

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/08/2019.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



BEATRIZ HELENA DIAS PANARIELLO

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS, DO FLUCONAZOL E DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS NA MATRIZ EXTRACELULAR DE BIOFILMES DE *Candida* SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE A FLUCONAZOL

Araraquara
2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



BEATRIZ HELENA DIAS PANARIELLO

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS, DO FLUCONAZOL E DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS NA MATRIZ EXTRACELULAR DE BIOFILMES DE *Candida* SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE A FLUCONAZOL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral- Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marlise Inêz Klein

Araraquara
2017

Panariello, Beatriz Helena Dias

Influência de alterações genéticas, do fluconazol e de enzimas hidrolíticas na matriz extracelular de biofilmes de *Candida* susceptível e resistente a fluconazol / Beatriz Helena Dias Panariello.-- Araraquara: [s.n.], 2017

116 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

1. *Candida* 2. Biofilmes 3. Matriz extracelular
4. Resistência a medicamentos 5. Fluconazol 6. Mutação I. Título

BEATRIZ HELENA DIAS PANARIELLO

INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS, DO FLUCONAZOL E DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS NA MATRIZ EXTRACELULAR DE BIOFILMES DE *Candida* SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE A FLUCONAZOL

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos Graner

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Lívia Nordi Dovigo

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge

Araraquara, 4 de agosto de 2017.

DADOS CURRICULARES

BEATRIZ HELENA DIAS PANARIELLO

- NASCIMENTO** 16/02/1987- São Paulo, São Paulo.
- FILIAÇÃO** Cibele Mara Dias Panariello
Fábio Leonardo Panariello.
- 2006 – 2010** Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.
- 2008** Iniciação científica na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
- 2009** Iniciação científica na disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
- 2010** Bolsista do projeto de extensão denominado “Programa de manutenção da saúde bucal em pacientes de 3ª idade usuários de Prótese Parcial Removível”- Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
- 2011** Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I.
- 2012** Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.
- 2013** Obtenção do Título de Mestre em Reabilitação Oral pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.
- 2014** Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.
- 2015** Estágio docência Prótese Parcial Removível II
Estágio docência Prótese Total II
- 2016** Doutorado com **período sanduíche** em New York University College of Dentistry (NYU), Nova York, Estados Unidos.

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais,

Fábio Leonardo Panariello e Cibele Mara Dias Panariello,

Pelo amor e carinho com que criaram a mim e meus irmão, educando-nos para a vida e nos proporcionando condições de perseguirmos nossos sonhos. A minha jornada de estudos até aqui não teria sido possível sem o apoio incondicional, e, acima de tudo, sem o amor de vocês. Aos meus pais, minha eterna gratidão e admiração.

Ao meu marido e amor da minha vida,

Éder Augusto Mastropietro Cavichioli,

Companheiro desde a graduação, grande incentivador durante meu mestrado e, principalmente, durante o doutorado. Por viver comigo os meus sonhos e apoiá-los incondicionalmente. Por entender as minhas ausências para desenvolver este trabalho e me ajudar com as tarefas diárias. Por me dar forças para continuar e nunca ter medido esforços para me fazer feliz. Sou infinitamente grata por cada momento que vivemos e viveremos juntos. Esta conquista é nossa! Eu te amo!

Agradecimentos especiais

Agradeço de forma especial...

À minha orientadora, professora Dra. **Ana Cláudia Pavarina**, exemplo de competência em tudo que faz. Excelente professora e pesquisadora que participou ativamente da minha formação acadêmica na graduação e na pós-graduação, e com quem tive a honra de aprender e compartilhar conhecimentos durante estes 4 anos de doutorado. Agradeço pela confiança em mim e no meu trabalho, pelos incentivos e pela paciência ao prestar ensinamentos. Sinto-me honrada em tê-la como orientadora!

À minha co-orientadora, professora Dra. **Marlise Inêz Klein**, exemplo de excelência científica, pela paciência em me ensinar novas metodologias, por confiar e acreditar na minha capacidade, pela disponibilidade e dedicação na elaboração deste trabalho e pelo carinho com o qual sempre me tratou. Seus conhecimentos inspiraram meu doutorado, fazendo com que eu me apaixonasse ainda mais pela pesquisa. Seus ensinamentos foram fundamentais para que esta tese fosse concluída. É uma honra tê-la como co-orientadora!

À professora Dra. **Simone Duarte**, pesquisadora brilhante e pessoa admirável, por ter me dado a oportunidade de viver um sonho ao aceitar me orientar, e por ter confiado em mim e no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos e ajudas que excederam as fronteiras do laboratório, e pelo carinho e atenção que foram fundamentais para que minha experiência em Nova York fosse tão enriquecedora. Sinto orgulho por ter sido sua orientada durante o Doutorado Sanduíche!

"Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes."

Isaac Newton

Agradecimentos

Sou grata...

Ao meu amado irmão, ***Fabrizio Dias Panariello***, o primeiro grande presente que meus pais me deram na vida e que, recentemente, junto com a querida ***Amanda Tascone***, presenteou-me com a alegria de ser tia do ***Pietro Tascone Panariello***.

À ***Thaís Helena Dias Panariello***, minha amada irmã caçula, pela amizade e companheirismo, por se orgulhar de mim e sempre me incentivar a buscar meu sonhos.

À minha sogra, ***Magda Regina Mastropietro***, por todo o carinho com que sempre me tratou, por apoiar minhas decisões, pelos conselhos e pela inestimável ajuda enquanto estive em Nova York relizando parte desta tese de doutorado.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa responsável por sua direção, a Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e ao seu Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, na pessoa responsável por sua coordenação, a Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina, pela oportunidade de realizar minha pós-graduação.

À **FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão de bolsa de doutorado regular (Processo FAPESP n° 2014/18804-1) e bolsa de estágio no exterior BEPE (Processo FAPESP n° 2016/00256-3).

Aos amigos da pós-graduação, em especial ***Fernanda Alves, Juliana Cabrini Carmello, Livia Jacovassi Tavares, Kássia de Carvalho Dias, Gabriela Caroline Alonso, Jeffersson Trigo Gutierrez, Bruna Pimentel, Carmélia Lobo, Maria Isabel Amaya, Camila de Foggi, Jéssica Bernegossi, Lucas Portela e Elkin Florez***, pela parceria no laboratório e fora dele. Por alegrarem meus dias difíceis e tornarem mais leve a minha caminhada rumo a este título.

Às bolsista de Apoio Técnico, , ***Bruna Novelli, Geisiane Bueno, Luana Sales e Lígia Sabino*** pela atenção, amizade e pelas ajudas no laboratório sempre com boa vontade e prontidão.

Aos amigos ***Natalia Bertolo Domingues*** e ***Aion Mangino Messias*** que, mesmo fisicamente distantes, estiveram presentes todos os dias enquanto estive em Nova York. Obrigada pelo apoio e pela força que me ajudaram a passar por essa fase com alegria e tranquilidade.

Às amigas da New York University College of Dentistry, ***Cecília Atem Gonçalves de Araújo, Paula Ventura da Silveira, Aline Rogéria Freire de Castilho e Adriana da Fonte Porto Carreiro***. A amizade de vocês fez toda a diferença para que eu conseguisse seguir em frente com a pesquisa sem me abalar com as saudades de casa. Obrigada pela ajuda e companhia nos experimentos, pelo apoio, pelos conselhos e, especialmente para a ***Paula***, meus sinceros agradecimentos pelo abrigo nas últimas semanas do doutorado em Nova York.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho, muito obrigada!

Panariello BHD. Influência de alterações genéticas, do fluconazol e de enzimas hidrolíticas na matriz extracelular de biofilmes de *Candida* susceptível e resistente a fluconazol [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

Biofilmes formados por *Candida* estão relacionados a infecções bucais, como a candidíase. Embora a resistência do biofilme seja multifatorial, a proteção exercida por sua matriz extracelular (MEC) é importante para os altos níveis de resistência a drogas antifúngicas. O conhecimento dos princípios estruturais da MEC possibilita maior compreensão de como atuar para desorganizá-la e melhorar a difusão de agentes antifúngicos para que atinjam mais eficientemente o biofilme, além de, futuramente, possibilitar o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o controle da formação de biofilmes. Sendo assim, os objetivos principais deste estudo foram: (1) verificar a influência da inativação de genes envolvidos na filamentação (EFG1 e TEC1) em características estruturais dos biofilmes e na produção de componentes da MEC; (2) verificar a influência do fluconazol (FLZ) na MEC de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 (susceptível a fluconazol- CaS), *C. albicans* ATCC 96901 (resistente a fluconazol- CaR), *Candida glabrata* ATCC 2001 (susceptível a fluconazol- CgS) e *C. glabrata* ATCC 200918 (resistente a fluconazol- CgR) e (3) estudar a ação de enzimas hidrolíticas (DNase, Dextranase e β -glucanase individualmente ou em diferentes combinações) sobre a MEC de biofilmes de CaS e CaR. Biofilmes maduros (48 horas) foram analisados através de contagem de unidades formadoras de colônia (ufc/mL), peso seco total, peso seco insolúvel e proteínas insolúveis. Os componentes da MEC- polissacarídeos solúveis em álcali (ASPs), polissacarídeos solúveis em água (WSPs), DNA extracelular (eDNA) e proteínas solúveis foram quantificados. No estudo 1, foi observado que o conteúdo de ASPs é significativamente maior em cepa parental de *C. albicans* em comparação com as cepas mutantes Δ/Δ efg1 e Δ/Δ tec1, o que indica que a produção de ASPs pode estar relacionada à morfologia celular filamentosa em *C. albicans*. No estudo 2, observou-se que as biomassas totais e WSPs foram significativamente reduzidos pelo FLZ na MEC de CaS, CaR, CgS e CgR, mas as quantidades de eDNA e proteínas não foram influenciadas pela presença de FLZ nem pelo tipo de cepa. O FLZ interferiu na morfologia celular e na estrutura dos biofilmes, reduzindo a formação de hifas nos biofilmes de CaS e CaR e diminuindo o número de células nos biofilmes de CgS e CgR. No estudo 3, observou-se que exposição de biofilmes maduros à DNase por 5 minutos reduziu o conteúdo de eDNA, polissacarídeos e proteínas solúveis da MEC de CaS e CaR, sendo um promissor adjuvante para terapias antibiofilme. A redução de polissacarídeos extracelulares e

do conteúdo de proteínas pela DNase indicam que esses componentes estão interligados ao eDNA na MEC de CaS e CaR. Portanto, células filamentosas têm tendência de produzirem mais exopolissacarídeos, e estes componentes estão interligados ao eDNA e a proteínas solúveis na MEC de biofilmes de *C. albicans*. Para reduzir componentes da matriz e desorganizar a estrutura formada por eDNA-exopolissacarídeos-proteínas, a aplicação de enzima DNase por 5 min em biofilmes maduros de *C. albicans* se mostrou eficaz.

Palavras chave: Candida. Biofilmes. Matriz extracelular. Resistência a medicamentos. Fluconazol. Mutação.

Panariello BHD. Influence of genetic alterations, fluconazole and hydrolytic enzymes on the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* biofilms [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Biofilms formed by *Candida* are related to bucal infections, such as candidiasis. Although the biofilm resistance is multifactorial, the protection exerted by its extracellular matrix (ECM) is essential for its high levels of resistance to antifungals. The knowledge of the structural principles of the ECM permits a better understanding of how to disorganize the ECM and improve the diffusion of antifungal drugs to reach the biofilm. Moreover, the study of the ECM may enable the development of more effective therapies to control biofilm formation. Thus, the main objectives of this study were: (1) to verify the influence of the inactivation of genes involved in filamentation and structural characteristics of the biofilms (EFG1 and TEC1) on the production of ECM components; (2) to verify the influence of fluconazole (FLZ) on the biofilms' ECM of *Candida albicans* ATCC 90028 (fluconazole-susceptible: CaS), *C. albicans* ATCC 96901 (fluconazole-resistant: CaR), *Candida glabrata* ATCC 2001 (fluconazole-susceptible: CgS) and *C. glabrata* ATCC 200918 (fluconazole-resistant: CgR) and (3) to study the action of hydrolytic enzymes (DNase, Dextranase and β -glucanase individually or in different combinations) on the ECM of CaS and CaR biofilms. Mature biofilms (48 hours) were analyzed by colony counting forming units (cfu/mL), total dry weight, insoluble dry-weight and total proteins. ECM components- alkali-soluble polysaccharides (ASPs), water-soluble polysaccharides (WSPs), extracellular DNA (eDNA) and soluble proteins- were quantified. In study 1, it was observed that ASPs content is significantly higher in *C. albicans* parental strain compared to the mutant strains Δ/Δ efg1 and Δ/Δ tec1, indicating that the production of ASPs may be related to the filamentous cell morphology in *C. albicans*. In study 2, it was observed that the total biomasses and WSPs were significantly reduced by FLZ in the ECM of CaS, CaR, CgS and CgR, but the amounts of eDNA and proteins were not influenced by the presence of FLZ nor by type of strain. FLZ interfered on the cellular morphology and structure of biofilms, reducing hyphae formation in CaS and CaR biofilms and reducing the number of cells in CgS and CgR biofilms. The study 3 demonstrated that exposure of mature biofilms to DNase for 5 minutes reduced the eDNA, polysaccharides and soluble proteins of the ECM of CaS and CaR, being a promising adjuvant for antibiofilm therapies. The reduction of extracellular polysaccharides and soluble proteins by DNase indicates that these components are intertwined to eDNA in the ECM of CaS and CaR. Therefore, filamentous cells tend to produce more

exopolysaccharides, and these components are intertwined to eDNA and soluble proteins in the ECM of *C. albicans* biofilms. To reduce matrix components and disrupt the structure formed by eDNA-exopolysaccharide-proteins, 5 min exposure of mature biofilms to DNase showed to be effective.

Keywords: Candida. Biofilms. Extracellular matrix. Drug resistance. Fluconazole. Mutation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	17
3 PUBLICAÇÕES	18
3.1 Publicação 1	18
3.2 Publicação 2	47
3.3 Publicação 3	78
4 DISCUSSÃO	104
5 CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Candida* são fungos comensais da cavidade oral de indivíduos saudáveis que podem se tornar agentes patogênicos oportunistas em algumas situações, por exemplo, quando há alterações no sistema imunológico, disfunção metabólica ou em população de idade avançada (Abaci et al.¹, 2010; Dagistan et al.⁷, 2009; Li et al.¹³, 2007; Luo, Samaranayake¹⁵, 2002; Pfaller, Diekema³¹, 2007; Samaranayake, Samaranayake³⁸, 2001). Além disso, o uso crescente de antibióticos de amplo espectro, quimioterapias citotóxicas e transplantes também intensificam o risco de infecções por esses fungos oportunistas (Pfaller, Diekema³¹, 2007). Essas infecções são conhecidas como candidíase. A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente associada a candidíase, seguida pela *Candida glabrata*, que é a espécie não-*albicans* mais prevalente que tem sido associada ao desenvolvimento de infecções orais (Abaci et al.¹, 2010; Dagistan et al.⁷, 2009; Li et al.¹³, 2007; Luo, Samaranayake¹⁵, 2002; Samaranayake, Samaranayake³⁸, 2001). A crescente importância de *C. glabrata* como um oportunista em indivíduos imunocomprometidos tem sido relatada (Bennet et al.³, 2001; Pfaller, Diekema³¹, 2007), principalmente devido a sua habilidade inata para adquirir resistência antifúngica (Mann et al.¹⁷ 2009; Tsai et al.⁴⁴, 2010).

Infecções causadas por *Candida* estão frequentemente associadas à formação de biofilmes (Nobile, Mitchell²⁶, 2007). O crescimento de biofilme se inicia quando células planctônicas aderem a um determinado substrato. Em seguida, ocorre proliferação de células de levedura na superfície do substrato e o início do desenvolvimento de hifas. O passo final para o desenvolvimento do biofilme é o estágio de maturação, no qual o crescimento em forma de levedura é reprimido, o crescimento de hifas se eleva e matriz extracelular (MEC) encobre o biofilme (Blankenship, Mitchell⁵, 2006). A via de desenvolvimento de hifas é crítica para que haja formação significativa de biomassa de biofilme (Ramage et al.³⁵, 2002). Mutantes com defeitos no fator de transcrição EFG1 (enhanced filamentous growth), o principal ativador do desenvolvimento de hifas, não foram capazes de formar nem mesmo uma monocamada de células sobre superfícies de poliestireno (Ramage et al.³⁵, 2002). Além de EFG1, o fator de transcrição TEC1 também é necessário para a formação de hifas (Schweizer et al.⁴⁰, 2000). Foi observado que biofilmes produzidos por cepa mutante com ausência do fator de transcrição TEC1 (Δ/Δ *tec1*) eram rudimentares, possuindo menos de 20 μ m de espessura (Ramage et al.³⁵, 2002). Cepas mutantes com defeitos em genes de filamentação são menos virulentas do que suas cepas parentais e apresentam menores níveis de infectividade de células endoteliais e catéteres (Lewis et al.¹², 2002; Lo et al.¹⁴, 1997).

Algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca a drogas antifúngicas, especialmente ao fluconazol (Pfaller, Diekma³¹, 2007; Tsai et al.⁴⁴, 2010). Em contraste, a resistência pode ser desenvolvida pelo microrganismo após longos períodos de exposição a antifúngicos (Shapiro et al.⁴¹, 2011). Dessa forma, uma grande preocupação com os biofilmes de *Candida* é que suas células podem ter uma susceptibilidade reduzida contra azóis e polienos, devido ao desenvolvimento de resistência (Pfaller et al.³⁰, 2002). A resistência dos biofilmes de *Candida* é multifatorial e está associada ao estado fisiológico das células, à ativação de bombas de efluxo de drogas e ao efeito protetor dos β -glucanos presentes na MEC de *C. albicans*, que se ligam ao fluconazol e à anfotericina B (Nett et al.²⁴, 2007, Nett et al.²⁵, 2010), dificultando a penetração desses fármacos nos biofilmes (Vediyappan et al.⁴⁵, 2010).

Foi demonstrado que a MEC de biofilme de *C. albicans* possui grandes quantidades de β -1,6 glucanos e α -mananas, que interagem para formar um complexo manano-glucano (MGCx) (Mitchell et al.²⁰, 2015; Zarnowski et al.⁴⁷, 2014). Esta interação de exopolissacarídeos foi considerada crucial para a proteção do biofilme contra tratamento medicamentoso (Mitchell et al.²¹, 2016). Além disso, demonstrou-se que o DNA extracelular (eDNA) contribui para a integridade estrutural do biofilme de *C. albicans* (Martins et al.¹⁸, 2012; Rajendran et al.³⁴, 2014). Esforços para hidrolisar polissacarídeos e ácidos nucleicos da MEC têm sido eficazes na sensibilização de biofilmes de *Candida* e *Aspergillus* (Martins et al.¹⁸, 2012; Mitchell et al.²⁰, 2015; Nett et al.²⁴, 2007; Rajendran et al.³³, 2013). O acúmulo de α -mananos foi bloqueado com α -manosidase, uma enzima que catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores de α -D-manose em α -D-manosídeos, aumentando a atividade do fluconazol contra os biofilmes de *C. albicans* (Mitchell et al.²⁰, 2015). Além disso, biofilmes de 24 horas desafiados com RPMI contendo diferentes concentrações de antifúngicos isolados ou em combinação com DNase mostraram que a adição de DNase aumentou a susceptibilidade das células de *C. albicans* à anfotericina B (Martins et al.¹⁸, 2012). Ademais, demonstrou-se que a combinação de biofilmes com DNase associada a anfotericina B e caspofungina melhorou significativamente a susceptibilidade antifúngica em biofilme de *Aspergillus fumigatus* (Rajendran et al.³³, 2013).

A matriz extracelular é considerada um dos maiores desafios no controle do biofilme oral (Panariello et al.²⁹, 2017). Sendo assim, o conhecimento dos princípios estruturais da matriz extracelular possibilita maior compreensão de como atuar para desorganizá-la e melhorar a difusão de agentes antifúngicos através do biofilme, a fim de que atinjam mais eficientemente as células de *Candida*. Além disso, possibilita que, futuramente, sejam desenvolvidas terapias mais eficazes para o controle da formação e patogenicidade de biofilmes de *Candida*. Portanto, os objetivos principais deste estudo foram: (1) caracterizar a matriz extracelular de biofilmes

de cepas mutantes (Δ/Δ *efg1* e Δ/Δ *tec1*) e cepa parental (wild-type-WT) de *C. albicans* para verificar a influência da inativação de genes envolvidos na filamentação e em características estruturais dos biofilmes na produção de componentes da MEC; (2) caracterizar a MEC de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* susceptíveis e resistentes ao fluconazol na presença e na ausência desta droga para verificar sua influência na MEC dos biofilmes destas cepas e (3) estudar a ação de enzimas hidrolíticas (DNase, Dextranase e β -glucanase individualmente ou em diferentes combinações) sobre a MEC de biofilmes de *C. albicans* susceptível e resistente a fluconazol.

5 CONCLUSÃO

1. O conteúdo de ASPs é significativamente maior em cepa parental de *C. albicans* (SN425) em comparação com as cepas mutantes com deficiência na formação de hifas e/ou biofilmes, Δ/Δ *efg1* (CJN 2302) e Δ/Δ *tec1* (CJN 2330), indicando que a produção de ASPs pode estar relacionada à morfologia celular filamentosa.
2. WSPs e as biomassas são diretamente afetados pela presença de FLZ durante formação de biofilmes, enquanto eDNA e proteínas permanecem estáveis nas cepas *C. albicans* ATCC 90028 (susceptível à fluconazol), *C. albicans* ATCC 96901 (resistente a fluconazol), *C. glabrata* ATCC 2001 (susceptível à fluconazol) e *C. glabrata* ATCC 200918 (resistente a fluconazol).
3. FLZ impediu o acúmulo de WSPs e reduziu as biomassas, atuando em hifas em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* ATCC 96901, e reduzindo a quantidade de células em *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. glabrata* ATCC 200918.
4. A exposição de biofilmes de 48 horas a DNase reduziu eDNA, polissacarídeos e proteínas solúveis das matrizes extracelulares de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* ATCC 96901.
5. A redução de polissacarídeos extracelulares e de proteínas solúveis pela DNase sugere que estes componentes estejam interligados ao eDNA nas matrizes extracelulares de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* ATCC 96901.

REFERÊNCIAS*

1. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010; 169(5):365-72.
2. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e67950.
3. Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 48(5):1773-7.
4. Bink A, Govaert G, Vandenbosch D, Kuchariková S, Coenye T, Nelis H, et al. Transcription factor Efg1 contributes to the tolerance of *Candida albicans* biofilms against antifungal agents in vitro and in vivo. *J Med Microbiol*. 61(Pt 6):813-9.
5. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9(6):588-94.
6. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34(2):183-8.
7. Dagistan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. *Mycoses*. 2010; 52(3):266-71.
8. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9):623-33.
9. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*. 2017; 122(2):321-30.
10. Hughes KA, Sutherland IW, Clark J, Jones MV. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol*. 1998; 85(3):583-90.
11. Kien CH, Theodore CW. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(4):763-8.
12. Lewis RE, Lo HJ, Raad II, Kontoyiannis DP. Lack of catheter infection by the efg1/efg1 cph1/cph1 double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(4):1153-5.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

13. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007; 86(3):204-15.
14. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997; 90(5):939-49.
15. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS*. 2002; 110(9):601-10.
16. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10 Suppl 1:1-10.
17. Mann PA, McNicholas PM, Chau AS. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12):5026-34.
18. 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 biofilms. *Mycopathologia*. 2012; 169(5):323-31.
19. Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *CurrGenet*. 2012; 59(4):251-64.
20. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(13):4092-7.
21. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9): e1005828.
22. Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 2016; 54(3):192-201.
23. Nailis H, Vandenbosch D, Deforce D, Nelis HJ, Coenye T. Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in *Candida albicans* biofilms. *Res Microbiol*. 2010; 161(4):284-92.
24. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(2):510-20.
25. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*. 2010. 202(1):171-5.
26. Nobile CJ, Mitchell AP. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Curr Biol*. 2007; 17(10): R349-53.

27. Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, et al. Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *J Appl Microbiol*. 2013; 115(1):260-70.
28. Oxman, DA, Chow JK, Frenzl G, Hadley S, Hershkovitz S, Ireland P, et al. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(7):1460-5.
29. Panariello BHD, de Araújo Costa CAG, Pavarina AC, Santiago SL, Duarte S. Advances and challenges in oral biofilm control. *Curr Oral Health Rep*. 2017; 4(1): 29–33.
30. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ; SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3):852-6.
31. Pfaller MA, Diekema DJ. The epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):133-63.
32. Prasad T, Hameed S, Manoharlal R, Biswas S, Mukhopadhyay CK, Goswami SK, et al. Morphogenic regulator EFG1 affects the drug susceptibilities of pathogenic *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2010.; 10(5):587-96.
33. Rajendran R, Williams C, Lappin DF, Millington O, Martins M, Ramage G. Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. *Eukaryot Cell*. 2013; 12(3):420-9.
34. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, et al. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2014; 14:303.
35. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 214(1):95-100.
36. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012; 2012:528521.
37. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(5):673-88.
38. Samaranyake YH, Samaranyake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 14(2):398-429.
39. Sapaar B, Nur A, Hirota K, Yumoto H, Murakami K, Amoh T, et al. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. *J Appl Microbiol*. 2014; 116: 16(6):1531-42.

40. Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Rollinghoff M, Schroppel K. The TEA/ATTS transcription factor Ca Tec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2000; 38(3):435-45.
41. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 5(2):213-67.
42. Sutherland, IW. Polysaccharases for microbial polysaccharides. *Carbohydr Polym*. 1999; 38: 319-28.
43. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001; 147 (Pt 1):3-9.
44. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(8):3308-17.
45. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, d'ENFERT C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5):2096-111.
46. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Front Microbiol*. 2017; 7:2173.
47. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Saharaoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, Ntambi JM, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*. 2014; 5(4):e01333-14.