



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Amanda Brandão Soares

**Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas
morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e
biofilmes**

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Amanda Brandão Soares

**Análise comparativa dos métodos de quantificação das
formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas
e biofilmes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (área de Reabilitação Oral), da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2021

S676a

Soares, Amanda Brandão

Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e biofilmes / Amanda Brandão Soares. -- Araraquara, 2021

139 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. *Candida albicans*. 2. Biofilmes. 3. Contagem de células. 4. Contagem de colônia microbiana. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Amanda Brandão Soares

Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e biofilmes

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

3º Examinador: Prof. Dr. Heitor Marques Onório

Araraquara, 07 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES

Amanda Brandão Soares

NASCIMENTO: 11/11/1995 – Salvador, Bahia

FILIAÇÃO: Milton Carlos Soares
Núbia Silva Brandão Soares

2014-2018: Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

2015-2018: Estágio de Iniciação Científica no grupo de pesquisa de “Biomateriais restauradores na Reabilitação Oral” da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

2017-2018: Monitoria na Clínica de Reabilitação Bucal II e III na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

2019-2020: Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista Júlio Mesquita Filho.

2019-2021: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dedico todo esforço que depositei neste trabalho aos meus pais,
Milton e Núbia, que são meus maiores exemplos de caráter e dignidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em sua infinita bondade, por iluminar meu caminho, por toda saúde, força e principalmente por ter colocado em minha vida pessoas especiais que me protegem e orientam, possibilitando que eu atinja meus ideais.

A Maria, Nossa Senhora e Mãe Protetora, pela sua divina providência. Por ser minha intercessora e consolo para todos os momentos. Por acalmar meu coração e proteger minha família com sua infinita graça.

Aos meus pais Milton e Núbia e a estrutura familiar criada e cultivada por eles, o que me possibilitou uma base sólida para o meu crescimento pessoal e profissional. Sempre vibrando por minhas vitórias e conquistas, jamais me deixando fraquejar e desistir quando essas conquistas pareciam distantes. Muito obrigada pelo exemplo de dignidade, honestidade, simplicidade e amor.

Ao meu irmão Mateus pelo apoio e companheirismo incondicional nos momentos de alegrias e tristezas. Sua irmandade é muito importante para mim. E saiba que tenho muito orgulho do homem que se tornou. Você me inspira a ser melhor.

Ao Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima, mais do que o orientador deste trabalho, participando ativamente do meu crescimento, transmitindo seus conhecimentos todos os dias. Agradeço por contribuir grandemente com meu crescimento pessoal e profissional.

A Bruna Pimentel por toda amizade e aconselhamento. Por ser uma das minhas maiores referências profissionais e de caráter. Estendo esse agradecimento a toda a

sua família, Hugo, Madoca, Juju e Bernardo, que hoje fazem parte da minha família também.

A Juliana Rios, minha dupla de vida, que dividiu toda essa jornada comigo, sempre presente em todos os momentos. Obrigada pelo apoio e ajuda durante todas as fases da minha vida, especialmente nessa reta final. Você é um exemplo de lealdade e determinação.

Aos meus queridos amigos e companheiros de vida acadêmica, por fazerem parte dos melhores momentos desta jornada. Sou extremamente grata pela amizade conquistada e por todos os momentos de descontração, risadas e desabafos. Em especial, Luana Dias, Jaqueline, Gabriel e Letícia, por serem tão presentes em minha vida.

Aos inúmeros amigos que também foram fundamentais, por estarem sempre ao meu lado, tornando tudo possível. Em especial, Ananda Nogueira, Jorge Lucas, Ellen Santos, Mariana Carvalho e Carol Felisberto.

A minhas primas-irmãs, Paula Carvalho e Michelli Soares, por toda irmandade e presença.

Agradeço aos meus amigos do grupo de pesquisa, Jeffersson, Vinícius, Yuliana, Letícia e Carol, por toda a troca de conhecimento e ajuda nesse processo.

A Profa. Marlise Klein pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho, pela infinita disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

A Profa. Livia Dovigo por todo conhecimento compartilhado e por toda dedicação de sempre. Sempre muito cuidadosa e empenhada a ajudar cada aluno!

A Paula Barbugli pela disponibilidade, ensinamentos e atenção dispensada para realização deste trabalho.

A Profa. Ana Claudia Pavarina por ser um grande exemplo de dedicação e cuidado. Por sempre ter sido muito atenciosa! E, em especial, por ter aceitado participar da comissão avaliadora desse trabalho.

Ao Prof. Heitor Honório por toda disponibilidade e por difundir com tamanha competência todos os seus ensinamentos. O Canal Pesquisa foi de grande valia em minha formação e para mim é uma grande honra ter sua contribuição em minha defesa!

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

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por ser uma instituição a qual me orgulho por ter feito parte.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese pela convivência e uso das dependências.

Pelo uso do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biologia Molecular.

A todos os docentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara, profissionais inspiradores, competentes e dedicados, obrigada pelas oportunidades e conhecimentos ofertados.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela amizade, disposição em colaborar e alegria demonstrada durante todos os momentos

Aos pacientes por toda confiança, delicadeza e sensibilidade para com o meu crescimento e aprendizado. Muito mais do que ter ajudado vocês em seus tratamentos, eu que fui ajudada, por ter aprendido tanto com cada um.

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

Soares AB. Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e biofilmes [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Candida albicans é o principal fungo patógeno que acomete os seres humanos e que apresenta a capacidade de se desenvolver em diferentes morfologias (leveduras, pseudo-hifas e hifas), característica essa denominada de polimorfismo. Esse polimorfismo compromete os métodos de quantificação que requerem precisão e acurácia, como as pesquisas que envolvem fungos filamentosos. O objetivo deste estudo foi comparar os métodos de quantificação de *C. albicans* por unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e por atividade metabólica (Ensaio XTT) com a contagem de células viáveis e de núcleos celulares em Microscópio Confocal. Cepa padrão SC5314 e isolado clínico de *C. albicans* foram utilizados. Culturas planctônicas padronizadas de cada cepa de *C. albicans* foram desenvolvidas nas formas de levedura e de filamentos e submetidas a três métodos de quantificação: UFC/mL e contagem celular. Para contagem celular, o Microscópio Confocal foi utilizado com a suspensão fúngica tratada com diferentes marcadores fluorescentes para evidenciar células viáveis, células não viáveis e os núcleos celulares. Biofilmes também foram cultivados em orifícios de placas de 48 poços por 48 horas e foram submetidos aos mesmos testes mencionados para as culturas planctônicas, além do ensaio de XTT. Os dados foram submetidos a uma análise de concordância (Coeficiente de Correlação Intraclass e Bland-Altman) e de correlação de Spearman ($\alpha = 5\%$) entre os métodos (UFC/mL, contagem celular e XTT). Os resultados demonstraram que não houve concordância ($p \leq 0,428$) entre o método de UFC/mL e contagem de células para as morfologias de leveduras e filamentos da cepa padrão SC5314 e do isolado

clínico de *C. albicans*, apesar dos métodos terem apresentado alta ($r_s \geq 0,884$) e significativa ($p < 0,001$) correlação. Também foi verificado um viés de proporção ($p < 0,001$) entre esses métodos. Biofilmes de ambas as cepas também apresentaram ausência de concordância ($p \leq 0,566$) e correlação forte ($r_s \geq 0,852$) e significativa ($p \leq 0,001$) entre os métodos de UFC/mL e células/mL, além de viés de proporção ($p < 0,001$). Na análise do XTT foi possível visualizar ausência de concordância ($p < 0,001$), apesar de uma forte e significativa correlação entre os métodos de quantificações (UFC/mL e células/mL). Para todas as morfologias e condições de cultivo, a quantificação por UFC/mL foi menor do que a quantificação por células/mL, sendo então o primeiro um método que subestima a quantificação celular of *C. albicans*.

Palavras – chave: *Candida albicans*. Biofilmes. Contagem de células. Contagem de colônia microbiana. Reação em cadeia da polimerase.

Soares AB. Comparative analysis of the quantification methods of the morphological forms of *Candida albicans* in planktonic cultures and biofilms [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Candida albicans is the main human fungal pathogen able to develop in different morphologies (yeasts, pseudo-hyphae and hyphae), a characteristic called polymorphism. This polymorphism undermines quantification methods that require precision and accuracy, such as research involving filamentous fungi. This study aimed to compare the methods of quantifying *C. albicans* by colony forming units (CFU/mL), and metabolic activity (XTT assay) with viable cell and cell nuclei count in a Confocal Microscope. Reference strains and clinical isolate of *C. albicans* were used. Standardized planktonic cultures of *C. albicans* SC5314 were grown as yeast and filaments and subjected to three methods of quantification: CFU/mL and cell count. The confocal microscopy was used for cell counting with the fungal suspension treated with different fluorescent markers to show viable cells, non-viable cells, and cell nuclei. Biofilms were also grown in 48-well plate for 48 hours and subjected to the same quantification methods mentioned for planktonic cultures and the XTT assay. The data were submitted to an analysis of agreement (Intraclass Correlation Coefficient and Bland-Altman) and correlation ($\alpha = 5\%$) between the methods (CFU/mL, cell count and XTT). The results demonstrated no agreement ($p \leq 0,428$) between the CFU/mL and cells/mL methods for the yeast and filamentous morphologies of both *C. albicans* strains, although the methods showed high ($r_s \geq 0,884$) and significant ($p < 0,001$) correlation. Proportion biases were also verified between the methods for both morphologies. Biofilms of both strains also showed no agreement ($p \leq 0,566$) and high ($r_s \geq 0,852$) and significant correlation ($p < 0.001$) between the CFU/mL and cells/mL

methods, which also demonstrated proportion biases ($p < 0,001$). In the XTT analysis, it was possible to see a lack of agreement ($p < 0.001$), despite a strong and significant correlation between the quantification methods (CFU/mL and cells/mL). For all morphologies and growth type, the quantification by CFU/mL underestimated cell quantification of *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilms. Cell count. Colony count microbial. Polymerase chain reaction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	<i>Candida albicans</i>	20
2.2	Biofilme Fúngico.....	28
2.3	Métodos Quantitativos.....	31
3	PROPOSIÇÃO.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Materiais.....	39
4.1.1	Materiais de consumo.....	39
4.1.2	Instrumentais.....	42
4.1.3	Equipamentos.....	42
4.2	Métodos.....	45
4.2.1	Cultivo de culturas planctônicas de <i>Candida albicans</i>	45
4.2.2	Marcação fluorescente para quantificação de células e núcleos.....	47
4.2.3	Quantificação de colônias (UFC/mL).....	49
4.2.4	Formação de biofilme.....	50
4.2.5	Atividade metabólica do biofilme.....	51
4.2.6	Calibração do operador.....	51
4.2.7	Adequação de metodologia.....	53
4.2.8	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Teste de Calibração.....	62
5.2	Cepa Padrão SC5314.....	63
5.2.1	Culturas planctônicas.....	63
5.2.2	Biofilme.....	68
5.3	Isolado Clínico 3030B.....	75
5.3.1	Culturas planctônicas.....	75
5.3.2	Biofilme.....	79
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÃO.....	88

REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES.....	96
ANEXO A	136

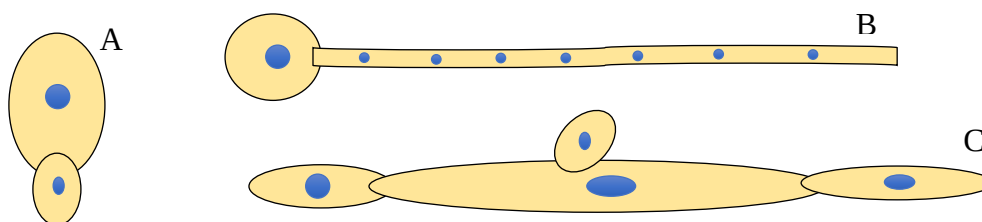
1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo patógeno oportunista que pode colonizar de forma comensal muitas áreas do corpo humano, como mucosas oral e genital, na qual sua proliferação é controlada pelo sistema imune do próprio hospedeiro¹. Entretanto, sob condições específicas, como diabetes, medicamentos para câncer, antibioticoterapia, xerostomia, uso de próteses dentárias e, principalmente, supressão imunológica, *C. albicans* pode tornar-se patogênico, causando infecções superficiais (candidíase oral e vaginal) até infecções sistêmicas e generalizadas (candidemia)²⁻⁷.

A característica oportunista de *C. albicans* em fazer a transição de comensal para sua forma virulenta está fortemente associada a sua capacidade de alternar morfológicamente entre formas de levedura e filamentos (hifas e pseudo-hifas), propriedade esta denominada de polimorfismo, que é fundamental para sua patogênese e para sua capacidade de formação de biofilme (comunidade microbianas aderidas a uma superfície e envoltas de matriz polimérica produzida pelas próprias células microbianas)⁸⁻¹⁰. Levedura consiste em um brotamento unicelular com formato redondo e bem definido. Já a forma filamentar de pseudo-hifas são morfológicamente distinguíveis das hifas, pois pseudo-hifas têm constricções nos locais de septação e são mais largas do que hifas. Já as hifas são alongadas e com as paredes completamente paralelas e sem constricções no local da septação¹¹ (Figura 1). As morfologias também se diferenciam quanto a quantidade de núcleos; enquanto a levedura é uma estrutura uninucleada, hifas e pseudo-hifas são multinucleadas¹¹.

O polimorfismo pode ser desencadeado por uma variedade de estímulos, como temperatura corporal (37 °C), presença de soro, baixo nível de nitrogênio, presença de glicose, disponibilidade de aminoácidos, pH neutro e condições de microaerofilia, como CO₂ a 5%^{12,13}.

Figura 1 – Representação esquemática de (A) levedura em brotamento, (B) hifa verdadeira e (C) pseudo-hifa.



Fonte: Elaboração do autor.

Diversos métodos têm sido utilizados para se quantificar micro-organismos. O método de quantificação por unidades formadoras de colônias (UFC/mL), ou cultivo em ágar, apesar de ser um método amplamente utilizado, é considerado lento e laborioso¹⁴, pois o crescimento de colônias necessita de dias para seu desenvolvimento, além de requerer a homogeneização das células fúngicas previamente ao seu plaqueamento.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) também tem sido utilizada para identificação e quantificação de espécies, principalmente de micro-organismos não cultiváveis. A qPCR se baseia na replicação do DNA cromossomal extraído da célula, o qual é detectado, amplificado e quantificado por sinais de fluorescência de maneira específica, eficiente e fidedigna¹⁵. Um fator importante para a determinação de viabilidade por qPCR diz respeito à amplificação somente de células viáveis. Como todo o DNA presente na amostra pode ser ligado especificamente ao primer (sequência de oligonucleotídeos utilizada para se ligar ao DNA genômico), a qPCR não diferencia o DNA de células vivas, mortas e o DNA extracelular (eDNA) da matriz do biofilme. O DNA de células mortas se mantém

estável por períodos prolongados¹⁶, o que acarreta em uma quantificação sobre-estimada da amostra avaliada.

Apesar de existir uma ampla disponibilidade de métodos para quantificação microbiana, a quantificação de fungos filamentosos ainda não é precisa. As diferenças morfológicas que o fungo apresenta comprometem a reprodutibilidade da quantificação por UFC/mL¹⁷, uma vez que uma única levedura produz um UFC/mL, assim como uma única pseudo-hifa com diversos compartimentos e ramos. Já quando esses compartimentos e ramos de uma única pseudo-hifa são separados, eles produzem um número maior de UFC/mL. Assim, o valor de UFC/mL para uma cultura de *C. albicans* com as diversas morfologias do micro-organismo não corresponde ao número exato de células, subestimando esse valor.

Além disso, a determinação da viabilidade por qPCR também não corresponde ao exato número de células, uma vez que uma única hifa irá produzir um valor correspondente à quantidade de núcleos que essa hifa apresenta, superestimando o número de células. Entretanto, não foi encontrado nenhum estudo prévio que demonstre que a morfologia fúngica pode comprometer a precisão desses métodos de quantificação.

A estimativa precisa da quantidade de células fúngicas, independente das diferenças morfológicas celulares encontradas, é importante no acompanhamento do tratamento em casos de infecção, para avaliar a eficácia antifúngica de métodos terapêuticos e também em pesquisa, sem que haja sub ou superestimação de valores. Uma quantificação precisa é relevante para se evitar vieses na quantificação e introdução de um componente de erro na medida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

C. albicans é o fungo comensal mais frequentemente encontrado na microbiota humana, especialmente no trato gastrointestinal e geniturinário^{11,18}. Entretanto, sob condições específicas, como diabetes, medicamentos para câncer, antibioticoterapia, xerostomia, uso de próteses dentárias e, principalmente, supressão imunológica, *C. albicans* pode tornar-se patógeno, causando infecções^{6,7,18}.

As infecções causadas por *C. albicans* podem ser divididas em duas categorias: mucosa ou sistêmicas¹⁸. As infecções da mucosa afetam algumas membranas das superfícies corporais, como por exemplo, mucosa orofaríngea e vaginal¹⁹. A infecção sistêmica envolve a disseminação de *C. albicans* para a corrente sanguínea e a órgãos vitais, afeta principalmente pacientes imunocomprometidos e hospitalizados, sendo uma das principais infecções nosocomiais com elevadas taxas de mortalidade^{19,20}.

A morfogênese é um traço essencial na patogenicidade e virulência de *C. albicans*²¹⁻²³. Essa característica é denominada de polimorfismo e consiste na capacidade que *C. albicans* possui em realizar a transição da forma de levedura para a forma filamentosa (pseudo-hifas ou hifas) de maneira reversível^{24,25}.

A formação de hifas inicia-se a partir da célula mãe leveduriforme, com um crescimento apical polarizado na forma de um prolongamento (evaginação), conhecido como tubo germinativo¹¹. Durante o desenvolvimento do tubo germinativo, proteínas chamadas de septinas são sintetizadas no local da evaginação, e inicia-se o ciclo celular. Como a evaginação do tubo germinativo pode ocorrer antes do ciclo celular, tubos germinativos não são considerados brotamento celular²⁶. Com a extensão do tubo germinativo, as septinas desaparecem na base do tubo e um anel

de septina é formado na hifa, com migração do núcleo da célula mãe para o tubo germinativo, onde ocorre a primeira mitose. Após a divisão nuclear, um dos núcleos retorna à célula mãe, e o outro se posiciona no tubo germinativo apical ao anel de septinas²⁷. O anel de septinas é então dividido em dois anéis, entre os quais é formado um terceiro anel de actomiosina, o qual se contrai originando o septo primário. O septo secundário é formado com a invaginação da parede celular, porém o septo primário é mantido de forma que os compartimentos filhos são mantidos fortemente unidos, sem a ocorrência de constrição. O compartimento apical do tubo germinativo se mantém em ciclo celular e continua a se alongar, enquanto que o compartimento mãe permanece em G1. Eventualmente, quando o compartimento mãe entra no ciclo celular novamente, pode haver a formação de um segundo tubo germinativo e formação de ramificações. Entretanto, como a velocidade de desenvolvimento no compartimento apical é maior que a do compartimento mãe, hifas são raramente ramificadas¹¹.

A formação de hifa verdadeira difere então do desenvolvimento de pseudo-hifas, pois nas pseudo-hifas o septo é formado entre as células mãe e filha, o núcleo se divide juntamente com o citoplasma das células mãe e filha²⁸ e ambas retornam ao ciclo celular. Além da presença de constrições entre as células na pseudohifa, esta é altamente ramificada e facilmente rompida por agitação mecânica²⁵. Adicionalmente, um mecanismo de síntese de enzimas de degradação de septo que ocorre em leveduras, responsável pela separação das células, é inibido nas hifas, o que faz com que a hifa seja caracterizada como uma cadeia linear de células alongadas²⁵.

O polimorfismo pode ser desencadeado por uma variedade de estímulos^{11,18,29}. Essas mudanças morfológicas ocorrem em resposta a alterações nas condições de crescimento. Parâmetros que promovem o desenvolvimento de hifas incluem

temperatura de crescimento acima de 35°C, pH maior que 6,5, presença de nitrogênio, fontes de carbono não fermentáveis, baixas concentrações de oxigênio e uma ampla gama de produtos químicos, incluindo N-acetilglucosamina, prolina (e outros aminoácidos) e álcoois^{18,29}.

O soro é um dos indutores mais potentes do desenvolvimento de hifas e considerado a “poção mágica” para indução de hifas verdadeiras em *C. albicans*²⁹. O fator responsável não é a albumina, uma vez que livre de albumina, o soro de rato foi tão eficiente na indução da filamentação como ao utilizar o soro convencional³⁰. Dois indutores conhecidos de formação de hifas, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e prolina, podem contribuir para o efeito sérico, uma vez que glicoproteínas são geradas na degradação do soro, conferindo assim a privação de aminoácidos²⁹⁻³¹. Além disso, o pH exerce um grande papel na morfogênese, pois um pH neutro auxilia no desenvolvimento de hifas de *C. albicans*, enquanto um pH alcalino (pH < 6,5) bloqueia a formação de hifas e estimula crescimento da forma de levedura^{18,29,32}.

A análise dos efeitos entre a morfologia de *C. albicans* com os fatores ambientais (pH, meio de cultura e temperatura) mostrou que temperatura de 37 °C e pH 7,0 foram essenciais para realizar a transição da forma de leveduras em filamentos¹⁸. Diversos trabalhos já abordaram a associação entre fatores nutricionais e as mudanças morfológicas em *C. albicans*^{18,29,32}. O soro é uma substância que está presente no sangue humano e foi observado um aumento da filamentação ao utilizar o soro de cavalo como meio de cultura, com uma filamentação de 52% da amostra no período de tempo de 4,5 horas. RPMI-1640 é um meio de cultivo que possui alta porcentagem de glicose, fosfato, aminoácidos e biotina e a presença desses nutrientes está associada com mecanismos indutores de filamentação³³. Foi visto uma filamentação moderada em RPMI-1640 (44% de filamentação em um período de

tempo de 4,5 horas). A filamentação observada em meio Modified Sabourauds Glucose Broth foi a menor quando comparada ao RPMI e soro de cavalo. Ao avaliar diferentes temperaturas, foi observado que a temperatura ideal para filamentação foi a de 37 °C e que temperaturas mais altas resultaram na regressão de hifas verdadeiras para tubos germinativos¹⁸. Também foi visto que o pH extracelular (pH em 7,0) é um dos fatores que modificam a morfologia de *C. albicans*. A associação entre pH 7,0 e a temperatura de 37 °C foi a ideal para indução da filamentação e a mudança desses parâmetros alterou e reduziu significativamente a filamentação¹⁸.

Desencadeada por esses fatores ambientais, a formação de hifas é regulada por mecanismos de sinalização celular, principalmente o complexo proteína quinase A e adenosina 3':5'-monofosfato cíclico (cAMP-PKA). Outras vias alternativas também podem ser ativadas e promover a formação de hifas, como a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e estresse genotóxico¹⁵. Essas vias de sinalização estão associadas a fatores de transcrição, como *enhanced filamentous growth 1* (Efg1,), *Candida pseudohyphal regulator 1* (Cph1,) e *Ras-like protein 1*, como também da expressão de adenilil ciclase codificada por Cyr1 (adenilato-ciclase). Essa via de sinalização leva à transcrição de genes específicos a hifas, como os genes *hyphal wall protein 1* (HWP1,), família de *secreted aspartyl protease* (SAP4, SAP5 e SAP6,), *agglutinin-like sequence 3* (ALS3,) e *cell elongation protein 1* (ECE1,), as quais codificam proteínas na parede celular ancoradas por glicosilfosfatidilinositol responsáveis pela virulência da hifa^{11,15}.

Na forma de hifas, *C. albicans* promove invasão dos tecidos do hospedeiro e infecção. Estudos demonstraram que *C. albicans* submetida a inibidores de conversão para a forma filamentosa ou cepas mutantes com deficiência para formação de hifas não são capazes de invadir os tecidos e causar infecção^{12,13}. Uma vez formada a hifa,

a invasão do epitélio colonizado pode ocorrer tanto por endocitose como por penetração ativa¹⁵. A endocitose é um processo mediado pelas células epiteliais e não necessita que as hifas estejam vivas, uma vez que as células não viáveis também sofrem esse processo. Já a penetração ativa é um processo realizado pela hifa, a qual necessita estar viável para penetrar entre as junções celulares ou entre as camadas do epitélio¹⁵.

C. albicans também pode formar clamidosporos, que consiste em células esféricas de parede espessa ou de esporos assexuados. Podem se desenvolver sobre pseudo-hifas ou hifas e aparecem em condições ambientais desfavoráveis e de extrema escassez de nutrientes e oxigênio^{11,18,24,34}.

Leveduras (também conhecidas como células “brancas”), hifas, pseudo-hifas e clamidosporos foram os primeiros tipos morfológicos de *C. albicans* descritos na literatura. Porém, atualmente, novos morfotipos de células semelhantes a leveduras mais alongadas foram relatados, como células opacas, cinzas e de transição induzida gastro-intestinalmente, o que totaliza nove morfologias já descritas para *C. albicans*. Essas células produzem colônias de aparências distintas: enquanto que as brancas (**a**/ α) são cremosas, brilhantes e abobadadas (mais comuns), as opacas (**a** ou α) são ligeiramente mais escuras, foscas e achatadas (mais raras). Esses novos morfotipos são identificados pelo padrão genotípico do locus *mating-type-like* (*MTL*), cujo alelo pode ser **a** (*MTLa*) ou α (*MTL α*), e se diferenciam pelo potencial de virulência e pelos reguladores da morfogênese ativados na transição de cada morfologia. As formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) e as leveduras brancas são associadas a infecções, já essas novas morfologias parecem estar especializadas para comensalismo em órgãos específicos³⁴. Cada uma das morfologias, assim como suas respectivas características, está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Características dos tipos de morfologias de *C. albicans* (continua).

	MTL	Formato celular	Unicelular vs. Multicelular	Caractéísticas Morfológicas especiais	Fatores desencadeadores	Funções especiais	Interação com o hospedeiro
Levedura (branca (a/α))	a/α	Redonda para oval	Unicelular	N/A	Forma de célula padrão em condições <i>in vitro</i>	Formação de biofilme (convencional)	Virulência (corrente sanguínea); comensalismo (boca, pele, vagina e trato gastrointestinal)
Hifa	a/α	Tubular	Multicelular	N/A	37 °C, N-acetilglucosamina, soro, imersão em ágar, hipóxia, hipercarbia e pH alcalino	Formação de biofilme (convencional), tigmotropismo	Endocitose induzida; penetração ativa do hospedeiro; virulência (boca, vagina e corrente sanguínea)
Pseudo-hifa	a/α	Elipsóide alongado	Multicelular	Constricções nos septos	Sinais indutores de hifa	Formação de biofilme (convencional)	Virulência (boca, vagina e corrente sanguínea)
Clamidosporo	a/α	Redonda para oval	Multicelular***	Parede celular espessa	Escassez de nutrientes, hipóxia	Desconhecido	Desconhecido
Branca (a) e Branca (α)	a/Δ, a/a e α/Δ, α/α	Redonda para oval	Unicelular	N/A	37 °C, glucose e pH alcalino	Formação de biofilme (sexual)	Desconhecido
Opaca (a) e Opaca (α)	a/Δ, a/a e α/Δ, α/α	Elipsóide	Unicelular	Espinhas na superfície	N-acetilglucosamina, hipercarbia e pH ácido	Acasalamento	Alta aptidão em colonizar em modelos de pele de camundongo

Quadro 1 - Características dos tipos de morfologias de *C. albicans* (conclusão).

Opaca (a / α)	a / α	Elipsóide	Unicelular	Espinhas na superfície	N-acetilglucosamina, escassez de nutrientes e hipercarbia	Desconhecido	Alta aptidão em colonizar em modelos de pele de camundongo
Cinza (a / α)	a / α	Elipsóide	Unicelular	Menor tipo celular	Abundância de nutrientes	Desconhecido	Alta aptidão em colonizar modelos de língua <i>ex vivo</i>
GUT	a / α	Elipsóide	Unicelular	N/A	Desconhecido	Desconhecido	Alta aptidão em realizar comensalismo em região gastrointestinal de camundongo

GUT, *gastrointestinally induced transition*; MTL, *mating-type-like* (tipo de acasalamento); N/A: não aplicável.

*Observe que as células **a** e α formam pseudo-hifas e hifas sob certas condições ambientais, mas esses tipos de células não foram bem caracterizados.

**As pseudo-hifas surgem como uma subpopulação na maioria das condições indutoras de hifas.

***Os clamidosporos são produzidos pelas células terminais de hifas e pseudo-hifas em condições de escassez de nutrientes e de oxigênio.

Fonte: Tabela reproduzida de Noble et al.³⁴, 2017.

Contudo, o modo como o sistema imune reconhece e diferencia as formas morfológicas da *C. albicans* não é completamente elucidado na literatura, mas sabe-se que envolve o reconhecimento de determinadas estruturas da parede celular fúngica (mananas, quitina, β -1,3-glucano e β -1,6-glucano) por receptores presentes na superfície das células imunológicas, como os receptores *Toll-Like*, lectinas tipo C e *NOD-Like*. Esses receptores desencadeiam uma cascata de sinalização que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e neutrófilos e defensinas pelas células epiteliais¹⁵. A formação das hifas é o mecanismo chave para evitar a morte de *C. albicans* pelas células fagocíticas do hospedeiro e representa um processo de adaptação do fungo às possíveis adversidades encontradas no corpo humano. A fagocitose induz uma mudança na morfologia da levedura em hifas, que alongam-se e, eventualmente, perfuram a membrana do macrófago. Isso resulta em lise e morte de macrófagos, permitindo assim que *C. albicans* continue a se desenvolver no hospedeiro^{11,17,35}. A transição para a forma de hifa também é responsável pela formação de biofilmes de *C. albicans*¹¹.

2.2 Biofilme Fúngico

Biofilme é o nome dado a uma comunidade complexa de micro-organismos incorporados em uma matriz polimérica extracelular, aderida a uma superfície inerte ou viva, e que fornece estrutura e proteção para as células^{36,37}. Logo, os micro-organismos se encontram protegidos em um ambiente estável e podem tolerar concentrações extremamente altas de antimicrobianos. No biofilme, a expressão gênica é regulada pela densidade da população microbiana por meio de substâncias liberadas, como o farnesol, o tirosol, o triptofol e o álcool feniletil, que afetam o comportamento microbiano (*quorum sensing*). Enquanto que o tirosol estimula a filamentação em *C. albicans*, farnesol, triptofol e álcool feniletil apresentam efeito oposto³⁸. O impacto desses biofilmes na saúde é alarmante, pois além de serem mais tolerantes aos antimicrobianos e de difícil tratamento, as células liberadas pelos biofilmes podem migrar para outros sítios do hospedeiro e causar infecções em outros órgãos/tecidos e também para a corrente sanguínea, causando infecções sistêmicas, responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade⁴⁻⁶.

Deficiente penetração e difusão dos antibióticos através da matriz polissacarídea, adsorção dos antimicrobianos da matriz polimérica, resposta fisiológica dos micro-organismos ao ambiente químico heterogêneo existente no biofilme, presença de células persistentes, idade do biofilme, produção de enzimas inativadoras dos antimicrobianos, estrutura populacional densa e proximidade das células microbianas, aumento da expressão de bombas de efluxo e expressão de genes de resistência têm sido discutidos como os fatores causadores da evidente tolerância antimicrobiana associada aos biofilmes. Os micro-organismos nos biofilmes são entre 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando cultivadas de forma

planctônica (livres, em suspensão)³⁹⁻⁴¹. Além disso, a matriz atua como uma barreira aos anticorpos do hospedeiro.

Experimentos *in vitro* mostraram que o desenvolvimento de biofilme ocorre em uma série de etapas sequenciais durante um período de 24 a 48 horas^{6,42}. A etapa inicial consiste na adesão de células fúngicas ao substrato, formando uma base de células de levedura basal (etapa de aderência)^{43,44}. Em seguida, ocorre a fase de proliferação e filamentação celular, em que as células formam projeções alongadas que continuam a crescer nas formas filamentosas (etapa de iniciação). A produção de hifas é uma característica do início da formação do biofilme, seguida pelo acúmulo de matriz polissacarídica extracelular, à medida que o biofilme amadurece (etapa de maturação). Finalmente, na última etapa, células de levedura são liberadas do biofilme, que podem colonizar outras superfícies adjacentes (etapa de dispersão). A dispersão de células associadas ao biofilme tem grande relevância clínica, pois as células liberadas podem iniciar a formação de novos biofilmes ou disseminar-se nos tecidos do hospedeiro e, portanto, estão associadas à ocorrência de candidemia e a doenças invasivas disseminadas⁴⁵.

A matriz polimérica do biofilme é responsável por proteger as células, fornecer coesão ao biofilme, manter sua arquitetura tridimensional e atuar como barreira defensiva às células contra agentes externos (antimicrobianos, anticorpos e células de defesa do hospedeiro)⁴⁶. A matriz do biofilme de *C. albicans* é composta por carboidratos (β -glucanos e mananas), proteínas, hexosamina, fósforo, ácido urônico, lipídeos e DNA extracelular (eDNA)⁴⁷ e tem sido associada à tolerância do biofilme aos tratamentos antifúngicos. O carboidrato β -1,3 glucano da matriz, também encontrado na parede celular do fungo, é responsável por sequestrar fluconazol e impedir sua ação na célula fúngica⁴⁸. Esse carboidrato se liga à manana, outro

carboidrato da matriz e da parede fúngica, o que resulta na formação do complexo manana-glucano na matriz do biofilme que também é responsável por sua tolerância⁴⁹. Adicionalmente, a biogênese da matriz envolve a síntese de vesículas extracelulares que contém os componentes da matriz do biofilme⁵⁰.

Investigações de propriedades quantitativas e qualitativas de células liberadas por biofilmes demonstraram que a maioria das células dispersas são células leveduriformes, sugerindo que a transição de levedura para hifas que ocorre durante a iniciação do biofilme pode ser revertida para dispersão. As células dispersas têm fenótipos distintos das células planctônicas, como elevada aderência, capacidade de filamentação e aumento de patogenicidade em animais. Assim, as células liberadas durante a etapa de dispersão são equipadas de forma única para semear novos biofilmes e locais de infecção^{6,45}.

A análise genética indicou que tanto as células de levedura como as hifas são críticas para a formação de biofilme, sugerindo que cada tipo de célula tem papel único e específico no processo⁴⁴. No entanto, os biofilmes de modelos de infecção *in vivo* parecem mais complexos do que aqueles formados *in vitro*, com leveduras e hifas encontradas intercaladamente. Em ambos os sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo*, no entanto, o material de matriz extracelular está ligado a células de levedura e hifas e é normalmente permeado por todo o biofilme⁶. O estabelecimento da matriz extracelular do biofilme representa uma característica única dos biofilmes³³.

Células do biofilme de *C. albicans* cultivadas com glicose apresentaram maior atividade metabólica durante a fase de adesão⁵¹. Ao avaliar a rugosidade média do biofilme, foi verificada formação máxima de biofilme em sacarose (21,75 nm), seguido por glicose (17,99 nm), arabinose (13,6 nm) e lactato (11,16 nm). A altura do biofilme suplementado com glicose e sacarose foi de 167,5 nm e 196 nm, respectivamente.

Além disso, as células expostas à sacarose exibiram maior formação de biofilme e secreção de polissacarídeos da matriz após o período de 48 horas. A capacidade de também utilizar lactato e arabinose como fontes de carbono alternativas indicam o papel adaptativo de *C. albicans* em modular o seu metabolismo para nichos específicos. Esta modulação na adaptação de carbono pode afetar a resposta imune do hospedeiro, promovendo assim a patogênese de infecções relacionadas ao biofilme. Com isso, os resultados foram indicativos de que a presença de fontes de carbono influenciam o desenvolvimento, a modulação dos fatores de virulência e a organização estrutural do biofilme de *C. albicans*⁵¹.

Uma série de outras propriedades e fatores de virulência de *C. albicans* são conhecidos por promover sua capacidade de formação de biofilme e contribuir para o dano tecidual e sua persistência no hospedeiro¹⁴. O mais importante é a propriedade de mudança morfológica, já que os estados morfológicos distintos de *C. albicans* ditam as fases de colonização, crescimento e disseminação. A forma de levedura tem sido associada tanto à fixação inicial quanto à disseminação, enquanto a forma filamentosa permite que *C. albicans* invada o tecido hospedeiro e forme um biofilme maduro^{52,53,54}.

2.3 Métodos Quantitativos

Diversos métodos têm sido utilizados para se quantificar micro-organismos e/ou biofilmes, como cultivo e contagem de colônias viáveis (UFC/mL) por meio das unidades formadoras de colônias (UFC), contagem celular, quantificação de matriz⁵⁵ e qPCR. O método de UFC/mL envolve a transferência de uma alíquota da suspensão microbiana para uma placa de Petri com meio de cultura ágar, que pode ser espalhada ou não sobre a superfície, seguida de incubação em temperatura, atmosfera e tempo controlados. Apesar de ser amplamente utilizado, é considerado lento e laborioso⁵⁶,

além de requerer a ruptura do biofilme e a homogeneização das células microbianas previamente ao seu plaqueamento. Outros métodos avaliam a viabilidade microbiana com o biofilme íntegro baseado na redução (alteração de cor) de sais, como os sais de tetrazólios utilizados para avaliar o metabolismo celular, e corantes como a resazurina conhecida como *Alamar Blue* ⁵⁵.

A técnica de qPCR baseia na amplificação do DNA extraído da célula, o qual é detectado, amplificado e quantificado por sinais de fluorescência de maneira específica, eficiente e fidedigna⁵⁷. Para isso, são utilizados *primers* específicos a determinados genes do organismo a ser identificado. Um par de *primer* é uma sequência específica de ácidos nucleicos composto pelo *Forward* (sense) e pelo *Reverse* (anti-sense) que se ligam ou anelam a regiões do gene de interesse e iniciam a reação. A avaliação da especificidade do *primer* é de extrema importância para que a PCR ocorra de maneira fidedigna, sem que haja a amplificação de outros genes que não são de interesse⁵⁸. Quando um par de primers é utilizado, a fluorescência para a quantificação é determinada por um intercalante, por exemplo, SYBR. Entretanto, além dos primers, pode ser incluída uma sonda, por exemplo, TaqMan, que é acoplada a um fluóforo responsável pela fluorescência a ser quantificada.

Outro fator importante para a determinação de viabilidade por qPCR diz respeito à amplificação somente de células viáveis. Como todo o DNA de uma espécie presente na amostra pode ser ligado especificamente ao *primer*, a qPCR não diferencia o DNA de células vivas, mortas e o DNA extracelular (eDNA) da matriz do biofilme. O DNA de células mortas se mantém estável por períodos de tempos prolongados¹⁶, o que acarreta em uma quantificação sobre-estimada da amostra avaliada. Em virtude disso, corantes intercalantes ao material genético, como monoazida de etídio (EMA) e monoazida de propídio (PMA), têm sido utilizados para se excluir o DNA de células

não viáveis e o eDNA do biofilme durante a qPCR, de forma a se quantificar somente as células viáveis. Esses agentes penetram em células com rompimento de membrana, intercalam-se ao DNA dessas células e, após serem fotoativados, impedem a amplificação do DNA na PCR^{59,60}. Foi demonstrado que o EMA foi superior ao PMA em distinguir células viáveis e células não-viáveis de *C. albicans*, e os melhores parâmetros de utilização do EMA em qPCR foram: concentração de 25 µM, incubação por 10 min com as células fúngicas seguida por fotoativação por 15 minutos utilizando um sistema de fotoativação⁶⁰.

A suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* a agentes antifúngicos é frequentemente avaliada utilizando ensaios colorimétricos que estimam a atividade de células metabolicamente ativas^{61,62}. Nestes ensaios, as células viáveis convertem corantes de tetrazólio em derivados de formazan que podem ser mensurados através do uso de um espectrofotômetro. Entre esses ensaios, um dos mais utilizados é ensaio de redução do sal de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxianilida, ou XTT. O ensaio XTT tem sido usado para avaliação da viabilidade de diferentes organismos incluindo células de mamíferos, bactérias e fungos^{63,64}. É um método simples, porém para sua realização é necessário que haja uma correlação linear entre a atividade metabólica celular e o sinal de colorimétrico. Em biofilmes maduros esse ensaio é mais desafiador, já que a relação entre atividade metabólica e número de células pode não ser linear. UFC/mL é um método que subestima a contagem de células viáveis nas populações de biofilmes maduros, já que os mesmos são estruturas multicelulares, com predomínio de hifas e envoltos de uma matriz de polissacarídeo que impede o desenvolvimento das colônias⁶².

Sendo assim, Xie et al, 2011⁶² desenvolveram um ensaio molecular baseado no teste de PCR em tempo real (qRT-PCR) para estimar a viabilidade de biofilmes

maduros. Inicialmente, foram feitas análises em amostras com um amplo intervalo de densidade celular de *C. albicans* e foi visto que a linearidade ocorreu apenas quando sinal de densidade óptica (450 nm) e o número de células foram observados até uma densidade celular de 1×10^5 células por poço. Nos poços com densidade celular maior, não foram observadas diferenças significativas nos valores de DO. Essa informação sugere que o ensaio de XTT seja limitado quando utilizados em biofilmes maduros. Além disso, também foi feita uma correlação entre os testes XTT e qRT-PCR. Para isso, os biofilmes foram cultivados por 48 h e tiveram sua biomassa mecanicamente reduzidas para que o restante do biofilme fosse avaliado nos dois ensaios (XTT e qRT-PCR). O ensaio XTT mostrou que a remoção de 25-50% da biomassa resultou em diminuição detectável aos valores de DO, quando comparado com o biofilme intacto. No entanto, as diferentes remoções não foram proporcionais aos sinais de DO, o que sugere que o ensaio de XTT não quantifica com precisão as alterações que foram realizadas nos biofilmes maduros. No ensaio de qRT-PCR foi vista uma excelente concordância entre a redução na massa do biofilme em 25%, 33% e 50% para uma redução de 25,8%, 35,4% e 49,8% no logarítmico dos números de cópia de transcrição, respectivamente. Essa informação sugere que o ensaio qRT-PCR pode medir com precisão a atividade metabólica de biofilmes maduros⁶².

A avaliação de sete métodos de quantificação de biofilme de *C. albicans* (XTT, cristal violeta, quantificação de DNA, qPCR, quantificação de proteínas, peso seco e UFC) demonstrou que o ensaio de XTT foi o método mais acurado, reproduzível e eficiente⁶⁵. Foram comparados biofilmes de uma cepa de referência de *C. albicans* e duas mutantes com ausência dos genes de adesão (*ALS3Δ/Δ* e *ALS1Δ/Δ*), as quais demonstraram em microscopia eletrônica de varredura diferenças visuais na quantidade de hifas e células aderidas. Somente o ensaio de XTT mostrou diferenças

significativas entre as cepas mutantes e parental conforme visualização das imagens microscópicas⁶⁵. Entretanto, nenhuma correlação entre os métodos foi realizada, e a quantificação visual por microscopia eletrônica de varredura utilizada como referência aos demais métodos é bastante subjetiva.

Os métodos de UFC, microscopia de fluorescência por hibridização *in situ* (FISH) ou epifluorescência e qPCR foram comparados para quantificar um modelo de biofilme subgingival polimicrobiano *in vitro* composto por *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Actinomyces oris*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*⁶⁶. O biofilme foi exposto a meio de cultura de queratinócitos em condições aeróbias e, após 3 horas, verificou-se que os três métodos de quantificação demonstraram valores entre 10^6 e 10^8 células⁶⁶. Entretanto, após 24 horas de exposição, a variação foi maior, de até 10^4 a 10^9 células. Quando comparados, todos os métodos demonstraram correlação significativa após 3 horas de exposição, sendo que os valores dos métodos de epifluorescência e qPCR foram superiores ao dos de UFC⁶⁶. Após 24 horas de exposição, somente os métodos de epifluorescência qPCR demonstraram correlação significativa, e foi verificado valores maiores de epifluorescência e qPCR para os limites inferiores e superiores da escala de 10^6 a 10^9 , respectivamente⁶⁶.

A falta de precisão do método de UFC na quantificação de *C. albicans* foi observada em estudos *in vitro* e *in vivo*⁶⁶⁻⁷². Um ensaio metabólico cinético foi desenvolvido para correlacionar a viabilidade de um isolado clínico de *C. albicans* por metabolismo (XTT e Alamar Blue) e UFC/mL⁶⁸. Diferentes concentrações de inóculo fúngico (6×10^1 a 8×10^6 UFC/mL) demonstraram elevada correlação com a atividade metabólica (redução de XTT e de alamar Blue)⁶⁸. A avaliação de diferentes fases de

crescimento fúngico (exponencial e estacionária) em diferentes meios de cultura (convencional e modificado) mostrou que a correlação entre a atividade metabólica e o UFC resultou em valores de R^2 de 0,91 a 0,98¹⁷. Quando as células fúngicas foram tratadas com anfotericina B, o crescimento na fase exponencial demonstrou forte e significativa correlação entre a atividade metabólica e o UFC, enquanto que a correlação entre esses métodos foi fraca e não significativa para culturas em fase estacionária e meio de cultura convencional⁶⁸. Os ensaios metabólicos subestimaram a viabilidade celular comparado ao UFC, principalmente para as culturas na fase estacionária, quando o efeito da anfotericina B foi avaliado⁶⁸. Esses resultados demonstram que, mesmo quando há uma forte e significativa correlação entre os métodos de quantificação fúngica, a exposição a um agente antifúngico pode alterar essa relação, principalmente para fase estacionária de crescimento.

Em outra investigação também foi verificada forte e significativa correlação de um método de plaqueamento em ágar por um dispositivo em espiral (*spiral plating*) comparado com os métodos convencionais de espalhamento (*spread plating*) e derramamento (*pour plating*) em ágar para culturas de *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* padronizadas em concentrações de 10^2 a 10^5 UFC/mL⁶⁹. Esse estudo também demonstrou que, para uma forte e significativa correlação, é importante a padronização do inóculo fúngico em diferentes concentrações⁶⁹.

Quando óleos essenciais foram avaliados como tratamento de candidíase vaginal de camundongos, um método luminescente foi mais sensível do que UFC/mL⁷². Posteriormente, esse método de imagem bioluminescente foi comparado com o método de UFC/mL num modelo murino orofaríngeo de candidíase, e foi verificado que a técnica de bioluminescência detectou com maior precisão a presença de *C.*

albicans nos dias iniciais de infecção e também a redução da quantidade fúngica após tratamento com fluconazol, principalmente em outros locais da cavidade bucal (gengiva e palato mole) que não a origem da infecção (língua)⁷¹. No entanto, métodos moleculares não foram utilizados nesses estudos para comparar sua precisão na quantificação fúngica, além disso não foi reportado o quão subestimado é o método de UFC/mL em relação ao número células viáveis da amostra.

A estimativa precisa da quantidade de células fúngicas, independente das diferenças morfológicas celulares encontradas, é importante no acompanhamento do tratamento em casos de infecção, para avaliar a eficácia antifúngica de métodos terapêuticos e também em pesquisa, sem que haja sub ou superestimação de valores.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi comparar os métodos de quantificação das formas morfológicas de *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilmes. Deste modo, os objetivos específicos deste estudo são:

1. Comparar as técnicas de quantificação por contagem por células viáveis e UFC/mL de diferentes cepas de *C. albicans* em culturas planctônicas nas formas de leveduras e filamentos;
2. Comparar as técnicas de quantificação por contagem por células viáveis, UFC/mL, e atividade metabólica (XTT) de diferentes cepas *C. albicans* em biofilmes, os quais apresentam morfologias mistas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados os seguintes materiais, instrumentos e aparelhos:

4.1 Materiais

Os equipamentos de proteção individual (EPIs) foram utilizados, tais como máscara, luva, gorro e jaleco durante todos os experimentos microbiológicos. Todo material foi autoclavado antes e após o uso. Para a fase experimental, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

4.1.1 Materiais de consumo

- Acetona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- Água destilada;
- Água MilliQ;
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
- Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- Câmara de Contagem tipo Neubauer descartável (Kasvi, China);
- Cepas de *C. albicans* SC5314 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
- Cepas de *C. albicans* ATCC90028 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
- Cepas de *C. albicans* de Isolados clínicos de pacientes com diabetes coletados na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (CAAE: 18398719.0.0000.5416 – ANEXO A);

- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Concanavalina A conjugada a Alexa Fluor™ 488 Conjugada (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Fosfato de Potássio dihidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil).
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Hoechst 33342 (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Iodeto de Propídeo (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Iphone 7 Plus (Apple, California, EUA)
- Lâmina (Precision Glass Line, Hamburgo, Alemanha);
- Lamínula Lâmina (Precision Glass Line, Hamburgo, Alemanha);
- Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,05 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA);
- Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);
- Menadiona (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Microtubos 1,5mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);
- Microtubos 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil).

- Monoazida de etídio (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Ácido morfolinopropaneoulfônico (MOPS) Purificado (Quemis, Joinville, Santa Catarina, Brasil);
- Papel alumínio;
- Parafilme (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO, Diadema, SP, Brasil);
- Paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- Placas de 48 poços de fundo plano (Kasvi, China);
- Placas de 96 poços de fundo plano (Kasvi, China);
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Pote coletor 50 mL (Alibaba, Shanghai, China)
- Sistema de filtração de 250 e 500 mL (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- Soro Fetal Bovino (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- Triton X-100 (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- Tubos tipo Falcon de 15 mL (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

- Tubos tipo Falcon de 50 mL (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT, Thermo-Fisher, Waltham, MA, EUA);

4.1.2 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- Micropipetas de 0,5 – 10 µL, 100-1000 µL e de 20-200 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha);
- Pipetas de 1-10 mL e 1-5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia);
- Provetas graduadas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil);

4.1.3 Equipamentos

- Agitador de tubos Modelo: AP56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
- Agitadores de tubos vortex Modelo: KMC 1300V (Biosystem, Paraná, Brasil);
- Aparelho de luz LED (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA)
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. N°6614 (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil);
- Balanças de precisão Modelo: BG 400. N°016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
- Balança Analítica (modelo AUW 220D) (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão);

- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
- Estufa de Cultura e Bacteriologia (modelo 403-5N) (Nova Ética, São Paulo, Brasil);
- Estufa de cultura e bacteriologia (modelo 410-6ND) (Nova Ética, São Paulo, Brasil);
- Estufa de Cultura e Bacteriologia (modelo TE-392/2) (Nova Ética, São Paulo, Brasil);
- Estufa para secagem e esterelização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
- Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
- Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
- Centrífuga de microtubos Microhemato (modelo 2410) (Fanem, São Paulo, Brasil);
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, USA);
- Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. Nr-série: 919 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Microscópio de Fluorescência Modelo DFC310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha);
- Microscópio de bancada invertido (Optiphas, Van Nuys, CA, EUA);

- Sonicador Modelo: FB - 120, Número de série: 92506 W-10-16 ((Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);
- Fluostar Omega (BMG Lab Tech, São Paulo, Brasil);
- Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) (Zeiss, Koln, Alemanha);
- In Cell Analyser 2000 (GE Healthcare, Brasil)
- Biotable RGB (São Carlos, SP, Brasil);
- Incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20) (Quimis, São Paulo, Brasil);
- Incubadora de CO₂ (modelo L212) (Biosystem, Paraná, Brasil);
- Micro-ondas (Brastemp, São Bernardo do Campo, SP, Brasil);
- Microscópio Binocular Biológica (modelo N-107) (Coleman, Santo André, SP, Brasil);
- pHmetro de bancada (modelo QX1500 Plus pH/mV RS 232) (Qualxtron, São Paulo, SP, Brasil);
- Purificador e deionizador de água - Osmose reversa (modelo OS 10 LX) (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil);
- Refrigerador (modelo KSR39) (Bosch, Alemanha);
- Sistema de Ultrapurificação de Água-MiliQ (modelo Mega UP) Mega Purity (EximLab, Curitiba, PR, Brasil);
- Banho seco com agitação, modelo Isotemp (Fisher Cientific, Pittsburgh, EUA);
- Balança de precisão " NewClassic MS Precision Balances" (Mettler Toledo, Brasil);

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo de culturas planctônicas de *Candida albicans*

Cepa padrão (SC5314) e um isolado clínico de *C. albicans* de um paciente diabético com estomatite protética (3030B) mantidos em meio YNB com glicerol 50% em freezer -80 °C foram descongelados e reativados em meio de cultura SDA a 37 °C por 48 horas. O uso do isolado clínico foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE: 18398719.0.0000.5416 – ANEXO A). Em seguida, com base nos estudos de Mukaremera et al⁷³ e Merson-Davies & Odds²⁴, o crescimento fúngico nas diferentes morfologias foi controlado por meio da temperatura e da atmosfera e realizado inicialmente da seguinte maneira para cada forma morfológica:

1. Leveduras: a partir das colônias das cepas reativas em SDA, foi realizado um pré-inóculo em YNB cultivado *overnight* (16 h) a 26 °C, seguido de um inóculo diluindo-se o pré-inóculo no mesmo meio cultura fresco na proporção de 1:10 e 1:20. Esse inóculo foi incubado a 26 °C até que a densidade óptica (DO a 540 nm - $0,8 \pm 0,2$) atingisse a fase mid-log de acordo com a curva de crescimento de cada cepa.
2. Hifas: Cultivo de um pré-inóculo e inóculo conforme já descrito acima seguido por centrifugação da suspensão fúngica a 2.688 xg por 10 minutos a 4 °C, lavagem em tampão de fosfato e salina (PBS; 0,136 M NaCl; 1 mM KH₂PO₄; 2 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) e resuspensão das células em meio RPMI 1640 com glutamina e fenol vermelho, sem bicarbonato, tamponado com MOPS e suplementado com D-glicose 2%, pH 7,0⁷⁴. A suspensão fúngica foi então incubada a 37 °C em CO₂ 5% sob agitação (75 rpm) por 8 horas.

3. Pseudo-hifas: cultivo inicial de um pré-inóculo e inóculo conforme descrito anteriormente, seguido por centrifugação, lavagem em PBS pH 7,4, resuspensão das células em NaCl 0,15 M e incubação a 30 °C por 24 horas para restrição de nutrientes às células. Em seguida, a suspensão fúngica foi centrifugada e as células foram resuspensas em RPMI e incubadas a 30 °C por 8 horas.

Para todos os métodos, cada suspensão foi cultivada por meio de pré-inóculo e inóculo, pois dessa forma há menor quantidade de células agregadas mesmo em cultura planctônica⁷⁵. Mesmo com a utilização dessa metodologia, as suspensões fúngicas obtidas com cada método de crescimento morfológico foram submetidas à sonicação para separação de micélios e células agregadas, e as morfologias celulares das duas suspensões foram confirmadas em microscópio óptico.

Os parâmetros da sonicação, tempo e potência foram definidos de modo a não comprometer a viabilidade fúngica. Um inóculo foi submetido a diferentes tempos de sonicação. Foi comparado os valores de viabilidade de uma amostra não sonicada com amostras submetidas aos tempos de 30, 40, 50 e 60 segundos. O processo de sonicação foi realizado com um sonicador QSonica Q125 equipado com uma sonda de 2 mm de diâmetro. A potência de sonicação foi de 2 W e a frequência de 20 kHz. A análise de viabilidade foi realizada por meio de UFC/mL e pela contagem de células na Câmara de Neubauer. Com os parâmetros definidos, cada amostra foi sonicada e os parâmetros de sonicação foram de 30 segundos (50 J) para leveduras e 50 segundos (69 J) para hifas com amplitude de 52% e pulsos de 2 segundos para biofilmes.

A concentração das suspensões foi determinada em espectrofotômetro por meio da densidade óptica (DO) a 540 nm seguida por plaqueamento em DAS. Cada

suspensão fúngica foi centrifugada e resuspendida em PBS e submetida a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e cada diluição foi utilizada como uma amostra independente para que fosse possível uma análise correlacional.

4.2.2 Marcação fluorescente para quantificação de células e núcleos

Para quantificação das células fúngicas em suas diferentes morfologias (levedura e filamentos), uma alíquota de 100 μ L de cada cultura foi incubada inicialmente com concanavalina conjugada a Alexa Fluor 488 a 31,2 μ g/mL para marcação da parede fúngica em verde (excitação de 488 nm e emissão de 525 - 617 nm) e com iodeto de propídeo a 20 μ M (vermelho, excitação de 561 nm e emissão de 604 – 700 nm) para marcação de células não viáveis durante 30 min⁷⁵. Posteriormente, as células foram centrifugadas e fixadas em 100 μ L de paraformaldeído 4% por 30 min e incubadas com 10 μ L de Hoechst 33342 (excitação de 405 nm e emissão de 400 – 475 nm), 100 μ L de Triton X100 e 1000 μ L de PBS para marcação dos núcleos celulares (azul) por 30 min⁷⁶.

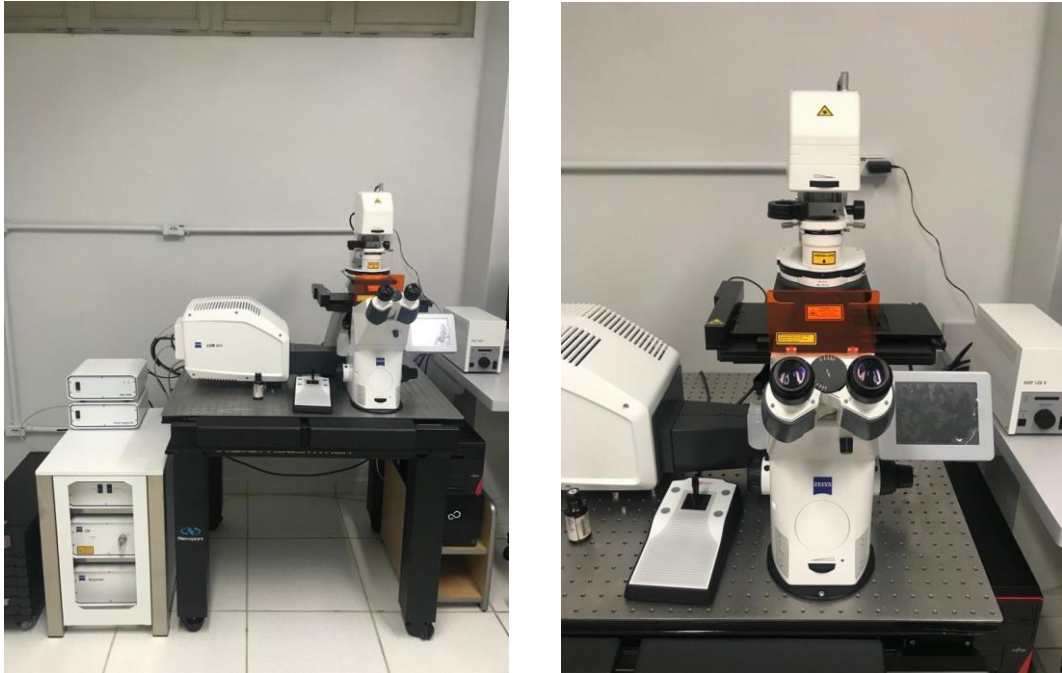
Após a marcação fluorescente, alíquotas de 10 μ L da suspensão microbiana foram transferidas para hemocitômetro (Câmara de Neubauer) e então foi realizada a captura de imagens no Microscópio Confocal. As imagens foram adquiridas nos diferentes canais de cada fluoróforo e também em campo claro. O Microscópio Confocal utilizado neste trabalho foi o LSM 780 da Zeiss®, invertido, que captura as imagens por varredura laser (Figura 2).

A contagem foi realizada em cinco quadrantes da Câmara de Neubauer (Figura 3) e após essa contagem, o número de células/mL foi definido pela seguinte fórmula:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de células/ml} = \text{n}^{\circ} \text{ total de células} / \text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

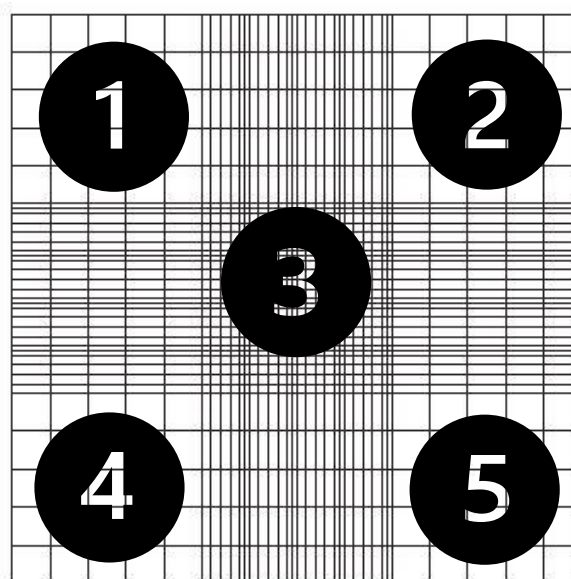
Nesta fórmula, o valor de 10.000 corresponde ao volume de 1 mL (ou 1.000 mm³) multiplicado por 10, uma vez que o número de células na câmara de Neubauer é obtido em 0,1 mm³.

Figura 2 – Microscópio Confocal utilizado para aquisição de imagens.



Fonte: Elaboração do autor.

Figura 3 – Grade de contagem da Câmara de Neubauer.



Nas áreas enumeradas, foram realizadas as contagens pelo método manual.

Fonte: Elaboração do autor.

Para aquisição e análise das imagens, foi utilizado o software ZEN 2.3 (blue edition) 2011 da Zeiss®. A quantificação de células foi realizada manualmente, com o auxílio do programa Image J (programa desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland). Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP. No Microscópio Confocal, não foram detectadas células nas amostras mais diluídas (10^3 a 10^1), somente nas mais concentradas (10^4 a 10^6), totalizando $n = 30$ para 10 suspensões fúngicas cultivadas para cada morfologia e para cada cepa.

4.2.3 Quantificação de colônias (UFC/mL)

Cada amostra obtida foi submetida a diluições seriadas (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1}) para possibilitar contagem de colônias. Alíquotas de 10 μ L de cada diluição foram colocadas em duplicata em placas de SDA. Após incubação por 24 horas a 37 °C, as

colônias foram contadas, a média das duplicatas foi obtida e o valor de UFC/mL foi calculado pela fórmula:

UFC/mL = (número de colônias X 10ⁿ) / q, onde **n** equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e **q** equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas (0,010 mL).

4.2.4 Formação de biofilme

O protocolo para formação de biofilme de *C. albicans* é baseado no reportado por Chandra et al⁴² com modificações. Cada cepa de *C. albicans* foi cultivada até a fase *mid-log* ($0,8 \pm 0,2$), como descrito acima para culturas planctônicas (leveduras). Alíquotas de 1000 µL dessa suspensão foram individualmente pipetadas em orifícios de placas de 48 poços de fundo chato (Kasvi®) e incubadas por 90 min a 37 °C (fase de aderência) sob agitação (75 rpm). Em seguida, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado 2 vezes com PBS para remoção de células não aderidas. Então, 1000 µL de RPMI 1640 foram adicionados e incubados a 37 °C em CO₂ 5% por 48 h para formação do biofilme.

Em seguida, cada orifício com biofilme foi lavado 2 vezes com 1000 µL de PBS para remoção de meio de cultura e células não aderidas. Cada amostra de biofilme foi despreendida dos poços raspando-se uma ponteira de pipeta nos poços com os biofilmes com 1000 µL de PBS. Como o desenvolvimento em biofilme envolve a formação de células filamentosas, as amostras de biofilme compreenderam amostras de morfologias mistas (leveduras, hifas, pseudo-hifas e tubos germinativos). Cada amostra de 1000 µL foi sonicada e os parâmetros de sonicação foram de 60 segundos (84 J) com amplitude de 52% e pulsos de 2 segundos para biofilmes. A suspensão obtida com o biofilme sonicado teve sua concentração determinada por DO. Da

suspensão total, 200 μ L foram utilizados para realizar as diluições seriadas e marcação com fluoróforos para contagem em Microscópio Confocal.

4.2.5 Atividade metabólica do biofilme

O protocolo utilizado para ensaio pelo XTT foi baseado no reportado por Silva et al 2008⁸⁰. Cada amostra foi lava duas vezes com PBS e teve o sobrenadante descartado. O pellet foi resuspenso em uma solução XTT constituído por: solução aquosa de XTT (40 μ L) em concentração de 1mg/mL e que foi armazenada no Freezer -80 °C até a realização dos experimentos, 2 μ L de solução de Menadiona (0,4 mM em Acetona), e 158 μ L de PBS com 200 mM de glicose.

Para o ensaio, cada amostra de biofilme foi colocada em placa de 96 orifícios de fundo chato, que foram incubadas a 37 °C durante 3 horas. Em seguida, 200 μ L do produto foram transferidos para o poço de uma outra placa de 96 poços. A reação foi lida em espectrofotômetro (Fluorstar) com filtro de 492 nm⁸⁰.

4.2.6 Calibração do operador

Como um dos aspectos da pesquisa envolve mensurar o quanto sub ou superestimados são os métodos de contagem das formas filamentosas de *C. albicans*, houve a necessidade de se realizar um teste de calibração intra-avaliador da pesquisadora para os diferentes métodos de contagem. Baseado no trabalho de Bland e Altman de 1986⁸¹, para a calibração é preciso realizar a contagem das mesmas amostras nos diferentes métodos em momentos distintos, tendo em vista a importância da avaliação da repetibilidade e, conseqüentemente, entender o quanto esses valores concordam entre si⁸¹. Isso permite, ao fim dessa análise inicial, entender

se a pesquisadora está realmente calibrada. Por se tratar de um trabalho com diversas etapas, antes de se obter um resultado final, esse piloto foi necessário justamente para que um mesmo erro ou viés na contagem não se reproduzisse por todos os experimentos. Tendo em vista essa real necessidade, foi realizado um teste de contagem de amostras leveduriformes e filamentosas de *C. albicans* (SC 5314) tanto para o método de UFC/mL como para a contagem de células em Câmara de Neubauer.

Para quantificação das células fúngicas em suas diferentes morfologias (levedura e hifa), uma alíquota de suspensão nas morfologias de levedura e hifa com um volume 10 µL foi marcada com 10 µL de azul de Tripán a 4% e levada para a contagem em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). A contagem de células viáveis (não marcadas pelo azul de Tripán) foi realizada através de fotografias realizadas na plataforma específica do software Leica Application Suite LASx do Microscópio de Fluorescência Modelo DFC310 com um aumento da ocular de 10x e objetiva de 10x, no qual foram consideradas as células presentes nos cinco quadrantes da Câmara de Neubauer. Após essa contagem, o número de células/mL foi definido pela fórmula mencionada anteriormente para quantificação em células/mL.

Essas mesmas suspensões que foram analisadas no Microscópio, foram também submetidas ao método de UFC/mL. As amostras foram diluídas para possibilitar a contagem em colônias. Alíquotas de 25 µL de cada diluição foram colocadas em duplicata em placa de SDA e incubadas por 48 h a 37 °C. Após esse período, as colônias foram quantificadas e fotografadas com o auxílio de um celular.

Para o estudo da reprodutibilidade utilizou-se o Coeficiente de Correlação Intra-classe (CCI) com seu respectivo nível de significância a 5% e a classificação do valor de CCI foi realizada segundo os critérios determinados por Fermanian em 1984⁸², o

qual propôs que uma correlação à partir de 0,71 já é considerada boa e que entre 0,91 a 1,00 é considerada excelente⁸².

Após a contagem de ambos métodos em dois momentos distintos, os dados de UFC/mL e células/mL obtidos para cada morfologia fúngica foram individualmente submetidos ao teste estatístico descrito para se verificar a concordância intra-examinador.

4.2.7 Adequação de metodologia

Foi realizado cultivo de inóculos nas morfologias de leveduras e hifas, conforme descrito no item 4.2.1, para a cepa ATCC90028 de *C. albicans*. Os valores de UFC/mL obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de contagem por UFC/mL obtidos nas diferentes diluições.

Morfologia	Diluição	UFC/mL*
Leveduras	10 ⁻⁶	2,51E+06 (1,20E+06)
	10 ⁻⁵	2,70E+05 (1,39E+05)
	10 ⁻⁴	1,61E+04 (2,85E+03)
Hifas	10 ⁻⁶	1,91E+06 (2,89E+05)
	10 ⁻⁵	1,57E+05 (4,04E+04)
	10 ⁻⁴	1,90E+04 (1,01E+04)

* Média (± desvio-padrão), n = 10 para cada diluição.

Fonte: Elaboração do autor.

Foram confeccionadas lâminas de cada amostra marcada com os diferentes fluoróforos e então foi realizada a leitura nesse momento no In Cell Analyzer 2000. As imagens foram adquiridas nos diferentes canais de cada fluoróforo e também em

campo claro. A quantificação de células foi realizada através da análise das imagens adquiridas (quantificação manual, Tabela 2). Não foram detectadas células nas amostras mais diluídas (de 10^{-3} a 10^{-1}) e, por isso, a contagem foi realizada somente nas amostras mais concentradas (10^{-4} a 10^{-6}).

Tabela 2 - Valores de contagem manual após leitura no In Cell Analyzer obtidos nas diferentes diluições.

Morfologia	Diluição	Campo Claro*	Concanavalina A, Alexa Fluor *	Iodido de Propídeo*	Hoechst*
Leveduras	10^{-6}	3,77E+06 (1,72E+06)	3,77E+06 (1,72E+06)	4,20E+04 (3,63E+04)	3,81E+06 (1,75E+06)
	10^{-5}	5,70E+04 (1,77E+04)	5,70E+04 (1,77E+04)	8,00E+02 (1,33E+03)	5,78E+04 (1,85E+04)
	10^{-4}	9,40E+03 (3,58E+03)	9,40E+03 (3,58E+03)	0,00E+00 (0,00E+00)	9,40E+03 (3,58E+03)
	10^{-6}	3,88E+06 (2,00E+06)	3,88E+06 (2,00E+06)	1,18E+05 (5,25E+04)	7,13E+06 (3,65E+06)
Hifas	10^{-5}	6,64E+04 (4,78E+04)	6,64E+04 (4,78E+04)	0,00E+00 (0,00E+00)	1,02E+05 (9,42E+04)
	10^{-4}	1,68E+04 (1,84E+04)	1,68E+04 (1,84E+04)	2,00E+02 (6,00E+02)	4,50E+04 (3,53E+04)

* Média ($\pm$ desvio-padrão), n = 10 para cada diluição.

Fonte: Elaboração do autor.

Não foi realizada a análise de pseudo-hifas e de outras cepas de *C. albicans* devido a alguns contra-tempos: o equipamento In Cell Analyzer é multiusuário, necessita de agendamento para uso e, até o primeiro semestre de 2020, estava precisando de manutenção, o que acarretava em demora na aquisição das imagens; a funcionária técnica responsável pelo equipamento necessitou se ausentar em alguns momentos (realização de cirurgia e férias). Além disso, com as amostras de

leveduras e hifas observadas no equipamento, algumas limitações na técnica foram encontradas, como por exemplo:

- Quando o equipamento captura imagens das células, principalmente hifas, há um desfoque de algumas regiões, o que impossibilita a contagem correta de núcleos.
- O equipamento fotografava um plano, ou seja, células que se encontravam em outros planos não eram captadas ou eram captadas sem nitidez, o que impedia distinguir se era uma célula isolada ou um aglomerado. Em alguns momentos, foi possível verificar que havia células no campo claro, e quando o equipamento era alterado para o modo de fluorescência, formavam-se “borrões”, consequência dessa falta de foco em outros planos. Assim, ao se adquirir a imagem da amostra, o total de células não era capturado.

Em virtude dessas limitações do In Cell Analyzer 2000, as imagens das amostras passaram a ser adquiridas em Microscópio Confocal para que todas as células presentes na amostra fossem capturadas. Adicionalmente, observa-se nas Tabelas 1 e 2 que os valores obtidos na contagem de células foram ligeiramente menores que os valores de UFC/mL para ambas morfologias (amostras 10^5 e 10^4), o que contradiz a informação de que a contagem de colônias subestima a de células^{17,66-72}. Por isso, outras adequações foram realizadas para que houvesse maior precisão do método: as amostras fúngicas marcadas com os fluoróforos foram pipetadas (10 µL) em câmara de Neubauer e não mais em lâminas convencionais para aquisição das imagens em Microscópio Confocal e maior precisão de contagem; o plaqueamento das amostras foi realizado com o mesmo volume utilizado na câmara de Neubauer (10 µL, e não mais 25 µL) e, previamente ao plaqueamento, as suspensões fúngicas foram diluídas em PBS no mesmo volume dos fluoróforos utilizados para marcação celular (1 mL de inóculo em 9,1 mL de PBS), para que a quantidade de células

plaqueadas fosse a mesma (ou mais próxima possível) que a observada em Confocal. Além disso, verificamos que os veículos dos fluoróforos (bicarbonato 9 mM para Concanavalina Alexa Fluor 1 e Triton X100 e PBS para Hoechst em 10:90:1) não comprometiam a viabilidade celular fúngica quando comparados com PBS (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de UFC/mL de *C. albicans* (SC5314) tratado com os veículos dos fluoróforos (bicarbonato 9 mM e Triton X100 e PBS em 10:9:1) ou somente PBS na mesma proporção.

Diluição	Veículos dos fluoróforos	PBS
10^0	5,60E+06	2,28E+06
10^1	4,75E+05	1,78E+05
10^2	6,50E+04	1,98E+04
10^3	9,00E+03	2,03E+03
10^4	5,00E+02	1,58E+02

Fonte: Elaboração do autor.

Na literatura, o uso do soro é constantemente associado a indução de filamentação em *C. albicans*²⁹⁻³¹. Por isso foram realizados alguns testes para verificar a possibilidade do uso do soro no presente estudo também. As amostras receberam RPMI-1640 suplementado com Soro Fetal Bovino e foram realizadas capturas de imagens em diversos períodos de tempo com o objetivo de verificar o aumento da filamentação no protocolo de formação de hifa. Com a observação das imagens foi estabelecido que o melhor protocolo para o presente estudo seria o já estabelecido inicialmente por meio de temperatura e atmosfera (em 4.2.1) e sem a suplementação do soro. O soro atuou semelhante a um meio de cultivo, aumentando a quantidade de células (Figura 4).

Figura 4 - Imagens obtidas no Microscópio Confocal (objetiva de 20x, campo claro) para teste do uso de soro no protocolo de filamentação (continua).

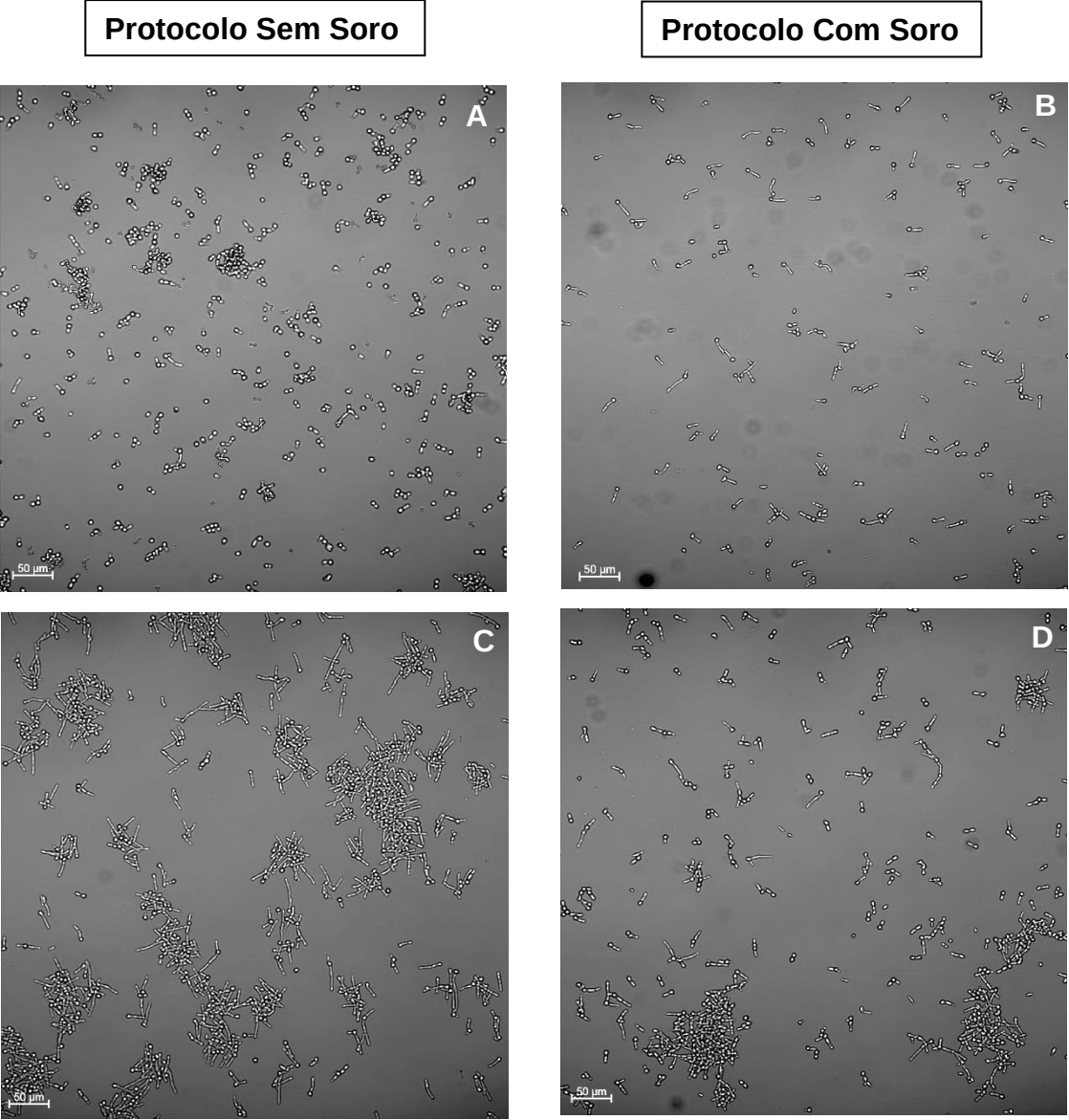
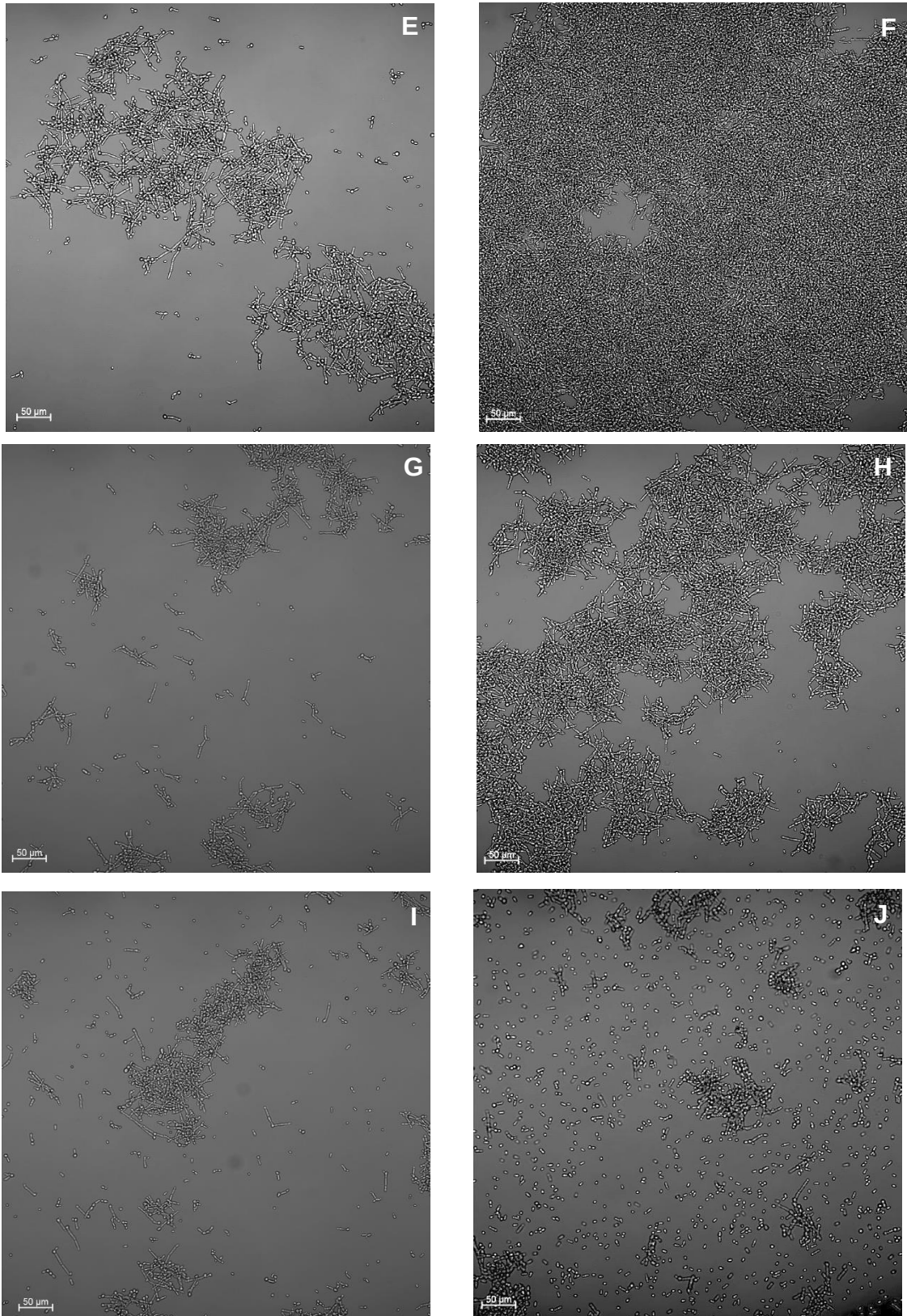


Figura 4 - Imagens obtidas no Microscópio Confocal (objetiva de 20x, campo claro) para teste do uso de soro no protocolo de filamentação (conclusão).

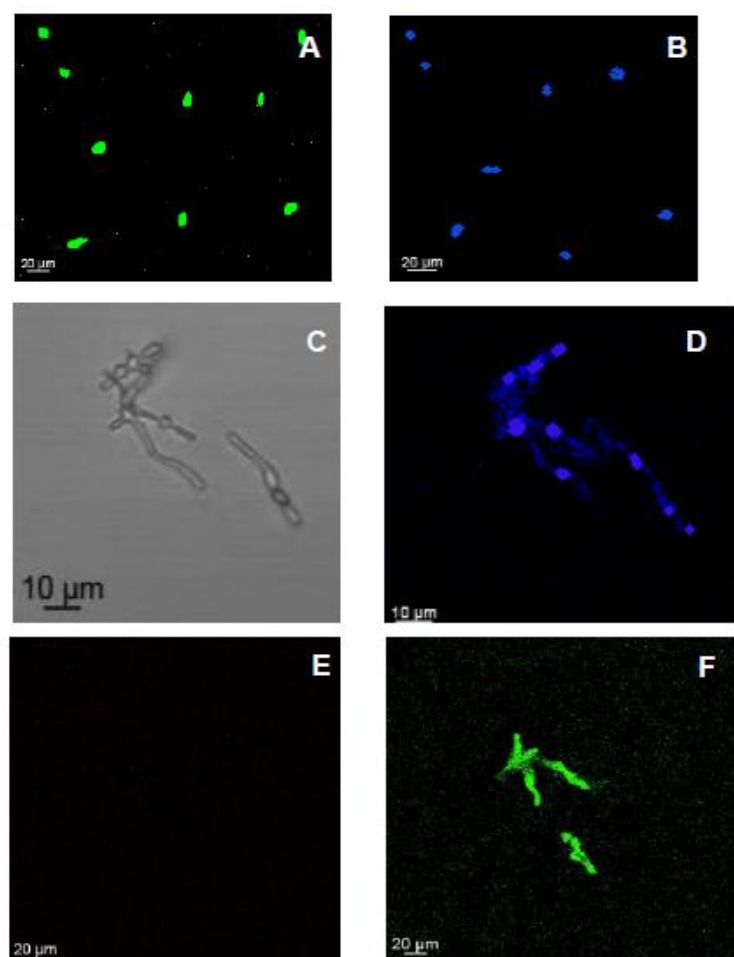


A figura é composta por imagens que foram suplementadas com soro e imagens que não foram suplementadas com o soro e as imagens foram capturadas em diversos períodos de incubação (4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas e 24 horas). A (Sem soro, incubação por 4 horas); B (Com soro, incubação por 4 horas); C (Sem Soro, incubação por 6 horas); D (Com soro, incubação por 6 horas); E (Sem Soro, incubação por 8 horas); F (Com soro, incubação por 8 horas); G (Sem soro, incubação por 10 horas); H (Com soro, incubação por 10 horas); I (Sem soro, incubação por 24 horas); J (Sem soro, incubação por 24 horas).

Fonte: Elaboração do autor.

Feitas essas adequações, amostras de leveduras e hifas ($n = 10$ cada) da cepa SC5314 foram cultivadas, sonicadas, diluídas e quantificadas por crescimento de colônias (UFC/mL) e em microscópio Confocal (células/mL) (Figura 5).

Figura 5 - Imagens obtidas no Microscópio Confocal para os diferentes fluoróforos.



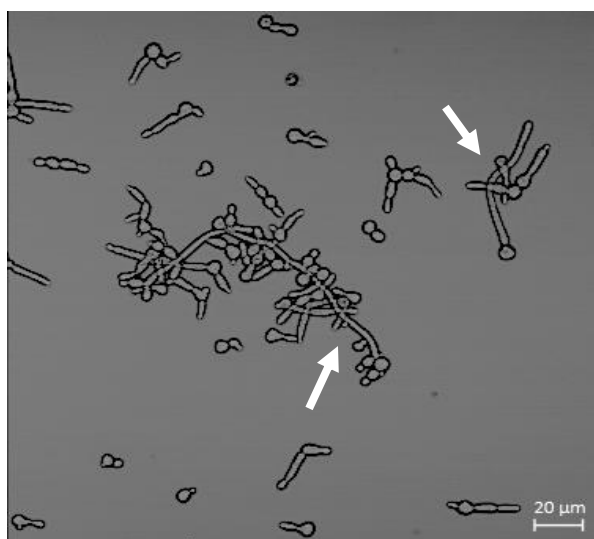
Concanavalina Alexa Fluor (verde, A e F); Iodeto de Propídeo (vermelho, E); Hoechst (azul, B e D). Sendo as imagens A e B referentes a morfologia de levedura e as demais imagens a morfologia de filamentos.

Fonte: Elaboração do autor.

Como no In Cell Analyzer, no Microscópio Confocal também não foram detectadas células nas amostras mais diluídas (10^3 a 10^4), somente nas mais concentradas (10^4 a 10^6), totalizando $n = 30$ para 10 inóculos para cada morfologia.

A metodologia proposta para crescimento de pseudo-hifas demonstrou presença de hifas verdadeiras (Figura 6) e por isso não foi utilizada. Esse resultado confirma a informação de que ainda não há nenhuma condição *in vitro* para indução somente de pseudo-hifas³⁴.

Figura 6 - Hifas verdadeiras de *C. albicans* (setas) obtidas com o protocolo de cultivo para pseudo-hifas (24 h em NaCl seguido por 8 h em RPMI a 30 °C).



Fonte: Elaboração do autor.

4.2.8 Análise estatística

Cada amostra, tanto de cultura planctônica como biofilme, foi submetida aos métodos de quantificação para que a correlação dos métodos possa ser mais precisa. Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, cujas variáveis manifestas, quantitativas contínuas e de desfecho são: UFC/mL, número de células viáveis no Microscópio Confocal, número de núcleos de células viáveis (determinado no Microscópio Confocal) e atividade metabólica; e as variáveis manifestas, quantitativas discretas e independentes são: morfologia e tipo de crescimento (biofilme ou planctônico).

Os métodos de quantificação foram comparados dois a dois: UFC/mL X células/mL para culturas planctônicas e biofilmes e XTT X células/mL; XTT X UFC/mL para biofilmes. Para culturas planctônicas (leveduras e formas filamentosas) e biofilmes, foi analisada a concordância e correlação entre os métodos de quantificação. Para a análise de correlação linear, os dados ($n = 30$) foram plotados em um gráfico de dispersão, foram calculados os coeficientes de determinação (R^2) e correlação (r), bem como a equação de regressão. A distribuição normal e a homocedasticidade dos dados foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. A significância foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman ($\alpha = 5\%$).

A análise de concordância foi realizada pelo CCI com Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores de efeito aleatório e que teve como variáveis independentes os métodos de quantificação, além do gráfico de Bland-Altman que permite verificar contagens sub e superestimadas, com intervalo de confiança de 95%. Para complementar os dados encontrados no Bland-Altman Plot, também foi realizado um teste t para saber se as diferenças entre os métodos são estatisticamente diferentes de zero. A análise do erro sistemático também foi realizado através do teste t pareado para compreender se as quantificações foram estatisticamente diferentes de zero.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Calibração

Para as diferentes morfologias analisadas da cepa de *C. albicans* SC5314, foi verificado que os valores concordância tanto das contagem de colônias (UFC/mL) como das de células/mL em câmara de Neubauer em dois momentos distintos (das amostras e posteriormente das fotografias das amostras) foi acima de 0,915 (Tabela 4), o que corresponde ao critério “Excelente” segundo Fermanian⁸², 1984:

Tabela 4 - Valores de concordância intra-avaliador obtidos na contagem de colônias e células para as diferentes morfologias de *C. albicans* (SC5314).

Morfologia	Método	Contagem Amostras*	Contagem Fotografia*	ρ^{82}
Leveduras	UFC/mL	1,18E+07 (4,43E+06)	1,26E+07 (5,18E+06)	0,999
	Células/mL	3,04E+07 (2,17E+06)	3,04E+07 (2,21E+06)	0,915
Pseudo-hifas	UFC/mL	3,55E+07 (9,61E+06)	3,55E+07 (9,56E+06)	0,971
	Células/mL	1,42E+07 (2,44E+06)	1,39E+07 (2,18E+06)	0,988
Hifas	UFC/mL	5,39E+07 (9,96E+06)	5,38E+07 (9,86E+06)	0,999
	Células/mL	2,10E+07 (1,06E+06)	2,08E+07 (1,05E+06)	0,999

* Média ($\pm$ desvio-padrão), n = 10 para cada método de contagem.

Fonte: Elaboração do autor.

5.2 Cepa Padrão SC5314

5.2.1 Culturas planctônicas

Os resultados de CCI da Tabela 5 mostram que houve uma concordância nula⁸² ($p < 0,31$) (APÊNDICE D, I), o que é explicado pelos valores maiores de células/mL em relação aos de UFC/mL. Em média ($\pm$ desvio-padrão), os valores de células/mL são maiores do que os de UFC/mL em $0,64 \pm 0,26 \log_{10}$ e $0,69 \pm 0,18 \log_{10}$ para leveduras e filamentos, respectivamente. Para a análise de normalidade, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,001$), que demonstrou que os dados não apresentaram distribuição normal. O teste de Levene realizado para os dados obtidos com as culturas planctônicas de SC5314 em ambas as morfologias demonstrou heterocedasticidade ($p \leq 0,05$) dos dados (APÊNDICE A, B, E, F). Assim, foi feita a análise de correlação de Spearman que demonstrou correlação forte/alta e significativa ($p \leq 0,001$) para ambas morfologias (APÊNDICE C). Os valores do coeficiente de correlação de Spearman e CCI estão demonstrados na Tabela 7 (APÊNDICE C, D, G, H). Os valores do coeficiente de determinação (R^2 , Figura 7) demonstram que 70% e 90% da variabilidade de UFC/mL é explicada por células/mL para leveduras e filamentos, respectivamente.

Tabela 5 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras e filamentos da cepa padrão de *C. albicans* SC5314 (APÊNDICE A-D).

	CCI (ρ)	r_s	p^*
Leveduras	0,401	0,884	0,001
Filamentos	0,428	0,909	0,001

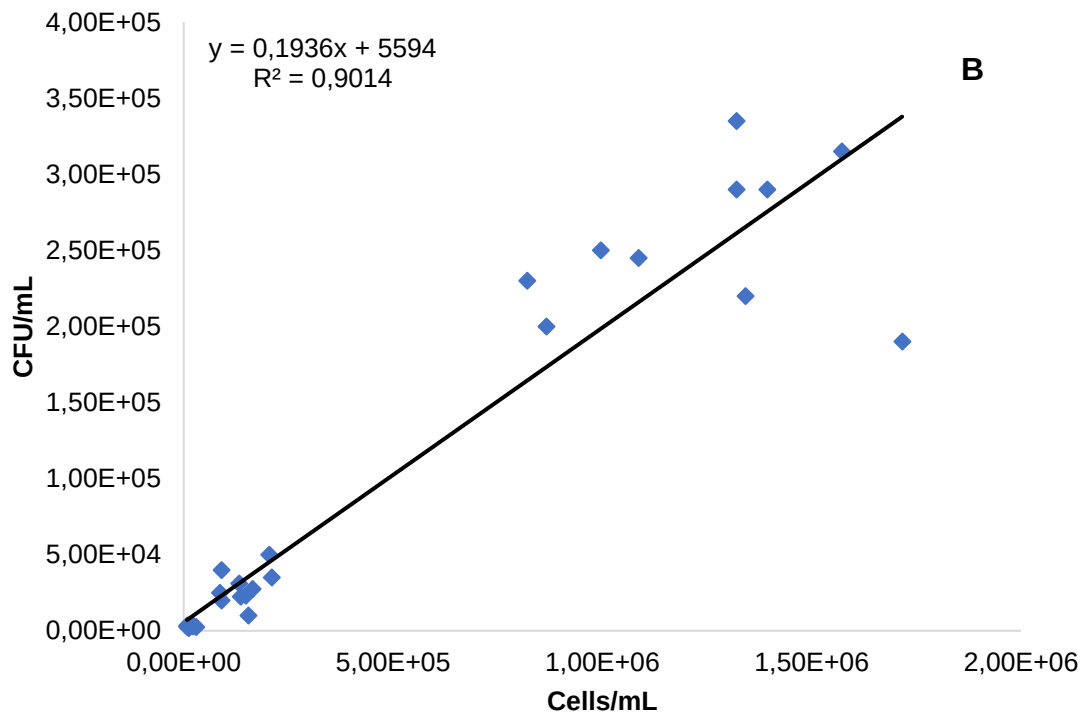
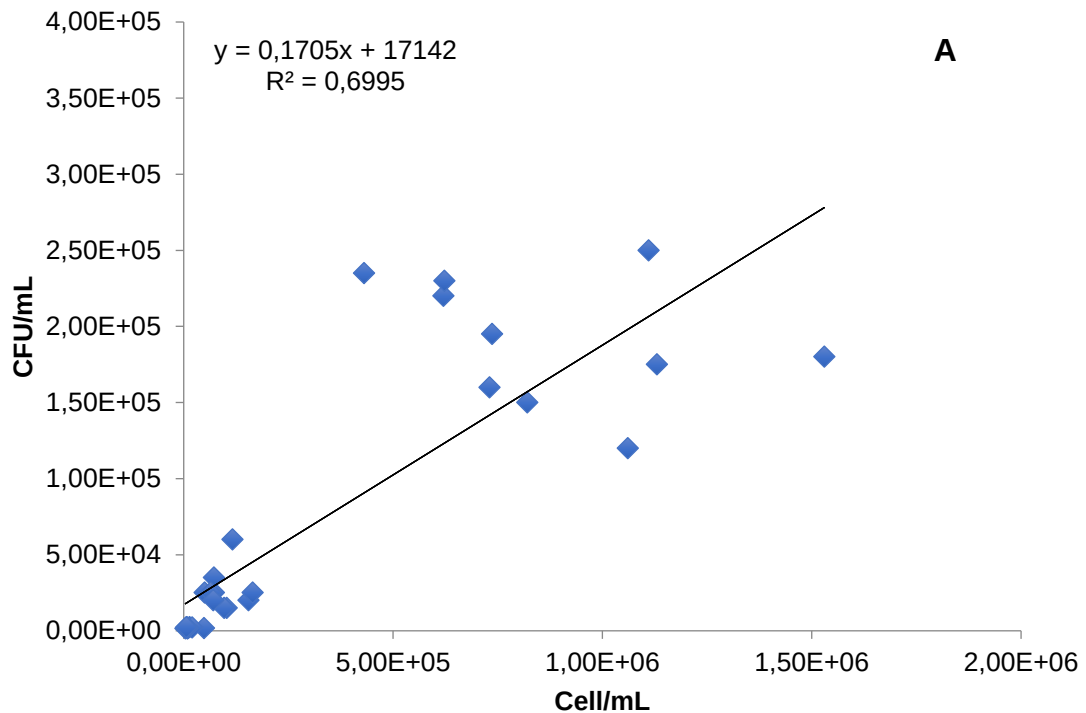
r_s : Coeficiente de correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman.

Fonte: Elaboração do autor.

Esses resultados demonstram que os métodos de contagem por UFC/mL e células/mL, apesar de fortemente correlacionadas, não concordam entre si. Com isso, foi realizada uma outra análise de concordância, o teste de Bland-Altman (Figura 8), que demonstrou também ausência de concordância entre os métodos, tanto para leveduras ($p = 0,001$) como para filamentos ($p < 0,001$) (APÊNDICE I - L). A análise do erro do método (Tabela 6) demonstrou que os valores das diferenças entre os métodos foram estatisticamente diferentes de zero. Os gráficos da Figura 8 demonstram, para ambas morfologias, que: 1. As diferenças entre as medidas são sempre negativas, ou seja, a contagem por UFC/mL é sempre menor em relação à de células/mL; 2. O módulo da diferença das medidas é maior quanto maior são as suas médias, ou seja, quanto maior é a média entre UFC/mL e células/mL, maior é o módulo da diferença entre essas medidas e 3. Existe um viés de proporção entre os métodos de UFC/mL e células/mL para ambas morfologias, cujo modelo de regressão simples ($p < 0,001$) demonstra que existe uma tendência das diferenças dos métodos se concentrarem abaixo da média das diferenças dos métodos.

Figura 7 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras (A) e filamentos (B) (n = 30 cada) da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.



Fonte: Elaboração do autor.

Figura 8 - Gráfico Bland-Altman para os métodos de UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras (A) e filamentos (B) (n = 30 cada) cepa padrão SC5314 de *C. albicans* (continua)

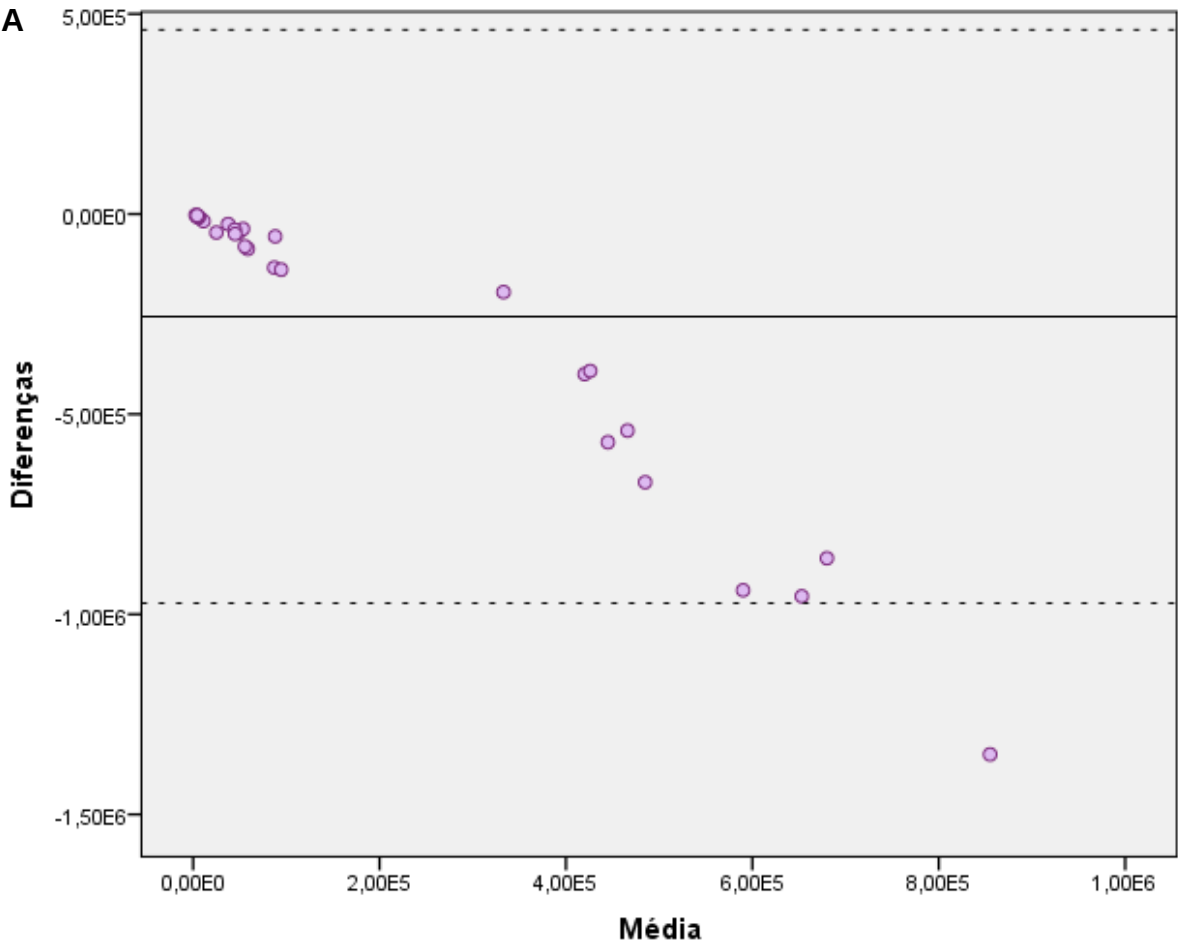


Tabela 6 - Resultados da análise do erro do método entre os valores de UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras e filamentos da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

	t	p*
Leveduras	3,836	0,001
Filamentos	4,288	0,001

*: Significância do teste t pareado.

Fonte: Elaboração do autor.

5.2.2 Biofilme

Os resultados das análises CCI e correlação entre os métodos de contagens de UFC/mL e células/mL para as amostras de biofilme da cepa padrão SC5314 estão apresentados na Tabela 7 e Figura 9, respectivamente. Os resultados de CCI da Tabela 7 mostraram que houve uma concordância regular ($p = 0,566$)⁸² (APÊNDICE Q).. Em média ($\pm$ desvio-padrão), os valores de células/mL são maiores do que os de UFC/mL em $4,50E+05$ ($\pm 7,35E+05$). Os testes de Shapiro-Wilk e Levene demonstraram que os pressupostos normalidade ($p < 0,001$) e homogeneidade das variâncias ($p = 0,009$) não foram atendidos. Já os valores do coeficiente de correlação de Spearman (Tabela 7, APÊNDICE M-P) demonstraram correlação forte/alta e significativa ($p < 0,001$). Os valores do coeficiente de determinação (R^2 , Figura 9) demonstram que 64% da variabilidade de UFC/mL é explicada por células/mL em biofilmes (APÊNDICE Q, R). A análise de Bland-Altman (Figura 10) demonstrou também ausência de concordância entre os métodos ($p < 0,05$) (APÊNDICE R,S). A análise do erro do método nas amostras de biofilme (Tabela 8) também demonstrou que os valores das diferenças entre os métodos foram estatisticamente diferentes de zero. O gráfico da Figura 10 demonstra que: 1. As diferenças entre as medidas são sempre negativas, ou seja, a contagem por UFC/mL é sempre menor em relação à de

células/mL; 2. O módulo da diferença das medidas é maior quanto maior são as suas médias, ou seja, quanto maior é a média entre UFC/mL e células/mL, maior é o módulo da diferença entre essas medidas e 3. Existe um viés de proporção entre os métodos de UFC/mL e células/mL, cujo modelo de regressão simples ($p < 0,001$) demonstra que existe uma tendência das diferenças dos métodos se concentrarem abaixo da média das diferenças dos métodos.

Tabela 7 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL e células/mL para biofilme da cepa padrão SC5314 de *C. albicans*.

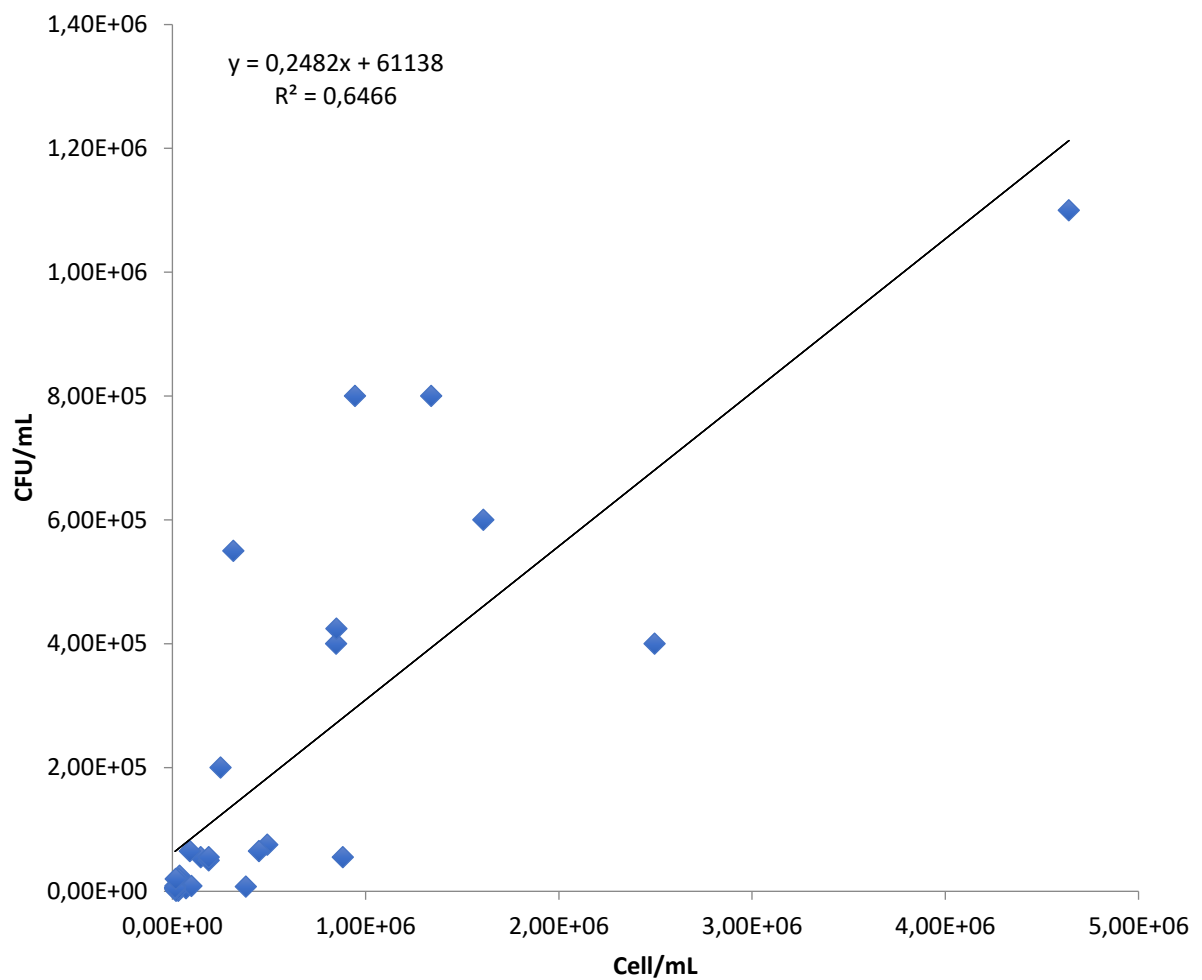
	CCI (ρ)	r_s	p^*
Biofilme	0,566	0,852	0,001

r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman.

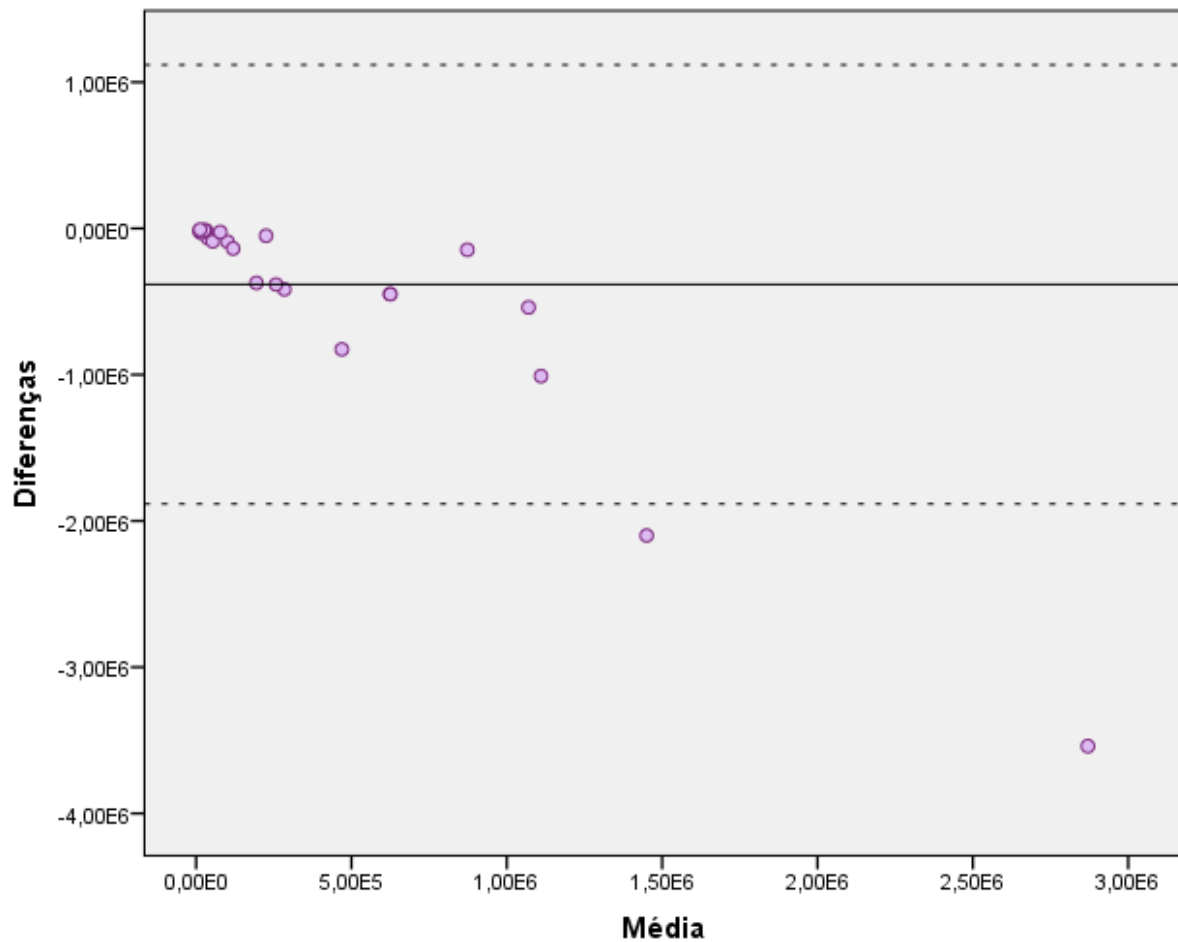
Fonte: Elaboração do autor.

Figura 9 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre UFC/mL e células/mL para biofilme da cepa padrão SC5314 de *C. albicans* (n = 28).



Fonte: Elaboração do autor.

Figura 10 - Gráfico Bland-Altman entre UFC/mL e células/mL para biofilme (n = 28) da cepa padrão SC5314 de *C. albicans*.



Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 8 - Resultados da análise do erro do método entre os valores de UFC/mL e células/mL para biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

	t	p*
Biofilme	2,660	0,013

*: Significância do teste t pareado.

Fonte: Elaboração do autor.

A análise de correlação entre o ensaio XTT e as contagens de UFC/mL e células/mL e para as amostras de biofilme da cepa padrão SC5314 de *C. albicans* estão apresentados na Figura 11. Os valores do coeficiente de determinação (R^2) demonstram que 40% da variabilidade dos valores de absorbância do ensaio XTT é explicada por UFC/mL em biofilmes (Figura 11A) e que 41% da variabilidade dos valores de absorbância de ensaio XTT é explicada por células/mL (Figura 11B). Os valores do coeficiente de correlação de Spearman e CCI estão demonstrados na Tabela 9 (APÊNDICE S, T). Foi possível identificar uma forte e significativa correlação, porém através do valor de CCI foi possível identificar que os valores não concordam entre si.

Tabela 9 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL, células/mL e XTT para biofilme da cepa padrão SC5314 de *C. albicans* (APÊNDICE T, U).

	CCI (ρ)	r_s	p^*
UFC/mL x XTT	-0,011	0,848	0,001
Células/mL x XTT	-0,003	0,707	0,001

r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman.

Fonte: Elaboração do autor.

Figura 11 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre os valores de absorbância do ensaio de XTT e os métodos de quantificação por UFC/mL (A) e células/mL (B) para biofilme da cepa padrão *C. albicans* (n = 28) (continua).

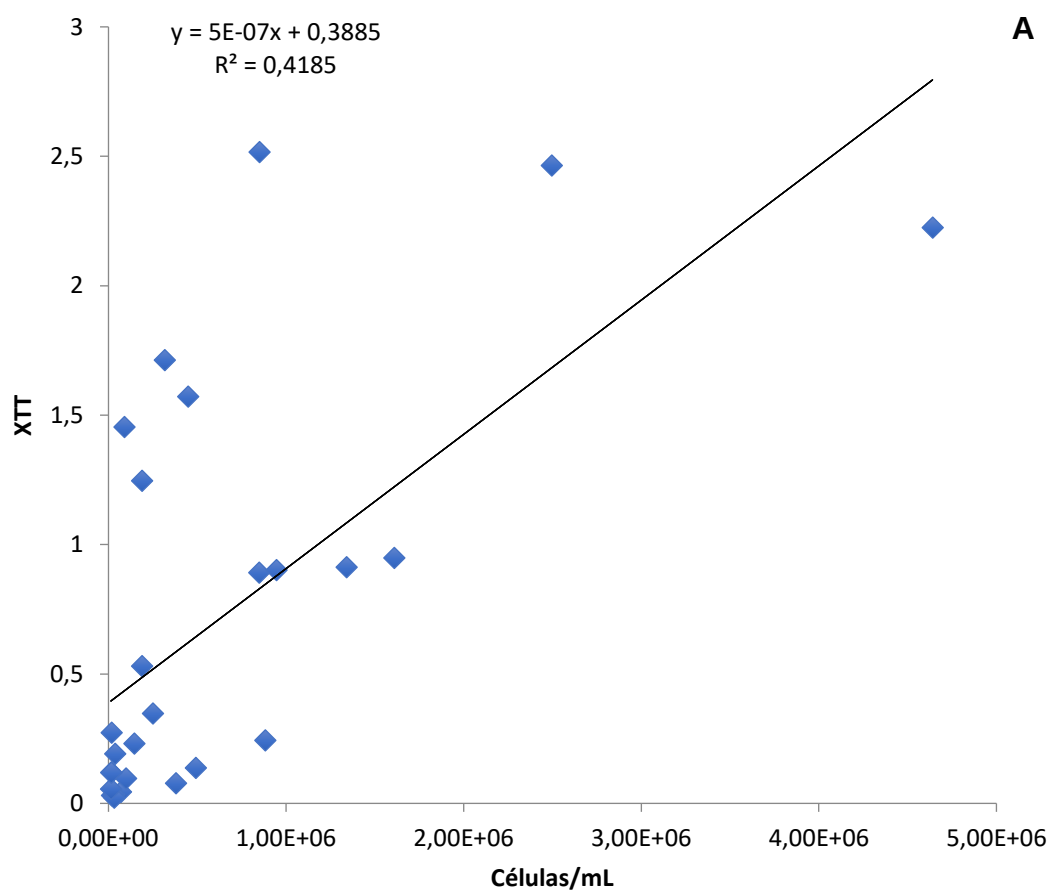
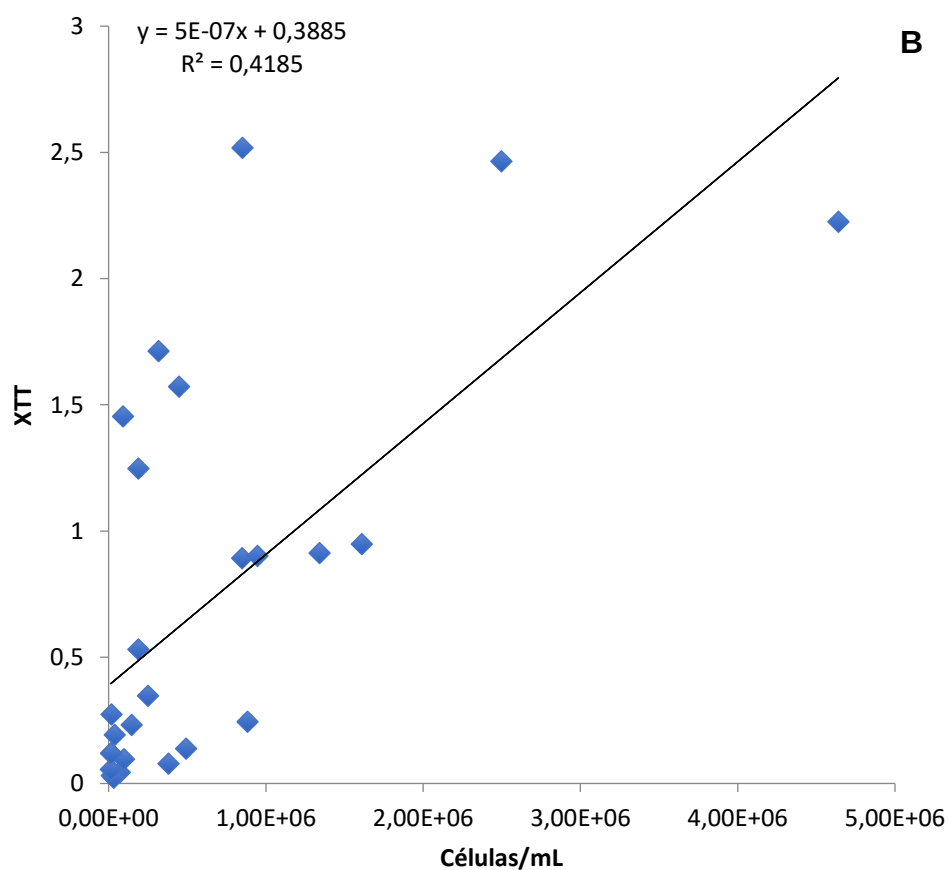


Figura 11 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre os valores de absorbância do ensaio de XTT e os métodos de quantificação por UFC/mL (A) e células/mL (B) para biofilme da cepa padrão *C. albicans* (n = 28) (conclusão).



Fonte: Elaboração do autor.

5.3 Isolado Clínico 3030B

5.3.1 Culturas planctônicas

Os valores de concordância e correlação para as amostras de isolado clínico de *C. albicans* de paciente diabético com estomatite protética estão apresentadas na Tabela 10 e Figura 12. Os resultados de CCI da Tabela 10 mostram que houve uma concordância nula ($p < 0,31$)⁸² (APÊNDICE X, B1). Já os valores do coeficiente de correlação de Spearman estão apresentados na Tabela 10 (APÊNDICE U - A1). Os valores do coeficiente de determinação (R^2 , Figura 12) demonstram que 85% e 89% da variabilidade de UFC/mL é explicada por células/mL em leveduras e filamentos, respectivamente. Assim como observado para a cepa padrão SC5314 de *C. albicans*, os resultados demonstram que os métodos de contagem por UFC/mL e células/mL, são fortemente correlacionados, porém não concordam entre si. A análise do erro do método (Tabela 11) também demonstrou que as diferenças entre as médias foram estatisticamente diferentes de zero. A análise de concordância, pelo teste de Bland-Altman (Figura 13), demonstrou também ausência de concordância entre os métodos ($p < 0,001$) e que UFC/mL subestima a quantificação de células/mL.

Tabela 10 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL e células/mL do isolado clínico 3030B (APÊNDICE X,Y,B1,C1).

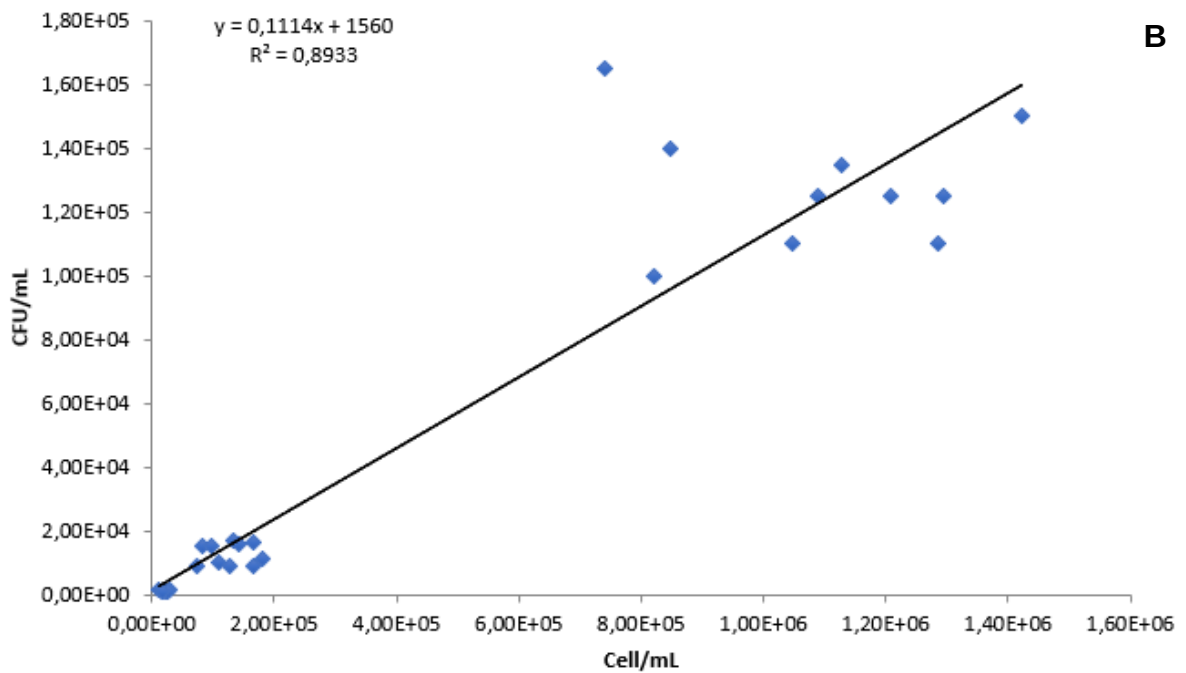
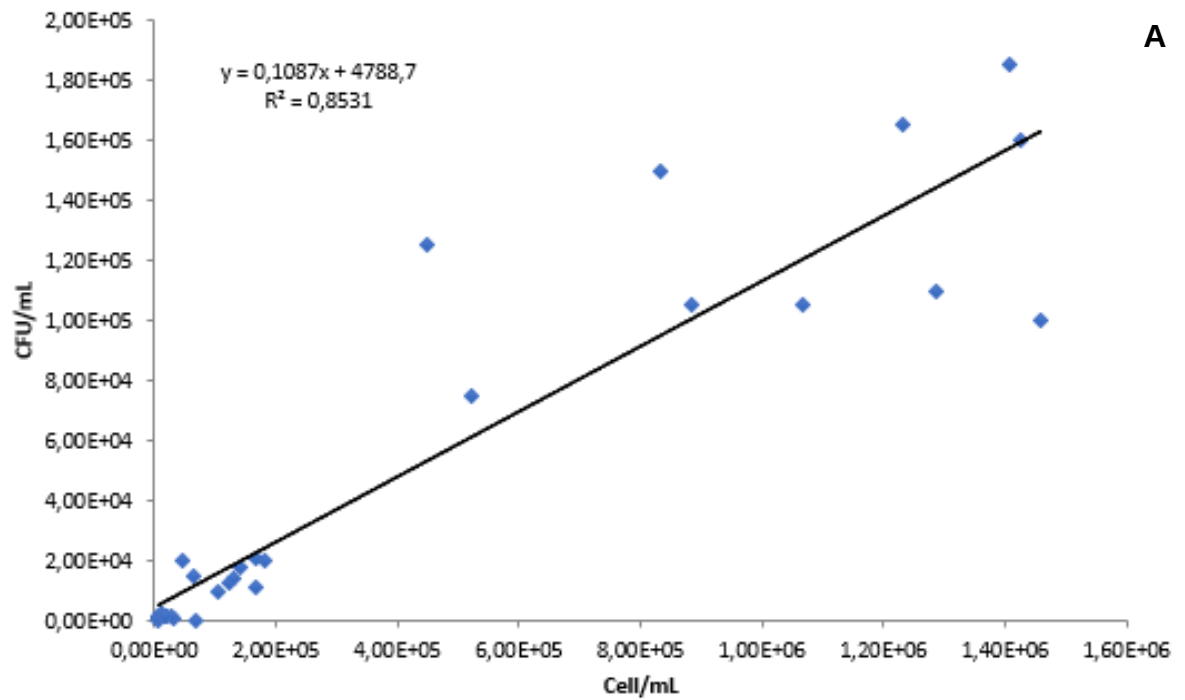
	CCI (ρ)	r_s	p^*
Leveduras	0,263	0,884	$< 0,001$
Filamentos	0,257	0,903	$< 0,001$

r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman

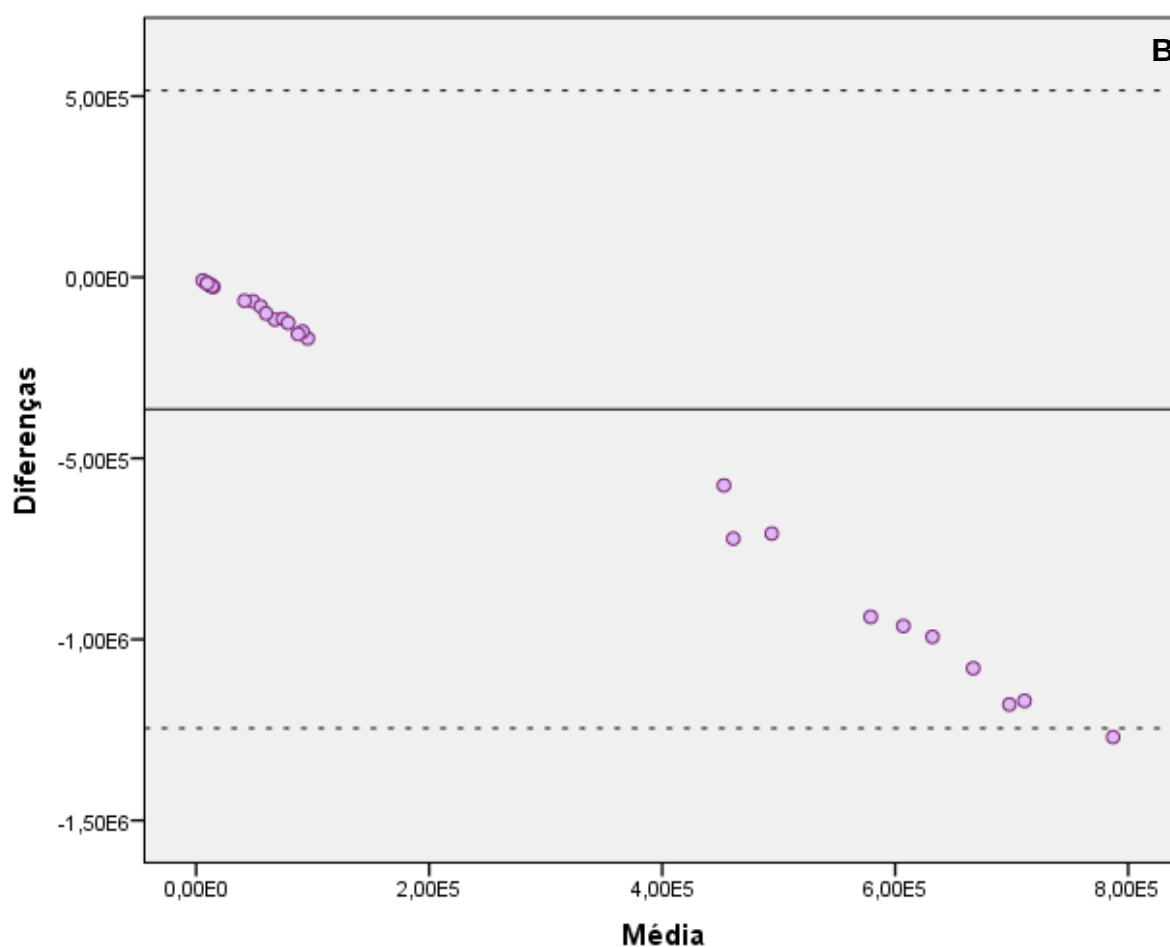
Fonte: Elaboração do autor.

Figura 12 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras (A) e filamentos (B) (n = 30 cada) do isolado clínico 3030B.



Fonte:Elaboração do autor.

Figura 13 - Gráfico Bland-Altman dos métodos de UFC/mL e células/mL para as morfologias de leveduras (A) e filamentos (B) (n = 30 cada) do isolado clínico 3030B (conclusão).



Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 11 - Resultados da análise do erro do método entre os valores de UFC/mL e células/mL isolado clínico 3030B.

	t	p*
Leveduras	4,113	< 0,001
Filamentos	4,449	< 0,001

*: Significância do teste t pareado.

Fonte: Elaboração do autor.

5.3.2 Biofilme

Os valores de concordância e correlação para as amostras de biofilme do isolado clínico do isolado clínico 3030B estão apresentadas na Tabela 12 e Figura 14. Os resultados de CCI da Tabela 12 mostram que houve uma concordância nula ($p < 0,31$)⁸² (APÊNDICE C1 – H1). Os valores do coeficiente de correlação de Spearman estão apresentados na Tabela 12. Os valores do coeficiente de determinação (R^2 , Figura 14) demonstram que 88% da variabilidade de UFC/mL é explicada por células/mL. Assim como observado para a cepa padrão SC5314 de *C. albicans*, os resultados demonstram que os métodos de contagem por UFC/mL e células/mL, são fortemente correlacionados, porém não concordam entre si. A análise de concordância, pelo teste de Bland-Altman está demonstrado na Figura 15. A análise do erro do método (Tabela 13) demonstrou que os valores das diferenças entre os métodos foram estatisticamente diferentes de zero. Em média ($\pm$ desvio-padrão), os valores de células/mL são maiores do que os de UFC/mL em $3,93E+04 (\pm 5,93E+04)$.

Tabela 12 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL e células/mL mL para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (APÊNDICE G1, F1).

	CCI (ρ)	r_s	p^*
Biofilme	0,884	0,929	$< 0,001$

r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman

Fonte: Elaboração do autor.

Figura 14 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre UFC/mL e células/mL para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (n = 30).

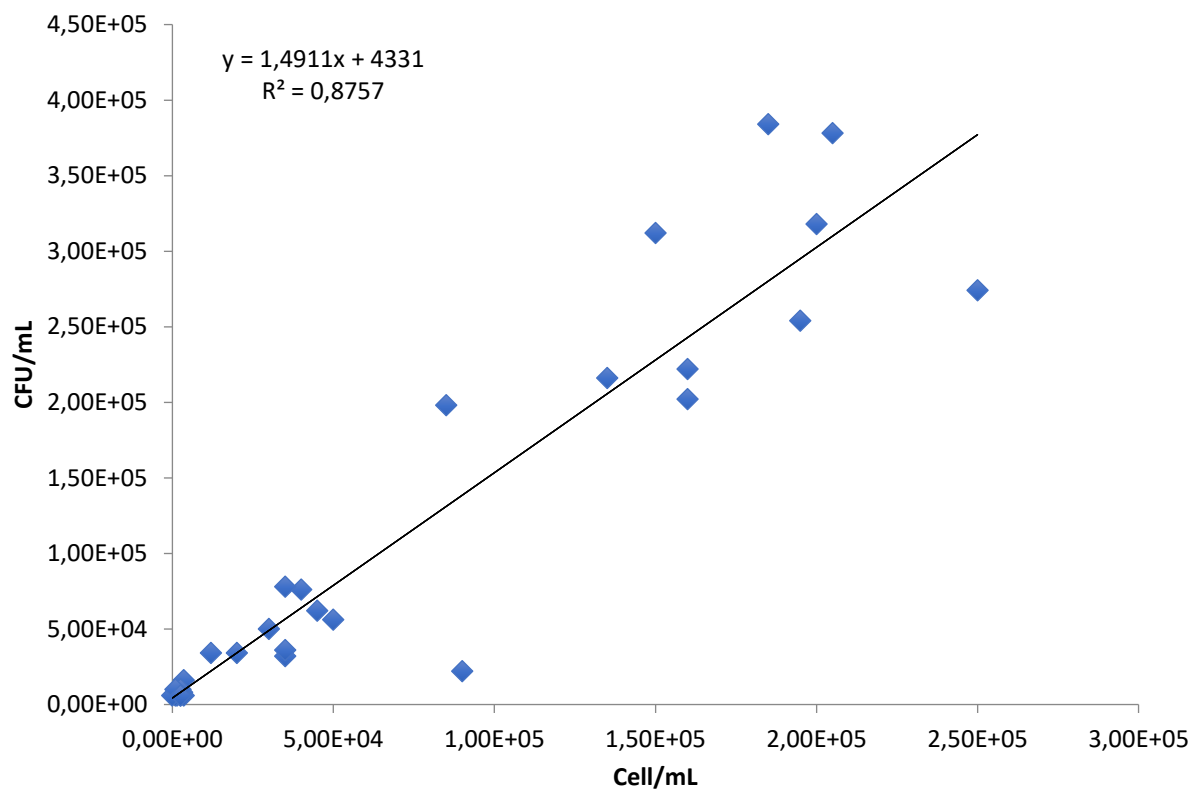
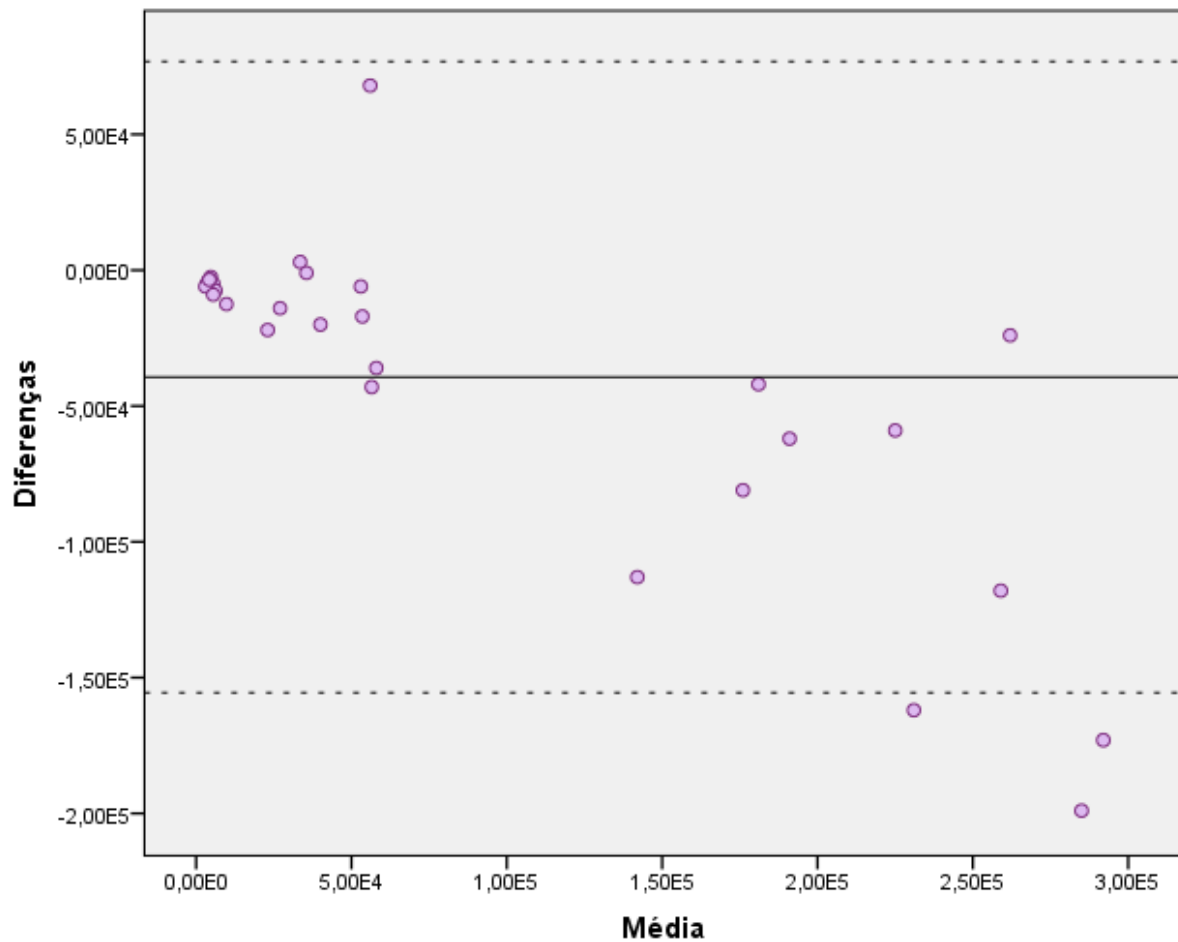


Figura 15 - Gráfico Bland-Altman entre UFC/mL e células/mL para as amostras de biofilme de isolado clínico de *C. albicans* (n = 30).



Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 13 - Resultados da análise do erro do método entre os valores de UFC/mL e células/mL para biofilme do isolado clínico 3030B.

	t	p*
Biofilme	4,449	< 0,001

*: Significância do teste t pareado.

Fonte: Elaboração do autor.

As análises de correlação entre o ensaio XTT e as contagens de UFC/mL e células/mL para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B estão apresentados na Figura 16 (APÊNDICE I1 – N1). Os valores do coeficiente de determinação (R^2) demonstram que 89% e 79% da variabilidade dos valores de absorbância do ensaio XTT são explicados por UFC/mL (Figura 16A) e células/mL (Figura 16B) em biofilmes. Os valores do CCI e correlação de Spearman estão apresentados na Tabela 14. Foi demonstrado que os métodos se correlacionam fortemente ($r_s \geq 0,894$), apesar de não concordarem entre si ($p < 0,001$).

Tabela 14 - Resultados dos testes de CCI e correlação de Spearman entre os valores de UFC/mL e células/mL mL para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (APÊNDICE H1, I1).

	CCI (ρ)	r_s	p^*
UFC/mL x XTT	0,001	0,950	0,001
Células/mL x XTT	0,001	0,894	0,001

r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman;

*: Significância do Coeficiente de Correlação de Spearman

Fonte: Elaboração do autor.

Figura 16 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre os valores de absorbância do ensaio de XTT e os métodos de quantificação por UFC/mL (A) e células/mL (B) de isolado clínico de *C. albicans* (n = 30) (continua).

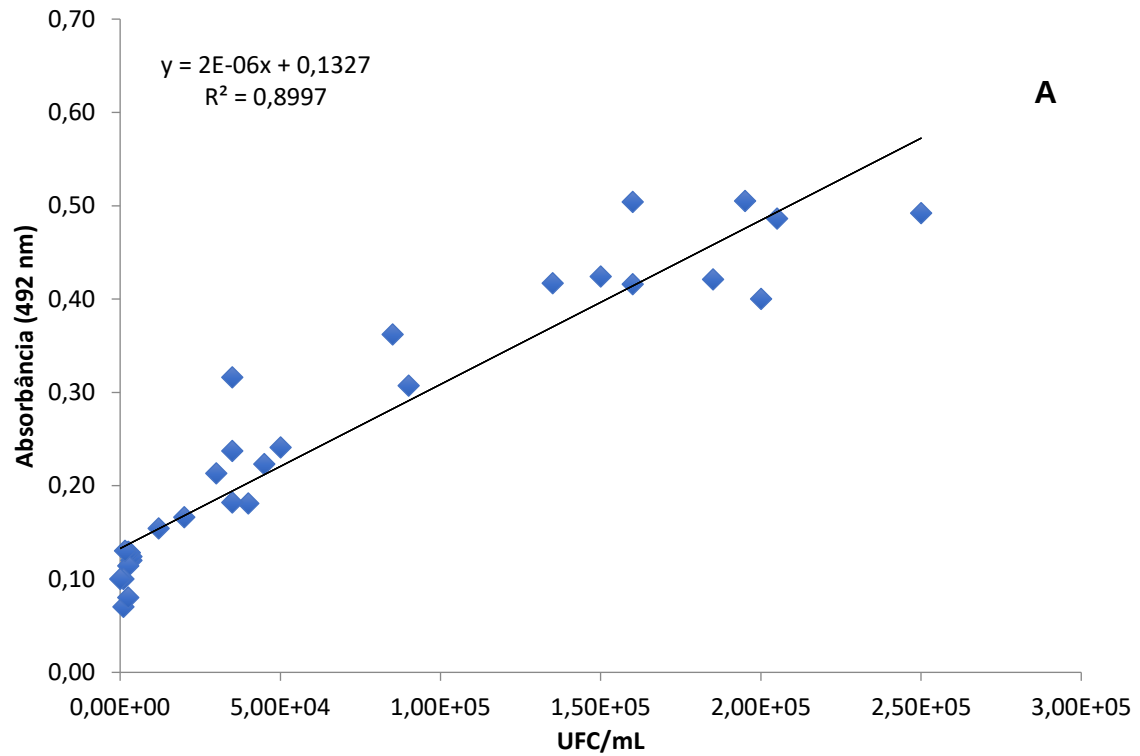
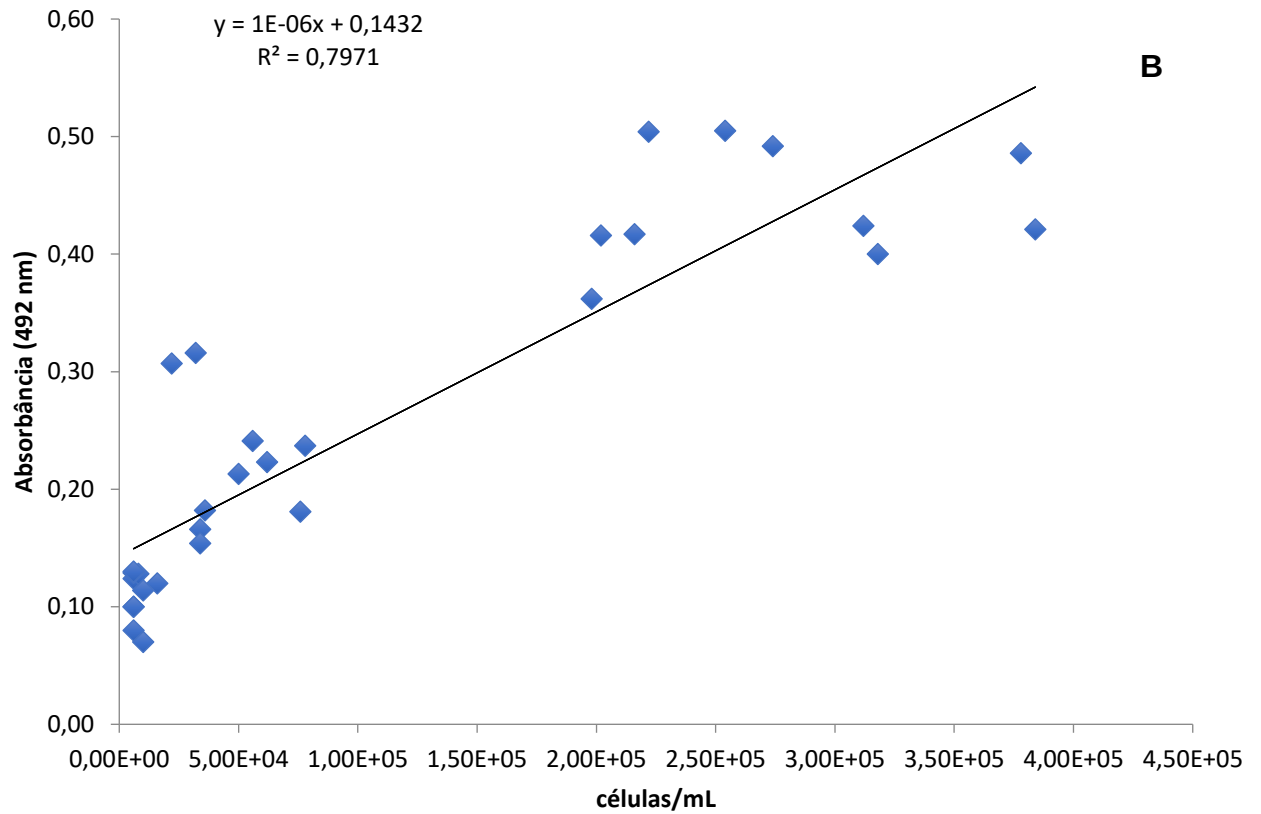


Figura 16 - Gráfico de dispersão com a correlação linear (reta) e regressão (equação) entre os valores de absorbância do ensaio de XTT e os métodos de quantificação por UFC/mL (A) e células/mL (B) de isolado clínico de *C. albicans* (n = 30) (conclusão).



Fonte: Elaboração do autor.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que não existe concordância entre os métodos de contagem de colônias (UFC/mL) e de células para as morfologias de leveduras e filamentos de *C. albicans*, apesar de haver forte e significativa correlação. Os valores verificados de UFC/mL foram sempre menores que os de células/mL de uma mesma amostra, independente de sua morfologia. Esse resultado demonstra que o método de UFC/mL subestima a contagem celular para ambas as morfologias. Outros estudos já haviam demonstrado que a contagem de colônias subestima outros métodos de quantificação, como testes colorimétricos e bioluminescentes^{60,72}. Entretanto, essas investigações não avaliaram a influência da morfologia fúngica no método de quantificação.

Estudos in vitro e in vivo que comparam métodos de quantificação de *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilmes não consideram as diferentes morfologias do micro-organismo^{60,62,67,72,71}. Inicialmente, esperava-se que a diferença entre os métodos de contagem fosse maior para filamentos do que para leveduras. Porém, os resultados de culturas planctônicas demonstraram que não houve diferença entre leveduras e filamentos quando a diferença dos métodos foi comparada. Esse resultado pode ser explicado pelo processo de sonicação das amostras, que permitiu que as células (tanto leveduras como filamentos) pudessem ser adequadamente separadas para serem contadas individualmente ou crescerem como colônias individuais. Para ambas as morfologias e independente da cepa avaliada, foi verificado que o método de UFC/mL subestima a quantificação de células/mL. Para as formas filamentosas, micélios e pseudo-hifas com muitos ramos produzem uma única colônias, o que justifica seu valor subestimado. Já para leveduras, o valor de UFC/mL subestimado pode ser justificado pela presença de células muito próximas

que crescem como colônias singulares. Neste trabalho, as amostras plaqueadas não foram espalhadas (técnica da gota) para impedir que células presentes na alíquota ficassem aderidas à alça de Drigalky durante o espalhamento e para permitir que todas as células presentes na amostra pudessem se desenvolver como colônias.

Biofilmes de *C. albicans* apresentam células com morfologias mistas, tanto leveduras como filamentos⁸⁻¹⁰ e células agregadas, por isso, sua quantificação por UFC/mL não é precisa. Os resultados deste trabalho mostraram que, para as amostras de biofilme, houve predomínio da morfologia de leveduras e que os resultados de concordância e correlação entre UFC/mL e células/mL se assemelharam aos observados nas amostras de culturas planctônicas. Essa semelhança entre os resultados pode ser atribuído ao método como as amostras de biofilme foram processadas (desprendimento mecânico dos orifícios e sonicação), o que permitiu separação das células e quantificação semelhante às amostras planctônicas.

Desenvolvidas como biofilmes, as células microbianas são envolvidas pela matriz polimérica, o que impede o crescimento de colônias a partir de células isoladas. Por essa razão, o método de UFC/mL não é considerado preciso para quantificação de biofilmes e outros métodos, como avaliação da atividade metabólica, têm sido utilizados^{62,67}. Os resultados obtidos com ensaio de XTT neste estudo demonstraram correlação insignificante em relação aos métodos de UFC/mL e células/mL. Estudos prévios já demonstraram uma relação linear entre os valores de absorbância de XTT e os de UFC (10^5 a 10^8) em culturas planctônicas de *C. albicans*⁸³ e ausência de linearidade entre XTT e o número de células em biofilmes com concentração acima de 10^5 células de *C. albicans*⁶². Foi verificado que, para quantificação de biofilmes com densidade de células acima de 10^5 , o método de PCR é mais preciso que o XTT⁶².

Entretanto, os resultados de quantificação por PCR deste estudo ainda não foram obtidos e outras cepas de *C. albicans* precisam ser ainda avaliadas.

Os resultados encontrados neste estudo alertam para o cuidado ao se selecionar o método de quantificação em estudos com fungos filamentosos. Apesar de ser amplamente utilizado, a contagem de colônias não é um método preciso para qualquer morfologia fúngica. Como limitações deste estudo, os métodos de quantificação não foram avaliados com as culturas planctônicas e biofilmes submetidas a tratamentos antifúngicos. Foi demonstrado que a relação entre os métodos de quantificação por XTT e UFC foi alterada com a ação de antifúngicos⁶⁸, enquanto que o método de PCR demonstrou maior precisão do que o XTT em biofilmes de *C. albicans* expostos à antifúngicos e neutrófilos⁶². Porém, sabe-se que o método molecular apresenta maior custo e demanda conhecimento técnico adicional. Esses fatores, além da precisão, devem ser também levados em consideração ao selecionar o método de quantificação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram, que tanto o crescimento planctônico na forma de leveduras e de filamentos como o cultivo de biofilmes subestimam os valores de UFC/mL em relação ao de células/mL para cepa padrão e isolado clínico de *C. albicans*, apesar desses métodos de quantificação demonstrarem forte e significativa correlação.

REFERÊNCIAS*

1. Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. J Oral Microbiol. 2013; 5: 1-8.
2. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. Pathog Dis. 2016; 74(4): 1-13.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 133–63.
4. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of Candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; 44(8): 2816–23.
5. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(2): 255–67.
6. Finkel J, Mitchell A. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(2): 109–18.
7. Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. Curr Genet. 2013; 59(4): 251–64.
8. Chauvel M, Nesseir A, Cabral V, Znaidi S, Goyard S, Bachellier-Bassi S, et al. A versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: Identification of regulators of morphogenesis and fitness. PLoS One. 2012; 7(9): e45912.
9. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis. 2004; 10(1): 14–9.
10. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot J. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005; 4(4): 633–8.
11. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 737–48.
12. Stylianou M, Uvell H, Lopes JP, Enquist PA, Elofsson M, Urban CF. Novel high-throughput screening method for identification of fungal dimorphism blockers. J Biomol Screen. 2014; 20(2): 285–91.

*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-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Sundstrom P, Balish E, Allen CM. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis.* 2002; 185(4): 521–30.
14. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015; 6(4): 338-46.
15. Gow NAR, Van De Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10: 112–22.
16. Josephon KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(10): 3513–5.
17. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(1): 85–93.
18. Nadeem SG, Shafiq A, Hakim ST, Anjum Y, Kazm SU. Effect of growth media, pH and temperature on yeast to hyphal transition in *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2013; 3(3): 185-92.
19. Sobel JD. Vaginitis. *N Engl J Med.* 1997; 337(26): 1896-903.
20. Sexton JA, Brown V, Johnston M. Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast.* 2007; 24(10): 847-60.
21. Braun BR, Johnson AD. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science.* 1997; 277(5322): 105-9.
22. Murad AM, d'Enfert C, Gaillardin C, Tournu H, Tekaia F, Talibi D, et al. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol.* 2001; 42(4): 981-93.
23. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2003; 2(5): 1053-60.
24. Merson-Davies LA, Odds FC. A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 3143–52.
25. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004; 12(7): 317-24.

26. Hazan I, Sepulveda-Becerra M, Liu H. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 134–45.
27. Finley KR, Berman J. Microtubules in *Candida albicans* hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(10): 1697–711.
28. Anderson J, Cundiff L, Schnars B, Gao MX, Mackenzie I, Soll DR. Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1989; 57(2): 458–67.
29. Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology*. 2000; 146: 1763–74.
30. Feng Q, Summers E, Guo B, Fink G. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 1999; 181(20): 6339-46.
31. Tripathi G, Wiltshire C, Macaskill S, Tournu H, Budge S, Brown AJ. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J*. 2002; 21(20): 5448-56.
32. Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9(6): 595-601.
33. Tournu H, Van Dijck P. *Candida* biofilms and the host: Models and new concepts for eradication. *Int J Microbiol*. 2012; 2012: 1-16.
34. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15(2): 96-108.
35. Kong E, Jabra-Rizk MA. The great escape: pathogen versus host. *PLOS Pathog*. 2015; 11(3):1-5.
36. Lewis KIM. Minireview - riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4): 999–1007.
37. O'Toole GO, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000; 54: 49–79.
38. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*. 2011; 48(8): 747-63.
39. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903–8.

40. Kratzer C, Graninger W, Macfelda K, Buxbaum A, Georgopoulos A. Comparative activities of antibiotics against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. Wien Klin Wochenschr. 2007; 119(9–10): 297–302.
41. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? Adv Drug Deliv Rev. 2007; 57(10): 1539–50.
42. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008; 3(12): 1909–24.
43. 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: 126–38.
44. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol. 2006; 8(9): 1382–91.
45. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramanian A, Köhler JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. PLoS Pathog. 2010; 6(3): 1-14.
46. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. J Fungi (Basel). 2017; 3(1): 1-8.
47. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2018; 5(4): 1-13.
48. 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.
49. 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 U S A. 2015; 112(13): 4092-7.
50. Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. PLoS Biol. 2018; 16(10): e2006872.
51. Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Modulation of *Candida albicans* biofilm by different carbon sources. Mycopathologia. 2016; 181(5-6): 341-52.

52. Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol. 1999; 48(7): 671–9.
53. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. Arch Oral Biol. 2004; 49(10): 789-98.
54. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. Arch Oral Biol. 2015; 60(6): 894-901.
55. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008; 72(2): 157–65.
56. Donlan R, Costerton W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167–93.
57. Cha R, Thilly W. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. Cold Spring Harb Lab. 1993; 3: 18–29.
58. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012; 13(134): 1-11.
59. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. J Microbiol Methods. 2006; 67(2): 310–20.
60. Agustí G, Fittipaldi M, Morató J, Codony F. Viable quantitative PCR for assessing the response of *Candida albicans* to antifungal treatment. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 97(1): 341–9.
61. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183(18): 5385–94.
62. Xie Z, Thompson A, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *Candida albicans* biofilms. BMC Microbiol. 2011; 11(93): 1-8.
63. McCluskey C, Quinn JP, McGrath JW. An evaluation of three new generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. Microb Ecol. 2005; 49: 379-87.

64. Scudiero D, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48: 4827-33.
65. Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol.* 2012; 50: 214–8.
66. Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, Thurnheer T. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res.* 2013; 48(4): 517–26.
67. 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: 1052–60.
68. Khot PD, Suci PA, Tyler BJ. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: Assessment using metabolic assays and colony forming units. *J Microbiol Methods.* 2008; 72(3): 268–74.
69. Walsh TJ, Venanzi WE, Dixon DM. Quantification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by a spiral inoculation system: correlation with pour plate and spread plate methods. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(5): 745–7.
70. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods.* 2018; 147: 1–13.
71. Gabrielli E, Roselletty E, Luciano E, Sabbatini S, Mosci P, Pericolini E. Comparison between bioluminescence imaging technique and CFU count for the study of oropharyngeal candidiasis in mice. *Cytometry A.* 2015; 87(5): 428-36.
72. Pietrella D, Angiolella L, Vavala E, Rachini A, Mondello F, Ragno R, et al. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11(18): 1-10.
73. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Front Immunol.* 2017; 8: 1-12.

74. Kragh K, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen P, Tolker-Nielsen T, et al. The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 84(5): 1-14.
75. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Mechanisms of the antifungal action of marine metagenome-derived peptide, MMGP1, against *Candida albicans*. *PLoS One.* 2013; 8(7): 1-14.
76. Pujol C, Daniels KJ, Lockhart SR, Srikantha T, Radke JB, Geiger J, et al. The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. *Eukaryot Cell.* 2004; 3(4): 1015-27.
77. Guannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi N, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *Plos Pathog.* 2010; 6(1): 1-8.
78. Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A.* 2003; 51(2): 127-8.
79. Klein M, Scott-Anne K, Gregoire S, Rosalen P, Koo H. Molecular approaches for variable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(5): 350-61.
80. da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008; 19(4): 364-9.
81. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1(8476): 307-10.
82. Fermanian J. Mesure de l'accord entre deux juges: cas quantitatif [Measuring agreement between 2 observers: a quantitative case]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 1984; 32(6): 408-13.
83. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 506-8.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Output do teste de normalidade para as amostras de leveduras cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Tests of Normality							
	Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,306	30	,000	,760	30	,000
	Célula	,314	30	,000	,752	30	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE B – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de leveduras da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	46,402	1	58	,000
	Based on Median	9,773	1	58	,003
	Based on Median and with adjusted df	9,773	1	31,119	,004
	Based on trimmed mean	34,652	1	58	,000

APÊNDICE C – Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de leveduras da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,884**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	30	30
	Célula	Correlation Coefficient	,884**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE D – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de leveduras da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Intraclass Correlation Coefficient							
	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,250 ^a	-,063	,538	1,974	29	29	,036
Average Measures	,401 ^c	-,134	,699	1,974	29	29	,036

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE E - Output do teste de normalidade para as amostras de hifas da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Tests of Normality							
	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,316	30	,000	,743	30	,000
	Célula	,336	30	,000	,749	30	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE F – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de hifas da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	75,055	1	58	,000
	Based on Median	11,950	1	58	,001
	Based on Median and with adjusted df	11,950	1	31,456	,002
	Based on trimmed mean	56,725	1	58	,000

APÊNDICE G – Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de hifa da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,909**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	30	30
	Célula	Correlation Coefficient	,909**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE H – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de hifas da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Intraclass Correlation Coefficient							
	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,272 ^a	-,057	,562	2,183	29	29	,020
Average Measures	,428 ^c	-,122	,720	2,183	29	29	,020

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable oth

APÊNDICE I – Output Teste T para a morfologia de levedura da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Diferença	-3,836	29	,001	-256031,66667	-392525,6945	-119537,6388

APÊNDICE J – Output Teste T para a morfologia de hifa da cepa padrão de *C.*

albicans SC5314.

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Diferença	-4,288	29	,000	-370695,00000	-547515,5648	-193874,4352

APÊNDICE K – Output da Análise do modelo de Regressão simples para a morfologia de levedura da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Coefficients ^a	
	Sig.
Média (UFC, Células/mL)	,000

a. Dependent Variable: Diferença (UFC/MI – Células/mL)

APÊNDICE L – Output da Análise do modelo de Regressão simples para a morfologia de hifa da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Coefficients ^a	
	Sig.
Média (UFC, Células/mL)	,000

a. Dependent Variable: Diferença (UFC/MI – Células/mL)

APÊNDICE M – Output do teste de normalidade para as amostras de de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Tests of Normality							
	grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
valores	célula	,279	28	,000	,617	28	,000
	UFC	,346	28	,000	,710	28	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE N –Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
valores	Based on Mean	7,322	1	54	,009
	Based on Median	3,489	1	54	,067
	Based on Median and with adjusted df	3,489	1	31,946	,071
	Based on trimmed mean	4,691	1	54	,035

APÊNDICE O – Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,852**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	28	28
	Célula	Correlation Coefficient	,852**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	28	28

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE P – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Intraclass Correlation Coefficient							
	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,395 ^a	,017	,683	2,677	22	22	,013
Average Measures	,566 ^c	,033	,812	2,677	22	22	,013

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE Q – Output Teste T para biofilme da cepa padrão de *C. albicans*

SC5314.

One-Sample Test						
	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Diferenças	-2,639	27	,014	-381878,57143	-678831,0134	-84926,1295

APÊNDICE R – Output da Análise do modelo de Regressão simples para biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314.

Coefficients ^a	
	Sig.
Média (UFC, Células/mL)	,000

a. Dependent Variable: Diferença (UFC/MI – Células/mL)

APÊNDICE S – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314 (XTT x UFC/mL).

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	-,006 ^a	-,360	,350	,989	29	29	,512
Average Measures	-,011 ^c	-1,125	,519	,989	29	29	,512

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE T – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme da cepa padrão de *C. albicans* SC5314 (XTT x Células/mL).

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	-,002 ^a	-,356	,354	,997	29	29	,503
Average Measures	-,003 ^c	-1,108	,523	,997	29	29	,503

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

APÊNDICE U – Output do teste de normalidade para as amostras de levedura do isolado clínico 3030B.

Tests of Normality ^a							
	Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,336	30	,000	,755	30	,000
	Célula	,327	30	,000	,731	30	,000

a. There are no valid cases for Valores when Grupos = .. Statistics cannot be computed for this level.

b. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE V – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de levedura do isolado clínico 3030B.

Test of Homogeneity of Variance ^a					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	62,979	1	58	,000
	Based on Median	14,004	1	58	,000
	Based on Median and with adjusted df	14,004	1	29,800	,001
	Based on trimmed mean	50,652	1	58	,000

a. There are no valid cases for Valores when Grupos = .. Statistics cannot be computed for this level.

APÊNDICE W – Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de levedura do isolado clínico 3030B.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,884**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	30	30
	Célula	Correlation Coefficient	,884**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE X – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de levedura do isolado clínico 3030B.

Intraclass Correlation Coefficient							
	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,151 ^a	-,113	,434	1,545	29	29	,124
Average Measures	,263 ^c	-,254	,605	1,545	29	29	,124

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

- a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.
- b. Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.
- c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE Y – Output do teste de normalidade para as amostras de hifa do isolado clínico 3030B.

Tests of Normality							
	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,239	30	,000	,818	30	,000
	Célula	,268	30	,000	,787	30	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE Z – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de hifa do isolado clínico 3030B.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	10,506	1	58	,002
	Based on Median	2,226	1	58	,141
	Based on Median and with adjusted df	2,226	1	46,366	,142
	Based on trimmed mean	8,011	1	58	,006

APÊNDICE A1 – Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de hifa do isolado clínico 3030B.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,903**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	30	30
	Célula	Correlation Coefficient	,903**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE B1 – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de hifa do isolado clínico 3030B.

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,147 ^a	-,109	,426	1,562	29	29	,118
Average Measures	,257 ^c	-,245	,598	1,562	29	29	,118

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

- a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.
- b. Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.
- c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE C1 – Output do teste de normalidade para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B.

Tests of Normality							
	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,239	30	,000	,818	30	,000
	Célula	,268	30	,000	,787	30	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE D1 – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	10,506	1	58	,002
	Based on Median	2,226	1	58	,141
	Based on Median and with adjusted df	2,226	1	46,366	,142
	Based on trimmed mean	8,011	1	58	,006

APÊNDICE E1 - Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B.

Correlations			UFC	Célula
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,929**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	30	30
	Célula	Correlation Coefficient	,929**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE F1 – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B.

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,000 ^a	-,355	,355	1,000	29	29	,500
Average Measures	,000 ^c	-1,101	,524	1,000	29	29	,500

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE G1 – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x UFC/mL).

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	-,002 ^a	-,356	,354	,997	29	29	,503
Average Measures	-,003 ^c	-1,108	,523	,997	29	29	,503

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

APÊNDICE H1 – Output do teste de Coeficiente de Correlação Intraclass para as amostras de biofilme de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x Células/mL).

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	,000 ^a	-,355	,355	1,000	29	29	,500
Average Measures	,000 ^c	-1,101	,524	1,000	29	29	,500

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

APÊNDICE I1 – Output do teste de normalidade para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x células/mL).

Tests of Normality

Grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	Células	,281	28	,000	,617	28	,000
	XTT	,239	28	,000	,803	28	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE J1 – Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x células/mL).

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	20,232	1	54	,000
	Based on Median	9,276	1	54	,004
	Based on Median and with adjusted df	9,276	1	27,000	,005
	Based on trimmed mean	13,859	1	54	,000

APÊNDICE K1 - Output do teste de correlação de Spearman para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x células/mL)..

Correlations

			Célula	XTT
Spearman's rho	Célula	Correlation Coefficient	1,000	,707**
		Sig. (2-tailed)		,000
		N	28	28
	XTT	Correlation Coefficient	,707**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	
		N	28	28

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE L1 – Output do teste de normalidade para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x UFC/mL).

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Valores	UFC	,346	28	,000	,710	28	,000
	XTT	,239	28	,000	,803	28	,000

a. Lilliefors Significance Correction

APÊNDICE M1 - Output do teste de homogeneidade das variâncias para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x UFC/mL).

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Valores	Based on Mean	52,004	1	54	,000
	Based on Median	12,973	1	54	,001
	Based on Median and with adjusted df	12,973	1	27,000	,001
	Based on trimmed mean	38,116	1	54	,000

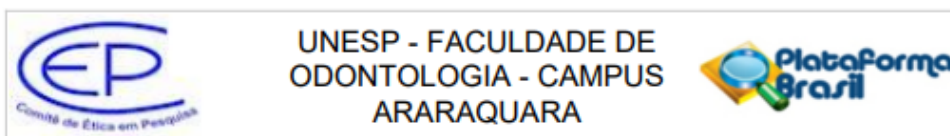
APÊNDICE N1 – Output teste de correlação de Spearman para as amostras de biofilme do isolado clínico 3030B (XTT x UFC/mL)..

Correlations

			UFC	XTT
Spearman's rho	UFC	Correlation Coefficient	1,000	,848**
		Sig. (2-tailed)		,000
		N	28	28
	XTT	Correlation Coefficient	,848**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	
		N	28	28

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise comparativa dos métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e biofilmes

Pesquisador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 18398719.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.998.236

Apresentação do Projeto:

Candida albicans é o principal fungo patógeno que acomete aos seres humanos e apresenta a capacidade de se desenvolver em diferentes morfologias (leveduras, pseudohifas e hifas), característica essa denominada de polimorfismo. Esse polimorfismo compromete os métodos de quantificação que requerem precisão e acurácia, como as pesquisas que envolvem fungos filamentosos. O objetivo deste estudo será comparar os métodos de quantificação de *C. albicans* por unidades formadoras de colônias (UFC), por reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) com a contagem de células viáveis e de núcleos celulares no In Cell Analyzer 2000. Cepas padrões ($n=3$) e isolados clínicos de *C. albicans* ($n=2$) serão utilizadas. Culturas planctônicas padronizadas ($n=25$) de cada cepa de *C. albicans* serão desenvolvidas nas formas de levedura e filamentos e submetidas aos três métodos de quantificação: UFC/mL, contagem celular e qPCR. Para contagem celular, o equipamento In Cell Analyzer 2000 será utilizado com a suspensão fúngica tratada com diferentes marcadores fluorescentes para evidenciar células viáveis, células não viáveis e os

núcleos celulares. Para a qPCR, um agente intercalante de ligação cruzada ao DNA será utilizado para excluir o DNA de células não viáveis com dano de membrana. Esses mesmos testes serão realizados para biofilmes, que serão cultivados em orifícios de placas de 96 poços por 48 horas. Os dados serão submetidos a uma análise de concordância (coeficiente de correlação intraclass) e de correlação ($r = 5\%$) entre os métodos (UFC/mL, contagem celular e qPCR). No caso de correlação

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

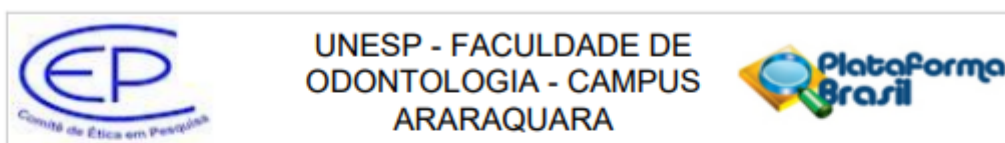
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.998.236

forte e significativa, esta será seguida por um estudo de regressão linear múltipla para tentar se prever os valores de quantificação de um método em relação ao outro.

Objetivo da Pesquisa:

A proposta deste estudo será comparar os métodos de quantificação das formas morfológicas de *Candida albicans* em culturas planctônicas e

biofilmes. Deste modo, os objetivos específicos deste estudo são:

1. Comparar a quantificação de *Candida albicans* por unidades formadoras de colônias (UFC) versus a contagem por células viáveis;
2. Comparar a quantificação de *Candida albicans* por reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) versus a contagem por células viáveis;
3. Comparar a quantificação de *Candida albicans* por reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) versus por unidades formadoras de colônias (UFC).
4. Comparar a quantificação de biofilme de *Candida albicans* por reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) versus análise da atividade metabólica (XTT);
5. Comparar a quantificação de biofilme de *Candida albicans* por UFC versus análise da atividade metabólica (XTT);
6. Comparar a quantificação de biofilme de *Candida albicans* por análise da atividade metabólica (XTT) versus a contagem por células viáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos são de contaminação e acidentes perfuro-cortantes ao pesquisador. Nesta pesquisa, serão asseguradas as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Para evitar a exposição da identidade dos participantes (doadores das cepas), serão utilizados códigos para identificação das amostras.

Benefícios: Com essa pesquisa, espera-se estimar a sub ou superestimativa dos métodos de contagem de *Candida albicans* em suas diferentes morfologias. Isso irá contribuir para a maior precisão dos métodos de quantificação deste micro-organismo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de maneira satisfatória e justificada.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

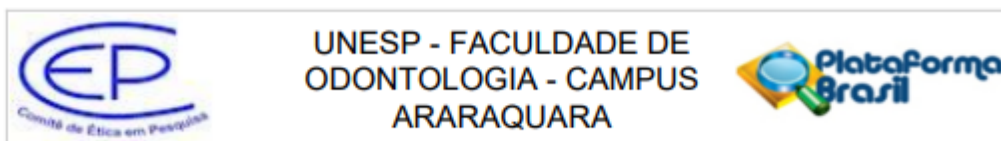
UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.998.236

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em 15 de abril de 2020.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1355591.pdf	07/04/2020 15:32:21		Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	07/04/2020 15:30:04	AMANDA BRANDAO SOARES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	07/04/2020 15:21:06	AMANDA BRANDAO SOARES	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3532950.pdf	06/09/2019 09:52:23	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_Reconsiderado.pdf	04/09/2019 12:09:28	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso.pdf	02/08/2019 09:35:32	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Orçamento	orcamentodepesquisa.pdf	02/08/2019 09:33:45	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Declaração do Patrocinador	declaracaoresponsabilidadepatrocinador.pdf	02/08/2019 09:32:29	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaomanuseiomaterialbiologico.pdf	02/08/2019 09:30:26	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoJoaoArioli.pdf	31/07/2019 10:28:29	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoMarlise.pdf	31/07/2019 10:28:10	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito
TCLE / Termos de	Solicitacaodedispensa.pdf	31/07/2019	Ewerton Garcia de	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

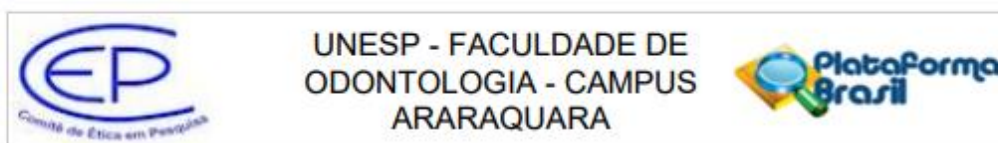
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.998.236

Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacaodedispensa.pdf	09:15:10	Oliveira Mima	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasil.pdf	31/07/2019 09:13:53	Ewerton Garcia de Oliveira Mima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 29 de Abril de 2020

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 07 de Julho de 2023
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 07 de Julho de 2021**

AMANDA BRANDÃO SOARES