003).

Gow et al. (2003) utilizaram o modelo de ovo embrionado de galinha para analisar a expressão de genes e patogenicidade. Os ovos foram inoculados com suspensão de *C. albicans* sobre MCA e também foi colocado um disco embebido com a suspensão. Para a cepa selvagem foi observada formação de tubo germinativo e leveduras após 2 h de inoculação na camada externa da MCA. As hifas penetraram a MCA e também os vasos sanguíneos, mas não foram encontradas no embrião. Os embriões morreram após 12-24 h quando inoculados com suspensões de 10^5 a 10^8 células/mL. Cem por cento dos ovos inoculados com 10^5 células/mL de cepas mutantes *efg1Δ/cph1Δ* sobreviveram após 24 h, enquanto que aqueles infectados com a cepa selvagem apresentaram taxa de sobrevivência de 50%. Os ovos infectados com cepas mutantes únicas para *SAP1-3* e mutantes triplos para *SAP1-3* e *SAP4-6* na concentração de 10^7 células por ovo não apresentaram redução da taxa de mortalidade. Foi observada expressão dos genes *SAP1*, *SAP2*, *SAP4* e *SAP8*, porém a expressão destes genes não foi decisiva para a

patogênese da cepa, ou seja, o modelo não foi afetado. O modelo demonstrou ser útil para ser usado anteriormente aos testes de virulência em modelo murino ou como modelo alternativo.

O modelo de ovo embrionado de galinha também foi utilizado por Jacobsen et al. (2010) para avaliação de cepas de *Aspergillus fumigatus* inoculados na MCA e intraperitoneal. Os ovos foram utilizados no tempo de desenvolvimento de 10 dias, pois são mais tolerantes a manipulação da casca. A dose de inoculo de conídios de 10^4 a 10^7 / ovo foram 100% letais dentro de 2 a 4 dias. Na membrana foi observado micélio a partir do dia 2 e esporulação a partir dos dias 4 e 6 de infecção, também foram observadas alterações nos vasos sanguíneos. O acúmulo de resposta imune local nos embriões nos estágios tardios do desenvolvimento coincidiu com a redução da mortalidade após infecção com *A. fumigatus*. Os autores ressaltaram que a inoculação na MCA apresenta vantagens como: característica translúcida consistindo em duas camadas epiteliais separadas por tecido conectivo frouxo, alta vascularização para mediar o transporte de oxigênio da albumina e saco vitelínico para o embrião e trocas gasosas durante os dois últimos terços de desenvolvimento, possibilidade de aplicação asséptica da solução e manipulação bem tolerada pelo embrião.

O mesmo grupo avaliou a patogenicidade de 15 cepas mutantes de *C. albicans* em ovo embrionado de galinha inoculadas na MCA, mostrando que 10 destas cepas apresentaram virulência atenuada para o modelo e induziram menos citocinas inflamatórias que a cepa selvagem. A dose letal₁₀₀ (LD) para a cepa selvagem de *C. albicans* SC5314 foi de 10^7 células/mL e a LD₅₀ foi de 10^5 células/mL. Foi observada correlação para a idade na infecção e sobrevivência, sendo que a infecção no ovo de 8 dias de desenvolvimento levou a rápida mortalidade em relação há 10 dias e resistência à infecção com 12 dias. Após a invasão da MCA houve forte produção de citocinas pró-inflamatórias e invasão dos vasos sanguíneos, porém a disseminação

para os órgãos internos foi rara, sugerindo que a imunopatologia seja responsável pela patogênese. O padrão de produção de citocinas foi semelhante ao modelo murino, exceto pelo efeito de IL-10 que apresentou efeito protetor no modelo de ovo embrionado. Além disso, foi observada presença de granuloma nas lesões, enquanto que no modelo murino a infecção por *Candida* leva a formação de abscessos, pois em aves a infecção é combatida por heterófilos (homólogo de neutrófilos nas aves) que são cercados por células epitelióides e fibroblastos, ao invés da infiltração de neutrófilos como ocorre para os mamíferos. Este modelo mostrou ser útil para o *screening* de virulência de cepas mutantes de *C. albicans* (Jacobsen et al., 2011).

C. albicans possui 6524 genes dos quais aproximadamente 73% são genes com função desconhecida que despertam o interesse para o estudo destes genes em modelos de biofilmes e modelos de infecção para análise extensiva de suas funções a fim de tentar esclarecer os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro que governam o comportamento deste patógeno humano.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) analisar a função de 34 genes de *C. albicans* com função desconhecida quanto à formação de biofilme;
- b) selecionar 9 cepas mutantes que apresentaram fenótipo alterado para formação de biofilmes e construir as cepas complementadas para estes genes;
- c) avaliar as cepas mutantes e complementadas na presença de agentes estressantes, crescimento sob limitação de nutrientes, ensaios de filamentação e interação com células epiteliais;
- d) selecionar de acordo com os resultados obtidos, uma cepa mutante para análise de gene/proteína correspondente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Construção das cepas mutantes de *Candida albicans*

A cepa parental e as cepas mutantes foram cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Hube chefe do Departamento de Mecanismos de Patogenicidade Microbiana do Hans-Knöll-Institute (HKI) associado a Friedrich-Schiller-University (FSU), em Jena, Alemanha.

Mutantes homozigotos nulos foram gerados usando a técnica de rompimento do gene baseado na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) (Gola et al., 2003). Inicialmente foi utilizada a cepa parental BWP17 auxotrófica para Arginina, Histidina e Uridina (Wilson RB et al., 1999). A completa sequência de leitura aberta (*Open reading frame* - ORFs) de ambos os alelos dos genes de interesse foram substituídos pelos cassetes ARG4 e HIS1 flanqueados por áreas de preservação permanente de 100 pares de bases homólogas a região do alvo. Duas transformações sequenciais usando o método modificado de acetato de lítio foram realizadas para ambos os cassetes gerados por PCR (Walther, Wendland, 2003) (Figura 1). As cepas mutantes de *C. albicans* construídas e cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Hube e as cepas construídas neste estudo estão listadas no Quadro 1.

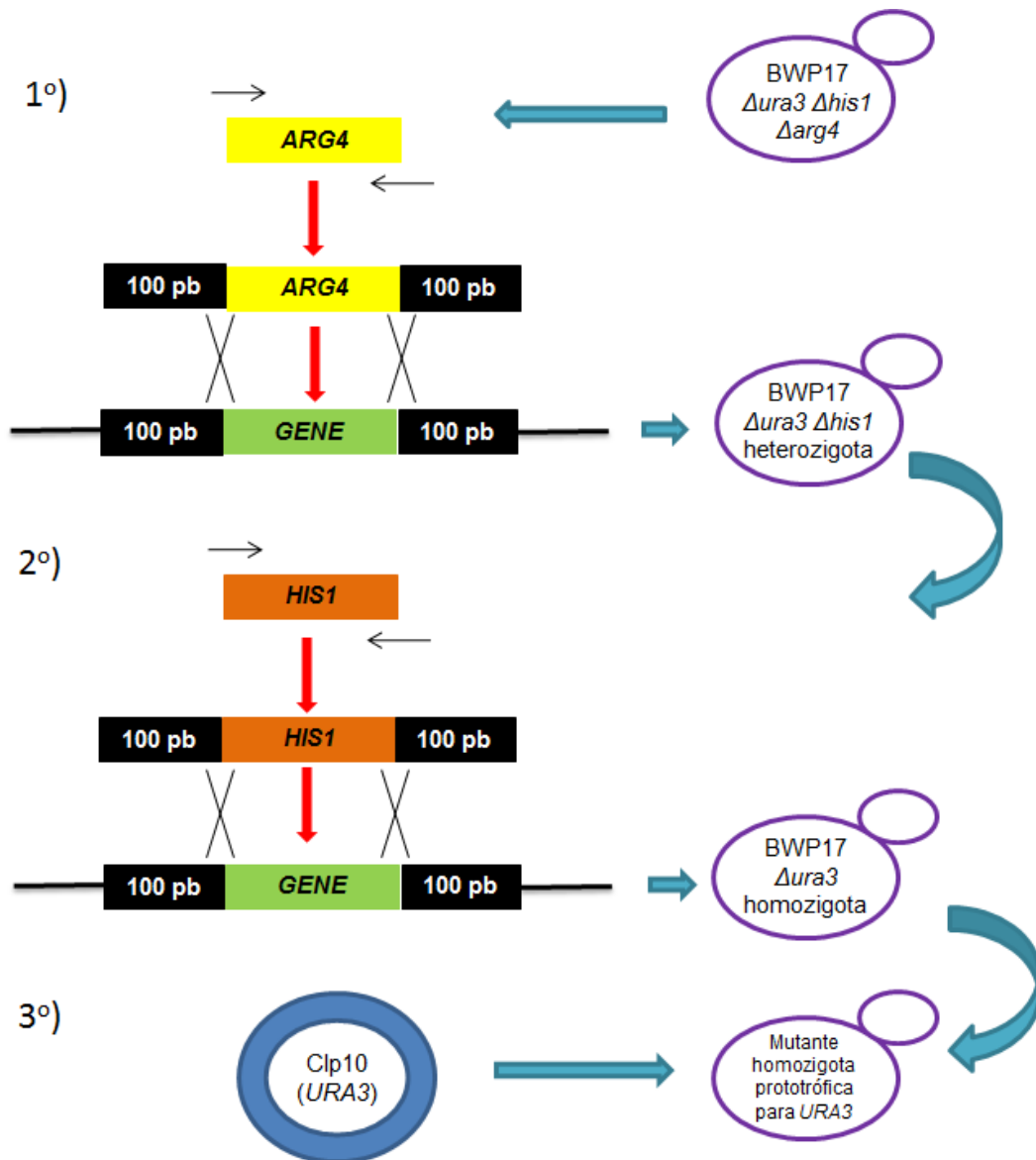


Figura 1- Esquema de construção das cepas mutantes. 1º passo: construção do cassete *ARG4* flanqueado por áreas de preservação permanente de 100 pares de bases homólogas a região alvo e transformação na cepa parental BWP17 auxotrófica para os genes *ARG4*, *HIS1* e *URA3* gerando o mutante heterozigoto. 2º passo: construção do cassete *HIS1* e transformação na cepa mutante heterozigota gerando a cepa mutante homozigota auxotrófica para o gene *URA3*. 3º passo: transformação da cepa mutante homozigota auxotrófica para o gene *URA3* com o plasmídeo Clp10 gerando a cepa mutante homozigota prototrófica para o gene *URA3*.

Quadro 1- Cepas de *C. albicans* usadas no estudo. Cepas selvagem, parental e mutantes construídas e cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Hube e as cepas complementadas construídas neste estudo

(continua)

| Identificação das cepas | Genótipos | Referências |
|---------------------------|--|-------------------------|
| SC5314 | Cepa selvagem de <i>C. albicans</i> | Gillium et al. (1984) |
| BWP17 + Clp30 | <i>ura3::λimm434/ura3::λimm434</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG</i> + Clp30 | Zakikhany et al. (2007) |
| M1552 | ⁺⁺ <i>orf19.1150Δ::ARG4/orf19.1150Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1490 | <i>orf19.2204Δ::ARG4/orf19.2204Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1405 | <i>orf19.2959.1Δ::ARG4/orf19.2959.1Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1554 (<i>mrv8Δ/Δ</i>) | <i>orf19.3908Δ::ARG4/orf19.3908Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1555 (<i>mrv1Δ/Δ</i>) | <i>orf19.4691Δ::ARG4/orf19.4691Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1486 | <i>orf19.4970Δ::ARG4/orf19.4970Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1556 (<i>dot5Δ/Δ</i>) | <i>orf19.5417Δ::ARG4/orf19.5417Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1532 (<i>bn4Δ/Δ</i>) | <i>orf19.5443Δ::ARG4/orf19.5443Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1558 | <i>orf19.5848Δ::ARG4/orf19.5848Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1535 | <i>orf19.5857Δ::ARG4/orf19.5857Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1493 | <i>orf19.6492Δ::ARG4/orf19.6492Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1544 | <i>orf19.6501Δ::ARG4/orf19.6501Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1408 (<i>dur31Δ/Δ</i>) | <i>orf19.6656Δ::ARG4/orf19.6656Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Mayer et al. (2012a) |
| M1557 | <i>orf19.6847Δ::ARG4/orf19.6847Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1496 | <i>orf19.7170Δ::ARG4/orf19.7170Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1393 | <i>orf19.7670Δ::ARG4/orf19.7670Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1402 (<i>hsp21Δ/Δ</i>) | <i>orf19.822Δ::ARG4/orf19.822Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Mayer et al. (2012b) |
| M1620 | <i>orf19.823Δ::ARG4/orf19.823Δ::HIS1</i> + Clp10 (URA3) | Este estudo |
| M1378 | <i>orf19.988Δ::HIS1/orf19.988Δ::ARG4</i> + Clp10(URA3) | Este estudo |

Quadro 1- Cepas de *C. albicans* usadas no estudo. Cepas selvagem, parental e mutantes construídas e cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Hube e as cepas complementadas construídas neste estudo

(conclusão)

| Identificação das cepas | Genótipos | Referências |
|------------------------------|--|-------------|
| M1541 (<i>pga16Δ/Δ</i>) | <i>orf19.8468Δ::ARG4/orf19.8468Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1561 | <i>orf19.6534Δ::ARG/orf19.6534Δ::HIS</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1562 | <i>orf19.6688Δ::ARG/orf19.6688Δ::HIS</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1374 | <i>orf19.1964Δ::HIS1 /orf19.1964Δ::ARG4</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1479 | <i>orf19.3737Δ::HIS1/orf19.3737Δ::ARG4</i> +Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1481 (<i>gtr1Δ/Δ</i>) | <i>orf19.3617Δ::HIS1/orf19.3617Δ::ARG4</i> +Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1478 | <i>orf19.2515Δ::HIS1/orf19.2515Δ::ARG4</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1382 | <i>orf19.1353Δ::ARG4 /orf19.1353Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1386 | <i>orf19.6200Δ::ARG4 /orf19.6200Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1482 | <i>orf19.2724Δ::HIS1/orf19.2724Δ::ARG4</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1377 | <i>orf19.4518Δ::HIS /orf19.4518Δ::ARG4</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1389 | <i>orf19.7504Δ::ARG4 /orf19.7504Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1601 (<i>pga32Δ/Δ</i>) | <i>orf19.6784Δ::ARG/orf19.6784Δ::HIS</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1480 | <i>orf19.5514Δ::HIS1/orf19.5514Δ::ARG4</i> + Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M1627 | [<i>orf19.3375/orf19.3376/orf19.3378</i>] <i>Δ::HIS /</i> [<i>orf19.3375/orf19.3376/orf19.3378</i>] <i>Δ::ARG</i> +Clp10 (<i>URA3</i>) | Este estudo |
| M2139 | <i>orf19.6847Δ::ARG4/orf19.6847Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>ORF19.6847, URA3</i>) | Este estudo |
| M2137 | <i>orf19.3908Δ::ARG4/orf19.3908Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>ORF19.3908, URA3</i>) | Este estudo |
| M2141 | <i>orf19.823Δ::ARG4/orf19.823Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>ORF19.823, URA3</i>) | Este estudo |
| M2144 | <i>orf19.7170Δ::ARG4/orf19.7170Δ::HIS1</i> + Clp10 (<i>ORF19.7170, URA3</i>) | Este estudo |

++ORF: Open reading frame (sequência de leitura aberta)

Abreviações: Mrv8 (*MaRVel domain*), Mrv1 (*MaRVel domain*), Dot5 (*Disruptor of Telomeric Silencing*), Bna4 (*Biosynthesis of Nicotinic Acid*), Dur31 (*Degradation of URea*), Hsp21 (*small Heat Shock Protein*), Pga16 (*Predicted Gpi-Anchored*), Grt1 (*GTP binding protein Resemblance*), Pga32 (*Predicted Gpi-Anchored*)

As cepas foram mantidas em caldo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD - Himedia) suplementado com 20% de glicerol em microtubos e armazenadas em freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O projeto foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Bernhard Hube, chefe do Departamento de Mecanismos de Patogenicidade Microbiana, do Instituto Hans Knoell (HKI), em Jena, Alemanha. Durante todo o ano de 2013 fiz doutorado sanduíche no laboratório do Prof. Hube. O fluxograma dos experimentos realizados durante o doutorado no Brasil e doutorado sanduíche na Alemanha estão apresentados na Figura 2.

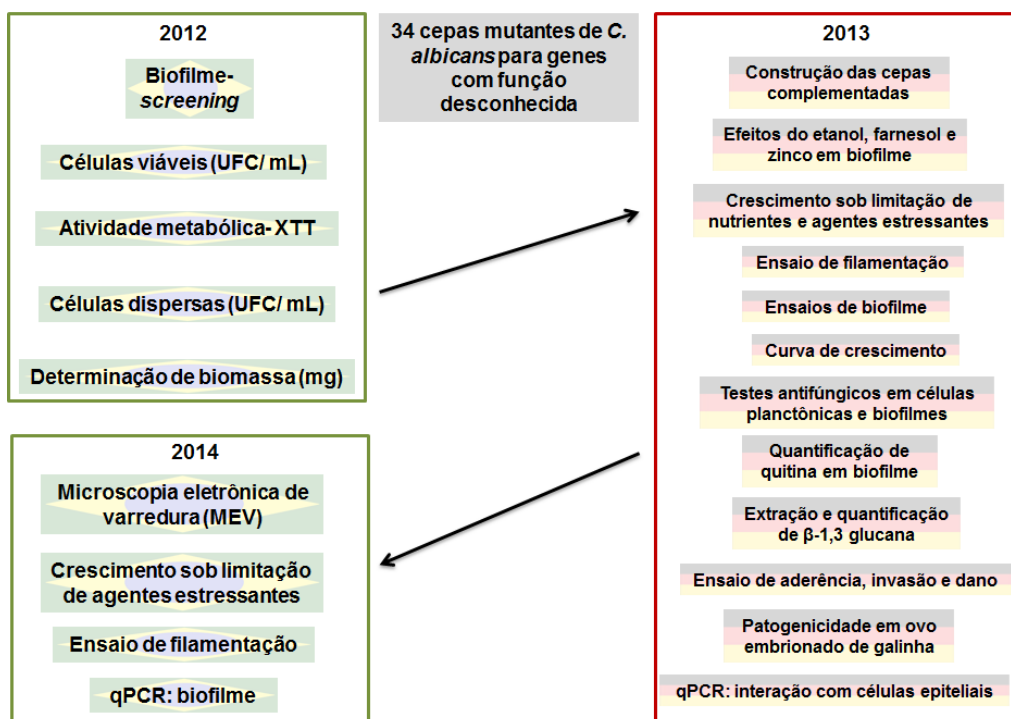


Figura 2- Fluxograma dos experimentos realizados durante o doutorado no Brasil e doutorado sanduíche na Alemanha. Em 2012, o Prof. Dr. Bernhard Hube enviou 34 cepas mutantes de *C. albicans* para genes com função desconhecida para o *screening* em biofilme no ICT/UNESP- Brasil. Após o *screening*, foram selecionadas 9 cepas mutantes que apresentaram fenótipo alterado. Em 2013, no doutorado sanduíche no HKI- Alemanha, foram construídas as cepas complementadas e a seguir foram feitas as análises extensivas dos genes de interesse quanto a formação de biofilme, características biológicas e interação patógeno hospedeiro. Em 2014, no ICT/UNESP-Brasil, foram feitos outros testes complementadas a fim de descrever as funções dos genes de interesse.

4.2 Desenvolvimento do biofilme

A cepa parental de *C. albicans* BWP17 contendo o plasmídio Clp30 foi usada como controle em todos os experimentos.

Para crescimento do biofilme foi utilizada a metodologia descrita por Seneviratne et al. (2009) com modificações. Cultura das cepas de *C. albicans* de 24 h a 37 °C em ágar Sabouraud dextrose (Himedia) foram semeadas em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB - Himedia) suplementado com glicose na concentração de 50 mM. Após o período de incubação de 18 a 20 h a 37 °C, as leveduras foram centrifugadas a 358 xg por 10 min, lavadas duas vezes com salina tampão fosfato (PBS, pH 7,4), ressuspensas em YNB suplementado com 100 mM de glicose e padronizadas na concentração de 10⁷ células/mL em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal) utilizando comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica (DO) de 0,381.

O biofilme foi formado no fundo do poço de placas de poliestireno de microtitulação de 96 poços de fundo plano (TPP). Foi adicionado 250 µL das suspensões previamente padronizadas nos poços e a placa foi incubada em agitação de 75 rpm (Quimis) a 37 °C/ 1,5 h para fase inicial de aderência. Decorrido este período, os poços foram lavados com 250 µL de PBS, para a remoção das células não aderidas. A seguir, foi adicionado 250 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e a placa incubada a 37 °C/48 h em agitação de 75 rpm. O caldo foi trocado a cada 24 h. Os biofilmes foram avaliados quanto à viabilidade das células (UFC/mL), atividade metabólica (ensaio colorimétrico- 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, sal sódico (XTT)) e quantificação de células dispersas do biofilme em diferentes intervalos de tempo (1,5, 4, 12, 24 e 48 h). No intervalo de tempo de 1,5 h foram realizadas todas as análises acima, exceto quantificação de células dispersas do biofilme.

4.2.1 Quantificação de células viáveis

Os biofilmes de diferentes tempos de desenvolvimento foram lavados com 250 μL de PBS. A seguir, foi adicionado 250 μL de PBS e os biofilmes foram rompidos por homogeneização dos poços por 30 s em homogeneizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) com amplificação de 25%. Foram feitas diluições seriadas das soluções dos poços contendo as células do biofilme em suspensão e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37 °C/48 h. Após o período de incubação, foram determinadas as UFC/mL e os valores transformados em logaritmo. Este teste foi realizado em triplicata para cada cepa em duas ocasiões diferentes.

4.2.2 Atividade metabólica (XTT)

O ensaio colorimétrico com XTT foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Jin et al. (2003). Resumidamente, XTT (Aldrich Chemical Co.) foi dissolvido em PBS na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 μm (TPP) e estocada a -70 °C. Solução de menadiona (0,4 mM) (Aldrich Chemical Co.) foi preparada e filtrada imediatamente antes dos ensaios. Antes dos ensaios, a solução de XTT foi descongelada e misturada à solução de menadiona na proporção de 20:1.

Os biofilmes foram lavados duas vezes com 250 μL de PBS. Então, 197,5 μL de PBS, 50 μL de XTT e 2,5 μL de menadiona foram adicionados a cada poço pré-lavado. Após o período de incubação no escuro a 37 °C/ 3 h, 100 μL da solução foi transferida para um novo

poço e a mudança colorimétrica foi medida usando um leitor de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm. Este teste foi realizado em triplicata para cada cepa em duas ocasiões diferentes.

4.2.3 Quantificação de células despreendidas do biofilme

Após os diferentes períodos de desenvolvimento do biofilme, a placa foi agitada em agitador orbital (Solab) por 5 min. Foram feitas diluições seriadas do sobrenadante dos poços e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37 °C/48 h. Após o período de incubação, foram determinadas as UFC/mL e os valores transformados em logaritmo. Este teste foi realizado em triplicata para cada cepa em duas ocasiões diferentes.

4.3 Análise da biomassa (peso seco)

A metodologia para formação de biofilme foi baseada no estudo de Nobile e Mitchell (2005) e Junqueira et al. (2011). Os biofilmes foram formados sobre discos de poliestireno de aproximadamente 8 x 2 mm de diâmetro. Foram utilizados 3 corpos de prova para cada cepa a ser testada e o teste foi realizado em duas ocasiões diferentes. Os corpos de prova foram pesados individualmente em balança analítica digital e esterilizados por radiação gama a 20 kGy (Cobalto 60) por 6 h. Os corpos de prova foram pré-tratados com soro fetal bovino (SFB) (Aldrich Chemical Co.). Para isso, os corpos de prova foram colocados em placas de 24 poços contendo 2 mL de SFB e incubados a 37 °C/24 h em agitação de 75 rpm. Após período de incubação dos corpos de prova em

SFB nas placas de 24 poços, o soro foi aspirado e os corpos de prova foram lavados com 2 mL de PBS.

As cepas foram cultivadas em caldo YPD (Himedia) a 37 °C/24 h. A seguir, foram preparadas suspensões padronizadas de cada cepa em Spider *medium* (caldo nutriente a 1%, D-manitol a 1% e fosfato de potássio dibásico a 0,4%, pH 7,2), ou YNB (Himedia) suplementado com 100 mM de glicose ou meio RPMI-1640 (Invitrogen) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio tamponado com MOPS a 0,165 M, pH 7,0 por meio de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e densidade óptica de 0,5.

Nos discos pré- incubados em SFB foram adicionados 2 mL da suspensão padronizada de *C. albicans* em cada poço da placa. As placas foram incubadas a 37 °C/ 1,5 h em agitação de 75 rpm para aderência dos micro-organismos aos corpos de prova. Posteriormente à incubação, os corpos de prova foram transferidos para poços contendo 2 mL de PBS para remoção das leveduras não aderidas. A seguir, os corpos de prova foram colocados em poços contendo 2 mL de Spider *medium*, ou YNB com 100 mM de glicose ou RPMI-MOPS e foram incubados a 37 °C/48 ou 60 h, em agitação de 75 rpm, para formação do biofilme.

Decorrido o tempo de incubação, os corpos de prova foram transferidos para poços vazios e deixados em temperatura ambiente por 48 h para secagem dos mesmos. Então, os corpos de prova foram pesados novamente e a avaliação quantitativa do peso seco do biofilme foi realizada pela subtração do peso do corpo de prova inicial do seu peso final. Os biofilmes também foram fotografados para análise visual.

4.4 Construção das cepas complementadas de *Candida albicans*

As 34 cepas mutantes de *C. albicans* cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Hube foram analisadas nos ensaios de biofilme. Foram selecionados os mutantes que mostraram fenótipo alterado significativo para os biofilmes e os genes deletados nestas cepas selecionadas foram os genes de interesse.

As ORFs dos genes de interesse foram amplificadas a partir das posições de no mínimo -180 a +120 pares de bases do DNA genômico de *C. albicans* SC5314 com o kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes). A seguir, os produtos das reações de PCR foram purificados com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen) e clonados dentro do vetor Pcr2.1TOPO. Após digestão dos plasmídios resultantes com as enzimas de restrição Sall/MluI, os insertos foram extraídos em gel usando o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), purificados, digeridos com a enzima de restrição PstI para destruição de qualquer vestígio de vetor pCR®2.1-TOPO, purificados novamente, e, então, subclonados dentro do plasmídio Clp10. Para isto, 0,17 µg/µL do plasmídio Clp10 foi digerido também com Sall/MluI e a enzima de restrição foi então inativada por aquecimento a 65 °C/20 min. Clp10 foi defosforilado com fosfatase alcalina intestinal de bezerro (New England BioLabs) e extraído em gel. O inserto e o vetor Clp10 foram então ligados por 30 min a 25 °C usando o kit Quick ligation (New England Biolabs). Cinco µL do produto de ligação foi usado para a transformação de *Escherichia coli* DH5α e os clones positivos foram selecionados em placas de agar LB suplementadas com 50 µg/mL de ampicilina. O plasmídio Clp10 carregando o gene foi re-isolado usando o kit midiprep (Qiagen) e confirmado por digestões controles. O plasmídio final foi então digerido com NcoI ou StuI antes da transformação dentro da cepa de *C. albicans* auxotrófica para uridina. Os controles positivos foram

selecionados em placas de agar SD (2% de glicose, 0,17% de YNB, 0,5% de sulfato de amônio, 2% de ágar) sem aminoácidos. A integração correta foi verificada por PCR. Os *primers* usados neste estudo estão apresentados no Quadro 2. Os mapas dos plasmídios utilizados para construção das cepas complementadas estão apresentados na Figura 3.

Quadro 2- *Primers* usados neste estudo

(*continua*)

| Primer | Sequencia | Referência |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| MRV8-Rec-F | GTCGACAGTAATCTATACATTACACAA CC | Este estudo |
| MRV8-Rec-R | ACGCGTATACCATCAGGGATGTTGC | Este estudo |
| MRV8-Int-F1 | GTTGGGCTATTGGCGTTATTTGTG | Este estudo |
| orf19.6847-Rec-F | GTCGACTTATATTCAACAACACTAGG | Este estudo |
| orf19.6847-Rec-R | ACGCGTAAAGTTGAGGATGAAGC | Este estudo |
| orf19.6857-int-F1 | ACAGCCAATGCCATCAGATGTTGC | Este estudo |
| orf19.823-Rec-F | GTCGACAGAATGATGTTTTTTTG | Este estudo |
| orf19.823-Rec-R | ACGCGTATTTTTATGACCAATATTGG | Este estudo |
| orf19.823-Int-F1 | ACTAGTATTGATTTAGGTACTAGC | Este estudo |
| orf19.7170-Rec-F | GTCGACTCTTTCTGAATAAGTTTGC | Este estudo |
| orf19.7170-Rec-R | ACGCGTATAGTAGGAAGAATGC | Este estudo |
| orf19.7170-Int-F1 | CCAACCACCCCTTGTGACACTCCTCC A | Este estudo |
| orf19.7504-Rec-F | GTCGACGAGCTTGAAAACAAATCG | Este estudo |
| orf19.7504-Rec-R | ACGCGTGTTTGTTTATTGATAAAGG | Este estudo |
| DOT5-Rec-F | GTCGACTCGGTGTTATTGTCTTTTTTCG | Este estudo |
| DOT5-Rec-R | ACGCGTTAAACTAGACACCATGC | Este estudo |
| RPF-F1 | GAGCAGTGACACACACACATCTTG | Wilson D et al. (2014) |
| RPF1-R1 | CGCCAAAGAGTTTCCCCTATTATC | Este estudo |
| URA3-F2 | GGAGTTGGATTAGATGATAAAGGTGA TGG | Gola et al. (2003) |
| MRV8-TR146-F | CGGTTACACCGACGATTGGACTG | Este estudo |
| MRV8-TR146-R | GCAGGAATGAGACCCCAACATACG | Este estudo |
| NDT80-REALT-F | GCTGACGCTCAATCACAAAGCCC | Este estudo |

Quadro 2- *Primers* usados neste estudo*(conclusão)*

| Primer | Sequencia | Referência |
|---------------|--------------------------|-------------------------|
| NDT80-REALT-R | GCTGATGGAAAATGGAGGCCCAAC | Este estudo |
| ACT1-for | TCAGACCAGCTGATTTAGGTTTG | Martin et al. (2011) |
| ACT1-rev | GTGAACAATGGATGGACCAG | Martin et al. (2011) |
| MRV8-qPCR-for | CTATGTTCCAAGCCTTCGC | Este estudo |
| MRV8-qPCR-rev | CCTAGAAGCAGGAATGAGACC | Este estudo |
| MRV1-qPCR-for | ACTAGAGTTGGTGTAGTGTTG | Este estudo |
| MRV1-qPCR-rev | TTGGCAGTCCAATCGTAGC | Este estudo |
| MRV6-qPCR-for | AGTTCTCCAGTTGGTAGGAG | Este estudo |
| MRV6-qPCR-rev | CTCACGTCCTCTGTATCCAC | Este estudo |

Sequência sublinhada corresponde ao sítio de restrição para a enzima de restrição Sall (*primer forward*) ou MluI (*primer reverse*).

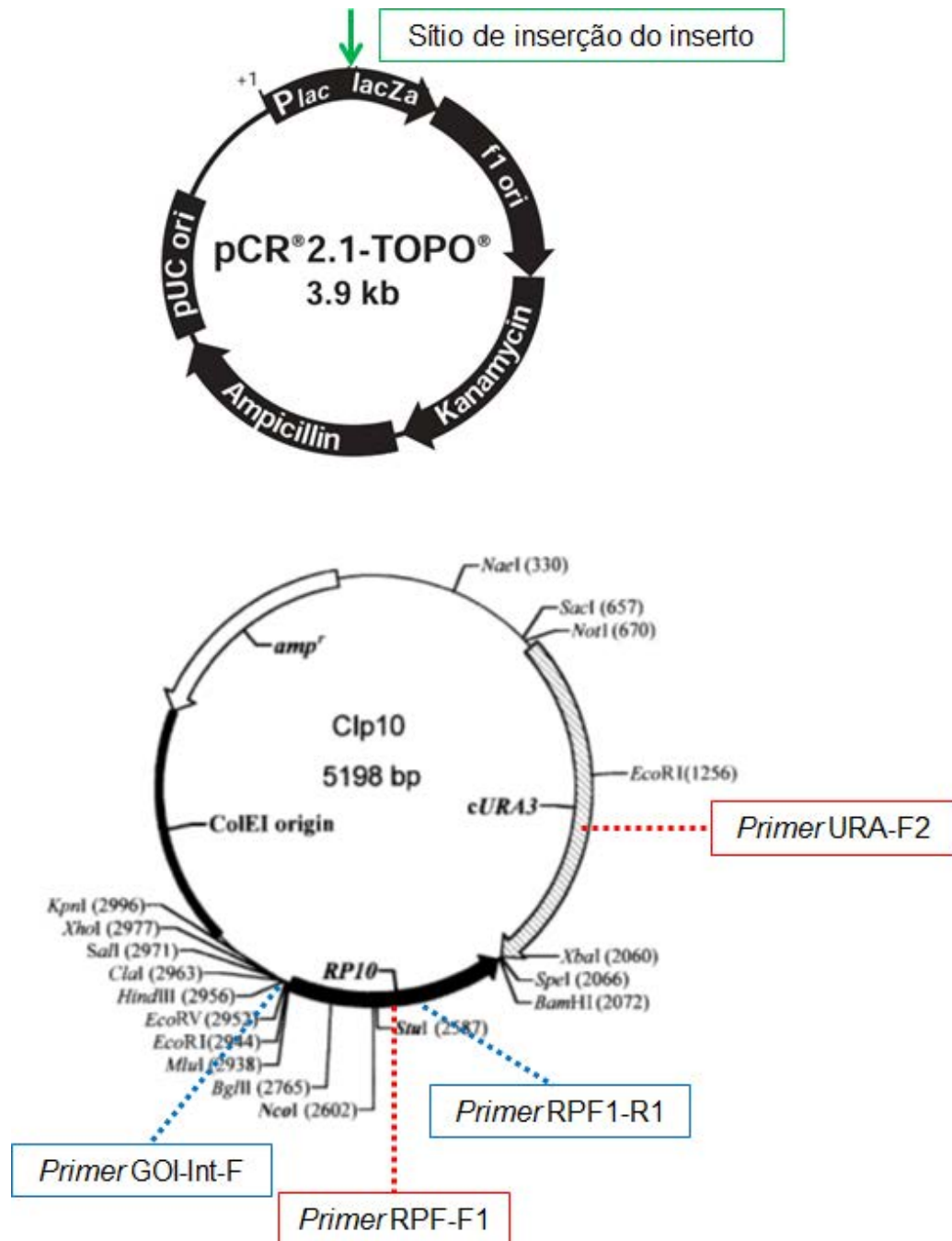


Figura 3- Mapas dos plasmídios usados no estudo. pCR[®]2.1- TOPO indicando o sítio de inserção do inserto. Clp10 contendo os sítios de restrição para as enzimas de restrição Sall e MluI, onde foi inserido o gene de interesse (*gene of interest- GOI*) e os pares de *primers* (RPF-F1/URA-F2 e GOI-Int-F/RPF1-R1) usados para confirmação da integração correta do plasmídio no locus *RP10* (Murad et al., 2000).

4.5 Avaliação do comportamento do biofilme frente ao etanol, farnesol e zinco

Foi avaliada a interferência do etanol, farnesol e zinco no desenvolvimento do biofilme. O etanol (Sigma-Aldrich) foi avaliado na concentração de 2,5% em meio de cultura YNB com 100 mM de glicose adicionado após o tempo de aderência de 1,5 h em biofilmes formados por 24 e 48 h e avaliados pelo ensaio XTT. Após 24 h de desenvolvimento do biofilme em meio YNB com 100 mM de glicose, o caldo foi trocado por meio de cultura contendo 100 μ M de farnesol (Sigma-Aldrich) e o biofilme foi incubado por mais 24 h. Foram avaliadas a atividade metabólica e contagem de células dispersas (UFC/mL). A avaliação da resposta da limitação de zinco foi feita em biofilmes crescidos em meio YNB com 100 mM de glicose, como controle, e meio zinco limitado (LZM) modificado contendo 25 μ M de FeCl_2 com ou sem 5 μ M de ZnSO_4 (Almeida et al., 2008). Os biofilmes foram avaliados após 1,5 h de aderência e 24 h de desenvolvimento pelo método XTT e após 48 h de desenvolvimento adicionando LZM + Zn após 24 h de crescimento, avaliados pelo método XTT e contagem de células dispersas (UFC/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata e em 2 ocasiões diferentes.

4.6 Crescimento sob limitação de nutrientes e agentes estressantes

Alíquotas de culturas em YPD de 16-18 h foram lavadas duas vezes com PBS e diluídas em base 10. As suspensões de células fúngicas foram padronizadas em câmara de Neubauer (Laboroptik GMBH) para todos os ensaios seguintes. Foram pingados 5 μ L (cobrindo uma variação de 10^6 a 10^1 de células) sobre agar SD ou YPD contendo concentrações de NaCl (Sigma-Aldrich), 450 μ g/mL de Vermelho Congo

(Sigma), 800 µg/mL de calcofluor branco (Sigma-Aldrich), exposição a 5 mJ de luz UV, 3% de etanol, 2 mM H₂O₂, concentrações de SDS (Sigma-Aldrich), concentrações de sorbitol (Sigma-Aldrich), incubadas a 37 °C/ até 7 dias. As placas incubadas a 42 °C foram fotografadas após 4 a 6 dias. O choque térmico foi realizado por incubação de diluições seriadas de base 10 (variando de 10⁶ a 10¹ células) a 55 °C ou temperatura ambiente/10, 15, 20 e 30 min, seguida por incubação em agar YPD a 37 °C/7 dias. O experimento foi repetido duas vezes em duplicata.

Culturas a 30 °C incubadas por 16-18 h foram ajustadas a densidade óptica de 600 nm (DO₆₀₀) no valor de 0,05 em 4 mL meio SD somente e SD suplementado com diferentes concentrações de SDS ou calcofluor branco. As cepas foram incubadas a 30 °C/24 h em agitação, seguida de determinação do crescimento por leitura de DO₆₀₀. O experimento foi realizado em três ocasiões diferentes.

Para os ensaios de crescimento sob limitação de nutrientes, ágar contendo 0,67% de YNB com sulfato de amônio sem aminoácidos (Difco) foi suplementado com 2% de glicose (Sigma-Aldrich), 2% de acetato de potássio (Sigma-Aldrich), ou 2% de glicerol (Sigma-Aldrich), 2% de galactose (Sigma-Aldrich), 2% de maltose (Sigma-Aldrich), 3% de etanol (Sigma-Aldrich) e 2% de azeite de oliva. Ágar contendo meio YCB (*Yeast Carbon Base*) (Difco) foi suplementado com 0,5% de BSA (Sigma-Aldrich), ou lisina (Sigma-Aldrich), histidina (Sigma-Aldrich), glicina (Sigma-Aldrich), cisteína (Sigma-Aldrich) e metionina (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 nM. Cada experimento foi realizado em duplicata e em duas ocasiões diferentes.

4.7 Ensaio de filamentação

Para todos os testes, as células fúngicas foram crescidas por 16-18 h na fase estacionária em meio YPD, lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em PBS para contagem.

Para observar a filamentação das cepas em meio sólido foram utilizados os seguintes meios de cultura e respectivos tempos de incubação: ágar Spider a 30 e 37 °C/ 7 dias; ágar suplementado com 10% de SFB a 37 °C/7 dias; ágar YPS (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% D(+)- sacarose e 2% de agar) semeado por *pour- plate* a 25 °C/5 a 7 dias (Chaput et al., 1983). Foram adicionadas aproximadamente 50 a 150 células fúngicas por placa. As colônias foram analisadas visualmente e os experimentos foram realizados em duplicata em duas ocasiões diferentes.

Para análise de filamentação em meio líquido, 5×10^4 células fúngicas foram adicionadas as placas de 12 poços contendo 1 mL de 10% de SFB, YPD, YPD + 10% de SFB, Spider medium, meio de Lee pH 6,5 incubada a 37 °C/3 h e 1 mL de meio RPMI-1640 e DMEM incubada a 37 °C/3 h na presença de 5% de CO₂. A presença de formas filamentosas foi determinada por observação microscópica. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes.

A indução da filamentação foi realizada em células de epitélio bucal monocamada (TR146) (Nicholls et al., 2009). As células epiteliais foram infectadas com 10^5 células de *C. albicans* e incubadas a 37 °C/3 -6 h em atmosfera de 5% de CO₂. As hifas foram, então, diferencialmente coradas de acordo com o ensaio de invasão no protocolo descrito abaixo e o comprimento foi determinado usando o *software* LAS (Leica Application Suite).

Para indução de microcolônias de hifas, foram adicionadas aproximadamente 50 células de *Candida* as monocamadas

de células de epitélio bucal (TR146), crescidas conforme o protocolo de ensaio de invasão descrito a baixo, contendo 0,5 mL de meio DMEM em placas de 24 poços pré- tratadas com DMEM + 10% de SFB por 24 h. As placas foram incubadas a 37 °C/24 h na presença de 5% de CO₂. A seguir, o meio foi removido, as células fixadas com solução a 4% de formaldeído e as microcolônias fixadas à monocamada foram coradas com solução de calcofluor branco e as células aderidas ao fundo da placa de 24 poços foi adicionado PBS. As dimensões das microcolônias de cada cepa foram determinadas por meio de microscópio invertido (Leica DMIL) e *software* LAS (Leica Application Suite).

A capacidade de invasão de hifas foi verificada em baixa e alta concentração de ágar (1,5 e 4% de ágar). As cepas foram cultivadas a 30 °C/16-18 h com agitação em meio YPD. Para os ensaios, aproximadamente 12,5 mL de ágar Spider ou ágar contendo 10% de SFB foi vertido na placa de Petri. Após a solidificação, por volta de 100 células de *Candida* foram semeadas com auxílio de alça de Drigalski. Após a secagem do inoculo, sobre o ágar foi vertido o restante dos meios de cultura, 12,5 mL, a uma temperatura de 45-50 °C. As placas foram incubadas a 30 e 37 °C por 7 dias. As colônias foram fotografadas e examinadas a olho nu. O experimento foi realizado em duplicata em duas ocasiões diferentes.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os biofilmes foram formados sobre discos de poliestireno de 8 x 2 mm de diâmetro esterilizados em câmara de radiação gama a 20 kGy (Cobalto 60) por 6 h (Embrarad, São Paulo, SP, Brasil). Os discos foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços (TPP) e o volume da suspensão, PBS e meio de cultura foi de 2 mL em duplicata. A

seguir, os discos foram transferidos para placas de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 h e desidratados em 1 mL de soluções de álcool com concentrações crescentes (10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 min e 100% por 1 h). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C/24 h para secagem completa dos discos (Costa et al., 2011).

A seguir, os discos foram transferidos para *stubs* de alumínio e recobertos com ouro por 120 s a 40 miliamperes (EMITECH SC62720, Spitter Coater, SC7620, Korum Technologies LTD). Após a metalização, os biofilmes foram examinados quanto ao aspecto morfológico das células e preenchimento do substrato e fotografados em MEV (JSM-5310, Jeol), com aumentos de 1000 e 5000 x.

4.9 Curva de crescimento

As cepas foram cultivadas a 30 °C/ 16- 18 h/ 180 rpm em meio SD. Para a curva de crescimento, a cultura foi diluída em DO₆₀₀ de 0,05 no volume de 200 µL em meio SD ou YPD em placa de 96 poços (TPP) selada. O crescimento das cepas foi registrado medindo-se a DO₆₀₀ a cada 15 min por 24 h a 30 °C em leitor de microplaca (Infinite M200, Tecan). O experimento foi realizado em triplicata em duas ocasiões diferentes.

4.10 Testes antifúngicos em células planctônicas e biofilmes

Para os testes em cultura planctônica, as cepas foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) anfotericina B (Sigma-Aldrich) e

casposfungina (Cancida, Merk & Co, Sumneytown Pike West Point, PA, EUA). As cepas foram padronizadas na concentração de 1×10^3 células/mL em meio RPMI-MOPS. Cem microlitros do inoculo foi adicionado ao poço da placa de 96 poços (TPP) pré- aquecida a 37 °C contendo os antifúngicos diluídos em meio RPMI-MOPS. A placa foi incubada a 37 °C/24 h para os antifúngicos fluconazol e casposfungina e por 48 h para anfotericina B. O ponto de corte de resistência foi estabelecido de acordo com o documento M27-A3 publicado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Quadro 3).

Quadro 3- Variação de concentrações de antifúngicos utilizados e pontos de corte para determinação de resistência

| Antifúngico | Concentrações utilizadas (µg/mL) | Ponto de corte para a CIM |
|--------------------|---|----------------------------------|
| Fluconazol | 0,125 – 64 | ≥ 64 µg/mL |
| Anfotericina B | 0,031 – 16 | ≥ 2 µg/mL |
| Casposfungina | 0,0158 - 8 | ≥ 4 µg/mL |

Para os testes antifúngicos em biofilmes foi usada a metodologia proposta por Pierce et al. (2008), com algumas modificações. As cepas foram crescidas em 20 mL de meio YPD a 30 °C/ 16-18 h/ 180 rpm. A seguir, 10 mL das culturas foram centrifugadas duas vezes e lavadas com PBS resfriado em gelo a 3.000 g/ 5 min/4 °C. As células foram ressuspendidas em 20 mL de meio RPMI-MOPS pré-aquecido a 37 °C, contadas em câmara de Neubauer e padronizadas na concentração de 1×10^6 células/mL. O inoculo foi pipetado em placas de 96 poços (TPP) no volume de 100 µL e a placa foi incubada a 37 °C/ 24 h em condição estática. Após o período de incubação, os poços foram lavados com 200 µL de PBS e, então, adicionadas as soluções de antifúngicos preparadas em meio RPMI-MOPS. O antifúngico fluconazol

foi testado em 10 concentrações seriadas variando de 2-1024 mg/L e os antifúngicos anfotericina B e caspofungina foram avaliados nas 10 concentrações seriadas de 0,031-16 mg/L. Após incubação a 37 °C/24 h, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS e a atividade antifúngica foi verificada avaliando a atividade metabólica através do ensaio com XTT, conforme descrito anteriormente no item 4.3.2, adicionando 100 µL da solução de XTT nos poços e coletando 80 µL para leitura. O experimento foi realizado em triplicata em duas ocasiões diferentes.

4.11 Quantificação de quitina em biofilme

Os biofilmes tratados com caspofungina nas concentrações de 16 e 32 mg/L foram avaliados quanto à quantidade de quitina. Os biofilmes foram crescidos em placas de 96 poços preta com fundo transparente (Corning Incorporated Costar). Para isto, os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS e fixados com 4% de formaldeído por 5 min. A seguir, foram lavados novamente com PBS e tratados com 100 µL de solução de calcofluor branco (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL por 45 min a temperatura ambiente. Os biofilmes foram novamente lavados com PBS e, então, foi adicionado 100 µL de água destilada para leitura em leitor de Elisa (Infinite M200, Tecan) avaliado quanto à emissão de fluorescência com emissão de 510 nm e excitação de 440 nm. O experimento foi realizado em triplicata em duas ocasiões diferentes.

4.12 Extração e quantificação da concentração de β -1,3 glucana

A matriz extracelular foi extraída de biofilmes crescidos a 37 °C/48 h em agitação de 75 rpm em poços de placas de 6 poços (TPP) pre-tratados com SFB por 24 h em meio RPMI-MOPS para quantificação de β -1,3 glucana, conforme descrito por Taff et al. (2012) com modificações. Após o período de incubação, o meio foi removido, foi adicionado 1 mL de água destilada estéril e o fundo e as paredes dos poços foram raspados com espátula estéril. O biofilme desprendido foi coletado em tubo Falcon de 15 mL e mantido em gelo. Os poços foram lavados novamente com 1 mL de água destilada estéril e a amostra foi recolhida nos tubos Falcon. As amostras foram homogeneizadas por 5 min em Sonicador (Sonoplus HD 2200- Bandelin Eletronic) com amplificação de 20%. A amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL que foram centrifugadas três vezes a 4500 x g/ 20 min para separar as células da matriz extracelular solúvel. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon de 15 mL e a seguir estocado a -20 °C até a etapa seguinte. A concentração de β -1,3-glucana foi determinada usando o kit reagente de detecção de (1,3)- β -D-glucana GlucateLL (Associates of Cape Cod, EUA) conforme instruções do fabricante. O experimento foi realizado em triplicata em três ocasiões diferentes.

4.13 Células epiteliais bucais: aderência, invasão e dano

Células epiteliais de carcinoma bucal humano da linhagem TR-146 (Cancer Research Technology, Londres) (Rupniak et al., 1985) foram rotineiramente cultivadas e passadas várias vezes em Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) com 2 mM de L-glutamina

(PAA) suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor (56 °C/10 min). Para os experimentos, as células TR146 foram usadas durante várias passagens de 10 a 20. As células foram cultivadas em uma incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultivo foi substituído por meio fresco a cada dois dias e accutase foi usada para destacar as células após a confluência alcançada de aproximadamente 80-100%.

As taxas de invasão de diferentes cepas de *C. albicans* foram determinadas como previamente descrito por Park et al. (2005). As células epiteliais TR146 foram crescidas em confluência em lamínulas de vidro de 15 mm de diâmetro por 2 dias. As monocamadas foram lavadas com PBS antes da infecção. Foram adicionadas 10⁵ células de *C. albicans* às monocamadas e as placas incubadas a 37 °C/3 - 6 h com 5% de CO₂. A seguir, as células epiteliais foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 5% de formaldeído. As células fúngicas foram coradas com concanavalina A (Con A) conjugada a Alexa Fluor 647 (Invitrogen) por 45 min. Após as lavagens com PBS, as células epiteliais foram permeabilizadas em 1% de Triton X-100 em PBS por 15 min. Em seguida, as células fúngicas foram coradas com calcofluor branco. As lamínulas foram, então, enxaguadas três vezes com água e montada de cabeça para baixo sobre lâminas de microscopia com meio de montagem ProLong® Gold Antifade. Microscopia de fluorescência foi realizada (Leica DM5500B, Leica DFC360 FX) usando filtros adequados para detecção de Con A (cora somente o meio extracelular, sem os elementos fúngicos invasores) e calcofluor branco (cora elementos fúngicos invasores e não invasores). Pelo menos 100 células de *C. albicans* foram examinadas para cada cepa e a taxa de invasão foi expressa como a porcentagem de células invadidas dividido pelo número de invadidas mais células não invadidas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões separadas.

Para o ensaio de aderência foram utilizadas as lâminas preparadas para o ensaio de invasão no tempo de 3 h. O número de células aderidas foi determinado por contagem de pelo menos 50 campos de alta potência de tamanho de 150 μm x 150 μm . Os experimentos foram realizados em três ocasiões separadas.

Os ensaios de dano foram realizados medindo-se a atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol das células danificadas no sobrenadante usando o kit Cytotoxicity Detection (Roche Applied Science). Células TR146 foram ajustadas a 10^5 células/mL em DMEM com 10% de SFB e 200 μL foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C/2 dias com 5% de CO_2 até a confluência ser alcançada. As células foram, então, lavadas duas vezes com PBS e 100 μL de DMEM foi adicionado por poço. Para as cepas de *C. albicans*, alíquotas de culturas em YPD por 16-18 h foram lavadas duas vezes com PBS e 100 μL de 5×10^5 células/mL em DMEM sem SFB foram adicionados às células hospedeiras. Os controles incluem o meio de cultura, um controle baixo com células hospedeiras não infectadas e meio somente e controle alto com células hospedeiras infectadas e meio suplementado com 1% de Triton X-100. As placas foram incubadas a 37 °C/ 24 h com 5% de CO_2 . A medida da atividade de LDH com o kit Cytotoxicity Detection foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi medida a 490 nm. Os valores do meio somente e controle baixo foram subtraídos dos valores de todas as amostras. O dano foi expresso como a porcentagem do controle alto, o qual foi definido como 100%. Cada experimento foi realizado pelo menos três vezes em triplicata.

4.14 Patogenicidade em ovo embrionado de galinha

Os experimentos de infecção em ovo foram realizados como descrito previamente (Hartl et al., 1995; Jacobsen et al., 2010). Os ovos de galinha fertilizados da raça Leghorn Branca foram estocados a 8 °C até 7 dias antes de começar a incubação. Os ovos foram incubados em uma incubadora especializada (BSS 300) a 37,6 °C com 50-60% de umidade antes da infecção e virados quatro vezes ao dia começando no quarto dia de incubação. Após confirmação dos embriões contra a luz, os ovos foram infectados no topo da membrana cório-alantóide com 0,1 mL de inóculo a 10^7 UFC/mL em PBS seguindo 10 dias de incubação inicial, como previamente descrito (Jacobsen et al., 2010). A sobrevivência dos ovos foi monitorada por até 7 dias por visualização do embrião contra a luz pelo menos duas vezes ao dia. Vinte ovos foram infectados por cepa de *C. albicans* e cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. Os dados de sobrevivência foram visualizados como curva de Kaplan-Meyer.

4.15 qPCR: interação com células epiteliais e biofilme

RNA de *C. albicans* foi isolado de células fúngicas em interação com células epiteliais bucais (TR146) e plástico para análise da expressão dos genes *MRV8* e *NDT80*. As células epiteliais foram padronizadas na concentração de 1×10^5 células/mL em DMEM + 10% SFB e adicionadas no volume de 2 mL aos poços de placa de 6 poços (TPP). Foram usados 3 poços por cepa e o experimento foi repetido três vezes. As placas foram incubadas 37 °C/48 h com 5% de CO₂. Células de *Candida* foram cultivadas em 30 mL de meio YPD a 30 °C/16-18 h em agitação. Dez mililitros da cultura foi centrifugado a $1\ 976 \times g/5$ min. As

células fúngicas foram ressuspensas em 10 mL PBS e 3 mL foi transferido para 3 microtubos de 1,5 mL e congelados em nitrogênio líquido. A seguir, estes tubos foram centrifugados a $8\ 765 \times g/8 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$ e, então, as células fúngicas dos três tubos foram transferidas para um único microtubo para extração de RNA, caracterizando a condição controle. O restante que sobrou da centrifugação (7 mL) foi centrifugado e lavado com PBS duas vezes e as células foram padronizadas em DMEM pré-aquecido a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na concentração de 1×10^6 células/mL. As células epiteliais foram lavadas com DMEM pré-aquecido e a seguir foi adicionado 2 mL do inoculo preparado. Além disso, também foi avaliada a expressão gênica das células aderidas ao plástico. As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}/3 - 6 \text{ h}$ com 5% de CO_2 . Para reduzir a quantidade de RNA da célula hospedeira e transcrição de RNA, o meio de cultura foi removido e foi adicionado 750 μL de reagente PeqGold RNA pure (Peqlab) nos poços e nos microtubos. As placas e microtubos foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O tempo entre o enxague das células e congelamento foi menor que 5 min. Após o descongelamento em temperatura ambiente, as células aderidas ao fundo do poço foram desprendidas com auxílio de varredor celular (TPP) e colhidas em microtubos. Os microtubos foram centrifugados a $8\ 765 \times g/8 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante removido para reduzir a quantidade de RNA humano. O precipitado foi ressuspendido em 400 μL de tampão AE (50 mM de acetato de sódio pH 5,3, 10 mM de EDTA) e 40 μL de solução de SDS (Sigma-Aldrich) e homogeneizado por agitação em vortex. Em seguida, foi adicionado 440 μL de fenol/ clorofórmio/ isoamilalcool (25:24:1) (Sigma-Aldrich) e os tubos foram incubados a $65 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ min}$ e logo em seguida, foram colocados em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ por cerca de 10 min e, então, aquecidos novamente a $65 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ min}$. A seguir, os microtubos foram centrifugados a $8\ 765 \times g/2 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi cuidadosamente removida e o RNA foi precipitado com 40 μL de 3 M de acetato de sódio e 400 μL de isopropanol a $-20 \text{ }^\circ\text{C}/16-18 \text{ h}$. As amostras foram centrifugadas

a 6 440 x g/10 min/4 °C e lavadas duas vezes com etanol a 70% resfriado em gelo (Wächtler et al., 2011). O RNA foi ressuspendido em água livre de nuclease e a quantidade foi medida em aparelho Nanodrop ND1000 (Pqlab) e a qualidade da amostra verificada pela razão de 260/280 nm que foi entre 1,8 a 2,0.

Para a análise da expressão dos genes, primeiro DNA genômico (gDNA) foi digerido com o kit Baseline-ZERO™ DNase (Epicentre Biotechnologies). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Foi investigada a expressão dos genes alvos *MRV8* e *NDT80*. A sequência dos *primers* está apresentada no Quadro 2. A solução foi preparada com 5X EvaGreen QPCR Mix II (Bio-Sell), 1 µL de cDNA diluído 1:20 e 10 µM de *primers* foram adicionados a um volume total de 20 µL. A reação de PCR em tempo real foi realizada em duplicata usando o sistema de CFX96 Real Time Systems (Bio-Rad). O programa para amplificação teve um passo de desnaturação inicial 95 °C por 15 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 20 s e 72 °C por 15 s.

Para análise da expressão de genes em biofilme, foram formados biofilmes conforme o método descrito no item 4.3 por 24 h em placas de 6 poços, sendo o volume de meio de cultura e inóculo de 4 mL, em três replicatas biológicas. Células crescidas em meio YNB acrescido de 100 mM de glicose a 30 °C/24 h em agitação foram consideradas grupo controle. As células em suspensão foram centrifugadas a 1 976 x g/5 min/4 °C para coleta das células. A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol® (Ambion), conforme instruções do fabricante. O RNA foi ressuspendido em água livre de nuclease e a quantidade foi medida em Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade da amostra verificada pela razão de 260/280 nm que foi por volta de 1,8 a 2,0. A digestão de gDNA e síntese de cDNA foi realizada como descrito acima. Foi investigada a expressão dos genes parálogos *MRV8*, *MRV1* e *MRV6*,

com os *primers* descritos no Quadro 2. A reação foi composta de 2X Fast EvaGreen qPCR Master Mix (Biotium), 1 μ L de cDNA e 10 μ M de *primers* em um volume total de 20 μ L e foi corrida em duplicata usando o sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). A reação de qPCR foi realizada a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 5 s, 51 °C por 10 s e 72 °C por 25 s.

A expressão dos genes foi determinada pelo método $\Delta\Delta$ Ct usando os *softwares* dos aparelhos de qPCR comparando os dados obtidos com a expressão do gene endógeno *ACT1* usado para normalização.

4.16 Análise estatística

Os resultados obtidos para as diferentes cepas mutantes, cepa parental e cepas complementadas nos diferentes tempos de desenvolvimento do biofilme e demais análises foram submetidos aos testes estatísticos conforme Quadro 4.

Quadro 4- Testes estatísticos utilizados para a análise dos resultados obtidos para as cepas mutantes, parental e complementadas

| Análises | Testes estatísticos |
|--|---|
| Contagem de células viáveis, XTT, células desprendidas, biomassa e efeitos do etanol, farnesol e zinco, teste antifúngico em biofilme, quantificação de β -1,3 glucana e quitina | Teste <i>t</i> de Student, ANOVA e teste de Tukey |
| Ensaio de aderência, invasão e dano | Teste <i>t</i> de Student |
| Patogenicidade em ovo embrionado de galinha | Teste de Log-rank (Mantel-Cox) |

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os programas Minitab 14 e GraphPad Prism versão 6.00 foram utilizados para os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos para as 34 cepas mutantes de *C. albicans* em relação à cepa parental BWP17+Clp30 para o desenvolvimento de biofilme estão descritos na Tabela 1, 2 e 3.

De acordo com os resultados obtidos foram selecionadas 9 cepas mutantes que apresentaram os fenótipos estatisticamente diferentes em relação à cepa parental para os testes realizados (Figura 4, 5, 6, 7 e 8 e APÊNDICE) (Métodos 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 e 4.3):

- *dur31Δ/Δ* (ORF19.6656): esta cepa mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à cepa BWP17+Clp30 para quantificação de células viáveis nos intervalos de tempo de 12 e 24 h e pouca quantidade de células desprendidas no tempo de 4 h de crescimento. Para o ensaio de XTT, somente o intervalo de tempo de 4 h foi estatisticamente menor. O valor de biomassa obtido foi menor que a biomassa para a cepa parental, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. Esta cepa mostrou aparência visual diferente quando comparada com a cepa BWP17+Clp30;
- *ORF19.7504Δ/Δ*: esta cepa aderiu melhor ao poliestireno que a cepa BWP17+Clp30. Seu resultado mais significativo foi à presença de pouca quantidade de células desprendidas nos

Tabela 1- Resultados obtidos para quantificação de células viáveis dos biofilmes das 34 cepas mutantes de *C. albicans* nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 12, 24, 48 h, onde "X" significa diferença estatisticamente significativa em relação à cepa BWP17+Clp30 (*t* de Student, $p < 0,05$)

| Cepas | Viáveis 1,5h | Viáveis 4h | Viáveis 12h | Viáveis 24h | Viáveis 48h |
|-----------------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>orf19.7670Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>orf19.1964Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>orf19.2515Δ/Δ</i> | | X | | | |
| <i>orf19.3737Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>orf19.6200Δ/Δ</i> | X | | | | |
| <i>orf19.4518Δ/Δ</i> | X | | | | |
| <i>dur31Δ/Δ</i> | | | X | X | |
| <i>orf19.7504Δ/Δ</i> | X | | | | |
| <i>rf19.2959Δ/Δ</i> | X | | | | |
| <i>orf19.1353Δ/Δ</i> | | | | X | |
| <i>hsp21Δ/Δ</i> | X | | | X | |
| <i>orf19.988Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>orf19.5514Δ/Δ</i> | | | X | | |
| <i>gtr1Δ/Δ</i> | | | X | X | |
| <i>orf19.2724Δ/Δ</i> | | | X | X | |
| <i>orf19.2204Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>orf19.6492Δ/Δ</i> | X | | X | | |
| <i>orf19.4970Δ/Δ</i> | X | | X | | |
| <i>orf19.7170 Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>bnaΔ/Δ</i> | X | X | X | | |
| <i>orf19.5857Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>pga16Δ/Δ</i> | | | | | X |
| <i>orf19.6501Δ/Δ</i> | X | | | | X |
| <i>orf19.1150Δ/Δ</i> | | | X | | X |
| <i>orf19.823Δ/Δ</i> | X | | X | | |
| <i>orf19.3375/</i> | X | | X | | |
| <i>orf19.3376/</i> | | | | | |
| <i>orf19.3378Δ/Δ</i> | | | | | |
| <i>pga32Δ/Δ</i> | X | | X | X | |
| <i>orf19.6534Δ/Δ</i> | X | | | X | |
| <i>orf19.6688Δ/Δ</i> | | | | X | |
| <i>orf19.5848Δ/Δ</i> | | | | X | |
| <i>mrV1Δ/Δ</i> | | X | X | X | |
| <i>orf19.6847Δ/Δ</i> | | | X | | |
| <i>mrV8Δ/Δ</i> | | | X | | |
| <i>dot5Δ/Δ</i> | | | | X | X |

Tabela 2- Resultados obtidos para quantificação de células dispersadas dos biofilmes das 34 cepas mutantes de *C. albicans* nos tempos de desenvolvimento de 4, 12, 24, 48 h, onde "X" significa diferença estatisticamente significativa em relação à cepa BWP17+Clp30 (*t* de Student, $p < 0,05$)

| Cepas | Dispersas 4h | Dispersas 12h | Dispersas 24h | Dispersas 48h |
|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>orf19.7670Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.1964Δ/Δ</i> | X | | | |
| <i>orf19.2515Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.3737Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.6200Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.4518Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>dur31Δ/Δ</i> | X | | | |
| <i>orf19.7504Δ/Δ</i> | X | X | | |
| <i>rf19.2959Δ/Δ</i> | X | | | |
| <i>orf19.1353Δ/Δ</i> | X | | | |
| <i>hsp21Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.988Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.5514Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>gtr1Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.2724Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.2204Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.6492Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.4970Δ/Δ</i> | | | | X |
| <i>orf19.7170 Δ/Δ</i> | | X | | |
| <i>bnaΔ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.5857Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>pga16Δ/Δ</i> | | X | | |
| <i>orf19.6501Δ/Δ</i> | X | | X | |
| <i>orf19.1150Δ/Δ</i> | | | | X |
| <i>orf19.823Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.3375/</i> | | | | |
| <i>orf19.3376/</i> | | | | |
| <i>orf19.3378Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>pga32Δ/Δ</i> | | X | | |
| <i>orf19.6534Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.6688Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>orf19.5848Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>mrV1Δ/Δ</i> | X | | | |
| <i>orf19.6847Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>mrV8Δ/Δ</i> | | | | |
| <i>dot5Δ/Δ</i> | | | | |

Tabela 3- Resultados obtidos para quantificação da atividade metabólica (XTT) dos biofilmes das 34 cepas mutantes de *C. albicans* nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 12, 24, 48 h e peso seco no tempo de desenvolvimento de 60 h, onde "X" significa diferença estatisticamente significativa em relação à cepa BWP17+Clp30 (*t* de Student, $p < 0,05$)

| Cepas | XTT 1,5h | XTT 4h | XTT 12h | XTT 24h | XTT 48h | Peso seco |
|-----------------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|
| <i>orf19.7670Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.1964Δ/Δ</i> | | | | | X | |
| <i>orf19.2515Δ/Δ</i> | | | | | X | |
| <i>orf19.3737Δ/Δ</i> | | | | | X | |
| <i>orf19.6200Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.4518Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>dur31Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.7504Δ/Δ</i> | | X | X | | X | |
| <i>rf19.2959Δ/Δ</i> | X | X | | | | |
| <i>orf19.1353Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>hsp21Δ/Δ</i> | | X | | | X | |
| <i>orf19.988Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.5514Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>gtr1Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.2724Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.2204Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.6492Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.4970Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.7170 Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>bnaΔ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.5857Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>pga16Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.6501Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.1150Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.823Δ/Δ</i> | X | X | | | X | |
| <i>orf19.3375/</i> | X | X | | | | |
| <i>orf19.3376/</i> | | | | | | |
| <i>orf19.3378Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>pga32Δ/Δ</i> | X | X | | | X | |
| <i>orf19.6534Δ/Δ</i> | | X | | | | |
| <i>orf19.6688Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.5848Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>mr1Δ/Δ</i> | | | | | | |
| <i>orf19.6847Δ/Δ</i> | | | | | | X |
| <i>mr8Δ/Δ</i> | | | | | | X |
| <i>dot5Δ/Δ</i> | | | | | | |

- tempos de 4 e 12 h de crescimento, enquanto que a atividade metabólica do biofilme foi maior no tempo de desenvolvimento de 12 h. Esta cepa ainda mostrou atividade metabólica menor nos tempos de 4 e 48 h de crescimento. Sua aparência visual foi similar à cepa parental;
- *ORF19.7170Δ/Δ*: apresentou menos células desprendidas para o intervalo de tempo de 12 h e menor atividade metabólica para o tempo de crescimento de 4 h em relação à cepa parental. Seu valor de biomassa foi menor que a biomassa da cepa parental, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. Analisado visualmente, seu biofilme mostrou alguns espaços vazios e aparência irregular;
 - *ORF19.6501Δ/Δ*: foi mais aderente ao poliestireno (Via 1,5 h) e produziu mais células com 48 h de crescimento. Por outro lado, com 4 h de crescimento o biofilme liberou menos células, mas com 24 e 48 h houve maior número de células dispersas, mas o resultado só foi estatisticamente significativo no intervalo de tempo de 24 h. Na análise visual do crescimento do biofilme, ele mostrou aparência irregular;
 - *ORF19.823Δ/Δ*: esta cepa aderiu melhor e produziu mais células nos tempos de 1,5 e 12 h de crescimento que a cepa parental, mas os valores para atividade metabólica nos tempos de 1,5, 4 e 48 h foram estatisticamente menores. Seu biofilme apresentou alguns

espaços vazios e aparência irregular por análise visual;

- *pga32Δ/Δ* (*ORF19.6784*): a atividade metabólica foi similar ao biofilme da cepa mutante para o gene *ORF19.823*, exceto para o resultado obtido para as células viáveis no tempo de 24 h, o qual mais células foram obtidas do biofilme do que a quantidade de células viáveis do biofilme da cepa BWP17+Clp30, além de menor quantidade de células dispersas no tempo de 12 h, porém sua aparência visual foi similar à cepa BWP17+Clp30;
- *ORF19.6847Δ/Δ*: esta cepa produziu mais células viáveis após 12 h de crescimento e biomassa estatisticamente menor quando comparada a cepa parental, visto que o biofilme apresentou alguns espaços vazios e aparência irregular para análise visual;
- *mrp8Δ/Δ* (*ORF19.3908*): seus resultados foram similares ao da cepa mutante para o gene *ORF19.6847*, mostrando menor acúmulo de biomassa e aparência irregular;
- *dot5Δ/Δ* (*ORF19.5417*): a cepa mutante *dot5Δ/Δ* produziu mais células viáveis nos tempos de 24 e 48 h de crescimento, mas sua biomassa foi menor que a biomassa da cepa parental, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. Seu biofilme mostrou alguns espaços vazios e aparência irregular observado por análise visual.

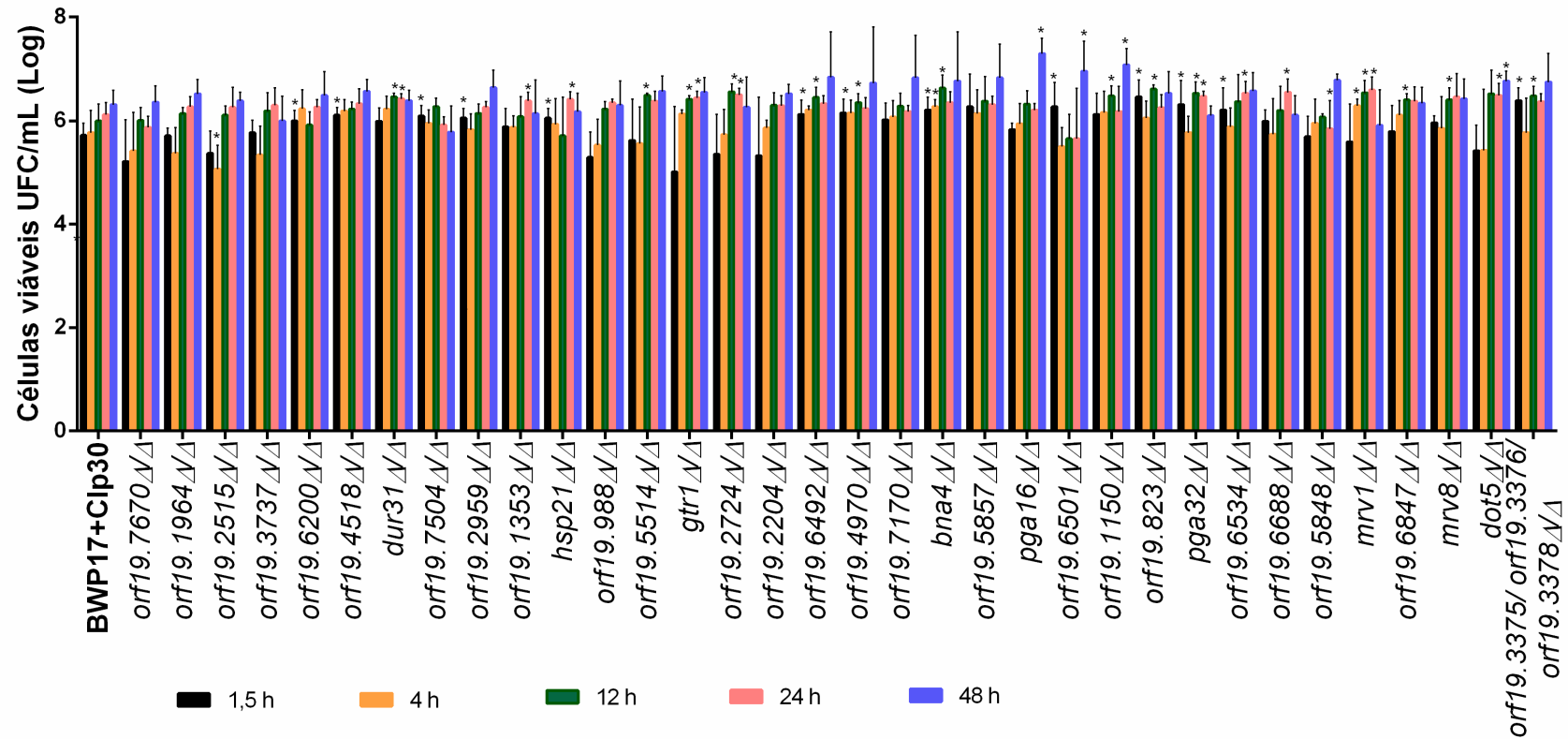


Figura 4- Valores de células viáveis (UFC/mL- Log) obtidos para a cepa parental BWP17+C1p30 e as 34 cepas mutantes crescidas em biofilme em YNB+100 mM de glicose a 37 °C.

* Diferença estatisticamente significativa em relação à cepa parental (*t* de Student, $p < 0,05$).

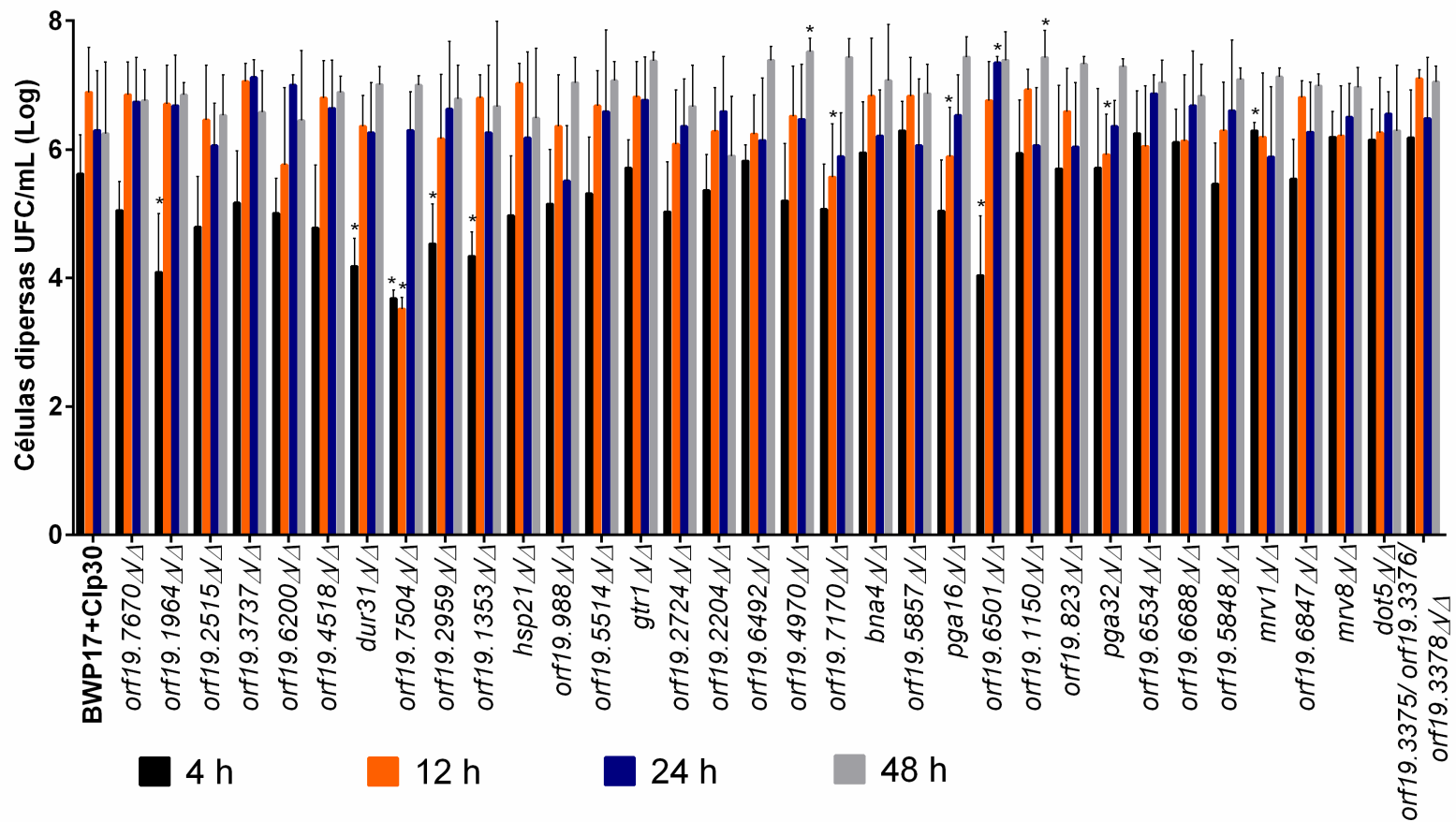


Figura 5- Valores de células desprendidas do biofilme (UFC/mL- Log) obtidos para a cepa parental BWP17+Clp30 e as 34 cepas mutantes crescidas em biofilme em YNB+100 mM de glicose a 37 °C.

* Diferença estatisticamente significativa em relação à cepa parental (t de Student, $p < 0,05$).

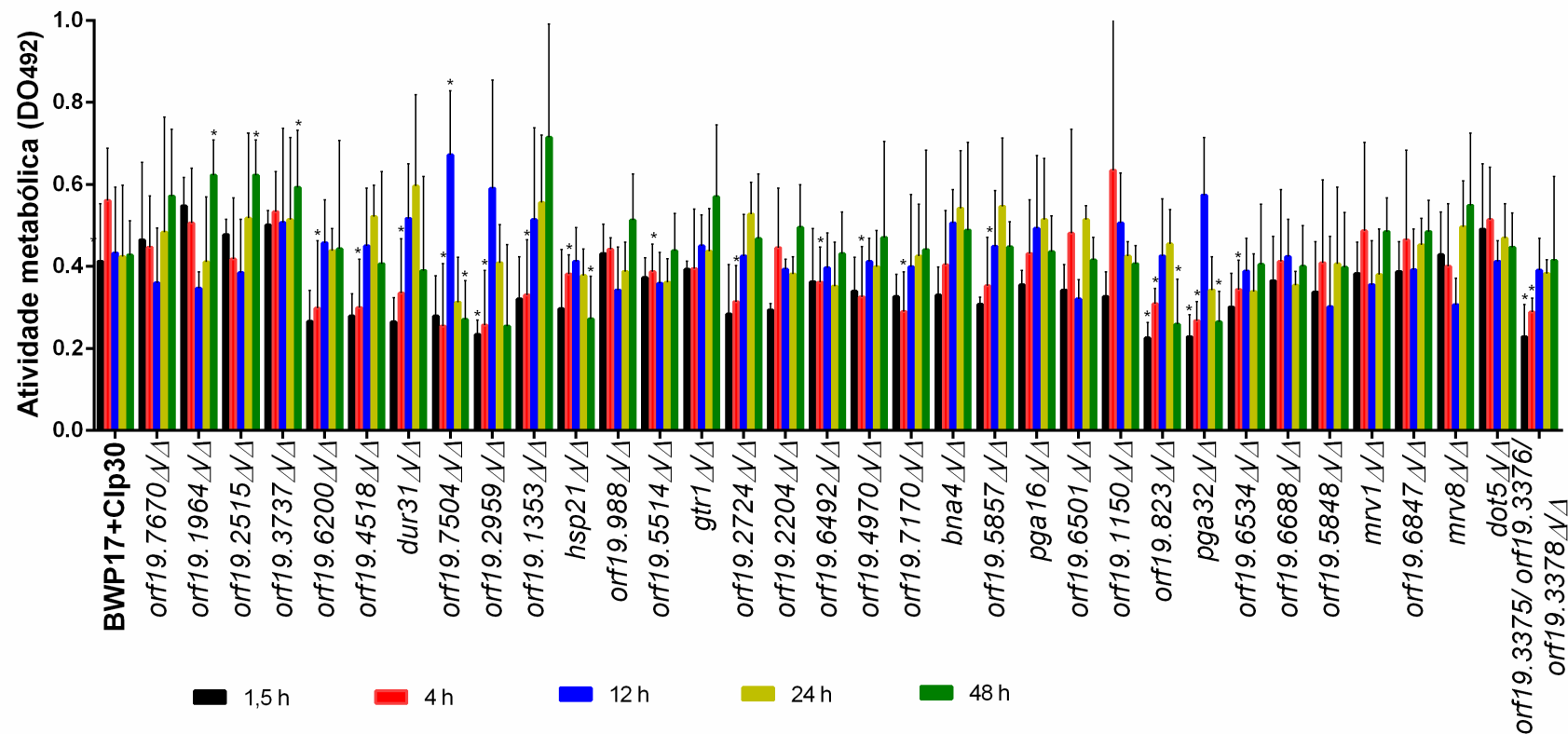


Figura 6- Valores para atividade metabólica (XTT) obtidos para a cepa parental BWP17+Cip30 e as 34 cepas mutantes crescidas em biofilme em YNB+100 mM de glicose a 37 °C.

* Diferença estatisticamente significativa em relação à cepa parental (t de Student, $p < 0,05$).

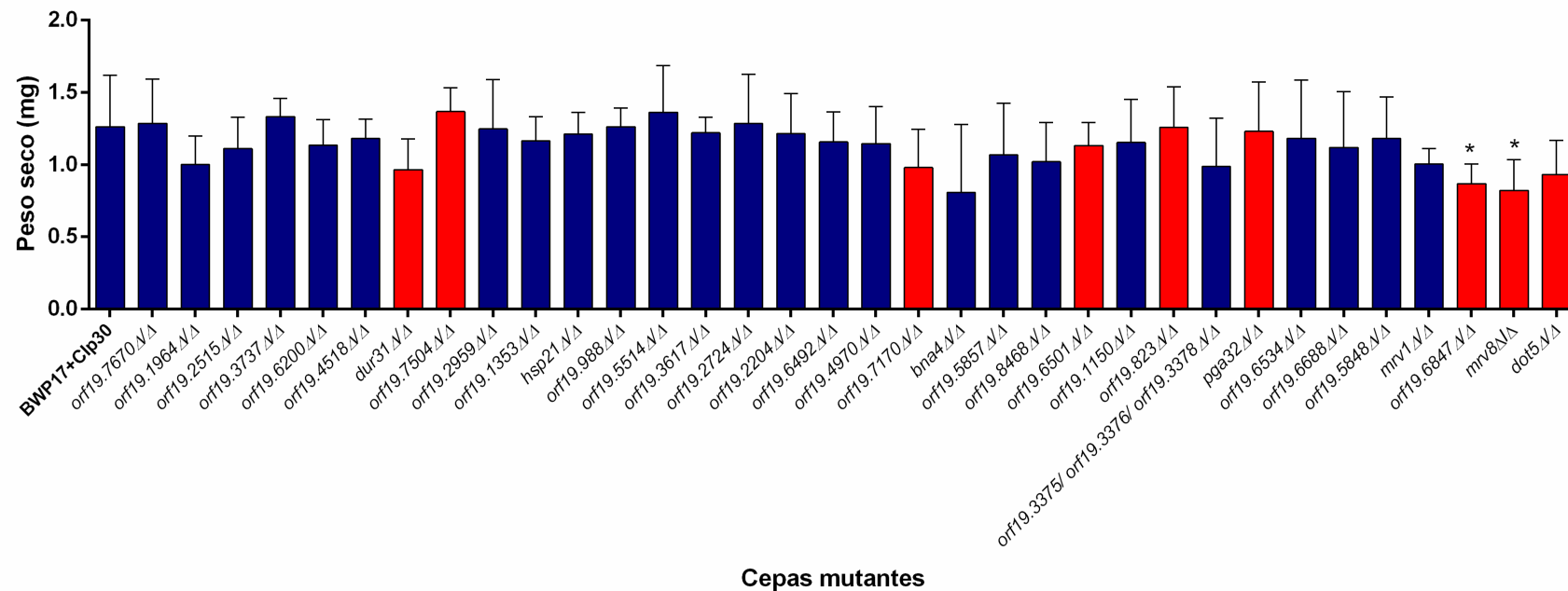


Figura 7- Valores de peso seco (mg) obtidos para a cepa parental BWP17+Clp30 e todas as cepas mutantes estudadas crescidas em biofilme em Spider *medium* a 37 °C/60 h sobre discos de poliestireno. Barras vermelhas representam as 9 cepas mutantes selecionadas.

* Diferença estatisticamente significativa em relação a cepa parental (*t* de Student, $p < 0,05$).



Figura 8- Aparência visual dos biofilmes da cepa parental BWP17+Clp30 e as 9 cepas mutantes selecionadas após 60 h de crescimento sobre disco de poliestireno (método de análise da biomassa) em Spider *medium* a 37 °C.

A adição de meio de cultura contendo 2,5% após o período de aderência de 1,5 h e incubação adicional por mais 24 e 48 h alterou a atividade metabólica dos biofilmes formados pelas cepas estudadas (Método 4.5). No tempo de desenvolvimento de 24 h, os biofilmes formados pelas cepas mutantes para os genes *DUR31*, *ORF19.823*, *PGA32* e *MRV8* foram os mais afetados pela molécula sinalizadora, enquanto que os biofilmes formados pelas cepas mutantes para os genes *ORF19.7504*, *ORF19.6501*, *PGA32*, *MRV8*, e *DOT5* exibiram maior tolerância ao etanol que a cepa parental BWP17+Clp30 no tempo de 48 h (Figura 9).

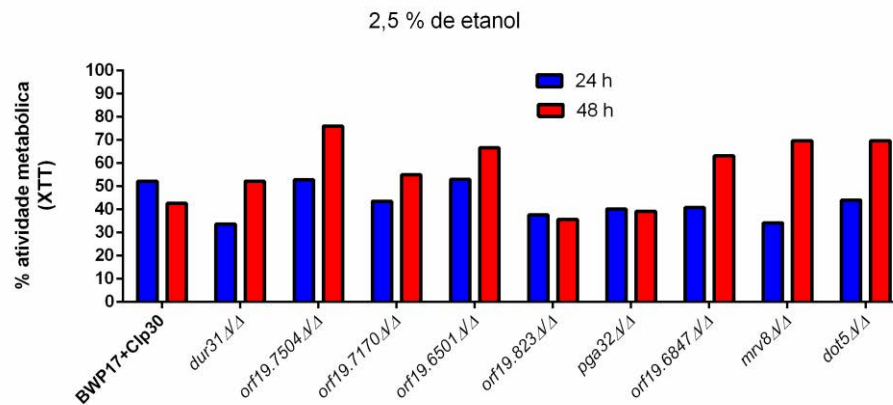


Figura 9- Efeito de 2,5% de etanol sobre a atividade metabólica de biofilmes formados por 24 e 48 h a 37 °C em relação ao controle. O meio de cultura YNB+100 mM de glicose contendo 2,5% de etanol foi adicionado após o período de aderência das células (1,5 h).

Os biofilmes formados pela cepa BWP17+C1p30 também foram crescidos na presença e ausência de zinco nos tempos de 1,5, 24 e 48 h, o qual não foi observada diferença significativa para a atividade metabólica e dispersão das células nas diferentes condições (Figura 10 e 11) (Método 4.5).

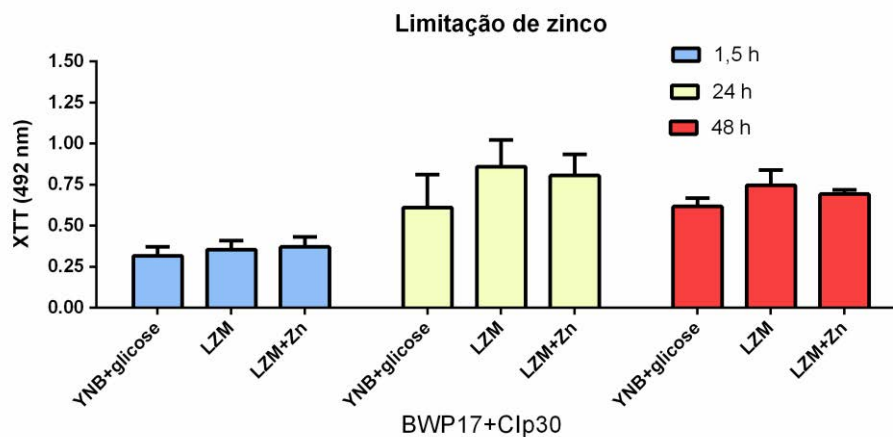


Figura 10- Efeito da limitação de zinco sobre a atividade metabólica de células aderidas (1,5 h de incubação) e biofilmes formados pela cepa BWP17+C1p30 por 24 e 48 h. Somente para o tempo de 48 h, o meio de cultura LZM+Zn foi adicionado após o período de aderência (1,5 h). Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

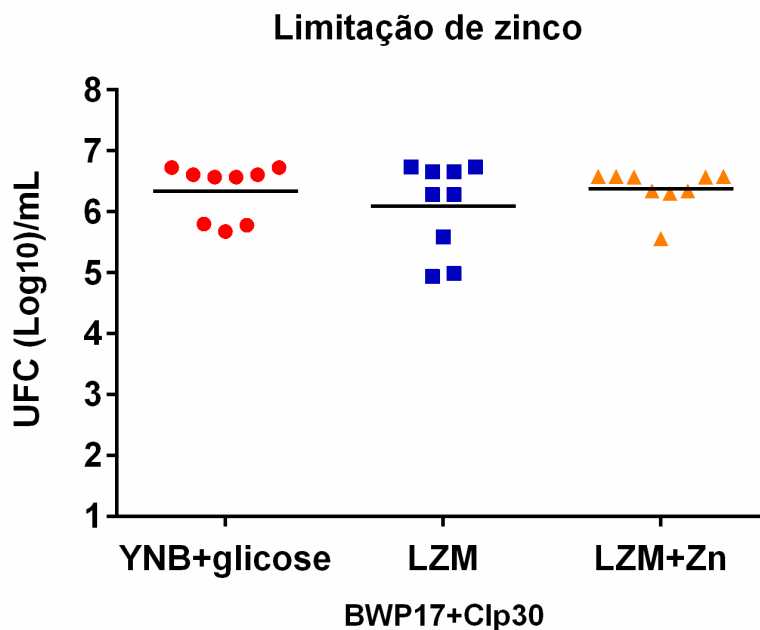


Figura 11- Efeito da limitação de zinco sobre a dispersão das células de biofilmes da cepa BWP17+Clp30 formados por 48 h. O meio de cultura LZM+Zn foi adicionado após o período de aderência (1,5 h). Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

Após 24 h de desenvolvimento, foi adicionado novo meio de cultura contendo 100 μM de farnesol e os biofilmes foram incubados por mais 24 h. Para atividade metabólica foi observada redução somente para a cepa *orf19.6501* Δ/Δ , sendo que para as células dispersas a redução da contagem foi observada para a cepa *orf19.823* Δ/Δ (Figura 12 e 13) (Método 4.5).

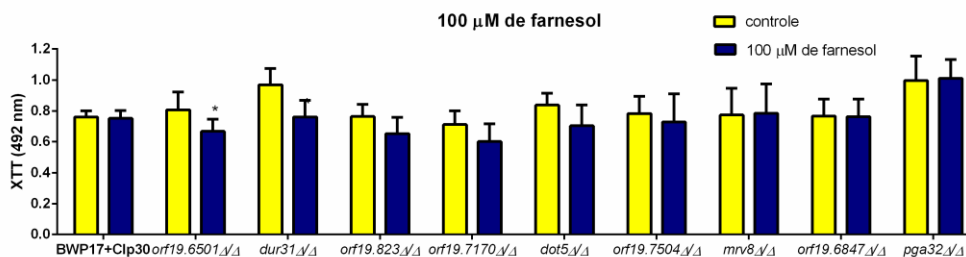


Figura 12- Efeito de 100 μM de farnesol sobre a atividade metabólica de biofilmes formados por 48 h. O meio de cultura YNB+100 mM de glicose contendo 100 μM de farnesol foi adicionado após 24 h de desenvolvimento do biofilme. Teste *t*, * $p < 0,05$.

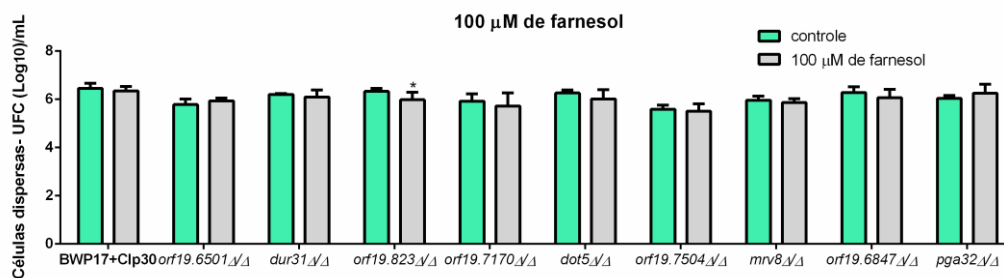


Figura 13- Efeito de 100 μ M de farnesol sobre a dispersão de células de biofilmes formados por 48 h. O meio de cultura YNB+100 mM de glicose contendo 100 μ M de farnesol foi adicionado após 24 h de desenvolvimento do biofilme. Teste t , * $p < 0,05$.

Para a construção das cepas complementadas foi adicionado um passo a mais: ligação ao vetor TOPO, pois após a reação de PCR para geração dos insertos não foi possível ligá-los ao vetor Clp10. Foram obtidos 6 transformantes para os genes *ORF19.823*, *ORF19.7504*, *MRV8*, *ORF19.7170*, *ORF19.6847* e *DOT5* com o plasmídeo TOPO e inserto. A seguir, foi possível a construção de 4 cepas complementadas: *orf19.823Δ/Δ+ORF19.823*, *orf19.7170Δ/Δ+ORF19.7170*, *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* (Método 4.4). Logo após, foram realizadas as análises fenotípicas dos genes de interesses.

Após a construção das cepas complementadas foi realizada a caracterização funcional utilizando diferentes condições, como diferentes nutrientes e condições de estresse. O experimento foi realizado com as cepas BWP17+Clp30, mutantes e complementadas para os 4 genes de interesse, o qual não houve diferença de crescimento entre elas para nenhuma das condições analisadas, conforme Tabela 4 (Método 4.6).

Tabela 4- Caracterização funcional frente a diferentes condições testadas para as cepas BWP17+Clp30, mutantes e complementadas para os 4 genes de interesse

| Condições | <i>MRV8, ORF19.6847, ORF19.823 e ORF19.7170</i> |
|--|--|
| SD- 30 °C, 37 °C e 42 °C | Sem diferença |
| YPD- 30 °C, 37 °C e 42 °C | Sem diferença |
| SD+1,5 M de NaCl- 30 °C e 37 °C | Sem diferença |
| SD+2 mM de H ₂ O ₂ - 30 °C e 37 °C | Sem diferença |
| SD+450 µg/mL de Congo Red- 30 °C e 37 °C | Sem diferença |
| SD+800 µg/mL de calcofluor branco- 30 °C e 37 °C | Sem diferença |
| Exposição a 5 mJ de luz UV- SD- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 2% de acetato de potássio- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 3% de etanol- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 2% de glicerol- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 2% de galactose- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 2% de maltose- 37 °C | Sem diferença |
| YNB+NH ₄ SO ₄ + 2% de óleo de oliva- 37 °C | Sem diferença |
| YCB+0,5% de BSA- 37 °C | Sem diferença |
| YCB+1 nM de lisina - 37 °C | Sem diferença |
| YCB+1 nM de histidina - 37 °C | Sem diferença |
| YCB+1 nM de glicina - 37 °C | Sem diferença |
| YCB+1 nM de cisteína - 37 °C | Sem diferença |
| YCB+1 nM de metionina - 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a 55 °C/10 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a temp. amb./10 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a 55°C/15 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a temp. amb./15 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a 55 °C/20 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a temp. amb./20 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a 55 °C/30 min- SD- 37 °C | Sem diferença |
| Choque térmico a temp. amb./30 min- SD- 37 °C | Sem diferença |

Condições de estresse: incubação a 42 °C e choque térmico: estresse térmico; NaCl: estresse osmótico; H₂O₂: estresse oxidativo; Congo Red e calcofluor branco: estresse na parede celular.

Os quatro genes de interesse foram verificados quanto à capacidade de filimentação sobre os meios sólidos Spider *medium* e 10% de SFB e embebimento em ágar YPS. As cepas mutantes para os genes *MRV8*, *ORF19.6847*, *ORF19.823* e *ORF19.7170* formaram colônias filamentosas comparáveis às colônias formadas pelas cepas BWP17+Clp30 e complementadas conforme observado na Figura 14 (Método 4.7).

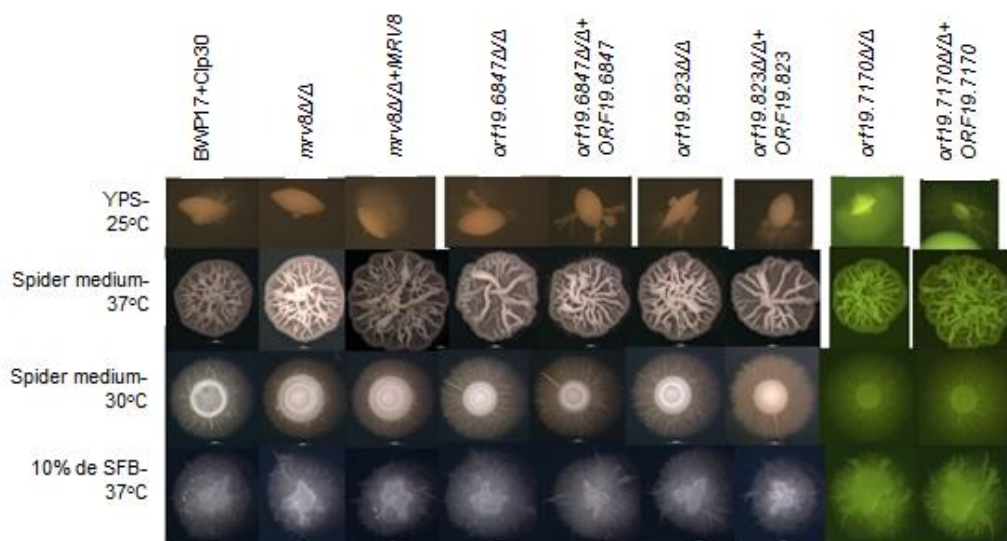


Figura 14- Teste de filimentação em meio sólido avaliado após 7 dias.

As cepas mutantes também foram crescidas em meio líquido e condições indutoras de filimentação por 3 h, onde foi verificada filimentação normal de acordo com a condição como observado para a cepa parental BWP17+Clp30. As cepas complementadas também apresentaram o mesmo padrão de filimentação que a cepa parental (Figura 15) (Método 4.7).

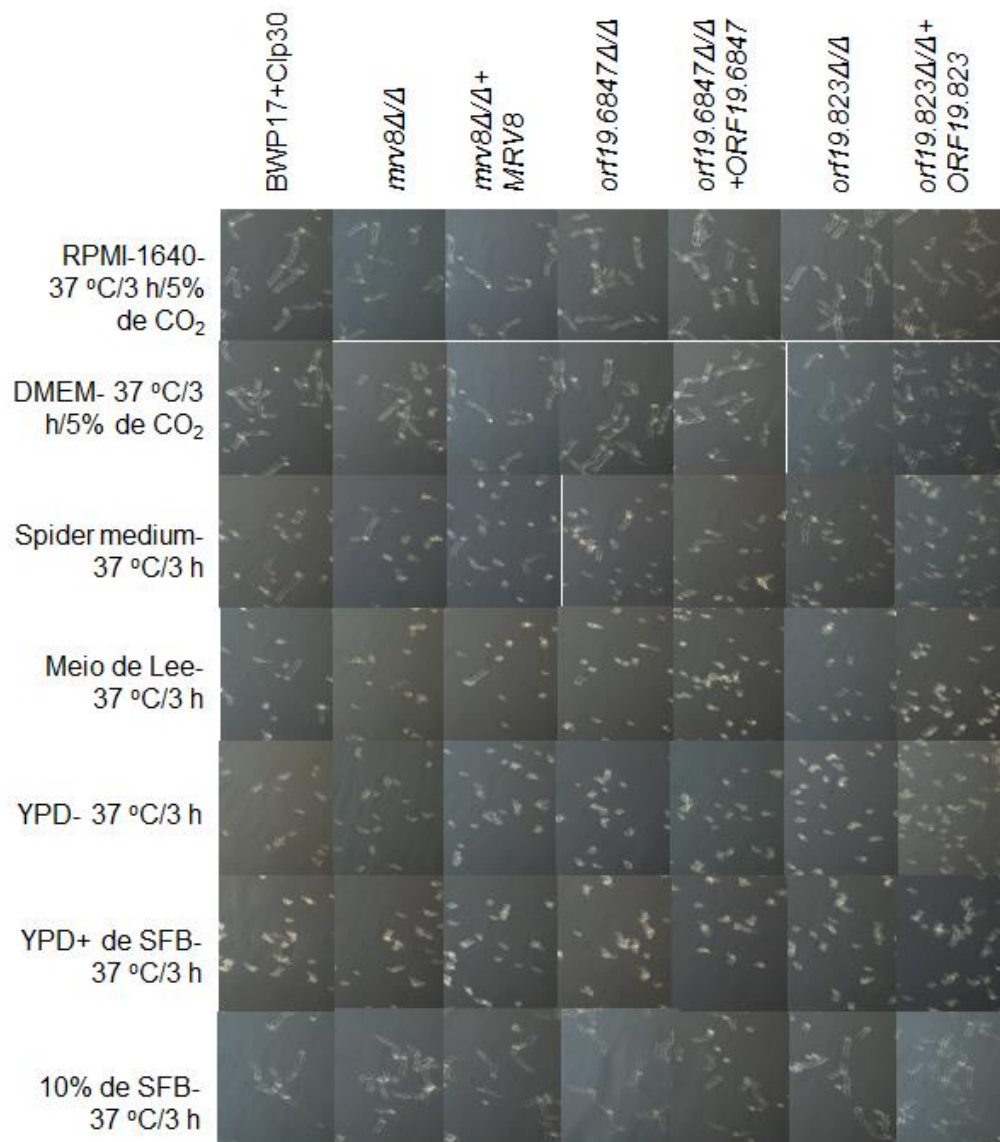


Figura 15- Teste de filimentação em meio líquido avaliado após 3 h de incubação.

O primeiro gene analisado foi *ORF19.823*, que de acordo com a base de dados *Candida Genome Database* (CGD)*, codifica uma proteína de função desconhecida e sua expressão é induzida em biofilmes crescidos em *Spider medium* (Nobile et al., 2012). Foi realizada a análise com a ferramenta *basic local alignment search tool* (BLAST)** da sequência da proteína deste gene mostrando similaridades com as proteínas de função desconhecida produzidas por *C. dubliniensis* (*CD36_18640*, 75% de identidade e 88% de similaridade) e *C. tropicalis* (*CTRG_01444*, 41% de identidade e 57% de similaridade). A análise com as bases de dados SMART*** e Wolf PSORT**** sugerem que a proteína seja uma proteína transmembrana localizada na mitocôndria.

Os biofilmes formados por *orf19.823Δ/Δ* nos tempos de 1,5, 4 e 48 h foram menos metabolicamente ativos que os biofilmes formados pela cepa parental no teste de *screening*. Este teste foi repetido com a cepa complementada, mas os resultados obtidos para a cepa mutante não foram reprodutíveis (Figura 16) (Método 4.2.2).

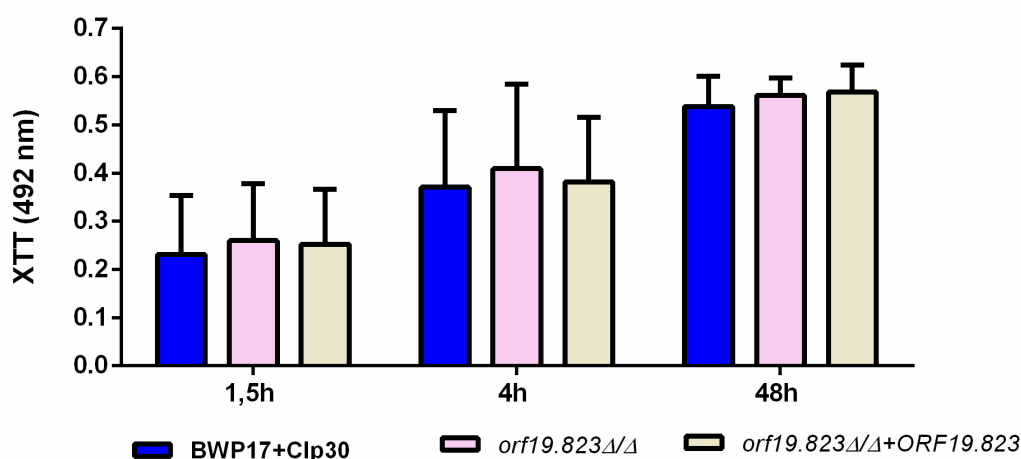


Figura 16- Atividade metabólica de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.823Δ/Δ* e *orf19.823Δ/Δ*+*ORF19.823* crescidos em meio YNB+100 mM de glicose nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4 e 48 h. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

* Disponível em: http://www.candidagenome.org/cgi-bin/compute/blast_clade.pl

** Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

*** Disponível em: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

**** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/subcellular/>

A cepa mutante *orf19.823Δ/Δ* acumulou biomassa nos mesmos níveis que a cepa parental, ainda assim este teste foi repetido com a cepa complementada, o qual não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as cepas para biofilmes crescidos por 48 e 60 h. A aparência visual do biofilme formado por *orf19.823Δ/Δ* mostrou-se desigual em relação à cepa parental e a complementação reconstituiu o fenótipo principalmente no biofilme crescido por 48 h (Figura 17) (Método 4.3).

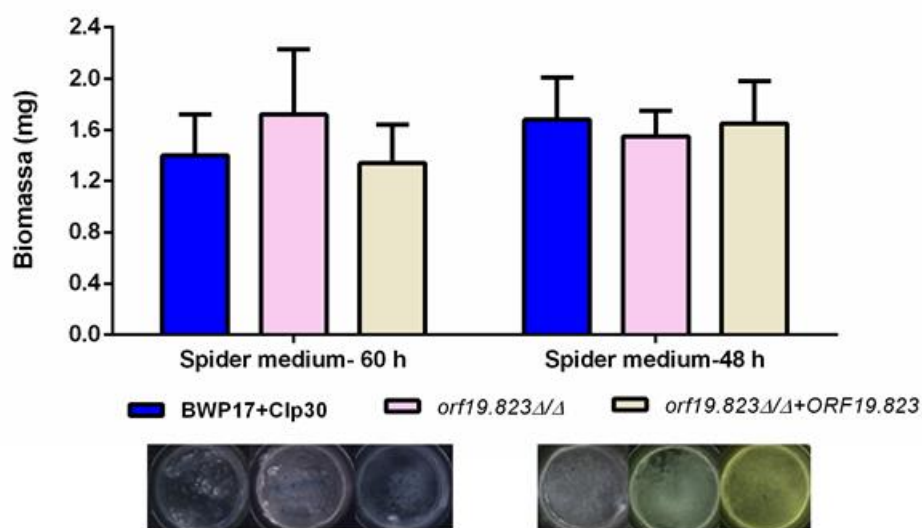


Figura 17- Acúmulo de biomassa e aparência de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.823Δ/Δ* e *orf19.823Δ/Δ*+ORF19.823 crescidos em Spider medium por 48 e 60 h sobre discos de poliestireno. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

A análise de caracterização funcional tinha mostrado um leve indício de defeito de crescimento de *orf19.823Δ/Δ* frente ao fator estressor de parede celular calcofluor branco, porém o teste foi repetido mais duas vezes e o padrão de crescimento não se repetiu. Desta forma, foi verificado o crescimento das cepas em meio líquido SD contendo diferentes concentrações de calcofluor branco, o qual somente para a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ foi observado leve defeito no crescimento da cepa mutante, de acordo com a Figura 18. Assim, o experimento foi

novamente repetido somente com a concentração de 400 µg/mL mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as cepas (Figura 19) (Método 4.6).

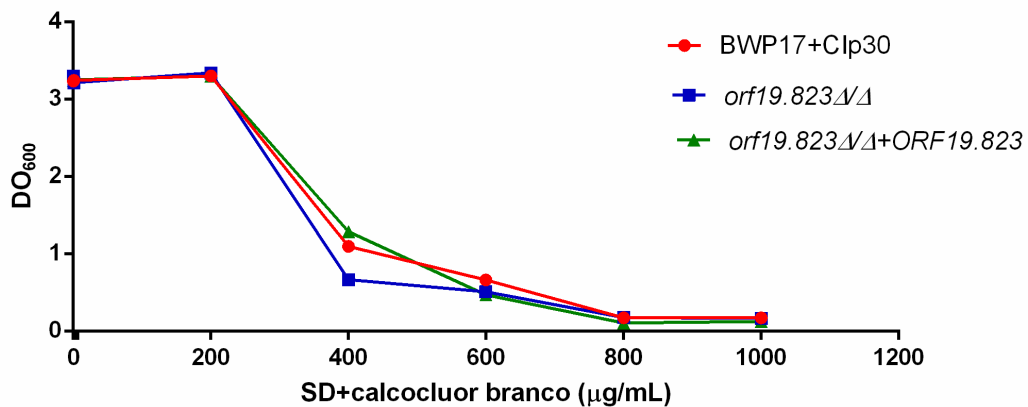


Figura 18- Crescimento das cepas BWP17+Clp30, *orf19.823ΔΔ* e *orf19.823ΔΔ+ORF19.823* em meio SD suplementado com diferentes concentrações de calcofluor branco a 30 °C/24 h determinado por medição da DO₆₀₀.

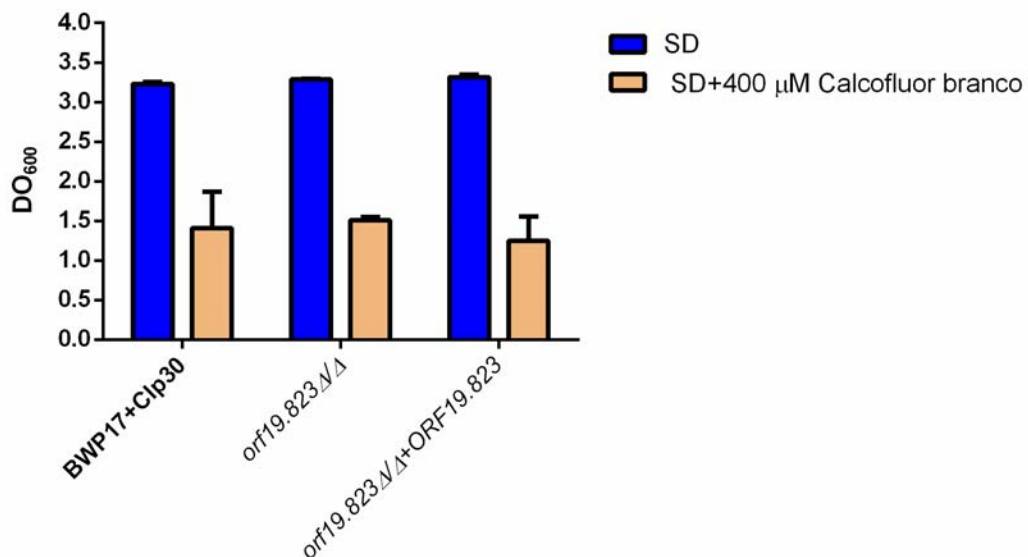


Figura 19- Crescimento das cepas BWP17+Clp30, *orf19.823ΔΔ* e *orf19.823ΔΔ+ORF19.823* em meio SD suplementado com 400 µg/mL de calcofluor branco a 30 °C/24 h determinado por medição da DO₆₀₀. Teste *t*, **p* < 0,05.

A suposta função do gene *ORF19.823* na interação patógeno-hospedeiro foi verificada pelo teste de dano a monocamada de células epiteliais bucais da linhagem TR146, onde não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as cepas (Figura 20) (Método 4.13).

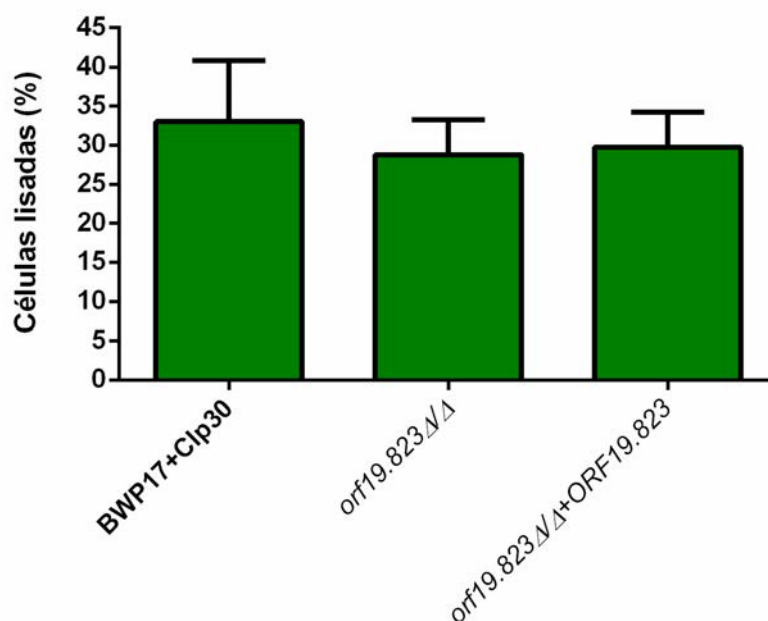


Figura 20- Dano celular provocado pelas cepas BWP17+Clp30, *orf19.823*Δ/Δ e *orf19.823*Δ/Δ+ORF19.823 em células epiteliais bucais da linhagem TR146 determinado por medição dos níveis da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Teste *t*, **p* < 0,05.

A proteína codificada pela *ORF19.7170* apresenta similaridade com duas proteínas com função desconhecida de *C. dubliniensis*, *CD36_73740* com 80% de identidade e 100% de similaridade e *CD36_73750* com 51% de identidade e 68% de similaridade, e uma proteína desconhecida de *C. tropicalis* (*CTRG_05151*, 36% de identidade e 76% de similaridade) de acordo com a análise BLAST. A base de dados Wolf PSORT mostrou que Orf19.7170p pode ser secretada, enquanto que as bases de dados SMART e TMHMM* sugerem

* Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

que Orf19.7170p seja uma proteína transmembrana de baixa complexidade.

No tempo de 4 h, a atividade metabólica do biofilme formado por *orf19.7170Δ/Δ* foi estatisticamente menor, porém este resultado não foi reproduzível como mostrado na Figura 18. Além disso, também foram avaliadas as atividades metabólicas dos biofilmes nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 24 e 48 h, o qual não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as cepas (Figura 21) (Método 4.2.2).

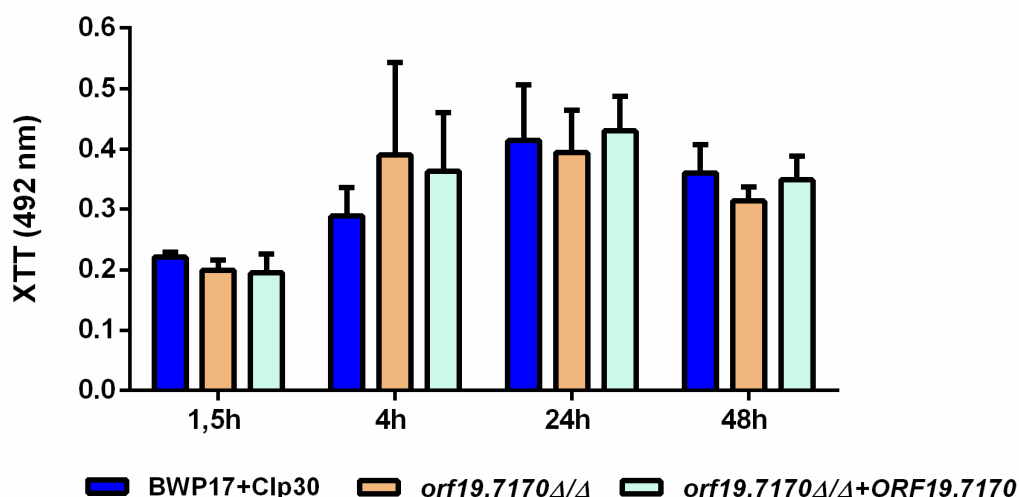


Figura 21- Atividade metabólica de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.7170Δ/Δ* e *orf19.7170Δ/Δ+ORF19.7170* crescidos em meio YNB+100 mM de glicose nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

Como a cepa *orf19.7170Δ/Δ* não apresentou defeito no acúmulo de biomassa quando crescida em Spider *medium* por 60 h, foi verificada a biomassa produzida pelas cepas parental, mutante e complementada quando crescidas em meio RPMI-MOPS e YNB acrescido de 100 mM de glicose. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para o meio RPMI-MOPS, contudo em meio YNB acrescido de 100 mM de glicose houve menor acúmulo de biomassa

que a cepa parental e a cepa complementada produziu menos biomassa que as cepas mutante e parental. Na análise visual pode-se observar que o biofilme produzido pela cepa mutante em RPMI-MOPS possui aparência desigual com espaços vazios e os biofilmes produzidos pelas três cepas em meio YNB acrescido de 100 mM de glicose apresentam irregularidades (Figura 22) (Método 4.3).

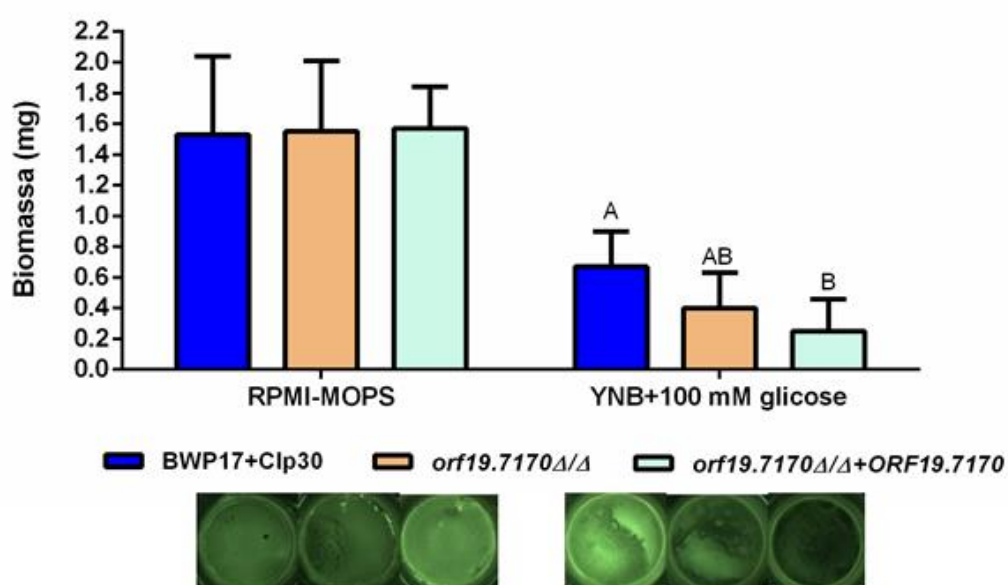


Figura 22- Acúmulo de biomassa e aparência de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.7170*Δ/Δ e *orf19.7170*Δ/Δ+ORF19.7170 crescidos em meio RPMI-MOPS e YNB+100 mM de glicose por 48 h sobre discos de poliestireno. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa, teste de Tukey, $p < 0,05$.

O dano provocado pela cepa *orf19.7170*Δ/Δ nas células epiteliais bucais foi menor que o dano provocado pela cepa parental, porém o resultado não foi estatisticamente significativo (Figura 23) (Método 4.13).

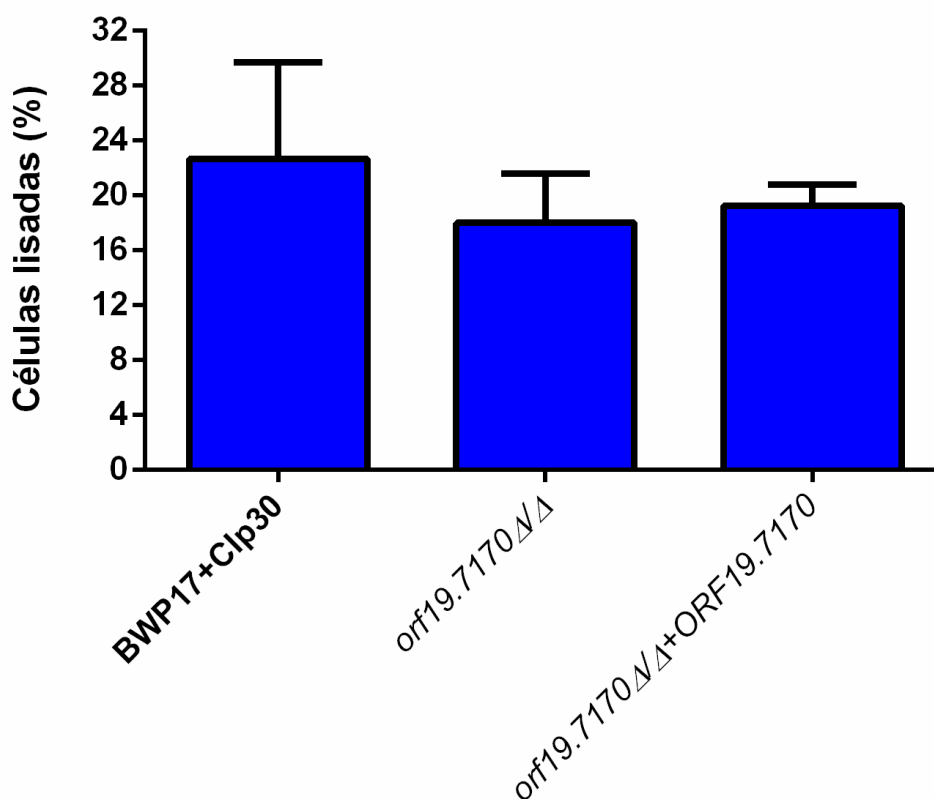


Figura 23- Dano celular provocado pelas cepas BWP17+Clp30, *orf19.7170ΔΔ* e *orf19.7170ΔΔ+ORF19.7170* em células epiteliais bucais da linhagem TR146 determinado por medição dos níveis da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Teste *t*, **p* < 0,05.

ORF19.6847 codifica uma proteína com alta similaridade com as proteínas de função desconhecida de *C. dubliniensis* (*CD36_04270*, 93% de identidade e 100% de similaridade), *C. maltosa* (*G 210_2781*, 74% de identidade e 98% de similaridade) e *C. tropicalis* (*CTRG_04705*, 74% de identidade e 98% de similaridade) de acordo com a análise BLAST. A análise BLAST e a base de dados CGD também apontaram fortes similaridades com o gene *TRM44* da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que codifica a proteína RNAt(Ser) Um(44) 2'-O-metiltransferase envolvida em manter os níveis de espécies de Ser-RNAt tS(CGA) e tS(UGA), conservada entre os metazoos e fungos, mas

parece não ser encontrada em plantas e, além disso, *TRM44* é um gene não essencial, conforme a base de dados *Saccharomyces Genome Database**. A base de dados Wolf PSORT sugere que Orf19.6847p seja uma proteína intracelular.

Apesar de inicialmente a cepa *orf19.6847Δ/Δ* não ter apresentado defeito para atividade metabólica do biofilme, o experimento foi repetido com *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* para os tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h mostrando atividade metabólica similar entre as cepas (Figura 24) (Método 4.2.2).

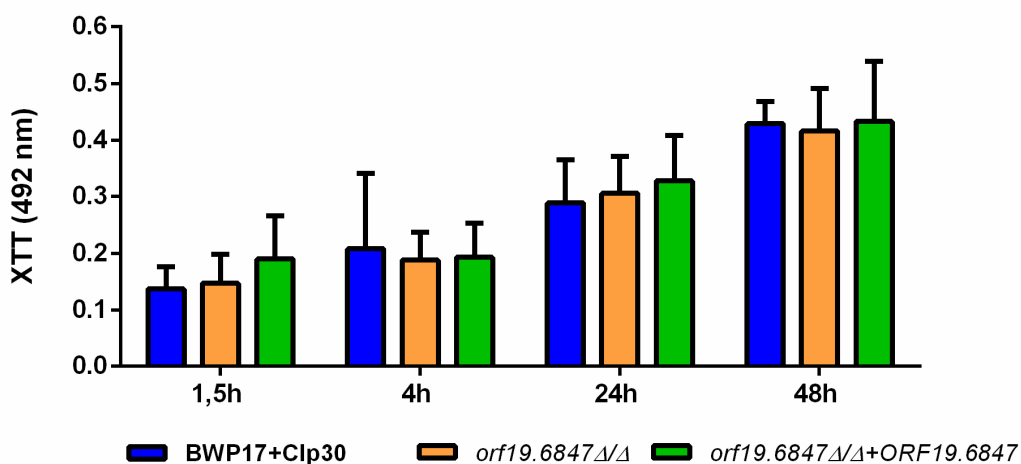


Figura 24- Atividade metabólica de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* crescidos em meio YNB+100 mM de glicose nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

O gene *ORF19.6847* foi selecionado, pois a cepa mutante apresentou significativa redução de acúmulo de biomassa para biofilme crescido em Spider *medium* por 60 h. Após a construção da cepa complementada, o experimento foi repetido obtendo novamente redução da biomassa para a cepa *orf19.6847Δ/Δ* e recuperação do fenótipo para a cepa complementada, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. A determinação da biomassa também foi realizada para os

* Disponível em: www.yeastgenome.org

biofilmes crescendo em meio RPMI-MOPS, YNB com 100 mM de glicose e Spider *medium* por 48 h, o qual não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre as cepas (Figura 25) (Método 4.3).

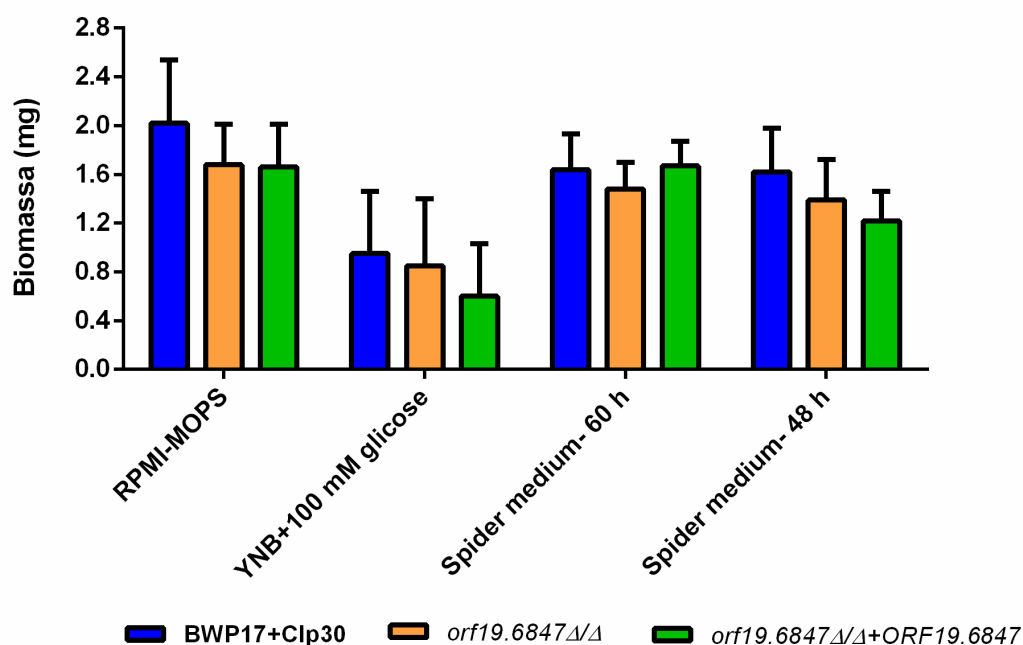


Figura 25- Acúmulo de biomassa de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847*Δ/Δ e *orf19.6847*Δ/Δ+ORF19.6847 crescidos em meio RPMI-MOPS e YNB+100 mM de glicose por 48 h e Spider medium por 48 e 60 h sobre discos de poliestireno. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

A análise visual foi realizada para os biofilmes das cepas estudadas nos diferentes meios de cultura e incubados por 48 ou 60 h. Dentre as condições, os biofilmes crescidos em meio RPMI-MOPS mostraram uma aparência mais madura e robusta que nos demais meios de cultura, onde foi possível observar que o biofilme formado por *orf19.6847*Δ/Δ apresentou diferença significativa quanto à aparência mostrando irregularidades e constituição menos adesiva conforme observado na Figura 26 (Método 4.3).

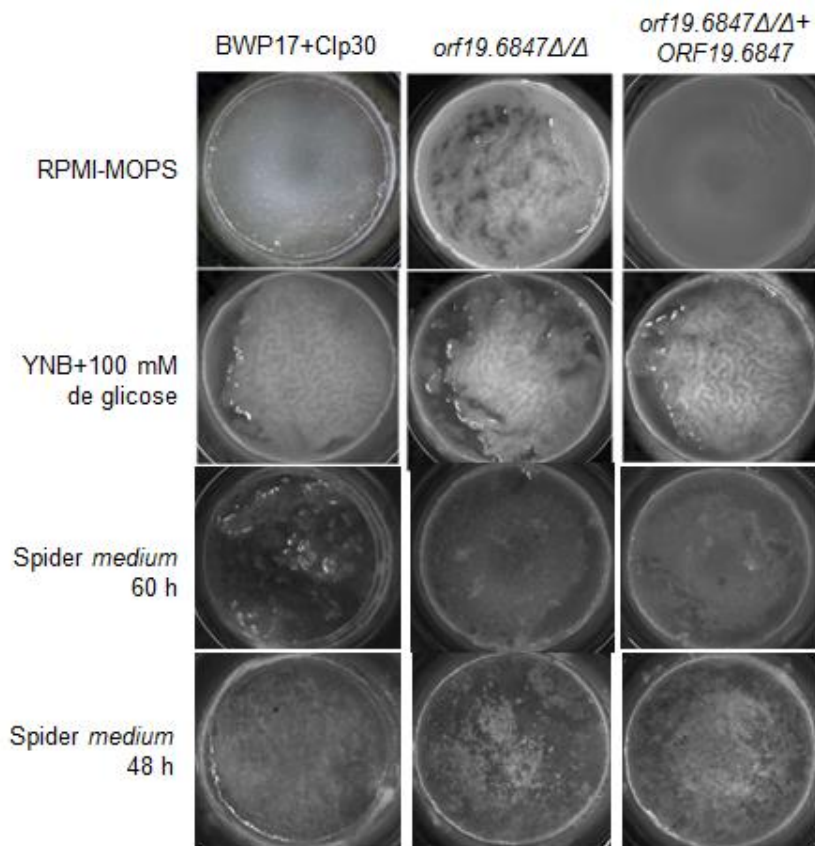


Figura 26- Aparência de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* crescidos em meio RPMI-MOPS e YNB+100 mM de glicose por 48 h e Spider medium por 48 e 60 h sobre discos de poliestireno.

Como a cepa mutante para o gene *ORF19.6847* produziu menos biomassa e não teve defeito para a atividade metabólica do biofilme, os resultados sugerem que a biomassa reduzida esteja relacionada com menor produção de matriz extracelular. Para testar esta hipótese, a matriz extracelular de biofilmes formados no fundo do poço da placa de 6 poços foi extraída para quantificação de β -1,3 glucana, que é o componente majoritário da matriz extracelular produzido por biofilmes de *Candida*, utilizando o kit GlucateLL (Nett J. et al., 2007). O biofilme formado por *orf19.6847Δ/Δ* produziu significativamente menos β -1,3 glucana que o biofilme formado pela cepa parental, porém a complementação não foi suficiente para reconstituir o fenótipo (Figura 27) (Método 4.12).

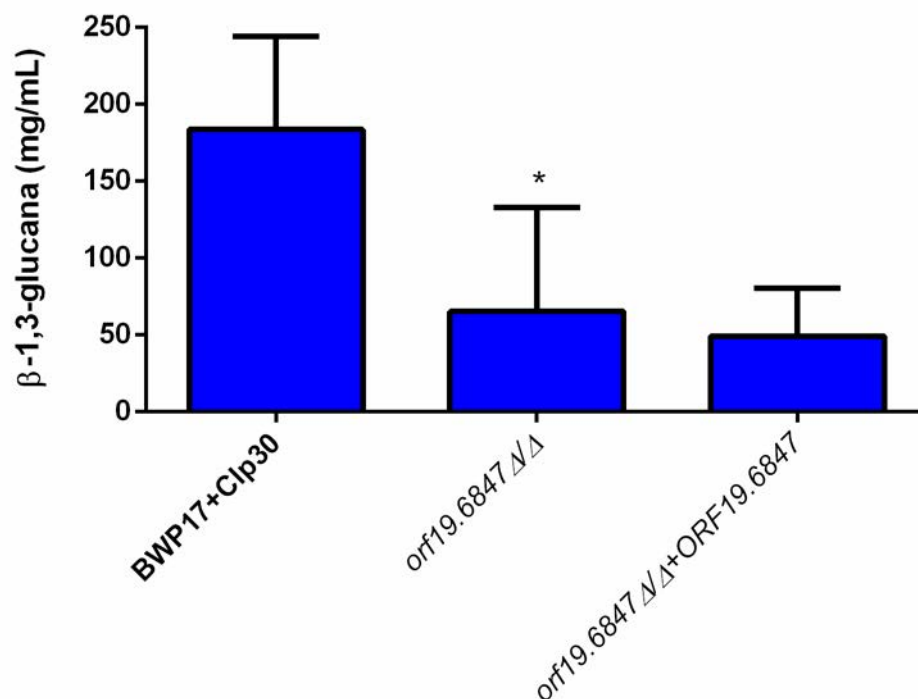


Figura 27- Concentração de β-1,3 glucana extraída da matriz extracelular de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847*Δ/Δ e *orf19.6847*Δ/Δ+ORF19.6847 no fundo do poço da placa de 6 poços em meio RPMI-MOPS por 48 h detectado pelo kit GlucateLL. Test *t*, **p* < 0,05.

Já que a matriz extracelular é um importante componente do biofilme maduro responsável por fornecer nutrientes e proteção às células da comunidade aos agentes antifúngicos, testes antifúngicos foram realizados em células planctônicas e biofilmes para verificar se a falta do gene *ORF19.6847* comprometeria a sensibilidade da célula fúngica. As células planctônicas das cepas parental, *orf19.6847*Δ/Δ e *orf19.6847*Δ/Δ+ORF19.6847 foram igualmente sensíveis aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina, apresentando CIM de 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. As cepas também apresentaram sensibilidade semelhante aos antifúngicos quando organizadas em biofilme, sendo resistentes a todas as concentrações de fluconazol testadas, menos resistentes as maiores concentrações de anfotericina B,

a partir de 0,25 mg/L, e sensíveis a caspofungina nas concentrações variando de 1-16 mg/mL (Figura 28, 29 e 30) (Método 4.10).

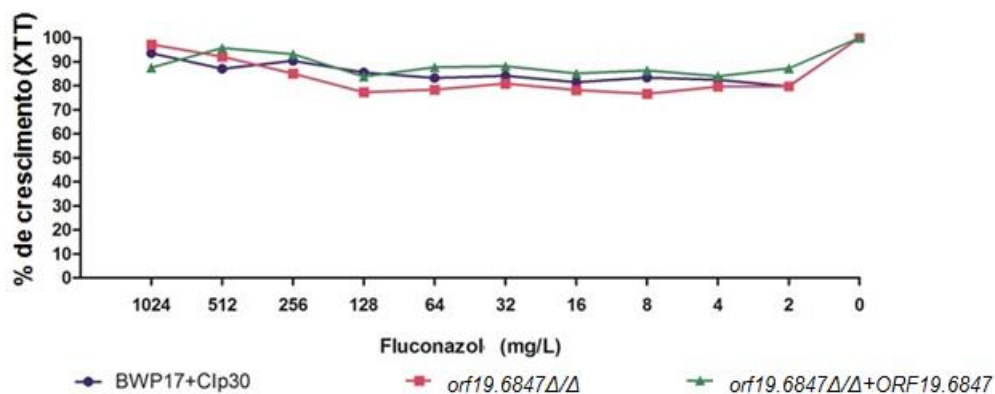


Figura 28- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ*+ORF19.6847 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico fluconazol determinada pelo ensaio XTT.

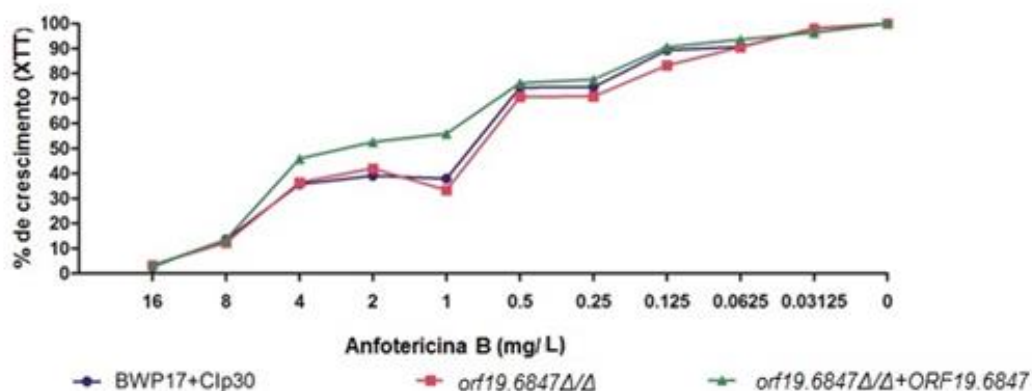


Figura 29- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ*+ORF19.6847 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico anfotericina B determinada pelo ensaio XTT.

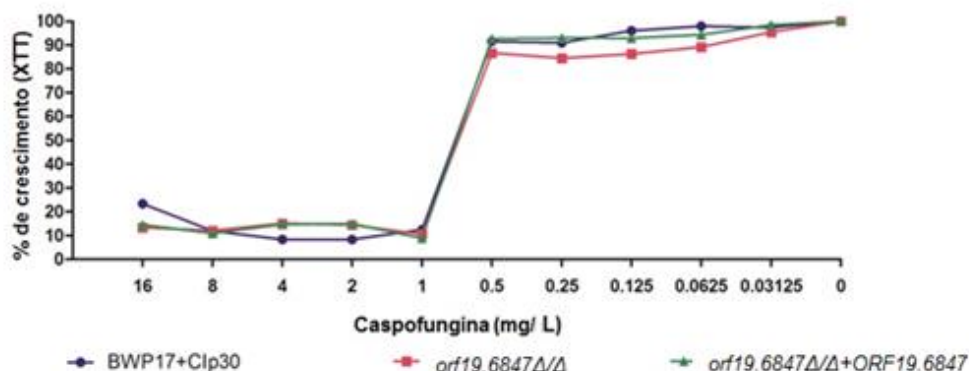


Figura 30- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* em meio RPMI-MOPS ao antifúngico caspofungina determinada pelo ensaio XTT.

A cepa mutante para o gene *ORF19.6847* apresentou leve defeito para dano nas células epiteliais bucais quando comparada com a cepa BWP17+Clp30, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. A complementação recuperou o fenótipo perdido nos mesmos níveis que a cepa parental (Figura 31) (Método 4.13).

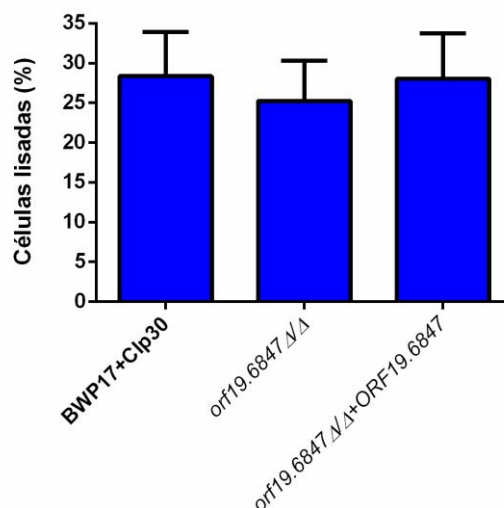


Figura 31- Dano celular provocado pelas cepas BWP17+Clp30, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* em células epiteliais bucais da linhagem TR146 determinado por medição dos níveis da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Teste *t*, **p* < 0,05.

O gene *ORF19.3908*, chamado *MRV8* (*MaRVel domain*), é um gene único para *C. albicans*, com exceção da espécie *C. dubliniensis* que é geneticamente relacionada (CGD). A análise *in silico* mostrou que a proteína codificada pelo gene *MRV8* apresenta similaridades com uma proteína de função desconhecida de *C. dubliniensis*, *CD36_53920*, apresentando 68% de identidade e 87% de similaridade, de acordo com a análise BLAST. Além disso, o gene *MRV8* possui 2 genes parálogos, *MRV6* e *MRV1*, também com funções desconhecidas. As bases de dados SMART, Wolf PSORT e TMHMM sugerem que *Mrv8p* seja uma proteína integral da membrana celular com quatro regiões transmembrana.

Foi avaliada atividade metabólica de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ*, *mrv8Δ/Δ+MRV8* nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h, o qual foi observada menor atividade metabólica para a cepa mutante para o gene *MRV8* no tempo de 24 h comparada à cepa parental e reconstituição do fenótipo para a cepa complementada. Além disso, houve também uma tendência de atividade metabólica menor para a cepa *mrv8Δ/Δ* no tempo de 48 h, porém o resultado não foi estatisticamente significativo (Figura 32) (Método 4.2.2).

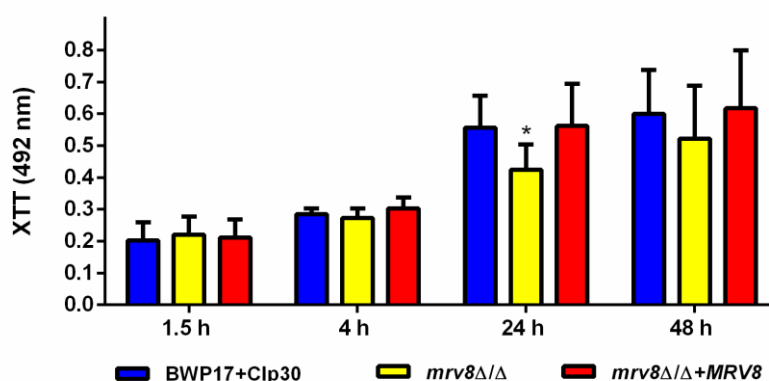


Figura 32- Atividade metabólica de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* crescidos em meio YNB+100 mM de glicose nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

Os biofilmes das cepas BWP17+Clp30, *mrp8Δ/Δ* e *mrp8Δ/Δ+MRV8* formados sobre discos de poliestireno em meio YNB com 100 mM de glicose por 24 h foram observados por MEV para estudo de sua arquitetura. As imagens mostram que o biofilme formado por BWP17+Clp30 é constituído predominantemente por hifas e tubos germinativos, enquanto que os biofilmes formados por *mrp8Δ/Δ* e *mrp8Δ/Δ+MRV8* são constituídos de leveduras e pseudohifas distribuídos espaçadamente sobre o substrato (Figura 33) (Método 4.8).

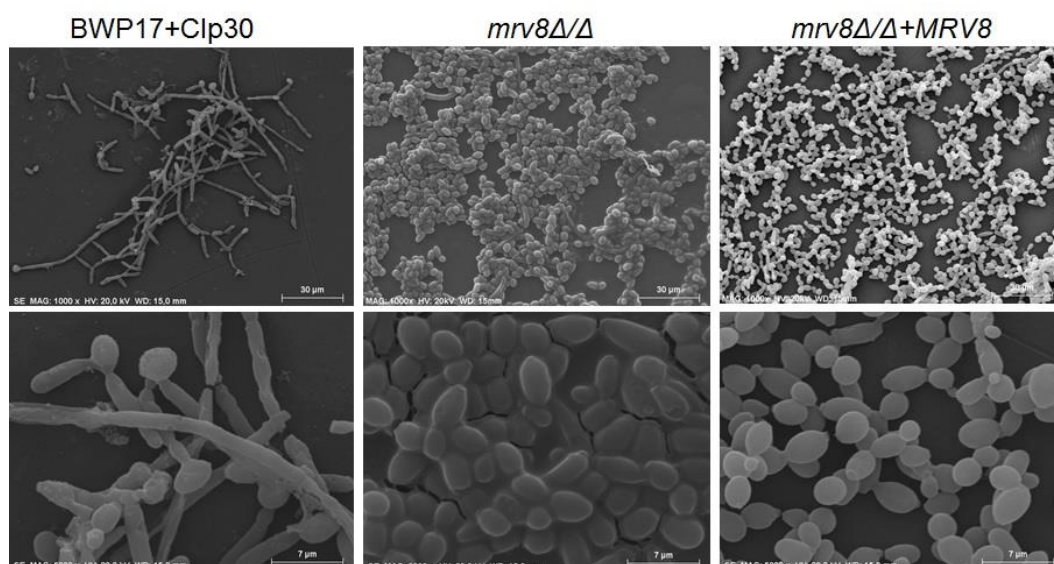


Figura 33- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrp8Δ/Δ* e *mrp8Δ/Δ+MRV8* em meio YNB+100 mM de glicose por 24 h sobre discos de poliestireno, nos aumentos de 1000x e 5000x.

Foi verificado também a curva de crescimento das cepas BWP17+Clp30 e *mrp8Δ/Δ* em suspensão em meio YPD e SD a 30°C/24 h, o qual foi similar para as duas cepas crescidas nos dois meios de cultura (Figura 34) (Método 4.9).

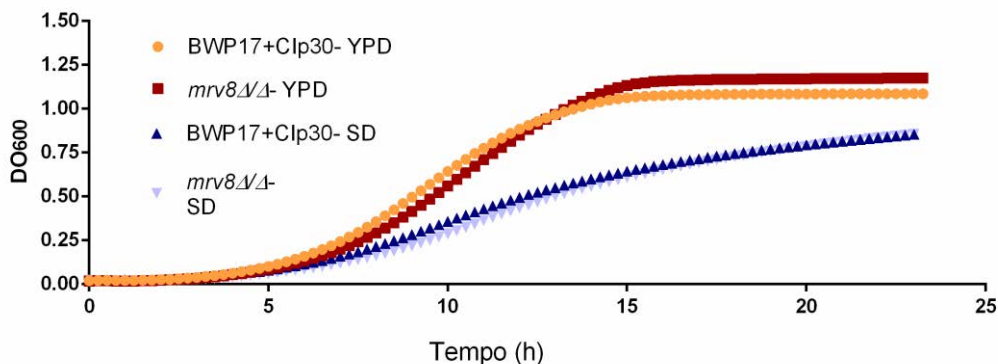


Figura 34-Curva de crescimento para as cepas BWP17+Clp30 e *mrV8Δ/Δ* crescidas em meio YPD e SD a 30 °C/24 h determinado por medição da DO₆₀₀.

O gráfico apresentado na Figura 35 mostra que a cepa *mrV8Δ/Δ* acumulou menos biomassa que a cepa BWP17+Clp30 quando crescida nos meios RPMI-MOPS por 48 h e Spider *medium* por 60 h e houve recuperação do fenótipo para *mrV8Δ/Δ*+*MRV8*, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Para a análise visual, o meio de cultura que mostrou diferença significativa entre as cepas foi RPMI-MOPS, em que se pode observar que o biofilme formado para a cepa mutante para o gene *MRV8* apresenta espaços vazios e irregularidades quando comparado aos biofilmes formados pelas cepas parental e complementada (Método 4.3).

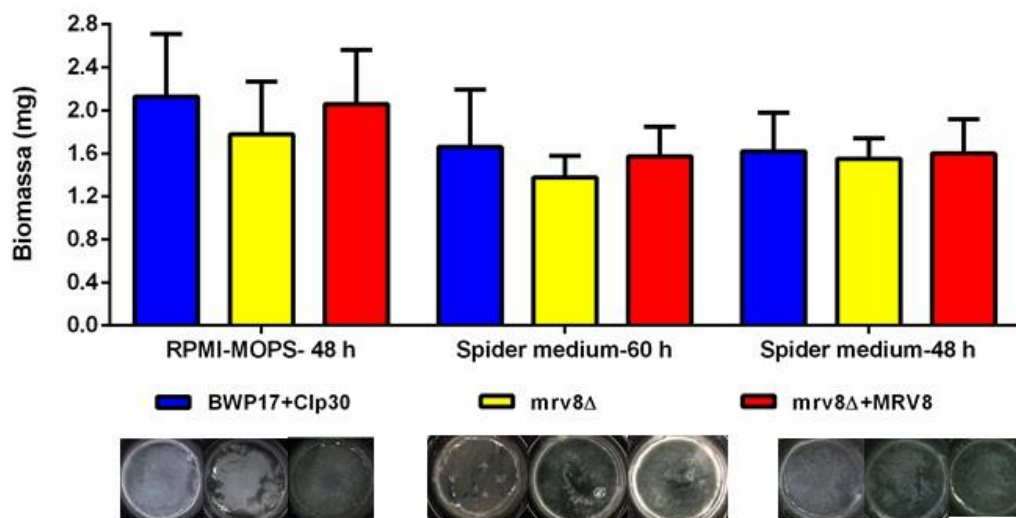


Figura 35- Acúmulo de biomassa e aparência de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* crescidos em meio RPMI-MOPS por 48 h e Spider medium por 48 e 60 h sobre discos de poliestireno. Teste de Tukey, * $p < 0,05$.

Os biofilmes formados pelas cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* sobre discos de poliestireno crescidos em Spider medium por 60 h também foram analisados por MEV. As imagens mostraram que o biofilme formado pela cepa BWP17+Clp30 é um biofilme maduro com estrutura tridimensional constituído por leveduras, hifas e pseudohifas formando canais. O biofilme formado pela cepa *mrv8Δ/Δ* foi composto predominantemente por leveduras e pseudohifas agrupadas e aderidas de forma espaçada sobre o substrato, enquanto que o biofilme formado pela cepa *mrv8Δ/Δ+MRV8* também foi formado predominantemente por leveduras e pseudohifas, porém apresenta maior agrupamento de células com poucos espaçamentos sobre o substrato (Figura 36) (Método 4.8).

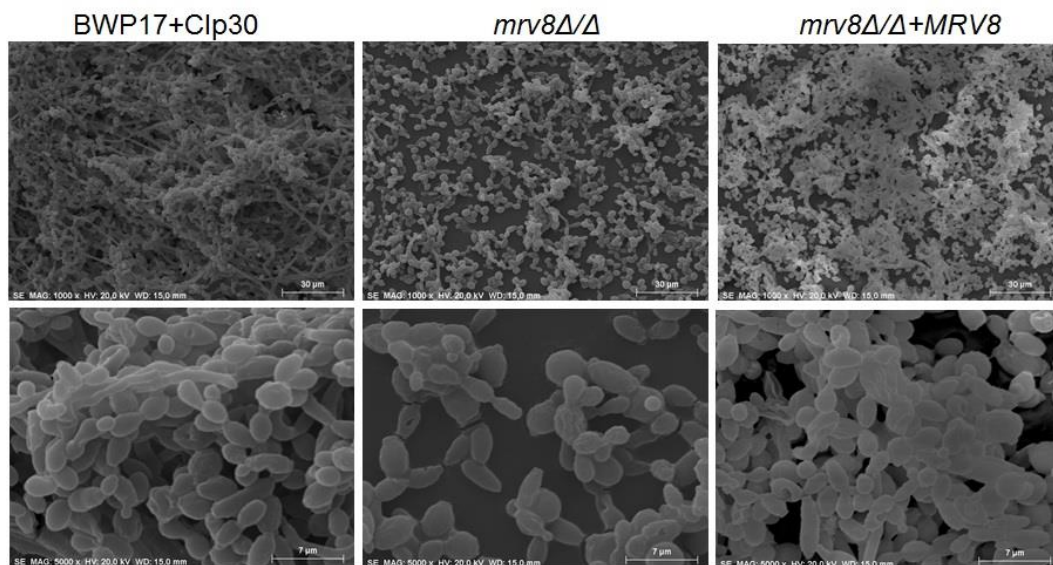


Figura 36- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 em Spider medium por 60 h sobre discos de poliestireno, nos aumentos de 1000x e 5000x.

Assim como a cepa mutante para o gene *ORF19.6784*, a cepa *mrv8Δ/Δ* apresentou menor acúmulo de biomassa o que pode estar relacionado à menor produção de matriz extracelular, por isso a matriz extracelular foi extraída de biofilmes crescidos em meio RPMI-MOPS por 48 h e a quantificação de β -1,3 glucana foi realizada com o kit GlucateLL. Os resultados mostraram que a cepa mutante para o gene *MRV8* apresentou alta variabilidade nos valores de quantificação de β -1,3 glucana quando comparado aos resultados obtidos para a cepa parental (Figura 37) (Método 4.12).

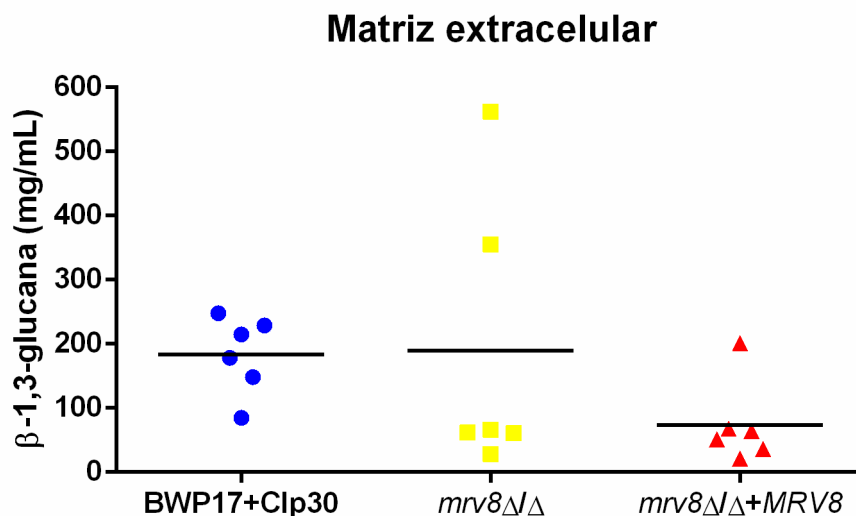


Figura 37- Concentração de β -1,3 glucana extraída da matriz extracelular de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8* Δ/Δ e *mrv8* Δ/Δ +MRV8 no fundo do poço da placa de 6 poços em meio RPMI-MOPS por 48 h detectado pelo kit GlucateLL.

As células planctônicas e biofilmes formados pelas cepas BWP17+Clp30, *mrv8* Δ/Δ e *mrv8* Δ/Δ +MRV8 também foram avaliados quanto à sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina. A CIM para as culturas planctônicas das cepas avaliadas foi a mesma para os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina, 1 μ g/mL, 0,5 μ g/ml e 1 μ g/mL, respectivamente. Os testes antifúngicos em biofilme mostraram resistência das cepas a todas concentrações de fluconazol testadas e maior sensibilidade ao antifúngico anfotericina B nas concentrações a partir de 25 mg/mL, visto que não houve diferença de sensibilidade entre as cepas (Figura 38 e 39). Já os testes com o antifúngico caspofungina mostraram que até a concentração de 4 mg/L os resultados foram similares entre as cepas, mas nas concentrações de 16 e 32 mg/L a atividade metabólica do biofilme foi maior que nas concentrações mais baixas e para a cepa mutante para o gene *MRV8* o crescimento foi maior que para as cepas BWP17+Clp30 e complementada (Figura 40). Desta forma, os testes foram repetidos para

as concentrações de 16 e 32 mg/L indicando que sem tratamento o biofilme formado pela cepa parental é estatisticamente mais ativo metabolicamente que o biofilme formado pela cepa mutante, mas quando tratado com caspofungina o biofilme formado pela cepa mutante é estatisticamente mais ativo que os biofilmes formados pelas cepas parental e complementada nas duas concentrações (Figura 41) (Método 4.10).

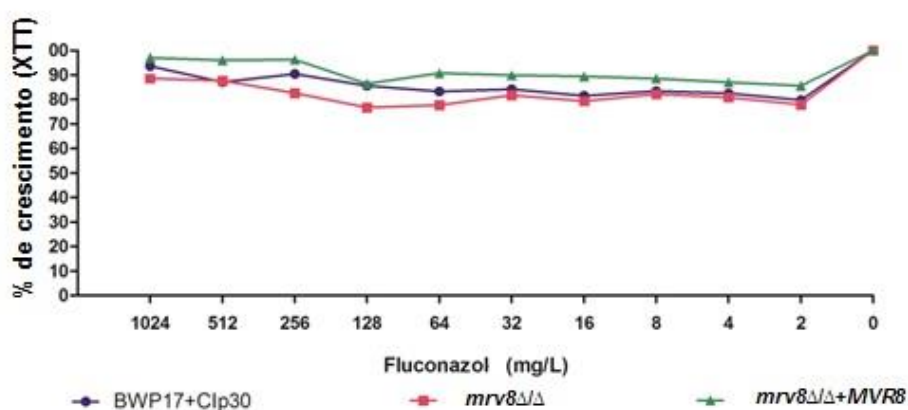


Figura 38- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrV8*Δ/Δ e *mrV8*Δ/Δ+MVR8 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico fluconazol determinada pelo ensaio XTT.

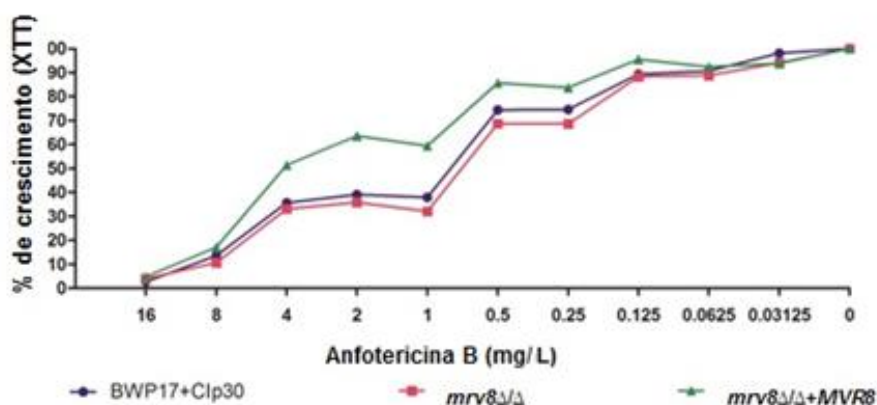


Figura 39- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrV8*Δ/Δ e *mrV8*Δ/Δ+MVR8 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico anfotericina B determinada pelo ensaio XTT.

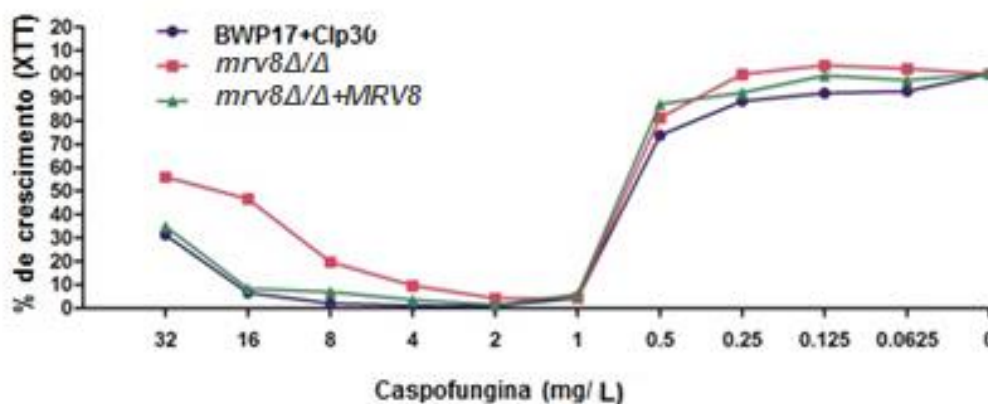


Figura 40- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico caspofungina determinada pelo ensaio XTT.

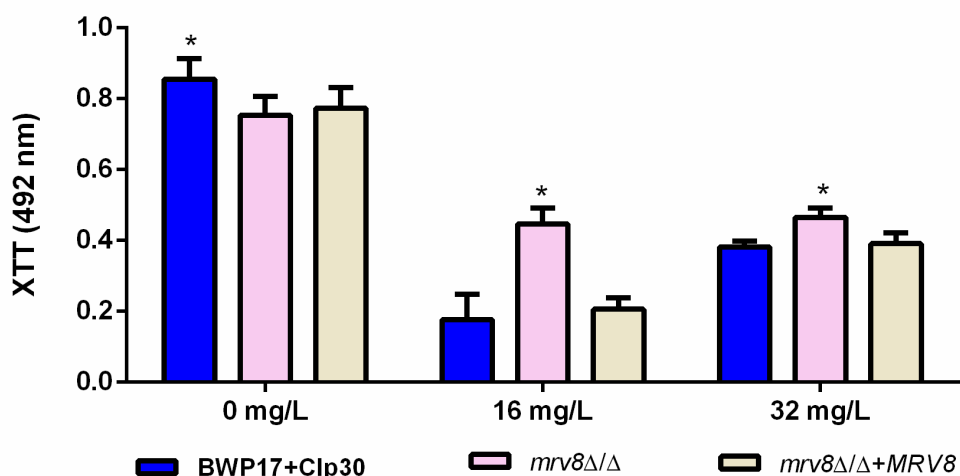


Figura 41- Susceptibilidade de biofilmes formados por BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 em meio RPMI-MOPS ao antifúngico caspofungina nas concentrações de 0, 16 e 32 mg/L determinada pelo ensaio XTT. Teste *t*, **p* < 0,05.

Em altas concentrações de caspofungina a célula ativa mecanismos de defesa, como por exemplo aumento da síntese de quitina (Pierce et al., 2008; Walker et al., 2013; Rueda et al., 2014), por isso os biofilmes tratados e não tratados com caspofungina foram avaliados

quanto à quantidade de quitina usando coloração com calcofluor branco e medição da fluorescência emitida. Os resultados obtidos não mostraram diferença de quantidade de quitina entre os biofilmes formados pelas cepas estudadas (Figura 42) (Método 4.11).

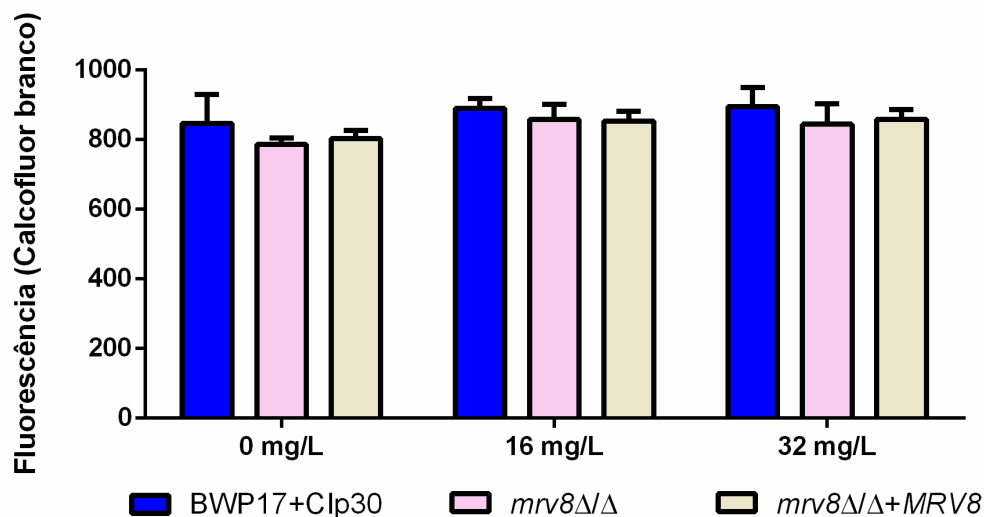


Figura 42- Quantificação de quitina presente nos biofilmes formados pelas cepas BWP17+Cip30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 em meio RPMI-MOPS tratados com o antifúngico caspofungina nas concentrações de 0, 16 e 32 mg/L detectada por coloração com calcofluor branco e leitura da emissão de fluorescência em leitor de microplaca. Teste *t*, **p* < 0,05.

Além da caracterização funcional realizada em paralelo para os 4 genes de interesse, também foi investigada a sensibilidade da cepa *mrv8Δ/Δ* comparada com as cepas BWP17+Cip30 e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 aos agentes estressantes osmóticos NaCl e sorbitol e agente estressante de membranas SDS em diferentes concentrações e condições de incubação, porém não foi observada diferença de crescimento entre as cepas. Para os testes com SDS realizados em meio base SD não foi observado crescimento algum das cepas investigadas (Tabela 5). Por isso, foram realizados testes de crescimento em meio líquido SD contendo diferentes concentrações de SDS e 5% de etanol a

30 °C/24 h, porém não foi observada diferença significativa de crescimento entre as cepas (Figura 43) (Método 4.6).

Tabela 5- Caracterização funcional do crescimento das cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* na presença dos agentes estressantes NaCl, sorbitol e SDS em diferentes concentrações e condições de incubação

| Condições | MRV8 |
|-----------------------------------|--|
| SD+1,5 M de NaCl- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+2 M de NaCl- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+2,5 M de NaCl- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+1,5 M de sorbitol- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+2 M de sorbitol- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+2,5 M de sorbitol- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| YPD+0,06% de SDS- 37°C | Sem diferença |
| YPD+0,1% de SDS- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| YPD+0,15% de SDS- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| YPD+0,01% de SDS- 30°C e 37°C | Sem diferença |
| SD+0,06% de SDS- 30°C e 37°C | Não houve crescimento de nenhuma das cepas |
| SD+0,1% de SDS- 30°C e 37°C | Não houve crescimento de nenhuma das cepas |
| SD+0,15% de SDS- 30°C e 37°C | Não houve crescimento de nenhuma das cepas |
| SD+0,2% de SDS- 30°C e 37°C | Não houve crescimento de nenhuma das cepas |

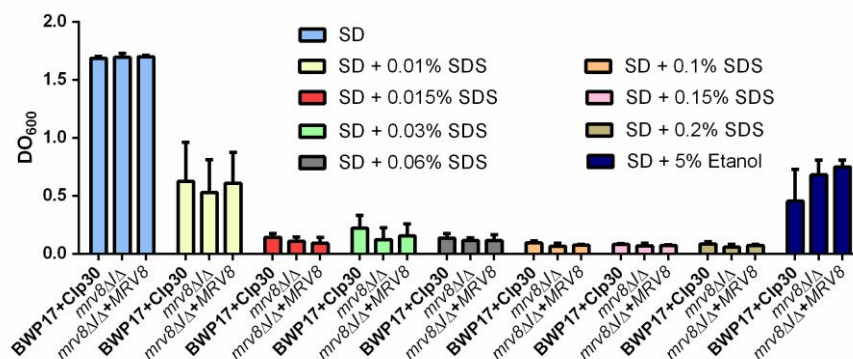


Figura 43- Crescimento das cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* em meio SD suplementado com diferentes concentrações de SDS e 5% de etanol a 30 °C/24 h determinado por medição da DO₆₀₀. Teste de Tukey, *p < 0,05.

As cepas também foram avaliadas quanto à capacidade de danificar as células epiteliais bucais, onde foi observado que a cepa *mrV8Δ/Δ* apresentou defeito significativo para dano comparado ao dano provocado pela cepa parental e a complementação reconstituiu o fenótipo nos mesmos níveis que a cepa parental (Figura 44) (Método 4.13). Desta forma, foi verificada a capacidade de invasão, aderência e filimentação sobre as células epiteliais.

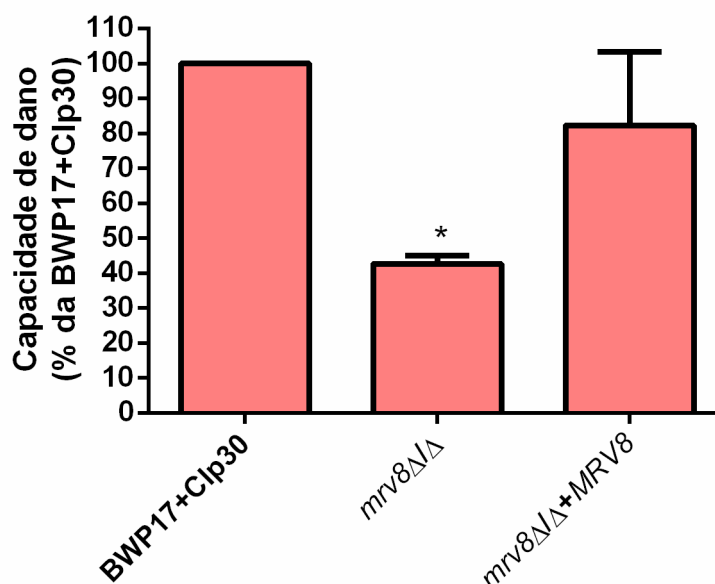


Figura 44- Dano celular provocado pelas cepas BWP17+Clp30, *mrV8Δ/Δ* e *mrV8Δ/Δ+MRV8* em células epiteliais bucais da linhagem TR146 determinado por medição dos níveis da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) expressado como porcentagem considerando dano total provocado pela cepa BWP17+Clp30 (100%). Teste *t*, **p* < 0,05.

Para o ensaio de invasão em células epiteliais bucais nos tempos de contato de 3 e 6 h foi observada leve redução do número de células invasoras para a cepa *mrV8Δ/Δ* e recuperação do fenótipo para a cepa complementada, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 45). As imagens do ensaio de invasão revelam que as hifas formadas pelas cepas parental e complementada parecem ser mais

compridas e com mais ramificações que aquelas formadas pela cepa mutante nos dois tempos analisados (Figura 46) (Método 4.13).

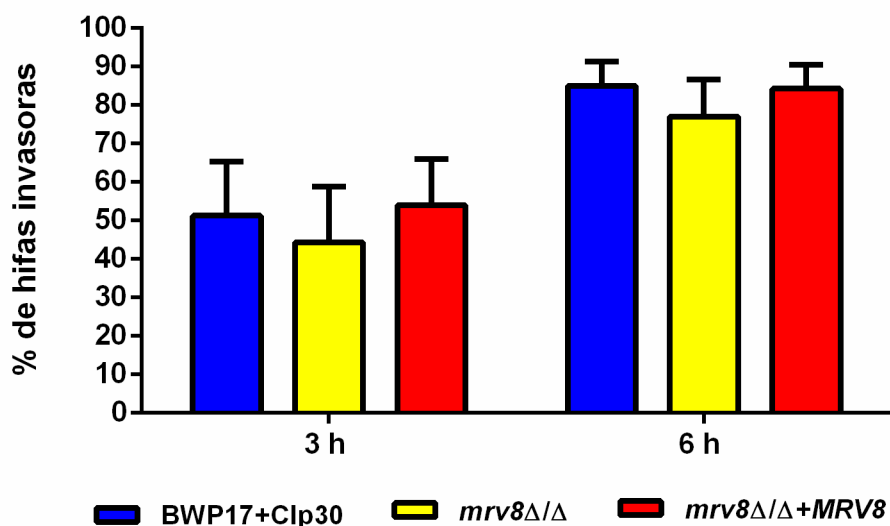


Figura 45- Contagem de hifas invasoras das cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* sobre monocamadas de células epiteliais bucais (TR146) em contato por 3 e 6 h. Teste *t*, **p* < 0,05.

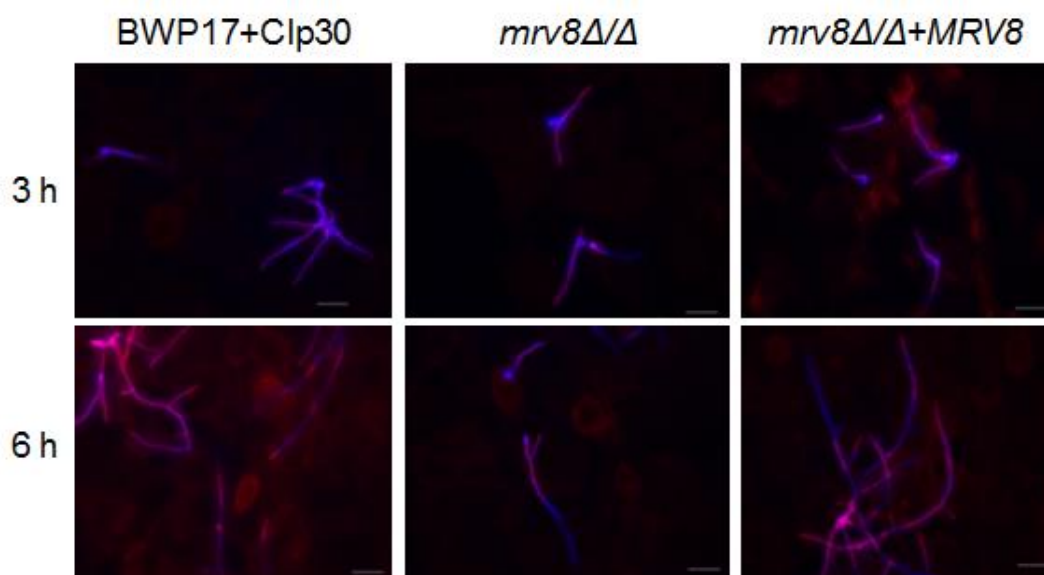


Figura 46- Hifas invasoras das cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ+MRV8* coradas com Alexa flúor 488 e calcofluor branco sobre monocamadas de células epiteliais bucais (TR146) em contato por 3 e 6 h.

O ensaio de aderência foi realizado no tempo de 3 h de contato mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre o perfil de aderência das cepas estudadas (Figura 47) (Método 4.13).

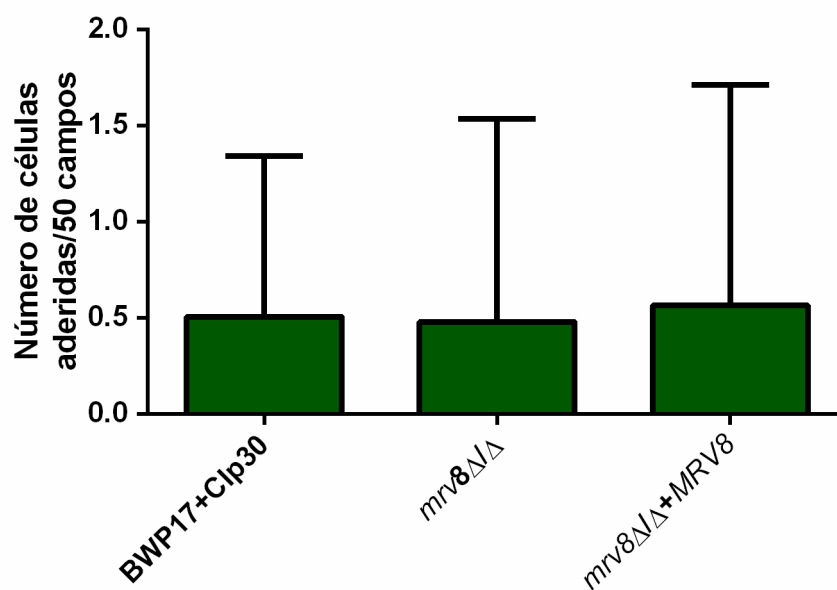


Figura 47- Quantificação de células das cepas BWP17+Clp30, *mrv8*Δ/Δ e *mrv8*Δ/Δ+MRV8 aderidas às células epiteliais bucais (TR146) em contato por 3 h. Teste *t*, **p* < 0,05.

O comprimento das hifas aderidas às células epiteliais bucais em interação por 3 e 6 h foi semelhante entre as cepas BWP17+Clp30 e *mrv8*Δ/Δ (Figura 48) (Método 4.7).

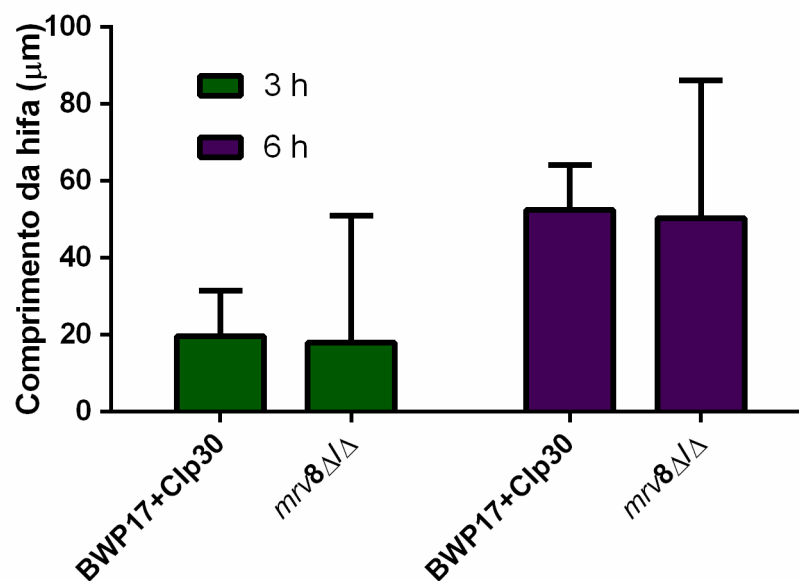


Figura 48- Comprimento das hifas das cepas BWP17+Clp30, *mrv8ΔΔ* e *mrv8ΔΔ+MRV8* aderidas às células epiteliais bucais (TR146) em contato por 3 e 6 h. Teste *t*, **p* < 0,05.

Para tentar explicar o defeito para dano da cepa *mrv8ΔΔ*, foi checado o crescimento de microcolônias sobre as células epiteliais bucais em interação por 24 h. As dimensões das microcolônias foram medidas mostrando que as microcolônias formadas pela cepa mutante foram significativamente menores que aquelas formadas pela cepa parental e a complementação reconstituiu o fenótipo, como pode ser visto no gráfico e imagens apresentadas na Figura 49. As dimensões das microcolônias também foram avaliadas sobre o plástico e os resultados foram similares aos obtidos para interação com as células epiteliais bucais, as microcolônias formadas pelas cepas mutantes foram estatisticamente menores e a complementação recuperou o fenótipo (Figura 50) (Método 4.7).

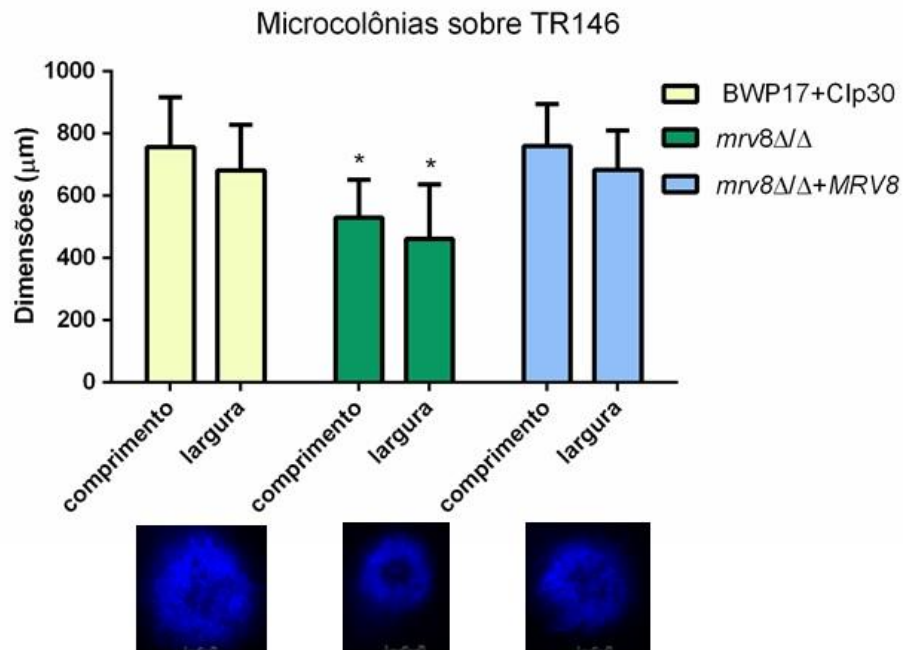


Figura 49- Dimensões das microcolônias formadas pelas cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 crescidas sobre as células epiteliais bucais (TR146) por 24 h coradas com calcofluor branco. Teste *t*, **p* < 0,05.

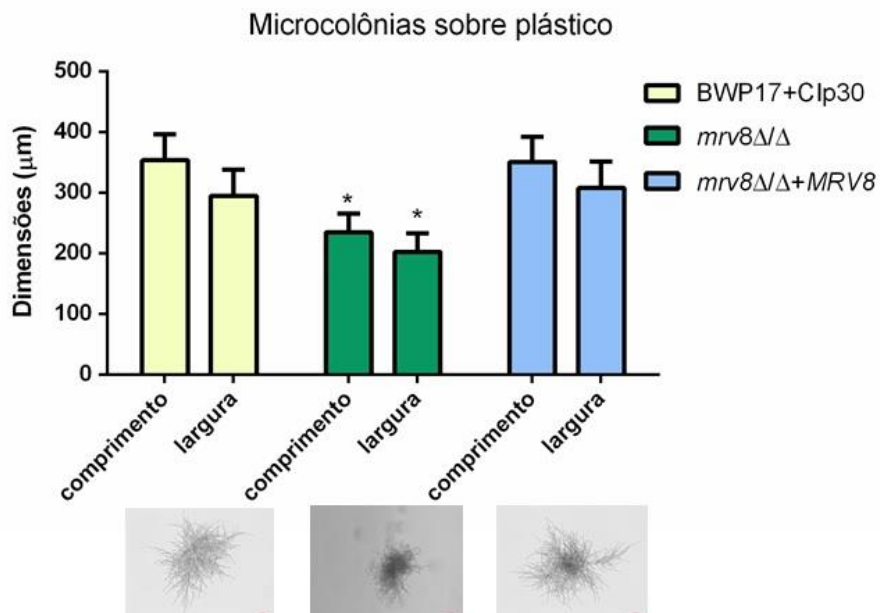


Figura 50- Dimensões das microcolônias formadas pelas cepas BWP17+Clp30, *mrv8Δ/Δ* e *mrv8Δ/Δ*+MRV8 crescidas sobre o fundo da placa de 12 poços em meio DMEM por 24 h. Teste *t*, **p* < 0,05.

Foi verificado o padrão de invasão das cepas BWP17+Clp30, *mrV8* Δ/Δ e *mrV8* Δ/Δ +MRV8 em 1,5 e 4% de ágar contendo ágar Spider ou 10% de SFB semeadas entre duas camadas de meio de cultura mostrando que todas as cepas foram capazes de filamentar com padrões semelhantes entre elas, como mostrado nas imagens da Figura 51 (Método 4.7).

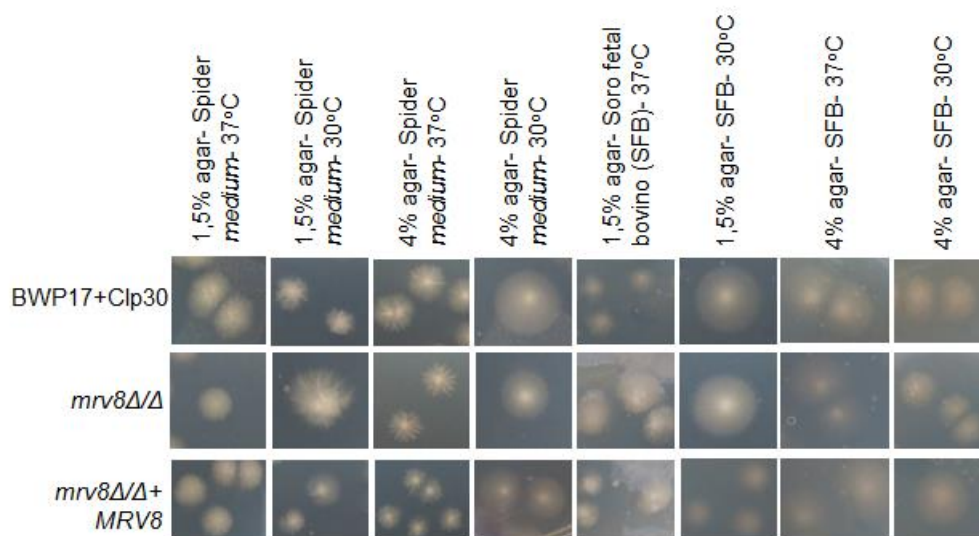


Figura 51- Verificação do padrão de invasão das cepas BWP17+Clp30, *mrV8* Δ/Δ e *mrV8* Δ/Δ +MRV8 em 1,5 e 4% de ágar Spider medium ou com 10% de SFB a 30 e 37 °C por 7 dias de incubação.

A patogenicidade das cepas BWP17+Clp30 e *mrV8* Δ/Δ foi avaliada no modelo animal experimental ovo embrionado de galinha por 7 dias mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as cepas como mostrando na Figura 52 (Método 4.14).

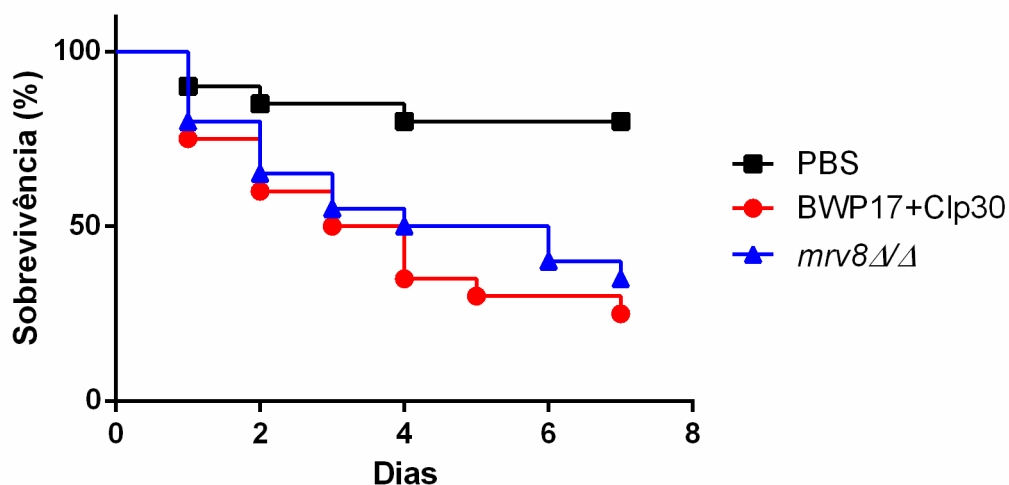


Figura 52- Curva de sobrevivência para os ovos embrionados infectados com as cepas BWP17+Clp30 e *mrv8*Δ/Δ. Os ovos foram verificados por 7 dias. Teste log-rank, $p < 0,05$.

Foi avaliada a expressão dos genes *NDT80* e *MRV8* em células de *C. albicans* em interação com células epiteliais bucais e plástica por 3 e 6 h. A Figura 53 mostra que o gene *NDT80* foi mais expresso na cepa mutante para o gene *MRV8* quando em interação com células epiteliais bucais nos dois tempos quando comparada com a expressão na cepa parental. Assim como o gene *MRV8* que também foi super expresso em interação com células epiteliais bucais nos dois tempos para cepa *mrv8*Δ/Δ (Figura 54) (Método 4.15). Como a cepa *mrv8*Δ/Δ é mutante para o gene *MRV8*, foi investigada a presença de genes parálogos no genoma de *C. albicans*. A sequência do gene *MRV8* foi alinhada com o genoma de *C. albicans* SC5314 usando a ferramenta ClustalW2* revelando a presença de 2 genes parálogos, *MRV1* e *MRV6*. Estes genes ainda não foram caracterizados. *MRV6* encontra-se antes de *MRV8* no cromossomo 5 e *MRV1* está localizado no cromossomo 4. Ambos apresentam mais de 70% de similaridade com a sequência de

* Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2.index.html>

nucleotídeos de *MRV8* e mais de 50% de similaridade com a sequência de aminoácidos de Mrv8p. De acordo com a análise BLAST, os pares de *primers* desenhados para anelar na sequência do gene *MRV8* poderiam se anelar aos genes *MRV1* e *MRV6*. O gene *MRV8* é considerado único para a espécie *C. albicans*, embora seja encontrado na espécie *C. dubliniensis*, porém os genes *MRV1* e *MRV6* são únicos somente para a espécie *C. albicans* (CGD).

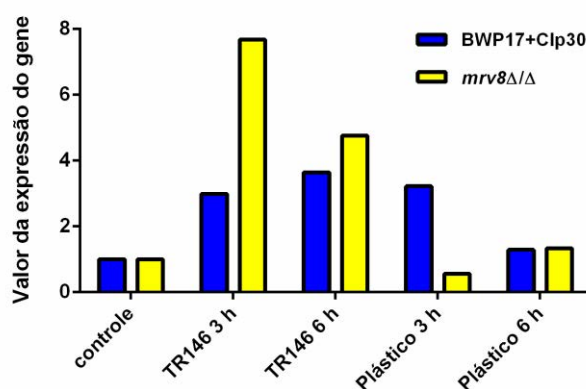


Figura 53- Expressão do gene *NDT80* em células das cepas BWP17+Clp30 e *mrv8Δ/Δ* em contato com células epiteliais bucais (TR146) e plástico por 3 e 6 h. O controle foi constituído por células de cultura em YPD a 30 °C/16-18 h. O gene *ACT1* foi usado como normalizador.

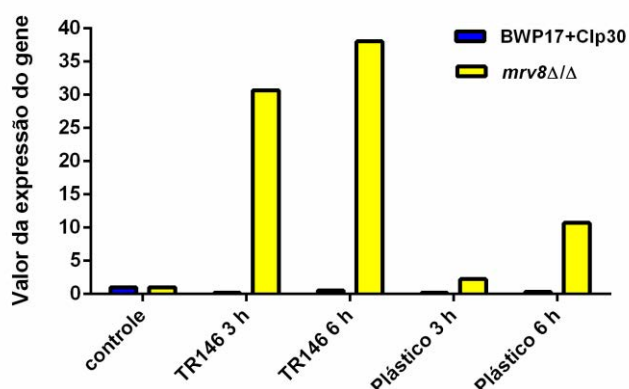


Figura 54- Expressão do gene *MRV8* em células das cepas BWP17+Clp30 e *mrv8Δ/Δ* em contato com células epiteliais bucais (TR146) e plástico por 3 e 6 h. O controle foi constituído por células de cultura em YPD a 30 °C/16-18 h. O gene *ACT1* foi usado como normalizador.

A Figura 55 mostra o perfil de expressão dos genes parálogos *MRV8*, *MRV1* e *MRV6* em células das cepas BWP17+Clp30 e *mrv8Δ/Δ* crescidas em condições sésseis em meio YNB com 100 mM de glicose por 24 h a 37 °C, utilizando os novos *primers* desenhados (“GOI”-qPCR-for e “GOI”-qPCR-rev). Os resultados obtidos mostraram mais uma vez a expressão do gene *MRV8* para a cepa *mrv8Δ/Δ*, indicando inespecificidade do par de *primers*. Ainda sim, podemos observar que a expressão do gene *MRV8* foi maior para a cepa parental que para a cepa mutante. Entretanto, a expressão dos outros dois genes parálogos, *MRV1* e *MRV6*, parecem ser “down” regulados para a cepa parental quando comparada com a expressão do gene *MRV8*. Os RNAs extraídos foram utilizados como *template* para reação de qPCR, o qual não foram observados produtos amplificados (Método 4.15).

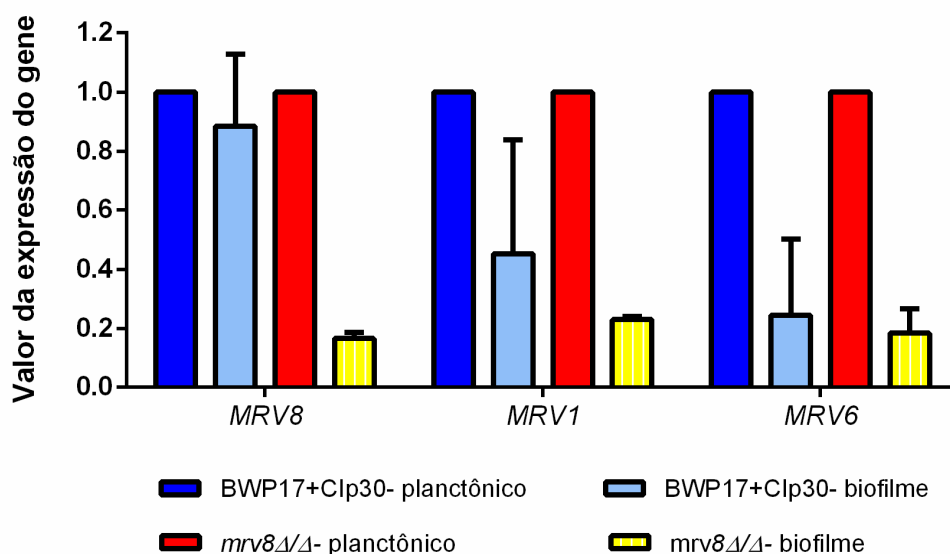


Figura 55- Expressão dos genes parálogos *MRV8*, *MRV1* e *MRV6* em células das cepas BWP17+Clp30 e *mrv8Δ/Δ* crescidas em fase de biofilme em meio YNB+100 mM de glicose a 37 °C/24 h. O grupo controle foi composto por células planctônicas crescidas em meio YNB+100 mM de glicose a 30 °C/24 h. O gene *ACT1* foi usado como normalizador.

6 DISCUSSÃO

Avaliando os resultados, foi observado que as análises de quantificação de células desprendidas, atividade metabólica, quantificação de biomassa e análise visual apresentaram os resultados mais confiáveis para a seleção das cepas e estudo de cepas mutantes. Os resultados obtidos para a contagem de UFC/mL das células aderidas ao biofilme com o uso do sonicador (quantificação de células viáveis) foram interpretados com cautela, pois este método pode fornecer resultados falsos. Cepas cuja agregação é menor podem se soltar mais facilmente e fornecer um valor mais alto na contagem de UFC/mL, enquanto que um biofilme cujas células se coagregam intensamente restará poucos agregados e, conseqüentemente, um valor mais baixo para contagem de UFC/mL. Taff et al. (2011) avaliaram 7 métodos de quantificação de biofilme usando a cepa DAY185 (tipo selvagem) e cepas mutantes para os genes *ALS3* e *ALS1/ALS3*. Os autores observaram que o método do XTT foi o mais reprodutível, apresentou melhor acurácia e foi o mais eficiente para quantificar a formação de biofilme. A contagem de células viáveis foi um método reprodutível e considerado razoável para quantificação de biofilme. Entretanto, os autores ressaltaram que métodos que requerem a remoção do biofilme aderido, como quantificação total de DNA, qPCR, proteína total e quantificação de células viáveis, pode fornecer uma coleta de células inconsistente. O método de análise da biomassa tem sido utilizado para analisar a formação de biofilme por cepas mutantes em comparação com a cepa tipo selvagem (Nobile et al., 2005, 2009, 2012).

Nobile et al. (2012) avaliaram 165 reguladores transcricionais quanto à formação de biofilme de *C. albicans* através da

medida da biomassa e análise visual, dos quais 6 mutantes foram selecionados para estudo da rede de circuito de controle transcricional: *bcr1* Δ/Δ , *tec1* Δ/Δ , *efg1* Δ/Δ , *ndt80* Δ/Δ , *rob1* Δ/Δ e *brg1* Δ/Δ . Foi demonstrado que 1061 genes foram regulados por pelo menos um dos 6 reguladores de biofilme. Além disso, foi observado que os 6 reguladores controlam a expressão dos outros reguladores: os 6 reguladores ligam-se as regiões promotoras de *BCR1*, *TEC1*, *EFG1* e *BRG1*; Tec1, Efg1, Ndt80 e Rob1 ligam-se a *ROB1*; Efg1 e Ndt80 ligam-se a *NDT80*; sendo que a regulação entre os reguladores é positiva. Bcr1, Efg1, Ndt80, Rob1 e Brg1 são ativadores e repressores de seus genes alvos, enquanto que Tec1 age somente como ativador em genes envolvidos com a formação de biofilme. Assim, considerando todos os genes alvos dos 6 reguladores, a rede de genes do biofilme compreende 15% do genoma de *C. albicans*. Sendo assim, o *screening* de 34 cepas mutantes de *C. albicans* para genes com função desconhecida revelou 9 genes com função envolvida na formação e desenvolvimento de biofilme, foram eles: *DUR31* (*ORF19.6656*), *ORF19.7504*, *ORF19.6501*, *ORF19.823*, *ORF19.7170*, *PGA32* (*ORF19.6784*), *ORF19.6847*, *MRV8* (*ORF19.3908*) e *DOT5* (*ORF19.5417*).

O gene *ORF19.6656* selecionado no presente estudo foi descrito por Mayer et al. (2012a). Este gene chamado *DUR31* codifica um transportador de sódio localizado na membrana plasmática, o qual não apresenta homologia com nenhum gene humano. Foi demonstrado o papel de Dur31 na assimilação de poliamina (espermidina) como fonte de nutriente, importação de histatina 5 levando a suscetibilidade a esta substância e contribuição para virulência mediada pela filamentação observada em meio sólido como resultado de alcalinização extracelular, destruição epitelial e endotelial e evasão imune. Suas múltiplas funções transportadoras e exclusividade na célula de *C. albicans* despertam o interesse para investigações mais extensivas das funções deste gene na formação de biofilme.

O gene *ORF19.7504* selecionado através de testes em biofilme é supostamente um componente do complexo da proteína fosfatase 2A apresentando um gene ortólogo no genoma de *Sacharomyces cerevisiae*, *RTS3*, que também parece ser um componente da mesma proteína (CGD; SGD). A cepa mutante para este gene apresentou elevada atividade metabólica e menor quantidade de células desprendidas no tempo de desenvolvimento de 12 h, sugerindo defeito para o brotamento de novas células ou destacamento da célula mãe. Além disso, apresentou efeito temporal diferenciado para formação de biofilme com menor atividade metabólica para os tempos de 4 e 48 h e maior atividade metabólica para 12 h de desenvolvimento.

O biofilme para a cepa mutante para o gene *ORF19.7170* apresentou menor valor para atividade metabólica e mais células desprendidas nos primeiros estágios de desenvolvimento do biofilme, além de biomassa menor e aparência irregular quando comparado com a cepa parental. Estes resultados podem indicar a falta de funções relacionadas à fisiologia da célula ou morfologia.

As cepas mutantes para os genes *MRV8* e *ORF19.6847* apresentaram fenótipos similares e interessantes para formação de biofilme quanto ao valor obtido para a biomassa que foi estatisticamente menor que a biomassa obtida para a cepa parental, além da aparência visual irregular, sugerindo que estes genes possam estar relacionados a produção de matriz extracelular.

Os resultados obtidos para a cepa mutante para o gene *DOT5*, como menor biomassa e aparência irregular do biofilme, sugerem deficiência na produção de matriz extracelular. Este gene é um suposto tiol peroxidase nuclear envolvido na desintoxicação de espécies reativas de nitrogênio que são produzidas por neutrófilos (Miramón et al., 2012).

A cepa mutante para o gene *ORF19.6501* liberou mais células dispersas nos tempos de 4 e 24 h de crescimento do biofilme, além de apresentar aparência irregular para análise visual. Este gene

apresenta supostamente atividade como lipase monoglicerol responsável por catalisar a reação de água com acilglicerol produzindo ácido graxo e glicerol. Foi demonstrado que o glicerol está envolvido na aderência, acúmulo de biomassa, formação de biofilme em cateter venoso central de rato e regulação da expressão dos genes das adesinas Als1p, Als3p e Hwp1p, porém o mecanismo de ação específico do glicerol para a formação de biofilme de *C. albicans* ainda permanece desconhecido (Desai et al., 2013).

No presente estudo, a cepa mutante para o gene *ORF19.823* mostrou fenótipo alterado para atividade metabólica e aparência visual do biofilme em relação à cepa parental, indicando possível defeito para organização da arquitetura tridimensional do biofilme provavelmente por conter menos células.

O gene *ORF19.6784*, chamado *PGA32*, é uma suposta proteína da parede celular fixada a β -1,6-glucona por meio de glicofosfatidilinositol (*Glycophosphatidylinositol*- GPI). O biofilme para a cepa mutante deste gene apresentou menor atividade metabólica para os estágios de 1,5, 4 e 48 h de crescimento. Foram identificadas proteínas ancoradas ao GPI que são importantes fatores de virulência com função de aderência e atividade histolítica, por exemplo. Os genes da mesma família que *PGA32*, *PGA59* e *PGA62*, participam da estabilidade e estrutura da parede celular e apresentam menor papel para morfogênese da hifa, porém não são críticos para formação de biofilme (Moreno-Ruiz et al., 2009). Wilson D et al. (2014) mostraram que o gene *PGA16* desempenha papel importante na interação patógeno-hospedeiro mediando a ramificação de hifas e dano epitelial *in vitro*.

Os biofilmes das cepas mutantes e parental foram crescidos após o tempo de aderência em meio YNB com 100 mM de glicose suplementado com 2,5% de etanol. Os resultados mostraram maior sensibilidade de quatro cepas mutantes, *dur31 Δ / Δ* , *orf19.823 Δ / Δ* , *pga32 Δ / Δ* e *mrv8 Δ / Δ* , no tempo de desenvolvimento de 24 h. Ao

contrário, no tempo de 48 h foi observado aumento de tolerância e adaptação nas cepas sem o genes *ORF19.7504*, *6501*, *6847*, *MRV8* e *DOT5*. O álcool é um metabólito produzido durante o crescimento anaeróbico que afeta o crescimento das células, mas por outro lado é considerado uma molécula sinalizadora. Chauhan et al. (2013) avaliaram os efeitos de álcoois de cadeia curta como butanol, propanol, isobutanol, isopropanol e butanol terciário em filimentação, crescimento, viabilidade e desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* mostrando que concentrações baixas variando de 0,5-4% foram capazes de inibir o crescimento das células e bloquear a transição de leveduras para hifas sem afetar a viabilidade celular. Além disso, os autores também obtiveram redução da atividade metabólica do biofilme de 24 h em 50-60%, resultado semelhante ao obtido neste estudo, porém foi interessante observar que no tempo de 48 h algumas cepas mutantes se adaptaram e foram tolerantes ao etanol sugerindo sinalização negativa para o biofilme percebido por estes genes, *ORF19.7504*, *6501*, *6847*, *MRV8* e *DOT5*, que estão ausentes na cepa parental. Os autores sugerem que os álcoois são moléculas sinalizadoras importantes, pois são produzidas em condições anaeróbicas de crescimento que bloqueia totalmente a produção da molécula sinalizadora farnesol. Condições anaeróbicas suportam a produção de álcoois que inibem a filimentação e podem favorecer a disseminação das leveduras para sítios com baixa concentração desta molécula (Chauhan et al., 2013).

Foi demonstrado que a proteína álcool desidrogenase codificada pelo gene *ADH1*, responsável por catalisar a conversão de acetaldeído em etanol, foi *down* regulada durante a formação do biofilme de *C. albicans*. A cepa *adh1Δ/Δ* apresentou maior habilidade de formar biofilme *in vitro* e *in vivo* e invadir e danificar células da mucosa do tecido do hospedeiro. Soluções de álcool variando de 2-80% foram adicionadas as células aderidas de *C. albicans* e os biofilmes foram avaliados após 24 h de incubação. Na presença de 10% de etanol foi observada redução

significativa da atividade metabólica e biomassa, demonstrando que sob condições de inibição por produtos metabólicos tóxicos para o biofilme, o gene *ADH1* pode ser *down* regulado de forma a evitar a toxicidade mediada pelo etanol proveniente do metabolismo (Mukherjee et al., 2006).

O zinco é um importante micronutriente envolvido em muitos processos celulares, como por exemplo, é componente da imunidade nutricional do hospedeiro e cofator de enzimas do hospedeiro e do patógeno (Nobile et al., 2009; Citiulo et al., 2012). A expressão do fator de transcrição Zap1p é dependente da concentração de zinco. Este fator de transcrição está diretamente implicado na formação de biofilme, pois é um regulador negativo para a produção de β -1,3 glucana, que é o componente majoritário da matriz extracelular do biofilme maduro (Nobile et al., 2012). Além disso, Zap1p apresenta funções contrárias: promove o acúmulo de farnesol, um inibidor da formação de hifas e promove o acúmulo de inibidores de células leveduriformes, porém o controle destas vias e a conexão entre moléculas do *quorum-sensing* e matriz extracelular ainda são desconhecidas (Ganguly et al., 2011). A hipótese de que a falta de zinco no biofilme poderia afetar o desenvolvimento do biofilme diminuindo a atividade metabólica e favorecendo a dispersão das células foi testada neste estudo. Entretanto, para os biofilmes da cepa parental formados por 1,5, 24 e 48 h em meio de cultura com e sem 5 μ M de ZnSO₄ não houve diferença para atividade metabólica e dispersão das células.

A possibilidade de que a adição de 100 μ M de farnesol após 24 h de formação do biofilme poderia afetar a morfologia das células diminuindo a atividade metabólica e por outro lado aumentando a dispersão das células foi testada. De maneira geral, a adição de farnesol não causou grande efeito no desenvolvimento dos biofilmes, exceto para a cepa mutante para o gene *ORF19.6501* que apresentou significativa redução da atividade metabólica, enquanto que a dispersão das células para a cepa mutante para o gene *ORF19.823* também apresentou

significativa redução. A ausência de resultados esperados pode ser explicada pelo estudo de Ramage et al. (2002) que avaliaram o efeito de diferentes concentrações de farnesol (0-300 μ M) na formação de biofilme por *C. albicans*. O farnesol foi adicionado aos biofilmes com tempo de desenvolvimento de 0, 1, 2, 4 e 24 h e o biofilme foi avaliado após 24 h de incubação. A redução de formação do biofilme foi dose-dependente e dependente do tempo de desenvolvimento, em que para a maior concentração utilizada houve prevenção da formação de tubos germinativos, resultando num biofilme escasso ou não existente quando adicionado nos períodos de pré-incubação. Análise microscópica demonstrou que uma vez que a formação da hifa tinha iniciado, ela não foi inibida pela adição de farnesol e a formação do biofilme não foi afetada, porém o biofilme maduro de 24 h apresentou valor baixo para leitura da atividade metabólica (XTT).

Com os 9 genes de interesse selecionados, partiu-se para a construção das cepas complementadas. Foram obtidos 6 transformantes para os genes *ORF19.823*, *ORF19.7504*, *MRV8*, *ORF19.7170*, *ORF19.6847* e *DOT5* com o plasmídio TOPO. A seguir, foi possível a construção de 4 cepas complementadas: *orf19.823 Δ / Δ +ORF19.823*, *orf19.7170 Δ / Δ +ORF19.7170*, *orf19.6784 Δ / Δ +ORF19.6784* e *mrv8 Δ / Δ +MRV8*. As demais cepas complementadas não foram construídas devido a dificuldades técnicas, como na amplificação de genes, ligação do inserto ao plasmídio Clp10 e na transformação da cepa *E. coli* DH5 α com os plasmídios e insertos construídos.

O estudo do gene *ORF19.823* não revelou nenhuma evidência de participação na interação patógeno-hospedeiro de acordo com os testes realizados. A cepa mutante para o gene *ORF19.823* não apresentou defeito algum para a caracterização funcional e nem para filamentação em meio líquido e sólido. A cepa *orf19.823 Δ / Δ* apresentou o mesmo padrão de crescimento quando comparada a cepa parental na

presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e frente a diferentes fontes de estresse oxidativo, osmótico, térmico e da parede celular. A princípio, o crescimento de *orf19.823Δ/Δ* na presença do agente estressor da parede celular calcofluor branco foi afetado, assim os testes foram repetidos em meio líquido, porém não houve diferença significativa entre as cepas. Estes resultados indicam que o gene *ORF19.823* não é importante para expressão das características básicas de sobrevivência e defesa da levedura *C. albicans*.

Os testes em biofilmes com as cepas *orf19.823Δ/Δ* e *orf19.823Δ/Δ+ORF19.823* revelaram que os resultados obtidos no *screening* não foram reprodutíveis. Para a seleção dos genes de interesse, a cepa *orf19.823Δ/Δ* tinha produzido biofilmes nos tempos de 1,5, 4 e 48 h com menor atividade metabólica, mas na repetição dos experimentos incluindo a cepa complementada os resultados anteriores não foram reproduzidos, provavelmente devido a pequena diferença alcançada anteriormente ou variação biológica. Porém para análise visual foi observada diferença na aparência do biofilme formado por *orf19.823Δ/Δ* que mostrou ser desigual. Os resultados para determinação da biomassa foram semelhantes entre o *screening* e a segunda etapa incluindo a cepa complementada. Os achados mostram fraca participação do gene *ORF19.823* na formação e desenvolvimento do biofilme.

A cepa *orf19.823Δ/Δ* também foi avaliada quanto a capacidade de causar dano nas células epiteliais bucais apresentando fenótipo comparável a cepa parental. Este resultado já era esperado já que a cepa *orf19.823Δ/Δ* não apresenta defeito para formação de hifas e nem formação de biofilme que são fatores de virulência importantes no processo de infecção (Junqueira et al., 2011; Mayer et al., 2012a). Como não foi observado dano nas células epiteliais bucais causados pela cepa *orf19.823Δ/Δ*, não foram realizados os ensaios de aderência e invasão, uma vez que estes são passos que antecedem o dano epitelial, e teste de

patogenicidade em ovo embrionado de galinha que é um modelo de infecção mais complexo e por isso com mais alternativas de defesa.

A cepa mutante para o gene *ORF19.7170* não apresentou defeito algum para caracterização funcional e filamentação, embora tenha apresentado leve defeito para acúmulo de biomassa e dano celular. Para caracterização funcional, a cepa *orf19.7170Δ/Δ* apresentou crescimento comparável a cepa parental na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e condições de estresse. Além disso, não apresentou defeito para filamentação em meio sólido.

O *screening* revelou que o biofilme de 4 h formado pela cepa *orf19.7170Δ/Δ* foi menos metabolicamente ativo que o biofilme formado pela cepa parental, porém o resultado não foi reprodutível quando avaliado novamente com a cepa complementada. Em adição, a atividade metabólica também foi avaliada nos tempos de 1,5, 24 e 48 h sem diferença significativa entre as cepas. Para análise da biomassa, anteriormente o biofilme formado pela cepa *orf19.7170Δ/Δ* não tinha apresentado defeito para acúmulo de biomassa quando crescido em *Spider medium* por 60 h. Assim, foram avaliadas outras condições de crescimento em meio RPMI-MOPS e YNB com 100 mM de glicose por 48 h mostrando acúmulo de biomassa semelhante entre as cepas quando crescida no primeiro meio de cultura e acúmulo de biomassa significativamente menor em YNB com 100 mM de glicose por 48 h, porém a análise visual revelou que os biofilmes crescidos neste meio apresentaram aparência desigual sem evidências de estrutura tridimensional madura.

A cepa *orf19.7170Δ/Δ* danificou menos as células epiteliais bucais em interação por 24 h, mas o resultado não foi estatisticamente significativo. Em um estudo recente foi avaliado o papel de genes únicos de *C. albicans* para a interação patógeno-hospedeiro, mostrando que a cepa *orf19.7170Δ/Δ* também apresentou leve dano para células epiteliais bucais em interação por 15 h, porém sem diferença

estatisticamente significativa e em interação por 24 h com diferença estatisticamente significativa (Wilson D et al., 2014). Estes resultados indicam que o gene *ORF19.7170* pode estar relacionado à interação patógeno-hospedeiro apresentando papel importante, mas que na falta deste gene outros genes com função semelhante podem estar super expressados compensando a falta de *ORF19.7170*.

O terceiro gene selecionado foi *ORF19.6847*. Este gene não é um gene único para fungos e apresenta um gene ortólogo no genoma de *S. cerevisiae* chamado *TRM44* que codifica uma proteína necessária para a 2'-O-metilação de U44 de RNAt de espécies de serina necessária para manter a estabilidade e estrutura deste RNAt. A cepa mutante de *S. cerevisiae* para *TRM44* não apresenta defeito de crescimento observável para temperaturas variando de 18 a 37 °C em meio mínimo ou enriquecidos com glicose ou glicerol, porém o mutante duplo para *TRM44* e *TAN1*, que codifica N4 acetiltransferase de citidina de RNAt, apresenta defeito de crescimento a altas temperaturas primariamente devido a perda de RNAtSer(CGA) e secundariamente a perda de RNAtSer(UGA) reforçando a importância de modificações para a estabilidade do RNAt (Kotelawala et al., 2008).

A cepa *orf19.6847Δ/Δ* não apresentou fenótipo claro para caracterização funcional com diferentes fontes de carbono e nitrogênio e agentes estressantes e nem defeito para filamentação em meio sólido ou líquido, assim como não foi observado defeito para *S. cerevisiae* mutante para *TRM44* em diferentes condições de crescimento (Kotelawala et al., 2008).

O papel do gene *ORF19.6847* na formação e desenvolvimento do biofilme foi avaliado quanto a atividade metabólica nos tempos de desenvolvimento de 1,5, 4, 24 e 48 h incluindo a cepa complementada mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as cepas, como obtido no *screening* das cepas. O biofilme da cepa *orf19.6847Δ/Δ* acumulou menos biomassa quando

crescido em meio RPMI-MOPS por 48 h e Spider *medium* por 48 e 60 h, porém a diferença não foi estatisticamente significativa como obtida para a etapa de seleção do gene. A análise visual revelou que os biofilmes crescidos no meio RPMI-MOPS por 48 h formaram um biofilme mais robusto e maduro em que se pode observar diferença clara entre a cepa *orf19.6847Δ/Δ* e as cepas parental e complementada, pois formou um biofilme mais irregular com aparência menos adesiva. Estes resultados indicam que o gene *ORF19.6847* pode estar envolvido na produção de matriz extracelular, pois não foi observada redução de atividade metabólica. Seneviratne et al. (2009) relataram que a atividade metabólica está diretamente relacionada com a quantidade de células, indicando que a redução da biomassa pode estar relacionada com menor quantidade de matriz extracelular no biofilme. Desta forma, foi quantificada β -1,3 glucana, que é o componente majoritário do biofilme de *Candida* (Nett J et al., 2007), dos biofilmes formados pelas cepas parental, *orf19.6847Δ/Δ* e *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847*, revelando que o biofilme formado pela cepa *orf19.6847Δ/Δ* produziu significativamente menos β -1,3 glucana que o biofilme formado pela cepa parental, porém a complementação não foi suficiente para reconstituir o fenótipo perdido. Isto deve ter ocorrido devido ao fenótipo de haploinsuficiência, enfraquecimento da regulação transcricional ou alteração da função do gene devido à integração ectópica (Bonhomme et al., 2011; Wilson D et al., 2014).

Taff et al. (2012) investigaram o papel de duas glucanosiltransferases (*BGL2* e *PHR1*) e 1 glucanase (*XOG1*) na entrega e acúmulo de β -1,3 glucana na matriz extracelular de biofilme de *C. albicans*. Foi observado que as cepas mutantes para estes genes produziram 10 vezes menos β -1,3 glucana que a cepa tipo selvagem, os biofilmes sequestraram menos moléculas do antifúngico fluconazol e foram de 35 a 70% mais sensíveis, enquanto que as células planctônicas não apresentaram diferença de susceptibilidade em relação à cepa selvagem, o qual se pode inferir que estes sejam fenótipos específicos

para a organização em biofilme. Além disso, o uso de glucanase no biofilme resultou em desagregação, menos β -1,3 glucana e acúmulo de biomassa sugerindo que a matriz de β -1,3 glucana fornece função adesiva dentro da matriz do biofilme. O gene responsável pela síntese de glucana, *FKS1*, foi super expresso nas cepas mutantes restaurando parcialmente o fenótipo dos mutantes. Os resultados indicaram que *FKS1* sintetiza glucano na membrana citoplasmática e os genes *BGL2*, *PHR1* e *XOG1* são responsáveis pela entrega e arranjo de β -1,3 glucana na matriz extracelular do biofilme. Seguindo esta ideia, foi investigado se a falta do gene *ORF19.6847*, que supostamente é importante para a produção de β -1,3 glucana na matriz extracelular, tornaria o biofilme mais susceptível aos agentes antifúngicos. Primeiro, foram realizados testes antifúngicos nas células planctônicas das cepas parental, *orf19.6847 Δ / Δ* *orf19.6847 Δ / Δ +ORF19.6847* aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina obtendo valores de CIM e perfil de sensibilidade iguais para as três cepas. Os biofilmes formados pelas três cepas apresentaram perfis de susceptibilidade semelhantes aos três antifúngicos testados. O antifúngico fluconazol foi ineficaz em todas as concentrações testadas, seguido pela anfotericina B que apresentou atividade somente em altas concentrações e, por fim, a caspofungina mostrou-se mais eficaz na redução da atividade metabólica dos biofilmes. Estes resultados corroboram com os dados da literatura que descreveram o biofilme de *C. albicans* como resistente ao fluconazol, susceptível a altas concentrações de anfotericina B e potente atividade de representantes da classe das equinocandinas, como caspofungina, na redução do biofilme (Kuhn et al., 2002; Uppuluri et al., 2011). A matriz extracelular do biofilme maduro tem sido destacada como importante fator de proteção contra a ação dos agentes antifúngicos por prevenir o acesso às células do biofilme (Bonhomme, D'Enfert, 2013). Nett JE et al. (2011) verificaram que a cepa mutante para o gene *SIM1*, que participa da produção de β -1,3 glucana na parede celular e matriz extracelular, formou biofilme mais susceptível

ao fluconazol, anfotericina B e a equinocandina anidulafungina, porém vale lembrar que a reduzida suscetibilidade do biofilme de *C. albicans* aos antifúngicos é um processo multifatorial orquestrado por alta densidade celular e aumento da atividade metabólica, super expressão dos alvos dos antifúngicos, produção de bombas de efluxo, heterogeneidade da população do biofilme e presença de células persistentes que são subpopulações de células altamente tolerantes a condições de estresse (Nobile, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2012; Bonhomme, D'Enfert, 2013).

A cepa *orf19.6847Δ/Δ* produziu menos dano na monocamada de células epiteliais bucais que a cepa parental com reconstituição do fenótipo para a cepa complementada, porém não houve diferença estatisticamente significativa. Mayer et al. (2012a) também obtiveram redução de dano nas células epiteliais bucais em interação por 15 h para a cepa *orf19.6847Δ/Δ*, com diferença estatisticamente significativa, em um estudo de seleção de genes com função desconhecida quanto a interação patógeno-hospedeiro, reforçando o papel do gene *ORF19.6847* como coadjuvante na patogenicidade da levedura *C. albicans*. O menor acúmulo de biomassa comprometido por menor produção de β -1,3-glucana interfere na manutenção da estrutura do biofilme formado pela cepa mutante para o gene *ORF19.6847*, o qual poderia reduzir a virulência desta cepa em modelo de infecção, uma vez que a carga fúngica e transição morfológica estão diretamente relacionadas a ativação do sistema imune e dano nas células epiteliais (Gow, Hube, 2012).

A análise *in silico* mostrou que o gene *MRV8* é único para a espécie *C. albicans* e *C. dubliniensis*, codificando provavelmente uma proteína integral da membrana celular com quatro regiões transmembrana. Douglas LM et al. (2013) publicaram um estudo descrevendo a função do gene *NCE102* de *C. albicans*. Este gene pertence à família das proteínas MARVEL (MAL e proteínas relacionadas com o tráfego de vesículas e ligação com a membrana), o qual também

fazem parte os genes *MRV6* e *MRV1*. *NCE102Ca* apresenta um gene ortólogo no genoma de *S. cerevisiae* também chamado *NCE102* que provavelmente age como exportador de proteínas e sensor de esfingolipídios (Fröhlich et al., 2009; Pérez et al., 2013). A cepa mutante para o gene *NCE102* apresentou padrão de coloração normal ao calcofluor branco e não mostrou significativo aumento da sensibilidade a uma variedade de fármacos e também não foi capaz de invadir baixa concentração de ágar, mas em alta concentração recebeu um sinal compensatório invadindo melhor. Além disso, apresentou defeito de filamentação em meio líquido em pouco tempo de incubação (7-17 h) e as células apresentaram morfologia arredondada devido ao defeito na organização de fibras de actina que também explica o defeito para filamentação e crescimento invasivo levando a diminuição da virulência e formação de hifas anormais *in vivo* (Douglas LM et al., 2013).

As proteínas pertencentes a família MARVEL são proteínas transmembrana contendo 4 regiões transmembrana com as regiões N- e C- terminais no citoplasma conservadas nos ascomicetos, como a levedura *S. cerevisiae* (Sánchez-Pulido et al., 2002; Scazzocchio et al., 2010; Douglas LM et al., 2013). Estas proteínas formam complexos na face interna da membrana plasmática chamados MCC (compartimento da membrana ocupado por Can1 arginina permease)/eisosomos que são grandes complexos de proteínas que regulam sítios de endocitose que correspondem a sulcos na membrana citoplasmática com aproximadamente 300 nm de comprimento por 50 nm de profundidade (Fröhlich et al., 2009; Douglas LM et al., 2011, 2013). Uma possível função dos domínios MCC/eisosomos é a regulação de proteínas e lipídios selecionando e separando-os em diferentes áreas para então serem estabilizados e endocitados seletivamente (Fröhlich et al., 2009).

A caracterização funcional com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, agentes estressantes e testes de filamentação em meio líquido e sólido não revelou nenhum defeito claro para a cepa

mutante para o gene de interesse *MRV8*. Da mesma forma, Douglas LM et al. (2013) não observaram defeito algum para as cepas mutantes *mrV1Δ/Δ*, *mrV2Δ/Δ*, *[mrV2-mrV8]Δ/Δ* e *mrV1[mrV2-mrV8]Δ/Δ* quanto ao crescimento invasivo em baixa e alta concentração, 1,5 e 4%, de ágar contendo 4% de SFB.

As cepas parental, *mrV8Δ/Δ* e *mrV8Δ/Δ+MRV8* foram avaliadas quanto a formação de biofilme nos tempos de 1,5, 4, 24 e 48 h, em que no tempo de 24 h o biofilme formado pela cepa *mrV8Δ/Δ* foi significativamente menos ativo metabolicamente que o biofilme formado pela cepa parental e a complementação reconstituiu o fenótipo. A morfologia dos biofilmes formados sobre discos de poliestireno por 24 h foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura (SEM) exibindo biofilmes mais escassos e com poucas células. Isto deve ter ocorrido provavelmente devido ao pouco tempo de incubação que não foi suficiente para formar um biofilme maduro e aderente em meio YNB com 100 mM de glicose ou durante a preparação dos espécimes os biofilmes foram destacados do substrato, visto que no tempo de 24 h o biofilme ainda não se encontra em plena maturação.

Como a cepa *mrV8Δ/Δ* apresentou reduzida atividade metabólica do biofilme no tempo de 24 h, foi avaliada a curva de crescimento das cepas parental e *mrV8Δ/Δ* por 24 h mostrando crescimento semelhante para as duas cepas indicando que o defeito metabólico não está relacionado ao defeito de crescimento da cepa *mrV8Δ/Δ*, mas sim relacionado às condições de crescimento em biofilme.

A cepa *mrV8Δ/Δ* também apresentou menor acúmulo de biomassa que a cepa parental com resconstituição do fenótipo para a cepa complementada nos tempos de 48 e 60 h, porém sem diferença estatisticamente significativa, além de biofilme irregular quando crescida em meio RPMI-MOPS por 48 h.

Os biofilmes formados sobre discos de poliestireno em Spider *medium* por 60 h também foram avaliados quanto à arquitetura por

MEV revelando que o biofilme formado por *mrV8* Δ/Δ foi constituído predominantemente por leveduras e pseudohifas formando agrupamentos espaçados sobre o substrato mostrando qualitativamente menos células e menor heterogeneidade que o biofilme formado pela cepa parental, o que poderia justificar o menor acúmulo de biomassa pela cepa mutante. Embora a cepa mutante para o gene *MRV8* não tenha apresentado nenhum defeito para os testes de filamentação, ela mostrou-se defeituosa para filamentação quando em alta densidade celular na organização em biofilme o que poderia indicar que a falta do gene *MRV8* é importante para a sinalização celular levando a continuidade de filamentação nestas condições.

Tentando buscar evidências para o menor acúmulo de biomassa pelo biofilme da cepa *mrV8* Δ/Δ foi quantificada β -1,3 glucana isolada de matriz extracelular de biofilmes crescidos em meio RPMI-MOPS por 48 h obtendo alta variabilidade nos valores de quantificação que talvez possa ter acontecido devido à variação biológica ou como o biofilme formado pela cepa mutante é mais frouxo, talvez tenha sido mais fácil extrair a matriz extracelular.

Os biofilmes formados pelas cepas parental, *mrV8* Δ/Δ e *mrV8* Δ/Δ +*MRV8* também foram submetidos aos testes com antifúngicos. Primeiro, as células planctônicas foram tratadas com os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina mostrando-se sensíveis a todos eles e apresentando as mesmas CIM. Os biofilmes tratados com fluconazol foram resistentes a todas as concentrações e quando tratados com anfotericina B, somente as concentrações mais altas foram eficazes. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para a cepa mutante para o gene *ORF19.6847* e resultados prévios descritos na literatura (Kuhn et al., 2002; Uppuluri et al., 2011). Quando os biofilmes foram tratados com caspofungina foi observado que nas concentrações mais altas, 16 e 32 mg/L, os biofilmes foram mais resistentes que nas concentrações mais baixas, como por exemplo de 1-8 mg/L, e, ainda

assim, o biofilme formado pela cepa *mrv8Δ/Δ* apresentou atividade metabólica maior que os biofilmes formados pelas cepas parental e complementada. Estes resultados foram confirmados por repetição do experimento que mostrou que mesmo formando menos biofilme que a cepa parental, a cepa mutante foi significativamente mais resistente as altas concentrações de caspofungina, 16 e 32 mg/L. Em altas concentrações de caspofungina, como concentrações não- terapêuticas, a célula ativa mecanismos de defesa, como por exemplo síntese de quitina contribuindo para o aumento da resistência provocando um fenômeno chamado efeito paradoxal ou efeito águia, porém os genes envolvidos neste processo ainda são desconhecidos (Pierce et al., 2008; Walker et al., 2013; Rueda et al., 2014). Desta forma, foi avaliada a presença de quitina nos biofilmes tratados e não tratados com caspofungina, porém não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os biofilmes. Os resultados obtidos para este teste não mostraram correlação entre a menor susceptibilidade do biofilme da cepa mutante a caspofungina com a quantidade de quitina.

Os polissacarídeos β -1,3 glucana e quitina estão presentes na parede celular de *Candida* formando ligações cruzadas responsáveis pela integridade estrutural, morfogênese e adaptação ao estresse (Munro et al., 2007; Walker et al., 2008). A produção da parede celular é alvo para os antifúngicos da classe das equinocandinas que inibem a síntese de β -1,3 glucana, porém tem sido relatada a ocorrência de cepas resistentes provavelmente devido a mutações no gene responsável pela síntese de glucana, *FKS1* (Walker et al., 2008, 2013). O efeito paradoxal parece não estar envolvido com os mecanismos convencionais de resistência as equinocandinas, talvez em altas concentrações de caspofungina, a parede celular ativa mecanismos de recuperação, como, por exemplo, aumento da síntese de quitina. Entretanto, a relevância clínica do efeito paradoxal é ainda incerta (Rueda et al., 2014). Este efeito é mais comum em biofilmes e em testes *in vitro*

ocorrendo pelo menos duas diluições acima da CIM em células planctônicas, além de ser mais comum para caspofungina do que para micafungina e anidulafungina (Chamilos et al., 2007; Walker et al., 2013). Chamilos et al. (2007) observaram prevalência de efeito paradoxal para culturas planctônicas nos valores de 90% para *C. parapsilosis*, 60% para *C. albicans*, 40% para *C. tropicalis* e 10% para *C. krusei*. Walker et al. (2008) observaram que as vias de sinalização *HOG*, *PKC* e calcineurina medeiam a elevação da expressão dos genes de síntese de quitina, *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* e *CHS8*, atividade de síntese de quitina e o conteúdo de quitina em resposta a exposição a caspofungina. Calcineurina é uma importante proteína dependente de cálcio composta por uma subunidade catalítica A (codificada por *CNA1*) e uma subunidade regulatória B (codificada por *CNB1*). Esta via é ativada pela chaperona molecular Hsp90 criando uma via de transdução de sinais levando a ativação do fator de transcrição Crz1p. A ativação da via calcineurina em *C. albicans* foi relacionada ao processo de apoptose, filamentação, sobrevivência na presença de soro, virulência e resistência a fluconazol e equinocandinas (provavelmente devido ao aumento da expressão do gene *FKS1*, responsável pela síntese de β -glucana) (Blankenship et al., 2003; Sanglard et al., 2003; Dai et al., 2012).

Foi demonstrado por Rueda et al. (2014) que em altas concentrações de caspofungina o volume das células de *C. albicans* aumentou e a quantidade de quitina também, porém o aumento de quitina não foi suficiente para garantir a sobrevivência celular sugerindo que não foi suficiente para a adaptação a exposição a altas concentrações de caspofungina e que outros rearranjos na parede celular devem contribuir para o fenômeno. Os autores ainda avaliaram a patogenicidade das células após exposição à caspofungina na larva *G. mellonella* e foi observado que as células que exibiram crescimento paradoxal foram menos patogênicas provavelmente devido à exposição de β -1,3 glucana

após o tratamento com caspofungina que influenciou no reconhecimento da célula fúngica pelo sistema imune da larva.

Nobile et al. (2014) também observaram maior resistência das cepas mutantes pertencentes ao complexo deacetilase de histona (*set3Δ/Δ*, *hos2Δ/Δ*, *snt1Δ/Δ* e *sif2Δ/Δ*) aos agentes 1,10-fenantrolina, 4-nitroquinolina-N-óxido, caspofungina e anfotericina B. Os autores não detectaram mudanças na expressão de bombas de efluxo, *CDR1*, *CDR2* e *CDR3*, em células planctônicas e nem nos biofilmes e as cepas mutantes não continham mais β-1,3 glucana na matriz extracelular que a cepa selvagem, sugerindo que a resistência dos biofilmes formados pelos mutantes provavelmente deve-se a outros atributos físicos específicos do biofilme. No presente estudo também foi observado crescimento paradoxal significativamente maior para o biofilme da cepa mutante para o gene *MRV8* mostrando que este gene parece exercer papel chave na modulação da resistência a caspofungina durante a fase de crescimento em biofilme.

Douglas LM et al. (2013) observam que o gene *NCE102*, membro da família das proteínas MARVEL assim como o gene de interesse *MRV8*, é importante para o crescimento invasivo em ágar e além de desempenhar papel importante na integridade da membrana plasmática. Por isso, avaliamos a capacidade da cepa mutante para o gene *MRV8* de invadir o ágar nas concentrações de 1,5 e 4% contendo Spider *medium* ou 10% de SFB mostrando fenótipo semelhante ao das cepas parental e complementada. A função de manter a integridade da membrana foi verificada em crescimento em meio líquido frente a diferentes concentrações de SDS, que é um surfactante que solubiliza a membrana celular, e 5% de etanol e crescimento em agar YPD contendo diferentes concentrações de SDS revelando crescimento normal para as cepas parental, *mrV8Δ/Δ* e *mrV8Δ/Δ+MRV8*. Não houve crescimento em ágar SD contendo diferentes concentrações de SDS. Como se trata de um meio mínimo, com poucos nutrientes, aliado a um agente estressante

pode ter havido inibição do crescimento das cepas. Os resultados mostraram que diferente ao observado para o gene *NCE102*, *MRV8* não desempenhou função relevante para crescimento invasivo e nem para a manutenção da integridade da membrana.

Para os ensaios de interação com as células hospedeiras, a cepa mutante para o gene *MRV8* apresentou defeito significativo para dano causado nas células epiteliais bucais com reconstituição do fenótipo e leve defeito para quantidade de hifas invasoras, porém não foi observada diferença significativa entre as cepas para os testes de aderência e comprimento das hifas sobre a monocamada de células epiteliais bucais. Wilson D et al. (2014) também verificaram que a cepa mutante para o gene *MRV8* causou dano moderado, mas significante em monocamadas de células epiteliais bucais e endoteliais em interação por 15 h.

Com intuito de tentar explicar o defeito de dano, foi avaliada a formação de microcolônias sobre monocamada de células epiteliais bucais e plástico por 24 h resultando em significativa redução da dimensão das microcolônias formadas pela cepa *mrV8Δ/Δ* comparada as microcolônias formadas pelas cepas parental e complementada. Estes achados indicam que a diminuição no dano as células epiteliais bucais correlacionou com a diminuição do crescimento de microcolônias sobre as células epiteliais.

O teste de patogenicidade em modelo animal ovo embrionado de galinha mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as cepas parental e *mrV8Δ/Δ*. O teste foi realizado antes da construção da cepa complementada, como não houve diferença significativa entre a cepa parental e mutante o teste não foi repetido para inclusão da cepa complementada. Portanto, o gene *MRV8* parece não ser importante para a patogenicidade em modelo de infecção complexo ou na falta dele outros genes compensatórios são expressos.

Foi demonstrado que a cepa mutante para o gene *DUR31*, um gene que codifica um transportador de poliamina e histatina 5, foi defectiva para causar dano em células epiteliais bucais, mas não foi defeituosa para aderir e invadir as células hospedeiras (Mayer et al., 2012a). Ao contrário do gene de interesse *MRV8*, *dur31Δ/Δ* foi atenuada para patogenicidade em modelo de camundongo com candidose disseminada hematogenicamente e mais suscetível a morte por neutrófilos, uma vez que estes defeitos foram justificados pelo papel do gene *DUR31* na morfogênese das estruturas filamentosas (Mayer et al., 2012a).

A infecção no ovo embrionado de galinha por cepas de *C. albicans* leva a resposta imune semelhante ao que ocorre em modelo mamífero com produção de ambas citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e desenvolvimento de uma resposta sistêmica (Jacobsen et al., 2011). Assim, os resultados sugerem que o gene *MRV8* não está envolvido na filimentação inicial, crescimento sob condições padrão de laboratório e patogenicidade em modelo animal com sistema imune complexo, mas parece ser requerido para produção regular de microcolônias e para danificar as células epiteliais bucais que constituem a primeira linha de defesa contra o fungo (Naglik et al., 2011).

O gene *NDT80* codifica um importante fator de transcrição para regulação positiva de genes envolvidos na separação celular, filimentação, resistência aos antifúngicos e formação de biofilme (Sellam et al., 2009, 2010; Nobile et al., 2012). Nobile et al. (2012) observaram que o fator de transcrição *NDT80* é responsável pela regulação positiva de 406 genes, dentre eles *MRV8*, expressos durante a formação de biofilme em Spider *medium* por 48 h. Por isso foi investigada a expressão de *NDT80* e *MRV8* quando em interação com células epiteliais bucais e plástico por 3 e 6 h. Os resultados mostraram que o gene *NDT80* foi 4 vezes mais expresso nas células de *mrV8Δ/Δ* em contato com as células epiteliais em ambos os tempos, mostrando que na falta do gene *MRV8*,

NDT80, que age *upstream*, tentou suprir a falta do gene de interesse importante nestas condições. Entretanto, o gene *MRV8* também se mostrou super expresso nas células de *mrV8Δ/Δ* que são mutantes para *MRV8*. O gene *MRV8* possui dois genes parálogos com mais de 70% de similaridade com a sequência de nucleotídeos, *MRV1* e *MRV6*. Talvez a cepa mutante esteja expressando um destes genes ou ambos, pois os pares de *primers* desenhados poderiam anelar nas sequências destes genes parálogos. Outra hipótese seria que um ou ambos os genes foram super expressos no mutante *MRV8* para compensar a falta deste, uma vez que não vemos o mesmo nível de expressão de *MRV8* na cepa parental.

Com a descoberta dos genes parálogos com sequências semelhantes ao gene de interesse *MRV8*, despertou-se o interesse em conhecer a expressão destes genes em condições onde o gene *MRV8* desempenha importante papel, como por exemplo crescimento em biofilme. O estudo da expressão dos genes parálogos nas cepas BWP17+C1p30 e *mrV8Δ/Δ* crescidas em biofilme revelou mais uma vez a dificuldade de desenhar *primers* específicos para genes da mesma família. O par de *primers* desenhado para o gene *MRV8* amplificou mais uma vez o gene *MRV8* para a cepa *mrV8Δ/Δ*, embora a expressão deste gene tenha sido menor que na cepa parental. Por outro lado, o fato do perfil de expressão dos genes *MRV1* e *MRV6* terem sido semelhantes nas cepas parental e mutante e mais baixa que a expressão do gene *MRV8* na cepa parental, sugere que os *primers* para *MRV1* e *MRV6* sejam específicos ou pelo menos não estão se anelando ao cDNA do gene *MRV8*. Além disso, podemos inferir que os genes *MRV1* e *MRV6* foram *down* regulados nos biofilmes. Comparando o perfil de expressão de *MRV8* para a cepa parental e mutante pode-se observar que a expressão de *MRV8* é muito maior na cepa parental que para a cepa mutante em condições de biofilme, visto que sabemos que os *primers* para *MRV8* não são específicos e podem se anelar a *MRV1* e *MRV6* e

que estes foram *down* regulados em biofilme, podemos sugerir que o fato da expressão de *MRV8* ser muito maior na cepa parental do que na cepa mutante, indica que este gene deve ser expresso por *C. albicans* crescendo em biofilme. Wilson D et al. (2014) sugeriram que a presença de genes parálogos específicos para *C. albicans* no genoma tenham passado por duplicação e sofrido seleção positiva permanecendo no genoma. Apesar da falta do gene *MRV8* e provável superregulação de um ou ambos genes parálogos com função desconhecida, a cepa mutante ainda apresentou defeito para formação de biofilme, dano epitelial e formação de microcolônias.

A cepa mutante para o gene *MRV8* mostrou fenótipos significativos para formação de biofilme, dano epitelial, formação de microcolônias e susceptibilidade ao agente antifúngico caspofungina. Estes resultados sugerem a participação do gene *MRV8* em dois processos:

- Sinalização celular: o gene *MRV8* participaria da sinalização celular na interação célula-célula permitindo que as hifas continuem crescendo em alta densidade celular quando aderidas a um substrato, condição esta que contribuiria para o desenvolvimento normal do biofilme, atividade metabólica e biomassa comparáveis a cepa parental, e formação e expansão das microcolônias e, conseqüentemente, estes processos aumentariam as chances de sucesso quando em contato com as células hospedeiras levando ao dano epitelial;
- Via da calcineurina: a falta do gene *MRV8* ativaria a via da calcineurina na presença de caspofungina levando a ativação do fator de

transcrição Crz1p que ativaria a expressão do gene *FSK1* culminando com a síntese de β -1,3-glucana que reduziria a susceptibilidade da cepa mutante a doses paradoxais de caspofungina. Ou ainda, a falta do gene *MRV8* poderia bloquear o ativador *upstream* da via da calcineurina, a chaperona molecular Hsp90p, que apresenta reconhecida função de *down* regular a síntese de quitina (Leach et al., 2012). Assim o gene *MRV8* teria papel importante na regulação da via da calcineurina na presença de caspofungina.

Os resultados apontam para o potencial deste gene como estratégia antifúngica contra doenças causadas por biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis* constituindo uma nova fonte de mecanismos de ação contra as duas espécies mais virulentas do gênero (*C. albicans* e *C. dubliniensis*).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- a) A partir do *screening* realizado com as 34 cepas mutantes de *C. albicans* para a formação e desenvolvimento do biofilme, foram identificadas e selecionadas 9 cepas mutantes que apresentaram fenótipo significativo para a formação de biofilme e construídas 4 cepas complementadas: *orf19.823Δ/Δ+ORF19.823*, *orf19.7170Δ/Δ+ORF19.7170*, *orf19.6847Δ/Δ+ORF19.6847* e *mrV8Δ/Δ+MRV8*;
- b) A função do gene *ORF19.823* quanto a formação de biofilme, características biológicas e interação patógeno-hospedeiro ainda permanece desconhecida, dado que a cepa mutante para este gene não apresentou fenótipo significativo para os testes realizados;
- c) O gene *ORF19.7170* apresentou fraca evidência de participação no dano epitelial e foi dispensável para a formação de biofilme *in vitro*;
- d) A cepa mutante para o gene *ORF19.6847* apresentou leve defeito para acúmulo de biomassa e dano epitelial e significativa redução da produção de β -1,3-glucana;

- e) A falta do gene *MRV8* causou redução da atividade metabólica de biofilmes crescidos por 24 h, menor acúmulo de biomassa, menor complexidade estrutural do biofilme observado por MEV, modulação da resposta ao agente antifúngico caspofungina em altas concentrações, redução do dano epitelial e tamanho das microcolônias com recuperação do fenótipo pela cepa complementada.

8 REFERÊNCIAS*

Albrachet A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, et al. Glycosylphosphatidylinositol- anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host- pathogen interactions. J Biol Chem. 2006;281(2):688-94.

Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi- a review. Med Mycol. 2012;50(4):337-45.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 8):999-1008.

Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE, et al. The hyphal- associated adhesion and invasion Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. PLoS Pathog. 2008;4:e1000217.

Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1998a;42(8):1900-5.

Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother. 1998b;42(8):2146-9.

Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2006;9(6):595-601.

Bernardo SM, Lee SA. *Candida albicans* SUR7 contributes to secretion, biofilm formation, and macrophage killing. BMC Microbiol. 2010;10:133.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 2006;9(6):588-94.

Blankenship JR, Wormley FL, Boyce MK, Schell WA, Filler SG, Perfect JR, et al. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. Eukaryot Cell. 2003;2(3):422-30.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda:US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014] U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.] Disponível em:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirement.html

Bonhomme J, Chauvel M, Goyard S, Roux P, Rossignol T, d'Enfert C. Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2011;80(4):995-1013.

Bonhomme J, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(4):398-403.

Borghesi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D, et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Future Microbiol*. 2014;9(2):163-73.

Braun BR, van Het Hoog M, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, et al. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet*. 2005;1(1):36-57.

Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(3):495-544.

Chamilos G, Lewis RE, Albert N, Kontoyiannis DP. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species *in vitro*: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2257-9.

Chandra J, McCormick TS, Imamura Y, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun*. 2007;75(5):2612-20.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum M. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):887-94.

Chaput M, Brygier J, Lion Y, Sels A. Potentiation of oxygen toxicity by menadione in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie*. 1983;65(8-9):501-12.

Chauhan NM, Shinde RB, Karuppaiyl SM. Effect of alcohols on filamentation, growth, viability and biofilm development in *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2013;44(4):1315-20.

Citiulo F, Jacobsen ID, Miramón P, Schild L, Brunke S, Zipfel P, et al. *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002777.

Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araujo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED- mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2012a;114(1):67-74.

Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Junior, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED- mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol*. 2011;56(11):1299-305.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses*. 2013a;56(6):614-22.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013b;4(5):391-9.

Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine- mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012b;55(1):56-63.

d'Enfert C, Goyard S, Rodriguez-Arnaveilhe S, Franqueul L, Jones L, Tekaia F, et al. CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database Issue):D353-7.

d'Enfert C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(4):358-64.

da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(1):149-56.

Dai B, Wang Y, Li D, Xu Y, Liang R, Zhao L, et al. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. *PLoS One*. 2012;7(9):e45109.

Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier K, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010;12(2):248-71.

de Souza RD, Mores AU, Cavalca L, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EAR. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. *Gerodontology*. 2009;26(2):157-61.

Desai JV, Bruno VM, Ganguly S, Stamper RJ, Mitchell KF, Solis N, et al. Regulatory role of glycerol in *Candida albicans* biofilm formation. *MBio*. 2013;4(2):e00637-12.

Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting in invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002451.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One*. 2009;4(11):e7967.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11(1):30-6.

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(3):139-43.

Douglas LM, Wang HX, Konopka JB. The MARVEL domain protein Nce102 regulates actin organization and invasive growth of *Candida albicans*. *MBio*. 2013;4(6):e00723-13.

Douglas LM, Wang HX, Li L, Konopka JB. Membrane compartment occupied by Can1 (MCC) and eisosome subdomains of the fungal plasma membrane. *Membranes (Basel)*. 2011;1(4):394-411.

Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, et al. Role of Bcr1- activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*. 2011;6(1):e16218.

Estivil D, Arias A, Torres- Lana A, Carrillo- Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*. 2011;86(2):238-42.

Filler SG. *Candida*- host cell receptor- ligand interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(4):333-9.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(2):109-18.

Finkel JS, Xu W, Huang D, Hill EM, Desai JV, Woolford CA, et al. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. PLoS Pathog. 2012;8(2):e1002525.

Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. Mol Microbiol. 2005;56(2):397-415.

Fröhlich F, Moreira K, Aquilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, et al. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. J Cell Biol. 2009;185(7):1227-42.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microbes Infect. 2010;12(6):488-96.

Ganguly S, Bishop AC, Xu W, Ghosh S, Nickerson KW, Lanni F, et al. Zap1 control cell-cell signaling in *Candida albicans* biofilms. Eukaryot Cell. 2011;10(11):1448-54.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2011;14(4):380-5.

Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-a mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filament. EMBO J. 2005;24(6):1277-86.

Giacometti R, Kronberg F, Biondi RM, Passeron S. *Candida albicans* Tpk1p and Tpk2p isoforms differentially regulate pseudohyphal development, biofilm structure, cell aggregation and adhesions expression. Yeast. 2011;28(4):293-308.

Gillium AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. Mol Gen Genet. 1984;198(1):179-82.

Gola S, Martin R, Walther A, Dunkler A, Wendland J. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. Yeast. 2003;20(16):1339-47.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. Curr Opin Microbiol. 2012;15(4):406-12.

Gow NA, Knox Y, Munro CA, Thompson WD. Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2003;41(4):331-8.

Green CB, Marretta SM, Cheng G, Faddoul FF, Ehrhart EJ, Hoyer LL. RT-PCR analysis of *Candida albicans* ALS gene expression in a hyposalivatory rat model of oral candidiasis and in HIV-positive human patients. *Med Mycol*. 2006;44(2):103-11.

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

Hartl A, Hillesheim HG, Kunkel W, Schrinner EJ. The *Candida* infected hen's egg. An alternative test system for systemic anticandida activity. *Arzneimittelforschung*. 1995;45(8):926-8.

Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*. 2009;11(8-9):753-61.

Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, et al. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol Immunol*. 2008;52(7):327-33.

Ishibashi H, Hisajima T, Hu W, Yamaguchi H, Nishiyama Y, Abe S. A murine model of esophageal candidiasis with local characteristic symptoms. *Microbiol Immunol*. 2007;51(5):501-6.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):14-9.

Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A, Hube B. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS One*. 2011;6(5):e19741.

Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M. Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun*. 2010;78(7):2995-3006.

Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(1):85-93.

Jayatilake JA, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses*. 2010;53(4):285-95.

Jayatilake JA. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia*. 2011;171(4):235-50.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeasts carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):2961-7.

Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J Oral Pathol Med*. 1993;22(2):52-6.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV- positive individuals have similar in vitro biofilm- forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011;11:247.

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):877-84.

Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2004;10(4):253-5.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(2):211-24.

Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011;49(2):171-7.

Klis FM, Sosinska GJ, Groot PWJ, Brul S. Covalently linked cell wall proteins *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res*. 2009;9(7):1013-28.

Kotelawala L, Grayhack EJ, Phizicky EM. Identification of yeast Trna Um(44) 2'-O-methyltransferase (Trm44) and demonstration of a Trm44 role in sustaining levels of specific tRNA(Ser) species. *RNA*. 2008;14(1):158-69.

- Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 2009;52(1):1-10.
- Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Channoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1773-80.
- Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(6):405-7.
- Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2010;109(1):128-36.
- Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, Prasad D, Uppuluri P, Lopez-Ribot JL. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):567-70.
- Leach MD, Budge S, Walker L, Munro C, Cowen LE, Brown AJ. Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003069.
- Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins- 1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2004;39(4):221-7.
- Luo Q, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1718-28.
- Martin R, Moran GP, Jacobsen ID, Heyken A, Domey J, Sullivan DJ, et al. The *Candida albicans*- specific gene *EED1* encodes a key regulator of hyphal extension. *PLoS One*. 2011;6(4):e18394.
- Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell*. 2007;6(12):2429-36.
- Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilm. *Mycopathologia*. 2010;169(5):323-31.

Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. 2013;59(4):251-64.

Mayer FL, Wilson D, Jacobsen ID, Miramón P, Große K, Hube B. The novel *Candida albicans* transporter Dur31 is a multi-stage pathogenicity factor. *PLoS Pathog*. 2012a;8(3):e1002592.

Mayer FL, Wilson D, Jacobsen ID, Miramón P, Slesiona S, Bohovych IM, et al. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. *PLoS One*. 2012b;7(6):e38584.

McCullough MJ, Savage NW. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Aust Dent J*. 2005;50(4):S36-9.

Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJ, Kurzai O, et al. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One*. 2012;7(12):e52850.

Mishra MM, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007;54(3):201-35.

Molero G, Díez- Orejas R, Navarro- García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol*. 1998;1(2):98-106.

Moreno-Ruiz E, Ortu G, de Groot PW, Cottier F, Loussert C, Prévost MC, et al. The GPI- modified proteins Pga59 and Pga62 of *Candida albicans* are required for cell wall integrity. *Microbiology*. 2009;155(Pt 6):2004-20.

Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:346307.

Mukherjee PK, Mohamed S, Chandra J, Kuhn D, Liu S, Antar OS, et al. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect Immun*. 2006;74(7):3804-16.

Munro CA, Selvaggini S, Bruijin I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, et al. The PKC, HOG and Ca²⁺ signaling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2007;63(5):1399-413.

Murad AM, Lee PR, Broadbent ID, Barelle CJ, Brown AJ. Clp10, an eficiente and conveniente integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast*. 2000;16(4):325-7.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia*. 2008;165(1):1-3.

Naglik JR, Fidel PL Jr, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Yeast Res*. 2008;283(2):129-39.

Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes infect*. 2011;13(12-13):963-79.

Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during in vitro *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*. 2009;167(1):9-17.

Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(1):67-78.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):510-20.

Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K, Andes DR. Time course global gene expression analysis of an in vivo *Candida* biofilm. *J Infect Dis*. 2009;200(2):307-13.

Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010;78(9):3650-9.

Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell*. 2011;10(12):1660-9.

Nicholls S, Leach MD, Priest CL, Brown AJ. Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. *Mol Microbiol*. 2009;74(4):844-61.

Nobile CJ, Fox EP, Hartooni N, Mitchell KF, Hnisz D, Andes DR, et al. A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in *Candida albicans*. *MBio*. 2014;5(3):e01201-14.

Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012;148(1-2):126-38.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006;8(9):1382-91.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell- surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol*. 2005;15(12):1150-5.

Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JB, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol*. 2009;7(6):e1000-117.

Nobile CJ, Scheneider HÁ, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008;18(14):1017-24.

Okoli I, Coleman JJ, Tampakakis E, An WF, Holson E, Wagner F, et al. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high- throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PLoS One*. 2009;4(9):e7025.

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, E Edwards J, et al. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2005;7(4):499-510.

Pérez JC, Kumamoto CA, Johnson AD. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001510.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494-500.

Pietrella D, Rachini A, Pandey N, Schild L, Netea M, Bistoni F, et al. The inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun*. 2010;78(11):4754-62.

Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol*. 2005;242:215-48.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(4):340-55.

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

Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(11):5459-63.

Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1071-83.

Rupniak HT, Rowlatt C, Lane EB, Steele JG, Trejdosiewicz LK, Laskiewicz B, et al. Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Natl Cancer Inst*. 1985;75(4):621-35.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000*. 2009;49:39-59.

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

Sánchez-Pulido L, Martín-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(12):599-601.

Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*. 2003;48(4):959-76.

Scazzocchio C, Vangelatos I, Sophianopoulou V. Eisosomes and membrane compartments in the ascomycetes: A view from *Aspergillus nidulans*. *Commun Integr Biol*. 2011;4(1):64-8.

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolitic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.

Schild L, Heyken A, de Groot PW, Hiller E, Mock M, de Koster C, et al. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell*. 2011;10(1):98-109.

Seider K, Heyken A, Luttich A, Miramón P, Hube B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4):394-400.

Sellam A, Askew C, Epp E, Tebbji F, Mullick A, Whiteway M, et al. Role of transcription factor CaNdt80p in cell separation, hyphal growth, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(4):634-44.

Sellam A, Tebbji F, Nantel A. Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(8):1174-83.

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

Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2009;54(11):1052-60.

Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics*. 2008b;8(14):2936-47.

Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol*. 2011;50(2):214-8.

Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002848.

Taguchi Y, Takizawa T, Ishibashi H, Sagawa T, Arai R, Inoue S, et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of Cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2010;51(1):13-21.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.

Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 6):495-500.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105-15.

Thewes S, Kretschamar M, Park H, Schaller M, Filler SG, Hube B. *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol*. 2007;63(6):1606-28.

Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res*. 2004;18(3):202-7.

Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010a;6(3):e1000828.

Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saville SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell*. 2010b;9(10):1531-7.

Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramaniam A, Lopez-Ribot JL. Effect of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3591-3.

Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):60-4.

Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6(2):e17046.

Walker LA, Gow NA, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):146-54.

Walker LA, Munro CA, Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NAR. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog*. 2008;4(4):e1000040.

Walther A, Wendland J. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet*. 2003;42(6):339-43.

Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:529-53.

Wilson D, Mayer FL, Miramón P, Citiulo F, Slesiona S, Jacobsen ID, et al. Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. *Eukaryot Cell*. 2014;13(8):977-89.

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

Wilson RB, Davis D, Mitchell AP. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*. 1999;181(6):1868-74.

Yanagi M, Hisajima T, Ishibashi H, Amemiya H, Abe S, Watanabe M. Oral candidiasis deteriorated by local application of a glucocorticoid-containing film in a mouse model. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(2):278-83.

Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt- Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol*. 2007;9(12):2938-54.

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2010;12(3):273-82.

APÊNDICE - Aparência visual dos biofilmes.



Figura 56- Aparência visual dos biofilmes das 25 cepas mutantes não selecionadas após 60 h de crescimento sobre disco de poliestireno (método de análise da biomassa) em Spider medium a 37 °C.