

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

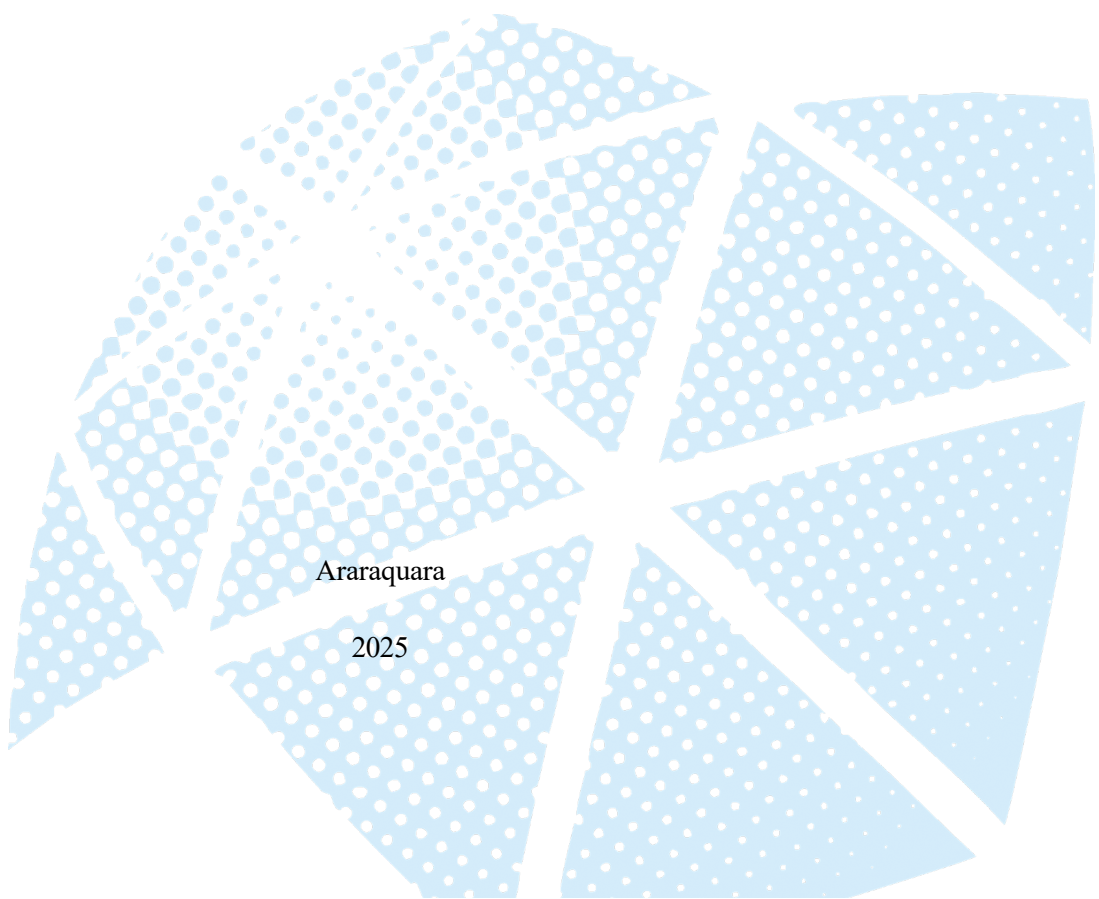
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

Estudo do secretoma de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* na resposta inflamatória e na expressão gênica de células displásicas de cavidade oral

Araraquara

2025



FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

Estudo do secretoma de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* na resposta inflamatória e na expressão gênica de células displásicas de cavidade oral

Tese apresentada ao programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Ciências em Biotecnologia.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Paula Aboud Barbugli

Araraquara

2025

D483e Dett, Freddy Humberto Marin.
Estudo do secretoma de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* na resposta inflamatória e na expressão gênica de células displásicas de cavidade oral / Freddy Humberto Marin Dett. – Araraquara, 2025.
127 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Paula Aboud Barbugli.

1. *Candida albicans*. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Biofilme. 4. Secretoma. 5. TNF. 6. IL-1 β . 7. BCL2. 8. TP53. I. Barbugli, Paula Aboud, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo do secretoma de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* na resposta inflamatória e na expressão gênica de células displásicas de cavidade oral.

AUTOR: FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

ORIENTADORA: PAULA ABOUD BARBUGLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI (Participação Presencial)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biomoleculares / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. CRISTINA KURACHI (Participação Virtual)
Departamento de Física e Ciência dos Materiais / Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 31 de julho de 2025

En primer lugar, quiero dedicar este trabajo a mis padres, Fredy e Yrma. Gracias por todo su apoyo, consejos, dedicación y ejemplo. Sin ustedes nada de esto sería posible. Siempre seré grato por la suerte de tenerlos como padres.

A André e Isabel, mis hermanos, gracias por saber llenar el vacío que me genera el estar lejos, pero sobre todo por entender y respetar mis decisiones, aunque a veces sean extrañas.

A toda mi familia, especialmente a mis tíos Beto, Johnny, Rogger, Peta, Pedro, Néstor, Amalia y Wagner, por siempre darme ánimos, estar presentes y cuidarme cuando fue necesario.

A Néstor Dett, mi abuelo, por siempre llenarme de alegrías, apoyarme y demostrarme su cariño. Espero ser una persona de la que cada vez te sientas más orgulloso.

A mis queridas abuelas (seguro se enojarán por llamarlas así) Mamá Rosa y Mamá Elda, por acompañarme y cuidarme desde donde estén. Espero no darles muchos dolores de cabeza y que sepan que siempre las tengo presentes.

A la memoria de mi bisabuela Mamá Petita, quien siempre me apoyo y estuvo presente a su forma, y de quien siempre tendré recuerdos maravillosos conmigo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Paula Aboud Barbugli, pela confiança, pela oportunidade de trabalho, pela paciência, dedicação e tempo concedidos. Sei que foi uma jornada longa com altos e baixos, mas sempre estarei agradecido pelas suas correções, ensinamentos e conselhos, sei que sempre foram com o intuito de minha melhoria e crescimento.

A todos os meus amigos, especialmente a Mateo e Alex, pelo apoio nos momentos que mais precisei, por entender minhas decisões e por sempre estarem presentes a pesar da distância.

A todos meus novos amigos no Brasil, pela amizade e os momentos que ficaram gravados nas minhas lembranças. Sem vocês com certeza tivesse sido um caminho muito mais complexo. Só tenho palavras de agradecimento e a certeza que vocês atingiram tudo o que se proponham.

À Iván Medeiros, Sarah de Annunzio, Bruna Moraes, Vinicius Henrique, Felipe Rondón, Karina Medina e Kasandra Yupanqui, sempre agradecerei por ter encontrado com vocês na minha vida, eu não tenho mais que agradecer pelos risos, lembranças e momentos vividos. Espero acompanhá-los nos seus caminhos e ver vocês cumprirem todos os seus sonhos.

Ao programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia de UNESP-AQA.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP de Araraquara, por sempre ser um apoio quando foi necessário.

À Faculdade de Odontologia UNESP de Araraquara, pela infraestrutura dos laboratórios de Microbiologia, Cultura Celular e Microscopia Confocal do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, assim como aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível e demais docentes do Departamento.

Ao Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Em especial a Profa. Valéria Valente e o doutorando Mateus Priolo Grejo.

À University of Tennessee Health Science Center, pelo recebimento e a infraestrutura dos laboratórios.

Ao Prof. Brian M. Peters, Tracey Peters e o Dr. Paul Saikat pelo recebimento, conhecimentos e o apoio durante a realização do período sanduiche. Assim como todos os membros do laboratório Amir, Nassim, Antony, Jenn e Robin, obrigado por estarem presentes e me ajudar quando era necessário.

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

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo no 2022/05180-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Os biofilmes são comunidades microbianas, que podem coexistir de forma sinérgica ou antagônica. Nos seres humanos, cerca de 80% dos processos infecciosos patogênicos estão relacionados ao desenvolvimento de biofilmes. Este trabalho tem como foco a espécie fúngica *Candida albicans* e a bactéria *Staphylococcus aureus*, ambos micro-organismos presentes em indivíduos saudáveis, que em determinadas condições clínicas, podem se tornar patogênicos, sobretudo na forma de biofilmes. Tais espécies são capazes de formar biofilmes de difícil controle e tratamento, sobretudo devido às interações moleculares e à produção de toxinas. Neste sentido, este projeto avaliou a ação biológica do secretoma, de biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, usando também como ferramenta, mutantes de *C. albicans* com deleções em genes relacionados aos principais fatores de virulência deste fungo, a cepa *ece1Δ/Δ*, incapaz de secretar candidalissina, a cepa *als3Δ/Δ*, incapaz de produzir a adesina Als3p, e a cepa *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*, incapaz de formar hifas. Tais biofilmes foram formados por 36 horas e caracterizados, através da contagem de unidade formadoras de colônia (UFC/mL), quantificação de carboidratos, lipídeos e proteínas secretadas, avaliados morfológicamente por Microscopia de Fluorescência Confocal (CLSM) e por capacidade hemolítica. O secretoma, obtido dos diversos biofilmes deste estudo, foi utilizado para estimular as células THP-1 naive. Estas células foram avaliadas por CLSM, quanto à expressão de receptores de superfície do tipo CD86+ (fenótipo M1) e CD163+ (fenótipo M2) e quanto à produção das citocinas IL-8; IL-1β; IL-6; IL-10; TNF e IL-12p70, por Citometria de Fluxo. Finalmente, o meio condicionado das células THP-1 estimuladas (mcTHP-1), foi utilizado para desafiar as células de displasia de cavidade oral, DOK, em relação à modulação da expressão gênica, (RT-qPCR), dos genes: *TP53*, *HRAS*, *AKT*, *STAT3*, *BCL2*, *BRAF*, *mTOR* e *PI3KCA*. Como resultados principais, evidenciamos que o secretoma do biofilme simples de *S. aureus* foi capaz de induzir a polarização das células THP-1 para um fenótipo CD86+, além de estimular a produção de TNF, IL-1β e IL-8 nestas células. Nos biofilmes mistos, tais capacidades de *S. aureus* foram abolidas por *C. albicans*, mecanismos parcialmente revertidos na presença do mutante *als3Δ/Δ* e totalmente revertidos na presença do mutante *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*; comprovando que *C. albicans* inibiu a antigenicidade do secretoma de *S. aureus* via Als3p e primordialmente através da formação de hifas. Além disto, o secretoma de *S. aureus* foi capaz, via modulação das células THP-1, de regular negativamente a expressão de *TP53* e positivamente a expressão de *BCL2*, nas células DOK. Tal capacidade, novamente, foi inibida pela presença de *C. albicans* nos cultivos mistos com *S. aureus*, e discretamente revertida pelos mutantes *als3Δ/Δ* e *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*. Assim, este trabalho demonstra,

pela primeira vez, a ação inibitória de *C. albicans* sobre *S. aureus*, na modulação da resposta inflamatória e na expressão de oncogenes. Este trabalho descreve que estes mecanismos estão atrelados à produção da adesina Als3p assim como à formação de hifas por *C. albicans*. Finalmente, este trabalho descreve a capacidade pró-inflamatória e pró-tumoral do secretoma de *S. aureus*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus*; biofilme; secretoma; TNF; IL-1 β ; IL-8; *BCL2*; *TP53*.

ABSTRACT

Biofilms are microbial communities that can coexist synergistically or antagonistically. In humans, approximately 80% of pathogenic infectious processes are associated with biofilm development. This study focuses on the fungal species *Candida albicans* and the bacterium *Staphylococcus aureus*, both of which are present in healthy individuals but can, under certain conditions, transition into a pathogenic biofilm form. These species are capable of forming biofilms that are difficult to control and treat, mainly due to complex molecular interactions and toxin production. In this project, we evaluated the biological activity of the secretome from single and dual-species biofilms of *C. albicans* and *S. aureus*, also using *C. albicans* mutants, as tools, to study specific fungal virulence factors. The mutants included the *ece1* Δ/Δ strain, incapable of secreting candidalysin; the *als3* Δ/Δ strain, deficient in Als3p production; and the *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ strain, incapable of forming hyphae. Biofilms were grown for up to 36 hours and characterized by colony-forming unit (CFU/mL) counts, quantification of carbohydrates, lipids, and proteins, morphological analysis by confocal laser scanning microscopy (CLSM), and hemolytic activity on blood agar. The obtained secretomes were also used to stimulate naïve THP-1 monocytic cells. After stimulation, these cells were evaluated by CLSM for surface markers CD86⁺ (M1 phenotype) and CD163⁺ (M2 phenotype), and by flow cytometry for cytokine production, including IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, and IL-12p70. Finally, the conditioned medium from the stimulated THP-1 cells (mcTHP-1) was used to challenge dysplastic oral keratinocytes (DOK cells), evaluating the modulation of gene expression (by RT-qPCR) for *TP53*, *HRAS*, *AKT*, *STAT3*, *BCL2*, *BRAF*, *mTOR*, and *PI3KCA*. Our main results demonstrated that the secretome from single-species *S. aureus* biofilms was able to induce THP-1 polarization towards a CD86⁺ phenotype and stimulate the production of TNF, IL-1 β , and IL-8. However, in dual-species biofilms, these *S. aureus*-induced effects were abolished by *C. albicans*. The suppression of cytokine production (TNF, IL-1 β , and IL-8) was partially reversed in the presence of the *als3* Δ/Δ mutant and fully reversed with the *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ mutant, demonstrating that *C. albicans* inhibited the antigenicity of the *S. aureus* secretome through Als3p function and, predominantly, hypha formation. Moreover, the *S. aureus* secretome was able, via THP-1 cell modulation, to downregulate *TP53* expression and upregulate *BCL2* expression in DOK cells. This effect was also inhibited by the presence of *C. albicans* in dual biofilms and partially reversed when the *als3* Δ/Δ and *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ mutants were used. In summary, this work demonstrates, for the first time, the inhibitory role

of *C. albicans* on the *S. aureus* secretome in modulating the inflammatory response and oncogene expression. These mechanisms are associated with the production of the Als3p adhesin and, most importantly, with hypha formation by *C. albicans*. Finally, this study highlights the pro-inflammatory and pro-tumorigenic potential of the *S. aureus* secretome.

Keywords: *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus*; biofilm; secretome; TNF; IL-1 β ; IL-8; BCL2; TP53.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arquitetura dos biofilmes.....	20
Figura 2 - Etapas do desenvolvimento do biofilme de <i>Candida albicans</i>	22
Figura 3 - Circuito de <i>quorum-sensing</i> de <i>S. aureus</i>	27
Figura 4 - Esquema para obtenção da fração solúvel (secretoma) dos biofilmes.....	38
Figura 5 - Alinhamento das sequências da Enolp de <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> e a sequência de ligação ao plasminogênio	51
Figura 6 - Mapa da sequência do DNA sintético de <i>ENO1 Ca</i>	53
Figura 7 - Mapa da sequência do DNA sintético de <i>ENO1 Sc</i>	54
Figura 8 - Mapa do plasmídeo pKE3 utilizado para a transformação de <i>C. albicans</i>	55
Figura 9 - Processo de eliminação, integração do cassette e excisão dos genes <i>ENO1</i> , <i>SAT1</i> e <i>CaHygB</i> pela enzima Flip recombinasse.....	56
Figura 10 - Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i>	66
Figura 11 - Curva de crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Figura 12 - Curva de crescimento do biofilme misto (<i>C. albicans</i> WT + <i>S. aureus</i>).	67
Figura 13 - Quantificações das biomoléculas do secretoma dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> WT e <i>S. aureus</i>	68
Figura 14 - Ensaio de hemólise para as culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> WT e <i>S. aureus</i>	70
Figura 15. Ensaio de hemólise para os biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	71
Figura 16 - Marcação dos biofilmes simples e mistos com Syto 9 e iodeto de propídeo (PI).	73
Figura 17 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de <i>C. albicans</i> em biofilmes simples e mistos.....	74
Figura 18 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> em biofilmes simples e mistos.....	75
Figura 19 - Viabilidade das células THP-1, em porcentagem, estimuladas por 24 h com o secretoma dos biofilmes simples de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	76
Figura 20 - Viabilidade das células THP-1, em porcentagem, estimuladas por 24 h com o secretoma dos biofilmes mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	76
Figura 21 - Quantificação da produção de TNF (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	77
Figura 22 - Quantificação da produção de IL-1 β (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	78

Figura 23 - Quantificação da produção de IL-8 (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	79
Figura 24 - Marcação das células THP-1 para os receptores de superfície do tipo CD86 e CD163, após o estímulo com o secretoma de biofilmes	80
Figura 25 - Níveis de expressão gênica de <i>PI3KCA</i> e <i>STAT3</i> após estímulo com os meios condicionados das células THP-1	82
Figura 26 - Níveis de expressão gênica de <i>TP53</i> e <i>BCL2</i> após estímulo com os meios condicionados das células THP-1	84
Figura 27 - Modelamento 3D obtido da proteína Enolp modificada com a sequência de <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 28 - Gel de agarose após a eletroforese do DNA sintético, com as sequências de <i>ENO1</i> sem modificação (<i>Ca</i>) e o <i>ENO1</i> com modificação (<i>Sc</i>).	87
Figura 29 - Gel de agarose após a eletroforese realizada com as amostras do plasmídeo e o DNA sintético, antes e depois da digestão com as enzimas de restrição	88
Figura 30 - Gel de agarose após a eletroforese dos plasmídeos extraídos de <i>E. coli</i> DH5 α transformada com o plasmídeo ligado.	89
Figura 31 - Crescimento de <i>C. albicans</i> Cai4 transformada com o plasmídeo, em placas de YNB suplementado com nitrato de amônio.....	90
Figura 32 - Gel de agarose após a eletroforese do produto de PCR dos transformantes de <i>C. albicans</i>	91
Figura 33 - Fotomicrografia de gel de agarose após a eletroforese do produto amplificado dos plasmídeos pBS22 com os genes <i>SAT1</i> e <i>HygR</i>	92
Figura 34 - Crescimento dos transformantes em placas YPD suplementadas com antibióticos.	93
Figura 35 - Crescimento dos transformantes de Cai4 após a eliminação dos genes de sensibilidade	94
Figura 36 - Gel de agarose após a eletroforese para a amplificação dos produtos de PCR, com o intuito de confirmação do processo de transformação por CRISPR-Cas9	95
Figura 37 - Resultados do teste de checagem de contaminação por micoplasmas	124
Figura 38 - Quantificação do $2^{-\Delta\Delta ct}$ de <i>mTORC</i> e <i>hRAS</i> nas linhagens orais (NOK, DOK e SCC- 25)	125
Figura 39 - Dados de <i>mTORC</i> e <i>hRAS</i> em câncer de cabeça e pescoço (CPP).....	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas no estudo.	34
Quadro 2 - Descrição fenotípica dos mutantes utilizados no estudo.	34
Quadro 3 - Sequência de Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	48
Quadro 4 - Descrição dos genes inclusos no estudo.....	49
Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados	52
Quadro 6 - Sequência do gRNA utilizados no estudo.	53
Quadro 7 - Protocolo para a preparação da PCR com a polimerase SuperFi II	57
Quadro 8 - Protocolo para preparo do mix de PCR utilizado para a enzima Phusion.....	57
Quadro 9 - Preparação realizada para a digestão do plasmídeo e do inserto.....	58
Quadro 10 - Protocolo de ligação do plasmídeo (vetor) e o inserto na proporção 3:1.	59
Quadro 11 - Quantidades utilizadas para a ligação do plasmídeo (vetor) e o inserto na proporção 5:1	59
Quadro 12 - Reagentes usados para a digestão e ligação do vetor	60
Quadro 13 - Soluções preparadas para a transformação de <i>C. albicans</i>	61
Quadro 14 - Preparação das reações com o Master Mix da DreamTaq	62
Quadro 15 - Reagentes utilizados para a PCR de amplificação do plasmídeo linearizado pBSS2	63
Quadro 16 - Preparação dos reagentes da PCR para confirmação da deleção de <i>ENO1</i> cromossomal.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva padrão das concentrações de lipídeos em mg/dL.....	39
Tabela 2 - Concentrações da curva padrão de carboidratos	40
Tabela 3 - Curva padrão das concentrações de proteínas em µg/mL.....	41
Tabela 4 - Curva padrão para quantificação das citocinas do kit CBA	44
Tabela 5 - Quantificações das proteínas obtidas das culturas planctônicas	69
Tabela 6 - Quantificações das proteínas obtidas dos biofilmes	69
Tabela 7 - Dados de Fold Change calculados para o gene mTOR nas células DOK	81
Tabela 8 - Dados de Fold Change calculados para o gene BRAF nas células DOK	81
Tabela 9 - Dados de Fold Change calculados para o gene AKT nas células DOK	81
Tabela 10 - Dados de Fold Change calculados para o gene hRAS nas células DOK.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ECM.....	Matriz extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>)
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônias
RPM.....	Rotações Por Minuto
YNB	Yeast Nitrogen Base
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
BHI.....	Infusão de cérebro e coração (<i>Brain- Heart Infusion</i>)
TSB	Caldo de soja tripsinizada (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
BSA.....	Soro de albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino)
CBA	<i>Cytometric Bead Assay</i>
Cód.....	Código de Compra
RNA.....	Ácido ribonucleico
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
Cas9	Proteína Associada ao CRISPR 9 (<i>CRISPR associated protein 9</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Relevância clínica dos biofilmes microbianos.....	19
1.2 Biofilmes de <i>Candida albicans</i>	21
1.3 A importância do processo de transição de levedura à hifa em <i>Candida albicans</i>	22
1.4 Biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.5 Biofilmes mistos de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
1.6 A importância dos produtos do metabolismo microbiano	27
1.7 Interação com o sistema imunológico.....	29
1.8 O Microambiente tumoral.....	30
1.9 Hipótese	32
1.10 Objetivo Geral	32
1.11 Objetivos Específicos.....	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1 Cultivo e formação dos biofilmes.....	34
2.1.1 Micro-organismos e condição de armazenamento.....	34
2.1.2 Reativação e condições de cultivo	35
2.1.3 Obtenção do inóculo	35
2.1.3.1 Formação do pré-inóculo e obtenção do inóculo para formação de biofilmes de <i>C. albicans</i>	35
2.1.3.2 Formação do pré-inóculo e obtenção do inóculo para formação de biofilme de <i>S. aureus</i>	36
2.1.4 Formação dos biofilmes	36
2.1.5 Curva de crescimento do biofilme com alamarBlue™	37
2.1.6 Cultivo dos micro-organismos em forma planctônica	37
2.1.7 Obtenção dos secretomas dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	37
2.1.8 Quantificação dos lipídeos provenientes dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> WT e <i>S. aureus</i>	38
2.1.9 Quantificação dos carboidratos provenientes dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> WT e <i>S. aureus</i>	39
2.1.10 Precipitação e quantificação das proteínas provenientes do secretoma obtidos dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	40

2.1.11 Avaliação da atividade hemolítica das proteínas presentes nas culturas simples e mistas de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	41
2.2 Caracterização dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	41
2.2.1 Marcação dos biofilmes com Syto 9 e Iodeto de Propídeo (PI).....	41
2.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) por diluição e técnica da gota.....	42
2.3 Cultura de células.....	42
2.3.1 Cultura de queratinócitos displásicos de cavidade oral (linhagem DOK)	43
2.3.2 Cultura de células inflamatórias -monócitos (linhagem THP-1)	43
2.4 Estímulo das células com os secretomas dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	43
2.5 Ensaio de viabilidade celular por alamarBlue™.....	44
2.6 Avaliação da produção de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA).....	44
2.7 Ensaio de Marcação de Receptores de Superfície Celular para CD86 e CD163 por Microscopia de Fluorescência Confocal (CLSM).....	45
2.8 Estímulo das células de queratinócitos displásicos de cavidade oral com meio condicionado das células THP-1	46
2.9 Ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	46
2.9.1 Extração de RNA com Trizol	46
2.9.2 Síntese de cDNA.....	47
2.9.3 PCR em tempo real quantitativa – qPCR.....	48
2.9.4 Validação do gene endógeno	48
2.9.5 Quantificação da expressão gênica	49
2.10 Transformação da cepa Cai4 de <i>Candida albicans</i> pela técnica de CRISPR-Cas9.....	51
2.10.1 Protocolo de clonagem e transformação em <i>E. coli</i>	57
2.10.2 Transformação de <i>E. coli</i>	60
2.10.3 Checagem da transformação por PCR e preparo para transformação gênica de <i>C. albicans</i>	60
2.10.4 Protocolo de Transformação de Levedura (<i>C. albicans</i>) com Acetato de Lítio	61
2.10.5 Deleção de gene homozigótico direcionado em <i>C. albicans</i> utilizando-se CRISPR com flipper SAT1/HygR.....	62
2.10.6 Transformação de <i>Candida</i> spp. mediada por CRISPR Cas9 por Eletroporação	63
2.10.7 Processo de excisão com ajuda da enzima flip recombinasse.....	64
2.11 Análise Estatística.....	65

3. RESULTADOS.....	66
3.1 Padronização da curva de crescimento dos biofilmes de 36 h de <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e misto	66
3.2 Quantificação das biomoléculas, dos secretomas filtrados, dos biofilmes simples e mistos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	68
3.3 Quantificação da capacidade hemolítica das proteínas extraídas das culturas simples e mistas de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	69
3.4 Marcação dos biofilmes por Microscopia Confocal (CLSM).....	71
3.5 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.....	74
3.6 Estimulo das células THP-1 naive, com os secretomas filtrados, dos biofilmes simples e mistos.	75
3.7 Ensaio de quantificação de citocinas inflamatórias mediante Cytometric Bead Array (CBA)....	77
3.8 Marcação de Receptores de Superfície Celular para CD86 e CD163.....	80
3.9 Ensaios de expressão gênica nas células displásicas de cavidade oral (DOK).....	81
3.10 Transformação de <i>C. albicans</i> Cai4	85
4. DISCUSSÃO	96
5. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE A – Sequência do DNA sintético ENO1 Ca.....	121
APÊNDICE B – Sequência do DNA sintético ENO1 Sc.....	122
APÊNDICE C – Teste da presença de micoplasma nas células do estudo e validação do gene endógeno	123

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância clínica dos biofilmes microbianos

Biofilmes são comunidades de micro-organismos cercados por uma matriz extracelular própria. Estima-se que cerca de 80% das infecções estejam relacionadas ao desenvolvimento de biofilmes (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Mah, 2012; Sharma; Misba; Khan, 2019). Estas comunidades microbianas podem ser formadas por diversos micro-organismos, incluindo fungos e bactérias. As características destes biofilmes mudam dependendo dos micro-organismos relacionados, assim como dos sítios anatômicos em que se desenvolvem (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Mah, 2012; Sharma; Misba; Khan, 2019; Sharma; Mohler; Mahajan; Schwartz *et al.*, 2023). Os biofilmes são importantes formas de disseminação dos processos infecciosos. O processo de formação dos biofilmes inicia-se a partir da fase de adesão ao substrato, seguindo-se pelo amadurecimento. Em seguida ocorre a fase de dispersão, onde os micro-organismos vão se espalhar tentando se aderir às novas superfícies, aumentando assim a virulência e a patogênese deste processo infeccioso (Sharma; Mohler; Mahajan; Schwartz *et al.*, 2023).

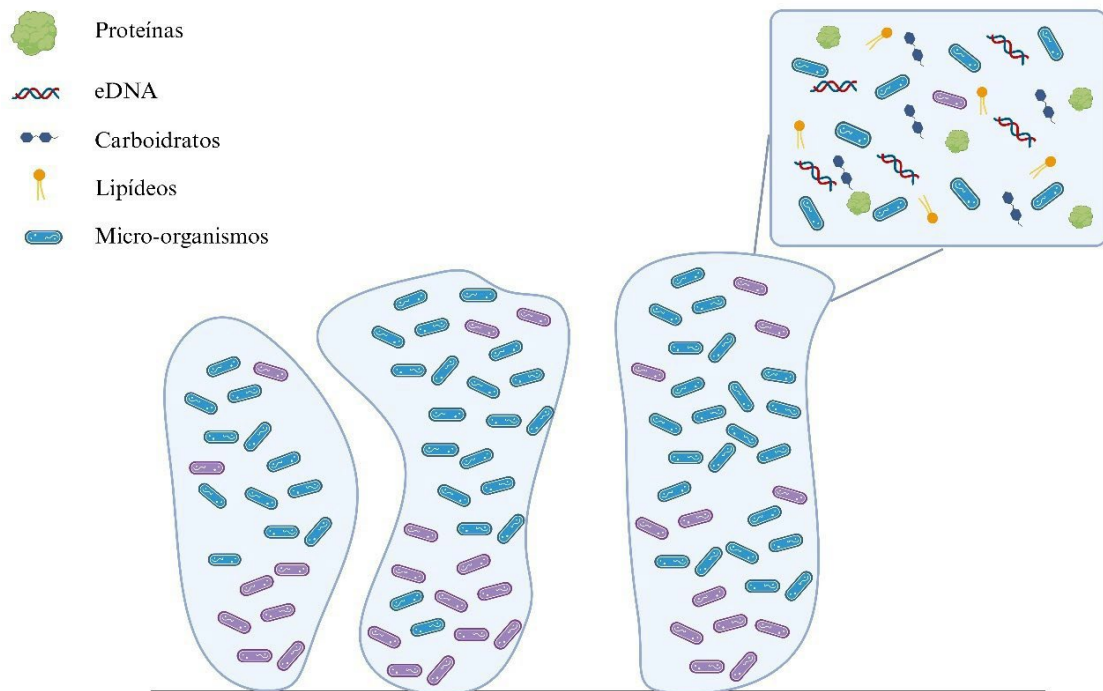
Os biofilmes podem se diferenciar das culturas planctônicas pois são comunidades heterogêneas e com alta densidade celular (Mah, 2012; Stewart; Franklin, 2008). Parsek e Singh (2003) definiram as principais características das infecções causadas por biofilmes, sendo algumas delas elencadas a seguir:

1. Durante os processos infecciosos relacionados à formação de biofilmes, os micro-organismos estão aderidos à uma superfície ou substrato;
2. A infecção tem como característica a presença de micro-organismos organizados em clusters ou microcolônias, com uma matrix extracelular própria (ECM do inglês *Extracelullar Matrix*);
3. A infecção tem que estar em uma localização determinada, sendo a disseminação um processo secundário;
4. A infecção é resistente, dificilmente eliminada mediante o uso de antimicrobianos, mesmo que os micro-organismos sejam susceptíveis aos fármacos utilizados.

A complexidade dos biofilmes está relacionada aos múltiplos microambientes nestas comunidades, em boa parte devido à ação da ECM, apresentando diferentes gradientes de concentração de oxigênio, metabólitos e moléculas de comunicação (*Quorum-sensing* - QS) (Azimi; Klementiev; Whiteley; Diggle, 2020; Tian; Ding; Ke; Wang, 2021). O QS é um intercâmbio de moléculas químicas que permite uma comunicação e uma interação entre os micro-organismos de diferentes espécies e reinos (Azimi; Klementiev; Whiteley; Diggle, 2020;

Tian; Ding; Ke; Wang, 2021). Nos biofilmes, a ECM é formada principalmente por proteínas, polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e lipídeos (Figura 1).

Figura 1 - Arquitetura dos biofilmes.



Fonte: Autoria própria, criado em <https://BioRender.com>.

Os biofilmes se desenvolvem aderidos à uma superfície, biótica ou abiótica. Neste microambiente, os biofilmes estão formados pelos micro-organismos e pela ECM. As principais moléculas da ECM são as proteínas, carboidratos, lipídeos e eDNA.

Os polissacarídeos presentes no biofilme diferem de acordo com a espécie microbiana envolvida. No caso de *C. albicans*, por exemplo, os glucanos extracelulares conferem resistência aos antifúngicos (Bonhomme; D'enfert, 2013). Os mecanismos mediante os quais esta resistência ocorre, ainda não estão completamente elucidados. Um dos mecanismos mais descritos atualmente é o dos polissacarídeos atuando no “sequestro” dos antifúngicos, dificultando a penetrabilidade dos fármacos nas células fúngicas (Azimi; Klementiev; Whiteley; Diggle, 2020; Tian; Ding; Ke; Wang, 2021). O eDNA é outro componente muito importante na composição da ECM, originado de células mortas, liberado através de vesículas extracelulares ou por sinalização do tipo QS (Azimi; Klementiev; Whiteley; Diggle, 2020; Mah, 2012; Tian; Ding; Ke; Wang, 2021). No caso das proteínas a resistência está relacionada a dois processos principais: à produção de proteínas envolvidas nas bombas de efluxo (Kaur; Nobile,

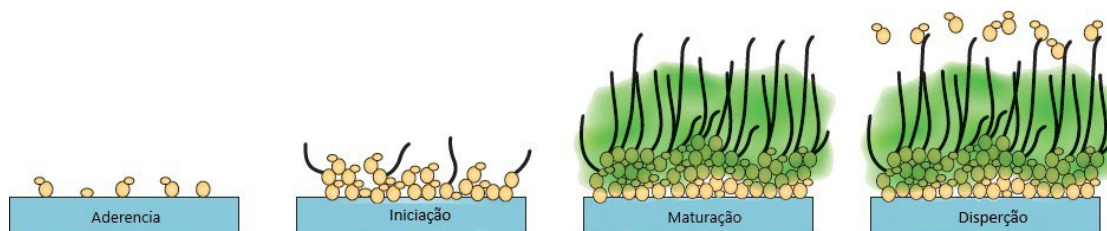
2023; Ramage; Rajendran; Sherry; Williams, 2012), e à superprodução de proteínas-alvo dos antibióticos (Ramage; Rajendran; Sherry; Williams, 2012). Quanto aos lipídeos, a formação de vesículas extracelulares é o principal promotor de mecanismos de resistência. As vesículas extracelulares permitem a comunicação mediante QS e o transporte de diversas moléculas para o meio extracelular (Jeong; Khan; Tabassum; Cho *et al.*, 2024).

1.2 Biofilmes de *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo comensal, podendo se tornar patogênico em determinadas condições (Da Silva Dantas; Lee; Raziunaite; Schaefer *et al.*, 2016). É um patógeno oportunista presente na microbiota oral de 30 a 60% das pessoas saudáveis (Hellstein; Marek, 2019). Os principais fatores de risco para desenvolvimento de um processo infeccioso por *C. albicans* são o uso de antibioticoterapia prolongada, imunossupressão, doenças crônicas como diabetes, uso de próteses dentárias e dispositivos médicos (Da Silva Dantas; Lee; Raziunaite; Schaefer *et al.*, 2016; Hellstein; Marek, 2019). *C. albicans* apresenta várias ferramentas para induzir a infecção, sendo a capacidade de transição morfológica de levedura para hifa uma das mais importantes neste contexto (Pereira; Dos Santos Fontenelle; De Brito; De Moraes, 2021; Soll, 2008).

De forma geral, os biofilmes de *C. albicans* são formados por uma ECM composta de cerca de 55% de proteínas (incluindo as glicoproteínas), 25% de carboidratos, 15% de lipídeos e 5% de eDNA (Alim; Sircaik; Panwar, 2018; Zarnowski; Westler; Lacmbouh; Marita *et al.*, 2014). Em *C. albicans*, esta formação de biofilmes ocorre em etapas de acordo com a Figura 2. Inicia-se pela adesão, onde as primeiras leveduras se aderem ao substrato e começam o desenvolvimento do biofilme. Após a adesão, segue-se com o processo de iniciação, onde as primeiras leveduras iniciam a mudança morfológica para pseudo-hifas e hifas, o que permite maior aglomeração de células, dando início então à produção da ECM (Zarnowski; Westler; Lacmbouh; Marita *et al.*, 2014). Em seguida ocorre a maturação dos biofilmes. Nesta etapa há produção de metabólitos secundários. Finalmente, ocorre a fase de dispersão, com formação de células persistentes que são capazes de iniciar um novo biofilme, em novos sítios anatômicos (Alim; Sircaik; Panwar, 2018; Mathé; Van Dijck, 2013; Pereira; Dos Santos Fontenelle; De Brito; De Moraes, 2021; Soll, 2008).

Figura 2 - Etapas do desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*.



Fonte: Adaptado de Finkel e Mitchell (2011).

O biofilme é formado em 4 etapas: Aderência mediada pelas leveduras; Iniciação com transições de leveduras para pseudo-hifas e hifas; Maturação com transição completa para hifas e formação da ECM; Dispersão e liberação de células persistentes.

1.3 A importância do processo de transição de levedura à hifa em *Candida albicans*

A transição de levedura à hifa é um dos fatores de virulência mais importantes de *C. albicans*. Esta transição está governada por múltiplos genes, sendo os principais *BRG1*, *NDT80*, *ROB1*, *TEC1*, *BCR1*, *EFG1* e *CPH1* (Glazier; Krysan, 2018; Glazier; Murante; Murante; Koselny *et al.*, 2017; Nobile; Fox; Nett; Sorrells *et al.*, 2012). O gene *Enhanced Filamentous Growth Protein 1 (EFG1)* regula a expressão dos genes das adesinas, como a *Agglutinin-like Sequence 3 e 1 (ALS3 e ALS1)* e a *Enhanced Adhesion to Polystyrene 1 (EAP1)*, necessárias para iniciar a formação dos biofilmes, assim como outros genes relacionados com o desenvolvimento de hifas, como o *Extent of Cell Elongation 1 (ECE1)* e o *Hyphal Wall Protein 1 HWPI* (Nobile; Andes; Nett; Smith *et al.*, 2006; Nobile; Fox; Nett; Sorrells *et al.*, 2012; Schena; Baker; Stark; Thomas *et al.*, 2023). O gene *Constitutive Pseudohyphae 1 (CPH1)* é um fator de transcrição importante. Entre os genes que estão regulados por *CPH1* estão: o *ECE1*, gene codificador de peptídeos altamente expressos na forma de hifa; o *TYE7*, um fator de transcrição relacionado com a glicogênese, o *HWPI* e o *YHB1* que codificam proteínas necessárias para a sobrevivência de *C. albicans* em condições adversas (Askew; Sellam; Epp; Hogues *et al.*, 2009; Braun; Johnson, 2000; Martorano-Fernandes; Goodwine; Ricomini-Filho; Nobile *et al.*, 2023; Moyes; Wilson; Richardson; Mogavero *et al.*, 2016). Além disso, o gene *CPH1* é parte da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), a qual está relacionada com a reprodução e com a formação de pseudohifas (Köhler; Fink, 1996; Liu; Köhler; Fink, 1994). A deleção dos genes *EFG1* e *CPH1* resulta em mutantes incapazes de formar hifas e, portanto, incapazes de formar um biofilme verdadeiro (García-Sánchez; Aubert; Iraqui; Janbon *et al.*, 2004). Como mencionado previamente, o gene *EFG1* regula o gene *ALS3* que codifica a proteína Als3p, uma adesina necessária para a adesão das hifas de *C. albicans* aos substratos bióticos e abióticos (Liu; Filler, 2011; Schena; Baker; Stark; Thomas *et al.*, 2023). No estudo de Argimón; Wishart; Leng; Macaskill *et al.* (2007) foi demonstrado que a

expressão de *ALS3* é induzida especificamente durante o desenvolvimento de hifas. Entre os substratos de ligação desta proteína podemos citar as células endoteliais, as células epiteliais, a fibronectina, o fibrinogênio, o colágeno tipo IV, a laminina e a película salivar (Liu; Filler, 2011; Sheppard; Yeaman; Welch; Phan *et al.*, 2004). Outra função da Als3p foi descrita por Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.* (2012), que diz respeito ao processo de adesão de *S. aureus* às hifas de *C. albicans*. A deleção do gene *ALS3* produz uma cepa mutante incapaz de aderir às superfícies, incapaz de formar biofilmes e que não permite a adesão do *S. aureus* em suas hifas (Deng; Jiang; Jiang; Deng *et al.*, 2021; Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.*, 2012; Zhao; Daniels; Oh; Green *et al.*, 2006). O gene *ECE1* também é regulado pelo gene *EFG1* (Fan; He; Dong; Pan, 2013; Nobile; Fox; Nett; Sorrells *et al.*, 2012). O gene *ECE1* é codificado apenas após a transição de levedura para hifa (Nantel; Dignard; Bachewich; Marcus *et al.*, 2002). Neste domínio, a proteína Ece1p é clivada pela proteinase Kex2, a qual encontra-se no lúmen do aparato de Golgi (Bader; Krauke; Hube, 2008). Ece1p apresenta 7 sítios de clivagem por Kex2 (Moyes; Wilson; Richardson; Mogavero *et al.*, 2016), dentre os quais a P3, que é um polipeptídeo citotóxico. A região P3 foi recentemente descoberta e denominada candidalisina. Trata-se da primeira toxina caracterizada em *C. albicans*. A candidalisina, de sequência aminoacídica (SIIGIIMGILGNIPQVIQIIMSIVKAFKGNKR), tem características anfipáticas e está formada por uma α -hélice, com um N-terminal hidrofóbico (Moyes; Wilson; Richardson; Mogavero *et al.*, 2016). Esta toxina tem a capacidade de lisar as células do hospedeiro e está relacionada diretamente com a virulência de *C. albicans* (Liu; Willems; Sansevere; Allert *et al.*, 2021; Richardson; Willems; Moyes; Shoaie *et al.*, 2018).

Levando-se em consideração todos os pontos abordados até aqui, cabe pontuar que além das vias relacionadas à formação de hifas e aos fatores de virulência de *C. albicans*, nosso trabalho também focou no estudo mais aprofundado da proteína Enolase 1 (Eno1p) de *C. albicans*. A Eno1p é uma enzima da rota glicolítica, que catalisa a conversão reversível de 2- fosfoglicerato à fosfoenolpiruvato (Kustrzeba-Wójcicka; Golczak, 2000), sendo esta reação magnésio dependente. A Eno1p é uma proteína indispensável à sobrevivência e crescimento de *C. albicans* em meios contendo fontes de carbono (Yang; Chen; Kuo; Lin, 2006). Adicionalmente ao papel glicolítico, a Eno1p de *C. albicans* também está relacionada com a atividade transglutaminase envolvida em modificações pós-traducionais neste fungo (Reyna-Beltrán; Iranzo; Calderón-González; Mondragón-Flores *et al.*, 2018). A presença da Eno1p tem sido reportada na parede celular, na matrix extracelular e em vesículas extracelulares de *C. albicans* (Consortium, 2022; Gil-Bona; Amador-García; Gil; Monteoliva, 2018; Macdougall; Volynkin; Saidi; Poggioli *et al.*, 2020; Reyna-Beltrán; Iranzo; Calderón-González; Mondragón-

Flores *et al.*, 2018). Além das funções descritas acima, a Eno1p de *C. albicans* também é designada como sendo uma proteína *moonlighting*. As proteínas *moonlighting* podem ser definidas como proteínas multifuncionais que exercem duas ou mais funções bioquímicas ou biofísicas. Estas funções são independentes de modificação genética, de *splicing*, de efeitos pleiotrópicos, de proteólise ou de atividades enzimáticas. As proteínas *moonlighting* estão relacionadas com vários processos metabólicos distintos, seja como controladoras ou iniciadoras destes processos, contribuindo para o aumento da patogenicidade (Jeffery, 2020; Satala; Karkowska-Kuleta; Zelazna; Rapala-Kozik *et al.*, 2020). No trabalho de Langenhorst; Fürst; Alberter; Vilhena *et al.* (2023) foi demonstrada a capacidade de Eno1p de se ligar às células B e T humanas. Devido a esta capacidade, a Eno1p é considerada uma proteína imunogênica (Daud; Dasari; Adelfinger; Langenhorst *et al.*, 2023), e também uma proteína capaz de estimular a invasão de células epiteliais mediante a ligação ao plasminogênio humano (Jong; Chen; Stins; Kim *et al.*, 2003). Adicionalmente ao plasminogênio, a Eno1p pode se ligar à vitronectina e à fibronectina humana, modulando a interação patógeno-hospedeiro (Satala; Satala; Karkowska-Kuleta; Bukowski *et al.*, 2020).

1.4 Biofilmes de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista que está presente especialmente em cavidades nasais e na pele do ser humano. Na cavidade oral, *S. aureus* está presente em casos de doença peri-implantar e também em usuários de próteses dentárias (Lechien; Filleul; Costa De Araujo; Hsieh *et al.*, 2014; Singh; Bhojaraju; Vinod; Anjali *et al.*, 2023). Em pacientes nosocomiais, a cavidade oral é um importante reservatório de *S. aureus* (Kearney; Kinnevey; Shore; Earls *et al.*, 2020). Uma das principais características infecciosas de *S. aureus* está relacionada com sua capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro (Foster; Höök, 1998; Ohara-Nemoto; Haraga; Kimura; Nemoto, 2008). Esta capacidade de adesão é relacionada a três tipos principais de proteínas: à Proteína A de ligação à fibronectina (FnBPA), à proteína ligadora a colágeno (Cna), e ao fator de agregação A (CfIA) (Foster; Höök, 1998).

Assim como no caso de *C. albicans*, o desenvolvimento de biofilmes de *S. aureus* inicia-se com o processo de adesão, seguindo-se pela maturação com a formação de ECM e finalmente a dispersão (Lamret; Colin; Mongaret; Gangloff *et al.*, 2020; Lister; Horswill, 2014). A ECM de *S. aureus* é composta, de forma geral, por polissacarídeos, proteínas e eDNA (Lamret; Colin; Mongaret; Gangloff *et al.*, 2020; Lister; Horswill, 2014). Entre os polissacarídeos presentes na ECM destaca-se, principalmente, o polissacarídeo intracelular de adesão (PIA do inglês *Polysaccharide Intercellular Adhesion*), que também é conhecido como PNAG (*poly-N-*

acetylglucosamine), o qual desempenha um papel fundamental na adesão e na agregação de *S. aureus* aos sítios anatômicos do hospedeiro (Otto, 2018; Peng; Tang; Dong; Sun *et al.*, 2023). Dentre as proteínas dos biofilmes de *S. aureus*, pode-se dizer que, em sua grande maioria, tratam-se de adesinas, como as proteínas ligadoras de fibronectina (FnBP do inglês *Fibronectin Binding Proteins*), as proteínas ligadoras de fibrinogênio (Fib do inglês *Fibrinogen-Binding Protein*), os fatores de aglomeração (Clf do inglês *Clumping Factors*) e as proteínas da família de repetições de serina-aspartato (Sdr do inglês *Serine-Aspartate Repeat Family Proteins*). Assim como os biofilmes de *C. albicans*, os biofilmes de *S. aureus* também são comunidades microbianas heterogêneas, com diferentes níveis de espessura e capacidade de crescimento, com variação de nutrientes, de oxigênio e de moléculas QS (Lamret; Colin; Mongaret; Gangloff *et al.*, 2020).

1.5 Biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Candida albicans e *Staphylococcus aureus* são micro-organismos capazes de desenvolverem biofilmes de forma cooperativa e mútua, em que uma espécie se beneficia da presença da outra (Todd; Peters, 2019). Os biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus* são amplamente estudados devido a sua alta prevalência e alta gravidade. Este tipo de infecção polimicrobiana é comum em quadros clínicos de pneumonia, de fibrose cística e em infecções do trato urinário, pele e cavidade oral (Gupta; Haque; Mukhopadhyay; Narayan *et al.*, 2005; Hu; Niu; Ye; Zhu *et al.*, 2021; Pate; Jones; Wilhelmus, 2006; Tawara; Honma; Naito, 1996; Valenza; Tappe; Turnwald; Frosch *et al.*, 2008; Van Dyck; Viela; Mathelié-Guinlet; Demuyser *et al.*, 2021). Além disso, estima-se que 27% dos quadros de disseminação hematogênica sejam causados por infecções conjuntas destes dois micro-organismos (Harriott; Noverr, 2009; Klotz; Chasin; Powell; Gaur *et al.*, 2007; Ribeiro; Pavarina; Dovigo; Machado *et al.*, 2012). Em modelo animal de infecção intra-abdominal, a infecção mista de *C. albicans* e *S. aureus* resulta em um aumento de 100% nos índices de morbidade e mortalidade destes animais, em comparação com infecções monoespécies (Todd; Noverr; Peters, 2019). Ao que se sabe até o momento, esta exacerbação do processo infeccioso misto, se deve, em partes à uma maior produção de alfatoxina pelo *S. aureus*, induzida pela presença de *C. albicans* (Todd; Noverr; Peters, 2019).

Em relação à arquitetura tridimensional, os biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus* apresentam uma estrutura similar aos biofilmes simples de *C. albicans*. Nestes casos, a maioria da ECM é produzida por *C. albicans*. Esta ECM é um ambiente favorável à interação física e química com *S. aureus*, sobretudo através da ligação com as adesinas Als1p e Als3p de *C.*

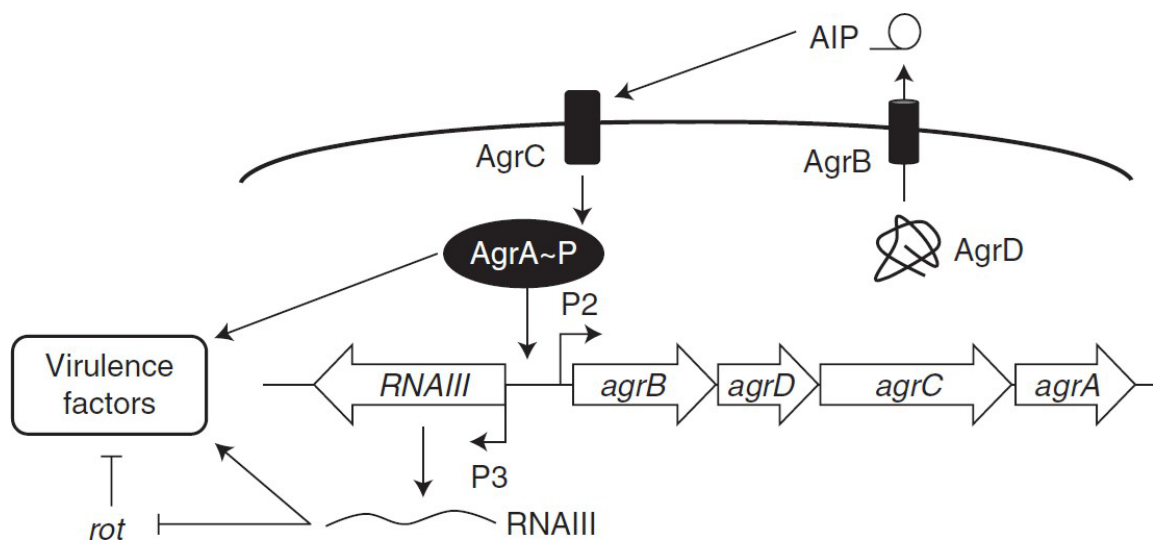
albicans (Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.*, 2012). No estudo de Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.* (2012) foi demonstrado que a adesão de *S. aureus* às hifas de *C. albicans* é mediada necessariamente pela ação da adesina Als3p, permitindo que *S. aureus*, aderidos às hifas de *C. albicans*, atinja as camadas mais profundas do sítio infeccioso (Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.*, 2012; Schlecht; Peters; Krom; Freiberg *et al.*, 2015).

Além disso, biofilmes destas duas espécies são microambientes favoráveis aos processos de sinalização do tipo QS (Carolus; Van Dyck; Van Dijck, 2019; Polke; Leonhardt; Kurzai; Jacobsen, 2018). No caso de *C. albicans*, a molécula QS mais descrita e estudada até o presente momento é o farnesol. O farnesol é um subproduto da via metabólica da síntese de esteróis (Honorato; Araujo; Ellis; Piffer *et al.*, 2022; Hornby; Kebaara; Nickerson, 2003). Uma das principais características do farnesol é a capacidade de limitar o desenvolvimento dos próprios biofilmes de *C. albicans*, mediante bloqueio da transição levedura-hifa (Costa; Silva; Amaral, 2021; Polke; Leonhardt; Kurzai; Jacobsen, 2018). Adicionalmente, o farnesol também regula a expressão de genes de resistência e de resposta imune e celular do hospedeiro, (Batliner; Schumacher; Wigger; Vivas *et al.*, 2024; Cho; Aoyama; Toyoda; Nakayama *et al.*, 2007; Polke; Leonhardt; Kurzai; Jacobsen, 2018). Em relação à interação com *S. aureus*, o farnesol de *C. albicans*, quando em baixas quantidades, consegue contribuir para a formação do biofilme de *S. aureus* em infecções mistas (Gaálová-Radochová; Kendra; Jordao; Kursawe *et al.*, 2023; Kong; Tsui; Kucharíková; Dijck *et al.*, 2017; Krause; Geginat; Tammer, 2015). Já em grandes quantidades, o farnesol pode ter um efeito modulatório e pró-apoptótico nas células do sistema imune. No trabalho de Leonhardt; Spielberg; Weber; Albrecht-Eckardt *et al.* (2015) foi demonstrado que as concentrações de farnesol em torno de 50 μ M induz à diferenciação de monócitos em células dendríticas imaturas. Estas células tem um padrão de resposta não protetivo e disfuncional frente à presença de fungos (Leonhardt; Spielberg; Weber; Albrecht-Eckardt *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi observado que concentrações acima de 200 μ M provocam apoptoses em monócitos e células dendríticas; sendo, portanto, o farnesol considerado um fator imunossupressor, relacionado à virulência de *C. albicans* (Leonhardt; Spielberg; Weber; Albrecht-Eckardt *et al.*, 2015).

Em relação às moléculas QS de *S. aureus*, a maior parte delas é regulada pelo locus *AGR* (Figura 3). De forma simplificada, o funcionamento deste locus ocorre via promotor P2, capaz de aumentar a expressão do transcrito RNAII. O transcrito RNAII codifica quatro componentes do sistema QS (Novick; Projan; Kornblum; Ross *et al.*, 1995). Estes componentes são: *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*. O *agrD* codifica o pro-peptídeo indutor (AIP, de *Autoinducible Peptide*),

que é processado e secretado pela proteína transportadora de membrana AgrB. Quando o AIP se acumula, ocorre a ligação com a quinase de membrana AgrC, que ativa a proteína AgrA. A proteína AgrA fosforilada se liga novamente ao P2 e autoinduz a expressão do complexo agr novamente (Rutherford; Bassler, 2012). Adicionalmente, AgrA também interage com o promotor P3, controlando o transcrito RNAIII (Novick; Ross; Projan; Kornblum et al., 1993). Na porção 5' do RNAIII está presente o gene *hld* que codifica a toxina δ -hemolisina (Janzon; Arvidson, 1990). Desta forma, a ativação do locus *AGR*, aumenta a expressão da α -toxina e outros fatores de virulência de *S. aureus* (Queck; Jameson-Lee; Villaruz; Bach et al., 2008; Rutherford; Bassler, 2012).

Figura 3 - Circuito de *quorum-sensing* de *S. aureus*.



Fonte: Figura adaptada de Rutherford e Bassler (2012).

O peptídeo autoindutor (AIP) é sintetizado como um precursor a partir do *agrD*. O transportador de AIP, AgrB, processa o precursor do AIP maduro e o transporta para fora da célula. Os AIPs são detectados por uma via de transdução de sinal de dois componentes. AgrC é a histidina quinase ligada à membrana e AgrA é o regulador da resposta. O AgrA fosforilado ativa os promotores P2 e P3 que codificam o operon *agr* (denominado RNAII) e o RNA regulador RNAIII, respectivamente.

1.6 A importância dos produtos do metabolismo microbiano

Nas células do hospedeiro, a interação de *C. albicans* ocorre através de diversas moléculas como as adesinas Als1p, Als3p, Hwp1p, a *Heat Shock Protein 70* (Ssa1 ou HSP70), as proteinases, as fosfolipases e as hidrolases (Lopes; Lionakis, 2022; Martin; Kavanagh; Velasco-Torrijos, 2021; Roudbarmohammadi; Roudbary; Bakhshi; Katiraei et al., 2016; Swidergall; Solis; Millet; Huang et al., 2021). Recentemente, a candidalisina, uma toxina secretada por *C. albicans*, codificada pelo gene *ECE1*, ganhou notoriedade nos estudos da

relação deste patógeno com o hospedeiro (Moyes; Wilson; Richardson; Mogavero et al., 2016). Neste sentido, sabe-se que a candidalisina provoca danos na membrana das células do hospedeiro e posteriormente a morte celular, mediante a formação de poros na membrana e liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) (Blagojevic; Camilli; Maxson; Hube et al., 2021; Lopes; Lionakis, 2022; Moyes; Wilson; Richardson; Mogavero et al., 2016). Além disso, sabe-se que a candidalisina pode atuar nas células humanas de três formas principais: através da perda da atividade metabólica por esgotamento de ATP celular e pela indução de estresse oxidativo (Blagojevic; Camilli; Maxson; Hube et al., 2021); por sinalização na via das quinases ativadas por mitógeno (MAPK de *Mitogen-activated protein kinases*); e por fim na via de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K de *phosphatidylinositol-3 kinase*). Estas duas últimas rotas ativam o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF de *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e a Proteína 3 da Família NLR (NLRP3 de *NLR family pyrin domain containing 3*). Tais processos estão relacionados ao recrutamento do sistema imunológico e ao dano celular. Estas vias de sinalização também são comuns em processos tumorais, relacionando-se à maior sobrevivência e à progressão do câncer (Engku Nasrullah Satiman; Ahmad; Ramzi; Abdul Wahab et al., 2020).

Com relação à patogênese de moléculas secretadas por *S. aureus*, existe uma ampla gama de fatores de virulência associados (Ahmad-Mansour; Loubet; Pouget; Dunyach-Remy et al., 2021; Jorde; Schreiber; Stegemann-Koniszewski, 2023; Krueger; Zaugg; Chisholm; Linedale et al., 2022; Löffler; Tuchscher, 2021; Pivard; Moreau; Vandenesch, 2021; Turk; Yanpar; Baesmat; Canli et al., 2023; Yamazaki; Ito; Tamai; Nakagawa et al., 2024). Neste sentido, pode-se dizer que as toxinas de *S. aureus* são as mais amplamente estudadas e importantes nos processos patogênicos desta bactéria até o momento. Estas toxinas podem ser divididas em: toxinas formadoras de poros (PFT de *Pore Forming Toxins*); toxinas exfoliativas (ET de *Exfoliative Proteins*) e os superantígenos (SAGs de *Superantigens*). Os PFTs podem ser divididos em 4 tipos: hemolisina α (Hla, também conhecida como alfatoxina); hemolisina β ; leucotoxinas; e modulinas solúveis em fenol (PSM de *Phenol-Soluble Modulins*) (Oliveira; Borges; Simões, 2018; Tam; Torres, 2019). A Hla é possivelmente a toxina mais descrita nos processos infecciosos por *S. aureus*. Como mecanismo de ação, a toxina Hla forma um oligômero heptaédrico capaz de induzir a formação de poros na membrana celular do hospedeiro, afetando a proliferação celular, a resposta inflamatória e a secreção de citocinas no hospedeiro (Oliveira; Borges; Simões, 2018; Tam; Torres, 2019). Na patogênese de *S. aureus*, destacam-se também as leucotoxinas (PVL; Luk AB/Luk GH; LukED e hemolisina γ). Este tipo de porinas são capazes de lisar diferentes tipos celulares, permitindo a sobrevivência de *S.*

aureus e garantindo a eficácia nos processos infecciosos desta bactéria, através da evasão do sistema imune (Cheung; Bae; Otto, 2021; Oliveira; Borges; Simões, 2018; Tam; Torres, 2019).

1.7 Interação com o sistema imunológico

De forma geral, durante os processos infecciosos no hospedeiro, os micro-organismos são reconhecidos pelo sistema imune, principalmente pelos padrões moleculares associados a patógenos microbianos (PAMPs de *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), os quais são detectados pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR de *Pattern Recognition Receptors*) (Mukaremera; Lee; Mora-Montes; Gow, 2017; Qin; Lulu; Zheng; Jinyu et al., 2016). No caso de *C. albicans*, os PAMPs encontram-se normalmente associados à parede celular. Mananas e glucanos são as principais moléculas detectadas pelos receptores do tipo lectina C (CLR de *C-type Lectin Receptors*) (Bojang; Ghuman; Kumwenda; Hall, 2021; Gow; Netea; Munro; Ferwerda et al., 2007; Mata-Martínez; Bergón-Gutiérrez; Del Fresno, 2022). Um dos receptores mais estudados na patogênese de *C. albicans* é a dectina 1. A dectina 1 detecta os β -glucanos, especialmente os β -1,3 e β -1,6 glucanos presentes nas paredes celulares de *C. albicans* (Mata-Martínez; Bergón-Gutiérrez; Del Fresno, 2022). A ativação da dectina 1 aumenta a expressão de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF (Bojang; Ghuman; Kumwenda; Hall, 2021; Mata-Martínez; Bergón-Gutiérrez; Del Fresno, 2022). A resposta à infecção por *C. albicans* requer a interação de vários tipos de células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK (*natural killer*) (Netea; Brown; Kullberg; Gow, 2008). Para exemplificar esta interação celular, pode-se citar os mecanismos desencadeados pelos neutrófilos durante a infecção por *C. albicans*. Nestas células ocorre a fagocitose, a degranulação e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS de Reactive Oxygen Species), além da formação de NETs (NET de *Neutrophil Extracellular Traps*) (He; Liu; Chen; Yan et al., 2022). Neste contexto, *C. albicans* apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune, entre eles a promoção da lise celular por penetração física, a piroptose e a secreção de toxinas, assim como a ação de moléculas de QS com capacidade citolítica, como o farnesol (Fan; Liu; Liu; Lv et al., 2022). Além disto, um mecanismo bem conhecido de escape do sistema imunológico por *C. albicans* é a capacidade de transição morfológica para hifas. Este processo de transição está mediado por vários fatores de transcrição, mas principalmente por *EFG1* e *CPH1* (García-Sánchez; Aubert; Iraqui; Janbon et al., 2004; Nobile; Fox; Nett; Sorrells et al., 2012).

O reconhecimento de *S. aureus* pelo sistema imune do hospedeiro ocorre devido à uma cascata de eventos relacionados aos PPR. Neste sentido, o ácido lipoteicóico (LTA), as

modulinas solúveis em fenol (PMSF), as hemolisinas e o peptidoglicano são moléculas responsáveis pela ativação de vias inflamatórias no hospedeiro (Pidwill; Gibson; Cole; Renshaw et al., 2021). Este reconhecimento imunológico é mediado via dois receptores principais: TLR2 e TLR4 (Pidwill; Gibson; Cole; Renshaw et al., 2021). Os receptores TLR2 ativam a expressão das citocinas pro-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-1 β mediante a sinalização mediada por MYD88 e pelo fator nuclear kappa-cadeia leve-potenciador de células B ativadas (NF-kB) (Pidwill; Gibson; Cole; Renshaw et al., 2021). Quando as toxinas de *S. aureus* são detectadas, as principais células recrutadas no hospedeiro são os monócitos, neutrófilos e macrófagos, via ativação do inflamassoma NLRP3 (Pivard; Moreau; Vandenesch, 2021). Uma destas toxinas, a hemolisina A, é detectada durante a interação com metaloproteases de matriz nos tecidos do hospedeiro, mediando a invasão celular. (Becker; Berube; Sampedro; Dedent et al., 2014; Inoshima; Inoshima; Wilke; Powers et al., 2011). Os receptores TLR4 são comumente relacionados com o LPS presente em bactérias Gram-negativas e não em bactérias Gram-positivas como o *S. aureus*, porém, no estudo de Gonzalez; Hossain; Neef; Zwack *et al.* (2024) foi demonstrado que a proteína B regulada por ferro (IsdB), de *S. aureus*, é reconhecida pelos TLR4. Este reconhecimento culmina na ativação destes receptores, disparando então as cascatas de produção de citocinas inflamatórias. (Gong; Zhang; Zhang; Cao *et al.*, 2022; Gonzalez; Hossain; Neef; Zwack *et al.*, 2024).

1.8 O Microambiente tumoral

É importante consolidar, através de entendimento atuais, que os processos tumorais são baseados em uma rede complexa, formada por diversos tipos celulares (células malignas, células normais e em diferentes graus de diferenciação, além de células do sistema imune), matrix extracelular, moléculas de sinalização e uma microbiota residente (Chen; Wu; Wu; Xing *et al.*, 2022). Esta complexa rede é designada como o Microambiente tumoral, do inglês TME (*Tumor-Microenvironment*). O TME é um promotor ativo da progressão do câncer (Anderson; Simon, 2020) e está diretamente relacionado com a sobrevivência das células tumorais, com a invasão local, com a disseminação metastática e com a evasão do sistema imune (Anderson; Simon, 2020; De Visser; Joyce, 2023). Diversas são as células imunológicas que realizam funções extremamente especializadas no TME, como os macrófagos associados à tumores (TAM) e os linfócitos reguladores (Treg), além das células apresentadoras de antígenos (APCs), como os monócitos e as células dendríticas. Neste contexto, os monócitos são consideradas “células sentinelas” do TME, pois são as primeiras células a serem recrutadas ao TME, além de serem capazes de mobilizar uma ampla gama de citocinas, exercendo assim diversas funções

neste ambiente, podendo atuar como um promotor da angiogênese, da evasão das células tumorais, dos mecanismos de tolerância, culminando no favorecimento ou não da progressão tumoral (Coffelt; Chen; Muthana; Welford *et al.*, 2011; Coffelt; Tal; Scholz; De Palma *et al.*, 2010). Os monócitos recrutados ao TME são induzidos por vários sinais, inclusive via angiopoietina 2, uma proteína secretada pelas células epiteliais. Nos estudos de Coffelt; Tal; Scholz; De Palma *et al.* (2010) foi demonstrado que a angiopoietina 2 aumenta a expressão de vários genes pro-angiogênicos como o VEGF (de *Vascular Endothelial Growth Factor*) e a MMP9 (de *Matrix Metalloproteinase 9*), assim como aumenta a produção de IL-10 e da quimiocina CCL17. (Coffelt; Tal; Scholz; De Palma *et al.*, 2010; Olingy; Dinh; Hedrick, 2019). Todos esses eventos culminam no aumento da vascularização do TME, no surgimento de um ambiente imunossupressor via ação de IL-10, e no recrutamento de linfócitos Treg, suprimindo a resposta imune anti-tumoral (Coffelt; Chen; Muthana; Welford *et al.*, 2011). Além do discutido acima, o TME também é influenciado por outros tipos celulares como os fibroblastos, assim como pela microbiota residente (Wong-Rolle; Wei; Zhao; Jin, 2020). Neste contexto, sabe-se atualmente que os micro-organismos podem estar relacionados com vários processos tumorais, seja através da ação direta na mutagênese das células saudáveis, seja na ativação da sinalização oncogênica ou na modulação do sistema imune (Wong-Rolle; Wei; Zhao; Jin, 2020). No caso de *C. albicans* e *S. aureus*, estudos reportam a presença destas espécies em casos clínicos de tumores de cabeça e pescoço, sem que haja, no entanto, uma relação clínica direta de causa-efeito bem estabelecida até o presente momento (Almståhl; Finizia; Carlén; Fagerberg-Mohlin *et al.*, 2018; Ayuningtyas; Mahdani; Pasaribu; Chalim *et al.*, 2022; G; Ravi; Maheswary; Leela *et al.*, 2025; Meng; Deng; Deng; Sun, 2025).

Clinicamente, a candidíase oral pode ser classificada em candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa e candidíase hiperplásica crônica (CHC) (Zhang; Wu; Wang; Gao *et al.*, 2021). A incidência de CHC pode chegar a 15% dos casos, e quando não é tratada corretamente, pode progredir para vários graus de displasia intraepitelial, podendo culminar em transformação maligna das células escamosas (Zhang; Wu; Wang; Gao *et al.*, 2021). A incidência deste tipo de progressão pode ocorrer em até 10% dos pacientes portados de CHC. Existem diversos estudos reportando a prevalência de *C. albicans* na progressão maligna da CHC (Sankari; Mahalakshmi, 2019; Wicaksono; Ngokwe; Mccullough; Yap, 2025). Clinicamente, uma das formas de diagnóstico precoce destes processos de progressão ocorre via detecção de *C. albicans* nestas lesões, assim como pela quantificação da produção dos mRNA de *ADHI* e *ADH2* (Bakri; Cannon; Holmes; Rich, 2014; Wicaksono; Ngokwe; Mccullough; Yap, 2025). Os níveis de mRNA destes genes pode predizer a progressão das lesões CHC, uma vez que,

estes genes são codificadores das enzimas álcool desidrogenase, relacionadas com a produção de acetaldeído, um metabólito carcinogênico de *C. albicans* (Bakri; Cannon; Holmes; Rich, 2014; Gainza-Cirauqui; Nieminen; Novak Frazer; Aguirre-Urizar *et al.*, 2013; Wicaksono; Ngokwe; Mccullough; Yap, 2025). Porém cabe destacar aqui que, até o presente momento, não existe um consenso clínico ou até mesmo da literatura atual, que relacione de forma direta a presença de *C. albicans* e/ou *S. aureus* na biologia das displasias de cavidade oral ou mesmo na biologia da progressão dos tumores de cabeça e pescoço, ressaltando-se a importância do estudo destes patógenos, no sentido de promover um maior conhecimento científico neste cenário.

1.9 Hipótese

A relação dos micro-organismos e o câncer está cada vez melhor descrita, porém a grande maioria de estudos centram-se em apenas detectar os micro-organismos, que compõe esta “microflora tumoral”, sobretudo, através de técnicas de sequenciamento genético. Esta abordagem desconsidera as inúmeras formas de interação entre os micro-organismos com o TME, como o papel dos fatores de virulência, das moléculas secretadas e da ativação ou inativação do sistema imune. Neste trabalho buscamos melhor entender como o secretoma dos biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* poderia exercer uma modulação inflamatória, em monócitos naive, e o que tal modulação poderia provocar em relação à expressão de oncogenes, em células displásicas de cavidade oral, mimetizando in vitro e de forma indireta, uma suposta rede de comunicação existente no TME displásico. Além disto, este trabalho estudou a relação direta de fatores de virulência da *C. albicans* neste contexto, através do emprego de mutantes *ece1*Δ/Δ, *als3*Δ/Δ e *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ.

1.10 Objetivo Geral

Avaliação da modulação da expressão de oncogenes nas células de queratinócitos displásicos orais (DOK), estimuladas com meios condicionados de células inflamatórias THP-1, previamente estimuladas com os secretomas dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*; e gerar um entendimento dos fatores de virulência de *C. albicans* neste contexto e na relação com *S. aureus*, em biofilmes, através do uso de mutantes *ece1*Δ/Δ, *als3*Δ/Δ e *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ.

1.11 Objetivos Específicos

1.1.Obtenção e caracterização dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*,

incluindo os mutantes de *C. albicans* *ece1* Δ/Δ , *als3* Δ/Δ e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ , e uma cepa revertida *ece1* Δ/Δ +ECE1, mediante contagem de Unidades Formadoras de Colônias e Microscopia de Fluorescência Confocal (CLSM).

1.2.Avaliação da capacidade hemolítica de *S. aureus*, em biofilmes simples e mistos com *C. albicans* WT e com as cepas mutantes *ece1* Δ/Δ , *als3* Δ/Δ , *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ e *ece1* Δ/Δ +ECE1.

1.3.Caracterização da resposta inflamatória em células THP-1 naïve (monócitos), estimuladas com os secretomas dos biofilmes desenvolvidos, mediante a quantificação da produção de citocinas por *Cytometric Bead Array* e através da marcação de CD86 e CD163 por CLSM.

1.4.Avaliação da expressão gênica das células displásicas orais, (DOK), estimuladas com o meio condicionado das células THP-1 previamente estimuladas, mediante RT-qPCR.

1.5.Criação por CRISPR-Cas9 de uma cepa de *Candida albicans*, com a *Eno1p* mutada na região de ligação ao plasminogênio humano, substituída pela região homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo e formação dos biofilmes

2.1.1 Micro-organismos e condição de armazenamento

Foram utilizados os seguintes micro-organismos:

- 2.1.1.1 *Candida albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876): isolado clínico proveniente de paciente com candidíase sistêmica. Esta cepa foi considerada *Wild Type* (WT) no estudo. Adicionalmente, no estudo foram utilizados 4 cepas mutantes e uma cepa revertida em parceria com o Prof. Brian M. Peters, da Universidade do Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, Estados Unidos. A descrição das cepas está resumida no Quadro 1, seguindo-se pela descrição das características fenotípicas dos mutantes no Quadro 2.

Quadro 1 - Cepas de *C. albicans* utilizadas no estudo.

Cepa	Parental	Genótipo
<i>ece1</i> Δ/Δ	SC 5314	Δ <i>ece1</i> :FRT+ Δ <i>ece1</i> :FRT+
<i>als3</i> Δ/Δ	SC 5314	Δ <i>als3</i> :FRT+Δ <i>als3</i> :FRT+
<i>efg1</i> Δ/Δ/ <i>cph1</i> Δ/Δ	<i>cph1</i> Δ/Δ	Δ <i>cph1</i> :FRT+Δ <i>cph1</i> :FRT+Δ <i>efg1</i> :FRT + Δ <i>efg1</i> :FRT
<i>ece1</i> Δ/Δ+ECE1	SC <i>ece1</i> Δ/Δ	Δ <i>ece1</i> :FRT+Δ <i>ece1</i> :FRT+Δ <i>neut5l</i> :PrE CE1-ECE1- <i>tADH1</i> /NEUT5L

Fonte: Autoria própria e Liu; Vogel; Miao; Carnahan *et al.* (2022)

Quadro 2 - Descrição fenotípica dos mutantes utilizados no estudo.

Mutantes	Fenótipo
<i>ece1</i> Δ/Δ	Deleção do gene <i>ECE1</i> , não apresenta produção de candidalisina nem dos outros sete peptídeos codificados pelo gene <i>ECE1</i> .
<i>ece1</i> Δ/Δ+ECE1	Reversão obtida a partir da inserção do gene <i>ECE1</i> ao mutante <i>ece1</i> Δ/Δ. Produtor de candidalisina e dos outros sete peptídeos codificados pelo gene <i>ECE1</i> .
<i>als3</i> Δ/Δ	Deleção do gene <i>ALS3</i> . Esta deleção impede a adesão de <i>C. albicans</i> às superfícies, assim como a adesão de <i>S. aureus</i> nas hifas.

<i>efg1</i> Δ/ <i>cph1</i> Δ/Δ	Dupla deleção dos genes <i>efg1</i> e <i>cph1</i> . Esta dupla mutação impossibilita a formação de hifas nesta cepa.
--------------------------------	--

Fonte: Autoria própria

2.1.1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: isolado clínico proveniente de um paciente portador de infecção cutânea por *S. aureus*. Obtido da empresa Plastilabor (Plastilabor; Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.1.2 Reativação e condições de cultivo

Os micro-organismos foram mantidos em 20% (v/v) de glicerol em freezer -80 °C até o momento da reativação. Para reativar as cepas de *C. albicans*, foram utilizadas placas de *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, Neogen; Lansing, Michigan, EUA, Cód. NCM0272A) suplementadas com cloranfenicol [0,1 g/L], (Éxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brazil, Cód. CL06722RA). As placas foram incubadas por 48 horas (h) a 30 °C. A cepa de *S. aureus* foi reativada em placas de *Brain Heart Infusion* (BHI; Neogen; Lansing, Michigan, EUA, Cód. NCM0080B) suplementadas com anfotericina B [0,025 g/L] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA, Cód. A4888). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h.

2.1.3 Obtenção do inóculo:

2.1.3.1 Formação do pré-inóculo e obtenção do inóculo para formação de biofilmes de

C. albicans:

Uma (01) colônia de *C. albicans* foi transferida para tubos estéreis contendo 5 mL de caldo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD, Extrato de levedura; Neogen; Lansing, Michigan, EUA, Cód. NCM0218B, Peptona; HiMedia; Mumbai, Maharashtra, Índia, Cód. RM001, Dextrose; Synth, Diadema, São Paulo, Brasil, Cód. 01G1008.01.AF). Os tubos foram incubados em estufa a 30 °C por 16 h. Após este período, uma alíquota (10 µL) da suspensão de crescimento foi observada entre lâmina e lamínula, em microscópio de luz transmitida, para descartar possíveis contaminantes na amostra. O inóculo de *C. albicans* foi formado a partir da diluição do pré-inóculo na razão de 1:10 (1 mL da solução de pré-inóculo em 9 mL de caldo YPD). Os inóculos foram incubados a 30 °C, por aproximadamente 6 h, até atingirem o meio da fase exponencial (mid-log), evidenciada pela medida da densidade óptica em 540 nm ($D.O_{540\text{ nm}} \text{ mid-log} = 0,580 \pm 0,06$) em espectrofotômetro (Kasvi K37-VIS; Pinhais, Paraná, Brasil).

2.1.3.2 Formação do pré-inóculo e obtenção do inóculo para formação de biofilme de

S. aureus:

Uma (01) colônia de *S. aureus* foi transferida para tubos estéreis contendo 10 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB; Neogen; Lansing, Michigan, EUA, Cód. NCM0019A). Os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C, por 16 h. Após este período uma alíquota (10 µL) da suspensão de crescimento foi observada entre lâmina e lamínula, em microscópio de luz transmitida, para descartar possíveis contaminantes na amostra. O inóculo de *S. aureus* foi obtido pela razão de 1:100 (0,1 mL da solução de pré-inóculo em 10 mL de caldo TSB). Os inóculos foram incubados a 37 °C, por aproximadamente 6 h, até atingirem o meio da fase exponencial (mid-log), com medida da densidade óptica em 600 nm ($D.O_{600nm}$ mid-log = $0,650 \pm 0,023$) em espectrofotômetro (Kasvi K37-VIS; Pinhais, Paraná, Brasil).

2.1.4 Formação dos biofilmes

Os inóculos de *C. albicans* e *S. aureus* foram centrifugados a 3 200 xg por 10 minutos (min) a 4 °C e lavados duas vezes em tampão fosfato 1X (PBS; 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH = 7,1). Em seguida os micro-organismos foram ressuspensos em 10 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640, Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, EUA, Cód. R6504) suplementado com HEPES (25 mM; pH: 7,0). As Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos micro-organismos foram ajustadas para iniciar a formação dos biofilmes, seguindo a seguinte descrição:

2.1.4.1 *Formação de biofilme simples de C. albicans*:

2 mL da suspensão 5×10^6 UFC/mL foram adicionados em garrafas de cultivo estéreis de 75 cm², completando-se com RPMI-1640 o volume final de 20 mL por garrafa.

2.1.4.2 *Formação de biofilme simples de S. aureus*:

2 mL da suspensão 5×10^7 UFC/mL foram adicionados em garrafas de cultivo estéreis de 75 cm², completando-se com RPMI-1640 o volume final de 20 mL por garrafa.

2.1.4.3 *Formação de biofilme misto de C. albicans e S. aureus*

Nestes biofilmes foram adicionados 2 mL da suspensão 5×10^6 UFC/mL de *C. albicans* e 2 mL da suspensão 5×10^7 UFC/mL de *S. aureus*, completando-se com RPMI-1640 o volume final de 20 mL.

Os diferentes biofilmes foram submetidos à fase de adesão, em incubação por agitação orbital (50 rpm), por 90 min a 37 °C. Após a fase de adesão, todo o meio líquido foi removido, as garrafas foram lavadas cuidadosamente com PBS 1X, para remoção das células não aderidas.

Em seguida, foram adicionados 30 mL de RPMI-1640, fresco, em cada garrafa de 75 cm². As garrafas foram incubadas estaticamente a 37 °C por 36 h.

2.1.5 Curva de crescimento do biofilme com alamarBlue™

Os biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus* foram formados em placas de 6 poços seguindo a relação de área/volume/inóculo, previamente estabelecida para as garrafas de 75 cm² (240 µL do inóculo e 3,6 mL de meio de cultura RPMI 1640). O branco consistiu de meio de cultivo, sem micro-organismos, com alamarBlue™ (Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: DAL1100). Em cada poço, foram adicionados 100 µL do reagente alamarBlue™. As placas foram incubadas, protegidas da luz, a 37°C. As leituras foram realizadas de hora em hora em equipamento Fluoroskan Ascent FL (Thermo-Scientific), com filtros de excitação em 544 nm e emissão em 590 nm. O método foi realizado em duplicata em duas ocasiões distintas (n = 4).

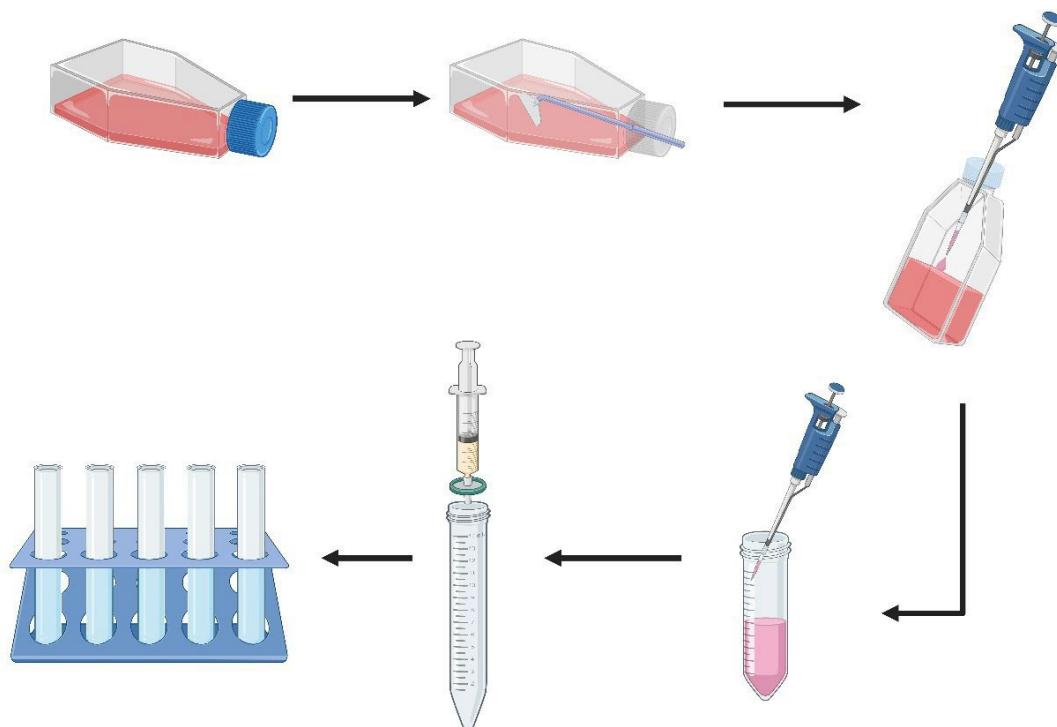
2.1.6 Cultivo dos micro-organismos em forma planctônica

Nestes cultivos, os mesmos inóculos descritos para a formação dos biofilmes foram utilizados para a formação das culturas planctônicas simples e mistas. Para o crescimento, o meio utilizado foi o TSB glicosilado (TSBg, TSB [0,6X] suplementado com 0.2% de glicose) como descrito no trabalho de Paul; Todd; Eichelberger; Tkaczyk *et al.* (2024). As culturas foram incubadas em tubos cônicos, sob agitação (100 rpm), em volume final de 5 mL por 16 h a 37 °C.

2.1.7 Obtenção dos secretomas dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*

Após as 36 h de formação dos biofilmes, as culturas foram recolhidas. Primeiramente, os biofilmes foram desestruturados gentilmente do fundo da garrafa com o auxílio de um cell scraper (KASVI, Pinhais, Paraná, Brasil, Cód. K26-0025). Os biofilmes desestruturados foram filtrados em filtro de baixa ligação proteica, do tipo SFCA de 0,22 µM (Corning; Oneonta, NY, EUA, Cód. 431219), para total esterilização da amostra e separação dos componentes não solúveis. Esta suspensão foi homogeneizada com a pipeta, recolhida e identificada (Figura 4). As culturas planctônicas descritas no item 1.5 também foram processadas seguindo-se este mesmo protocolo.

Figura 4 - Esquema para obtenção da fração solúvel (secretoma) dos biofilmes.



Fonte: Autoria Própria, criado em <https://BioRender.com>.

Os biofilmes foram coletados das garrafas de 75 cm², após 36 h de cultivo estático, mediante o uso de um cell scraper. Após coleta, o biofilme foi homogeneizado e filtrado. As soluções obtidas foram imediatamente identificadas e utilizadas para estimular as células THP-1.

2.1.8 Quantificação dos lipídeos provenientes dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans*

WT e *S. aureus*

A quantificação dos lipídeos foi realizada mediante a utilização do kit *Lipid Assay Kit (Neutral Lipids)* de Abcam (Cód. ab242307). O protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. De forma resumida, foi realizada uma curva padrão de lipídeos (0 – 500 mg/dL), mediante a diluição do padrão fornecido pelo kit, em água (dH₂O), seguindo-se a recomendação descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Curva padrão das concentrações de lipídeos em mg/dL.

Nº do padrão	Padrão de lipídeo 20 g/dL (µL)	Água (dH ₂ O)	Concentração final de Lipídeos (mg/dL)
1	10	390	500
2	200 do padrão 1	200	250
3	200 do padrão 2	200	125
4	200 do padrão 3	200	62,5
5	200 do padrão 4	200	31,3
6	200 do padrão 5	200	15,6
7	200 do padrão 6	200	7,8
8	200 do padrão 7	200	3,9
9	0	200	0

Fonte: Tabela adaptada e traduzida de Abcam (2020a).

A preparação das amostras foi realizada mediante a adição de 40 µL do filtrado dos biofilmes, em cada poço de uma placa de 96 poços, com 200 µL do reagente fluorimétrico 1X (incluído no kit), misturando-se mediante pipetagem. Para a curva e para os controles foi realizado o mesmo procedimento. Em seguida, incubou-se a placa por 15 min, protegida da luz, a temperatura ambiente. Finalmente, a leitura foi realizada no leitor de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher e software de apoio Omega versão 5.1 R2), com filtro de excitação em 490 nm e emissão em 540 nm. Para a transformação de mg/dL para µg/mL utilizou-se a seguinte fórmula:

$$XX \frac{\mu\mu\mu\mu}{mmmm} = XX \frac{mm\mu\mu}{dmm} * 10 \quad (1)$$

2.1.9 Quantificação dos carboidratos provenientes dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* WT e *S. aureus*

Os carboidratos foram quantificados com o kit *Total Carbohydrate Quantification Kit* (Cód. ab155891; Abcam). O protocolo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Primeiramente, preparou-se a curva padrão, de concentrações conhecidas de carboidratos, seguindo-se a descrição apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações da curva padrão de carboidratos.

Concentração	Carboidratos	Água (dH ₂ O)
0 µg	0 µL	30 µL
4 µg	2 µL	28 µL
8 µg	4 µL	26 µL
12 µg	6 µL	24 µL
16 µg	8 µL	22 µL
20 µg	10 µL	20 µL

Fonte: Elaboração própria baseado na informação fornecida pelo fabricante (Abcam, 2020b).

Em placa de 96 poços foram adicionados 30 µL de cada amostra (secretoma dos biofilmes) e 30 µL dos pontos da curva. Após, adicionou-se 150 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em cada poço, cuidadosamente. A placa foi homogeneizada e incubada por 15 min a 90 °C. Após este tempo, adicionou-se 30 µL da solução *developer* (fornecido com o kit). As amostras foram misturadas mediante pipetagem e incubadas por mais 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, a leitura foi realizada em absorbância de 490 nm no leitor de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher e software de apoio Omega versão 5.1 R2).

2.1.10 Precipitação e quantificação das proteínas provenientes do secretoma obtidos dos biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus*

As proteínas foram quantificadas de forma direta (filtrado dos biofilmes) e também a partir da fração proteica, isolada do secretoma. Neste processo de extração empregou-se a técnica de precipitação com acetona (Nickerson; Doucette, 2020; Scientific, 2009). Para isto foram adicionados 1,2 mL de acetona P.A, previamente resfriada a -20 °C, em um tubo de 1,5 mL contendo 30 µL dos biofilmes filtrados. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a -20 °C por 4 h. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12 000 xg a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, o *pellet* foi ressuspensionado em 80 µL de meio de cultura RPMI-1640. Este protocolo foi aplicado previamente aos ensaios de hemólise, tanto nas amostras de biofilmes como nas amostras das culturas planctônicas. Para a quantificação das proteínas utilizou-se o reagente de Bradford de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: B6916). Primeiramente, preparou-se uma solução de Soro Albumina Bovina (BSA) (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: P5369), para estabelecimento de uma curva padrão, cujo os valores estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Curva padrão das concentrações de proteínas em µg/mL.

Concentração	BSA	Água (dH ₂ O)
2,5 µg/mL	25 µL	975 µL
5 µg/mL	50 µL	950 µL
7,5 µg/mL	75 µL	925 µL
10 µg/mL	100 µL	900 µL
15 µg/mL	150 µL	850 µL
20 µg/mL	200 µL	800 µL

Fonte: Autoria Própria.

Para as medições, foram adicionados 50 µL da amostra e 50 µL de reagente de Bradford. A leitura foi realizada em leitor de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher e software de apoio Omega versão 5.1 R2) com absorbância em 595 nm.

2.1.11 Avaliação da atividade hemolítica das proteínas presentes nas culturas simples e mistas de *C. albicans* e *S. aureus*

Para a quantificação da atividade hemolítica do extrato proteico, o protocolo descrito por Paul; Todd; Eichelberger; Tkaczyk *et al.* (2024) foi utilizado. Primeiramente, as proteínas foram precipitadas conforme descrito na secção 1.10. Para o ensaio foram utilizadas placas de ágar sangue (TSA + 5% de sangue; Thermo-Scientific, Estados Unidos, Cód. R01198). Primeiramente, nestas placas, pequenos orifícios foram feitos com o intuito de adicionar o extrato de proteínas. Para a realização dos orifícios, ponteiros estéreis de 100 µL foram utilizadas. As proteínas foram aplicadas nas placas de TSA 5% e incubadas por 2 dias a 37 °C. As placas foram fotografadas e o diâmetro de hemólise foi medido utilizando-se o software ImageJ V1.54g (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012). O ensaio foi realizado em duplicata, em três ocasiões distintas (n = 6).

2.2 Caracterização dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*

2.2.1 Marcação dos biofilmes com Syto 9 e Iodeto de Propídeo (PI)

Os biofilmes simples de *C. albicans*, *S. aureus* e mistos foram formados em placas de microscopia confocal de 35 x 10 mm (SPL Life Science, Gyeonggi-do, South Korea, Cód. 210350). A marcação foi realizada com o kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA, Cód.: L7012). Primeiramente, foi realizada uma

diluição do iodeto de propídeo e do Syto 9, ambos 1:1000, em PBS 1X estéril. Adicionou-se 1 mL das diluições em cada placa de biofilmes de 36 h, recém formados, por 30 min, seguindo-se de uma lavagem para retirar o excesso dos marcadores. Os experimentos foram realizados em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800 com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue vs 2.3, utilizando-se o laser do 488 nm, com 4% de potência, para a excitação de ambos os marcadores; e faixas de emissão fixas em 530 nm para detecção do Syto9 e 610 nm para a detecção do PI, ambos com ganho em 700V nos eixos X, Y e Z. Estes experimentos foram realizados em triplicatas.

2.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) por diluição e técnica da gota.

Os biofilmes foram coletados das garrafas com ajuda de um cell scraper (KASVI, Pinhais, Paraná, Brasil, Cód. K26-0025) após as 36 h de formação, conforme já descrito no item 1.7. Os biofilmes coletados foram homogeneizados com ajuda de um vórtex. Em seguida, 400 µL dos biofilmes homogeneizados foram coletados, antes da filtração, para a realização do plaqueamento. Os biofilmes foram diluídos 1:10 até a sétima diluição seriada para *C. albicans*, e até a décima segunda diluição seriada para o *S. aureus*. Para a contagem em placas Petri, foram adicionados 10 µL das diluições em placas de Petri com meio SDA com cloranfenicol; no caso de *C. albicans*, e no meio BHI com anfotericina; no caso de *S. aureus*. Para os biofilmes mistos, 10 µL da mesma amostra foram adicionados a cada uma das placas já mencionadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após as 24 h, realizou-se a contagem do número de colônias e os valores de UFC/mL foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{UUUUU}{mmmm} = \frac{MMéddddd \ dddddd \ cccccccddpuccecd+DDddDDDDddçãcc \ DDccddDdduuddddd}{VVccDDDDmmcc \ DDccddDDdduuddddcc \ ppddppdd \ ffdduuccpp \ dd \ ccDDDDccDDppdd \ (mmmm)} \quad (2)$$

Os experimentos foram realizados em duplicatas em três ocasiões distintas (n = 6).

2.3 Cultura de células

Todas as células descritas a seguir foram cultivadas para os experimentos na ausência de antibióticos e antimicóticos, a fim de evitar possíveis interferências nas vias de sinalização celular relacionadas ao ciclo celular. Para os experimentos, todas as células foram utilizadas com 80% de confluência. Inicialmente, as células foram lavadas com PBS 1X, removidas com

solução de tripsina (0,05% v/v) /EDTA [0,53 mmol/L] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA, Cód. T4174) e centrifugadas a 400 xg por 5 min. As células foram ressuspensas em meio de cultivo apropriado e quantificadas em Câmara de Neubauer. Para os experimentos, as culturas foram utilizadas entre a terceira e oitava passagem.

2.3.1 Cultura de queratinócitos displásicos de cavidade oral (linhagem DOK)

A linhagem DOK (Sigma-Aldrich, Cód. 94122104) é uma célula epitelial proveniente de uma displasia moderada de língua, de um paciente do sexo masculino de 57 anos (Sigma-Aldrich, 2020). Estas células foram cultivadas em meio DMEM 4,5 g/L de glicose com 2,0 mM de L-glutamina e 5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA, Cód. H0888); contendo 10 % (v/v) de Soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil, Cód. 10270106), em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

2.3.2 Cultura de células inflamatórias -monócitos (linhagem THP-1)

A linhagem THP-1 (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Cód. 0234) são monócitos de sangue periférico isolados de um paciente portador de leucemia monocítica aguda (Atcc, 2020). Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; Cód. R6504) com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1,50 g/L bicarbonato de sódio, contendo 10 % (v/v) de SFB e 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich; Saint Louis; Missouri; Estados Unidos, Cód.: M3148), mantidos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

2.4 **Estímulo das células com os secretomas dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus***

Primeiramente, os biofilmes simples e mistos dos micro-organismos foram desenvolvidos como já descrito anteriormente (Na secção 1.4). Os filtrados (secretoma) foram utilizados para estimular as células THP-1 naive (sem prévio protocolo de diferenciação). Para o estímulo, 5 x 10⁶ células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² contendo 24 mL de meio de cultura RPMI-1640, com 5% de SFB e incubadas por 16 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após as 16 h, 8 mL dos filtrados dos biofilmes foram adicionados nas respectivas garrafas, de acordo com os diversos grupos experimentais. As garrafas foram incubadas por mais 24 h a 37 °C e com 5% de CO₂. Passadas as 24 h, o meio foi coletado e armazenado em -20 °C, para posterior uso no desafio das células displásicas (DOK) e para a quantificação das citocinas produzidas. As células remanescentes foram ressuspensas em meio de cultura fresco e utilizadas para calcular a viabilidade celular. O processo descrito acima foi realizado para cada um dos biofilmes em

estudo (biofilmes simples e mistos de *S. aureus* e as cinco cepas de *C. albicans*). Este protocolo foi realizado em três ocasiões distintas e em duplicata (n = 6).

2.5 Ensaio de viabilidade celular por alamarBlue™

Para certificar que o estímulo dos diferentes secretomas, nas células THP-1 naive, não apresentavam toxicidade, foi realizado o ensaio de alamarBlue™ (ThermoFisher-Invitrogen; Eugene, OR, EUA, Cód. DAL1100). Para isto, após o estímulo por 24 h com os diferentes secretomas, foram adicionados 20 µL do reagente alamarBlue™ (10% v/v) em 200 µL de células THP-1, distribuídas em placas de 96 poços. A placa foi incubada por 16 h a 37 °C e 5% de CO₂, seguindo-se de leitura em leitor de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher e software de apoio Omega versão 5.1 R2) a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão. Este experimento foi realizado em quintuplicatas em três ocasiões distintas (n = 15).

2.6 Avaliação da produção de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA)

Para a avaliação da produção das citocinas inflamatórias foi utilizado o kit *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines kit* (BD Biosciences; San Diego, CA, EUA, Cód. 551811). O kit permite quantificar seis citocinas inflamatórias: IL-8; IL-1β; IL-6; IL-10; TNF; IL-12p70. O ensaio foi realizado seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente, para a preparação do padrão, as citocinas liofilizadas foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL, reconstituídas em 2 mL de *assay diluent* (incluído no kit). A solução foi incubada por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, misturou-se a solução reconstituída, cuidadosamente, com a micropipeta. A partir desta solução, foi realizada a curva padrão das citocinas, de acordo com a descrição da Tabela 4.

Tabela 4 - Curva padrão para quantificação das citocinas do kit CBA.

Tubo	Concentração (pg/mL)	Relação ao padrão
1	0 (controle negativo)	Somente <i>assay diluent</i>
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312,5	1:16
7	625	1:8

8	1 250	1:4
9	2 500	1:2
10	5 000	<i>Top standard</i>

Fonte: Adaptada e traduzida de Biosciences (2008).

Para a adição das *beads* de captura, adicionou-se 10 µL de cada *bead* em cada tubo a ser analisado (*Mixed capture beads*). Após esta mistura, 50 µL desta solução foram adicionados a cada tubo para realização do teste, (amostras e pontos da curva padrão), juntamente com 50 µL de *Human inflammatory cytokine detection reagent* (fornecido com o kit). Os tubos foram incubados por 3 h em temperatura ambiente, protegidos da luz. Após este tempo, 1 mL de *wash buffer*, (fornecido com o kit), foi adicionado em cada tubo, seguido de centrifugação (200 xg por 5 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Finalmente, adicionou-se 200 µL de *wash buffer* em cada tubo para realização das leituras. A medição foi realizada no Citômetro de fluxo BD FACS Aria Fusion II (BD Biosciences, San José, CA, EUA), registrando 5 000 eventos por amostra, dentro do *Gate*. Os dados foram registrados utilizando o software BD FACSDiva V8.0.1 (BD Biosciences, San José, CA, EUA). Os dados foram analisados pelo software BD FCAP Array V3.0 (BD Biosciences, San José, CA, EUA). O ensaio foi realizado em duplicata, em três ocasiões distintas (n = 6).

2.7 Ensaio de Marcação de Receptores de Superfície Celular para CD86 e CD163 por Microscopia de Fluorescência Confocal (CLSM)

Após 24 h de estímulo das células THP-1 naive com secretomas dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, as células THP-1 foram marcadas com anticorpos receptores de superfície celular, Violeta Brilhante (BV) 610 anti-CD86 (1:400) BD-Bioscience (BD-Bioscience; Franklin Lakes, NJ, EUA) ou Flúor Ficoeritrina-Cianina (PE-CF) 594 anti-CD163 (1:200) BD-Bioscience (BD-Bioscience; Franklin Lakes, NJ, EUA), em um volume final de 1 mL, em amostras separadas. As células foram incubadas por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas uma vez em PBS 1X e visualizadas em CLSM LSM 800 Carl Zeiss, utilizando placas para Confocal SPL de 35 x 10 mm. Para um controle positivo, as células THP-1 foram diferenciadas por 48 h com 100 ng/mL de forbol12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos, Cód. P1585). Para a configuração do Microscópio Confocal, as células controle, não estimuladas, mantidas apenas em meio RPMI-1640, foram marcadas com anti-CD86 ou anti-CD163, conforme descrito acima. Para o anti-CD86 BV 610, o sinal de fluorescência de fundo das células controle foi configurado para 800 V (sem detecção de sinal

de fluorescência inespecífico), utilizando uma fonte de laser de 405 nm (15%) e um filtro de emissão de detecção de 610 nm. Para PE-CF 594 anti-CD163, o sinal de fluorescência de fundo foi configurado para 800 V (sem detecção de sinal de fluorescência inespecífico), utilizando uma fonte de laser de 561 nm (13%) e um filtro de emissão de detecção de 610 nm. As imagens foram obtidas em objetiva a óleo EC Plan-Neofluor 40x/1,30 DIC M27, de áreas randomizadas em 7x7 tiles. A quantificação da fluorescência foi realizada no software Zen Blue 2.3 Carl Zeiss, por meio do Valor Médio de Intensidade de Fluorescência. O ensaio foi realizado em três ocasiões distintas (n = 3).

2.8 Estímulo das células de queratinócitos displásicos de cavidade oral com meio condicionado das células THP-1

Os queratinócitos displásicos de cavidade oral, DOK, foram estimuladas usando o meio condicionado das células THP-1 (mcTHP-1), previamente estimuladas com o secretoma de culturas simples e mistas de *C. albicans* e *S. aureus*. Para isso, 250 000 células DOK foram cultivadas em cada poço de uma placa de 6 poços e incubadas por 16 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após as 16 h, o meio foi descartado e as células foram lavadas uma vez com PBS 1X. Depois da lavagem, 4 mL de mcTHP-1 foram adicionados nos respectivos poços. As células foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Neste ensaio, dois controles foram realizados. Primeiro Controle: células DOK estimuladas com mcTHP-1, não previamente incubadas com os secretomas (células THP-1 sem estímulo de biofilmes). Segundo controle: células DOK mantidas em condições padrão de cultura celular. As células DOK foram usadas para realizar os ensaios de RT-qPCR. A estimulação foi realizada em triplicata em três ocasiões distintas (n = 9).

2.9 Ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Valéria Valente e com o aluno de doutorado Mateus Priolo Grejo do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara-SP.

2.9.1 Extração de RNA com Trizol

Para a extração do ácido ribonucleico (RNA) das células, foi utilizado o protocolo de extração com Trizol, do Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp. Primeiramente, o meio de cultura foi retirado de cada um dos poços, seguindo-se da adição de

0,5 mL de reativo TRIzol® (Thermo Scientific, Eugene, OR, EUA, Cód. 15596026). Cada poço foi homogeneizado com ajuda de uma pipeta por 5 min a temperatura ambiente. Os poços, em duplicata, foram ressuspensos no mesmo volume de TRIzol. O volume total foi transferido para tubos de 1,5 mL. Após os 5 min, foram adicionados 100 µL de clorofórmio, em cada tubo, com agitação vigorosa por 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12 000 xg por 15 min a 4 °C. O RNA na fase aquosa foi coletado com muito cuidado para não perturbar a interfase lipídica nem a fase orgânica e, posteriormente, foi transferido para um novo tubo. Para a precipitação do RNA, adicionou-se 250 µL de isopropanol à fase aquosa coletada e incubou-se por 10 min a 4 °C. Após os 10 min, centrifugou-se a 12 000 xg por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando no tubo apenas o pellet de RNA. O pellet de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol gelado 75 % (v/v) (feito com água tratada com pirocarbonato de dietila, DEPC de *Diethyl pyrocarbonate*). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco até total evaporação do etanol. Após a secagem, o pellet de RNA foi ressuspendido em 20-50 µL (dependendo do tamanho do pellet) em água DEPC. As amostras de RNA foram aliquotadas em 5 µL e estocadas para posterior quantificação do rendimento de RNA no equipamento NanoDrop®. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80 °C até a síntese de cDNA.

2.9.2 Síntese de cDNA

A síntese do Ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada com o kit *cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Scientific; Eugene, OR, EUA, Cód. 4368814). O volume de reagente do mix para cada amostra foi: 1 µL de tampão 10X (incluído no kit), 1 µL de RNase OUT (Thermo Scientific; Eugene, OR, EUA, Cód. 10777-019), 1 µL de DNase I (Thermo Scientific; Eugene, OR, EUA, Cód. AM2222), 2 µL de água DEPC. Foram adicionados 5 µL desse mix em cada tubo da amostra e incubados a temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, adicionou-se 1 µL de *stop solution*, (incluído no kit), em cada tubo, e incubou-se a 65 °C por 10 min. Após esse tempo, foi realizada uma incubação em banho de gelo por 2 min. Para o processo de transcrição reversa foi realizado o preparo de um mix reacional para cada amostra: 2 µL de 10X RT buffer, 0,8 µL de dNTP's, 2 µL de random primers, 0,5 µL de oligo dT, 1 µL de transcriptase reversa, 3,7 µL de água DEPC. Os 10 µL de mix reacional foram adicionados aos 11 µL de RNA tratado com DNase. Para a síntese de cDNA foram realizadas as seguintes etapas de incubação:

- 25 °C por 10 min;

- 37 °C por 2 h;
- 85 °C por 5 min;

Para o armazenamento, o cDNA foi diluído em 180 µL de água DEPC e estocados a -20 °C até a realização da PCR.

2.9.3 PCR em tempo real quantitativa – qPCR

Para a realização das RT-qPCR foi utilizado o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, EUA, Cód. 4367659). As concentrações dos primers foram obtidas de trabalhos prévios do grupo (Amaya Arbeláez; De Paula E Silva; Navegante; Valente *et al.*, 2021). O gene endógeno usado para os ensaios foi o *HPRT* (Valente; Teixeira; Neder; Okamoto *et al.*, 2009). Os primers usados estão resumidos no quadro 3:

Quadro 3 - Sequência de Oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Gene	Primer Forward (5' – 3') (F)	Primer Reverse (5' – 3') (R)
<i>HPRT</i>	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	GAGCACACAGAGGGCTACAA
<i>TP53</i>	GCTGAATGAGGCCTTGGAAC	TTATGGCGGGAGGTAGACTG
<i>HRAS</i>	GGCTTCCTGTGTGTGTTTGC	AGCCAGGTCACACTTGTTCC
<i>AKT</i>	TCGGGCTCACCCAGTGACAA	TTGCCCAGCAGCTTCAGGTA
<i>STAT3</i>	ACCATTGACCTGCCGATGTC	CCGAGGTCAACTCCATGTCA
<i>BCL2</i>	CAACATCGCCCTGTGGATGA	GCCGTACAGTTCCACAAAGG
<i>BRAF</i>	AGGCGTCCTTAGCAGAGACT	AGGGCTGTGGAATTGGAATGG
<i>mTOR</i>	CCAGCTCAGATGCCAATGAG	GGAGGAGGTTCCGAAGATAG
<i>PI3KCA</i>	TAGGCAAGTCGAGGCAATGG	GGTCGCCTCATTTGCTCAAC

Fonte: A autoria é própria e Amaya Arbeláez; De Paula E Silva; Navegante; Valente *et al.* (2021).

2.9.4 Validação do gene endógeno

Primeiramente foi realizada uma validação do gene endógeno *HPRT*. Para isto o cDNA foi diluído 1:100. A reação de qPCR foi calculada para um volume final de 14 µL em placas de PCR de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 3 µL de primers (F+R) e 6 µL de SYBRGreen. Em seguida, foram adicionados 5 µL de cDNA (1:100), exceto no branco. As placas foram seladas e centrifugadas. A RT-qPCR foi realizada em 40 ciclos com uma desnaturação a 95 °C por 15 seg, e o anelamento e a extensão a 60 °C por 1 min, no equipamento *Gene Amp® 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems®, CA, EUA).

2.9.5 Quantificação da expressão gênica

Nas placas próprias para PCR, em cada poço, foram adicionados 3 µL de primers (F+R) e 6 µL de SYBRGreen. Em seguida, foram adicionados 5 µL de cDNA (1:100), exceto no branco. Os genes quantificados foram: *TP53*, *HRAS*, *AKT*, *STAT3*, *BCL2*, *BRAF*, *mTOR* e *PI3KCA*. A descrição dos genes está no Quadro 4. As concentrações dos primers foram validadas de acordo com Amaya Arbeláez; De Paula E Silva; Navegante; Valente *et al.* (2021). Para a padronização, o gene endógeno *HPRT* foi utilizado como controle interno (*housekeeping*). O ensaio foi realizado em triplicata, em três ocasiões independentes (n = 9). O nível de expressão gênica (fold change) foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Quadro 4 - Descrição dos genes incluídos no estudo.

Gene	Descrição	Oncogene ou Supressor tumoral	Referência
<i>TP53</i>	É um fator de transcrição, controlador mestre do ciclo celular. A perda da função de p53 culmina em tumorigenese, invasão, metástase, resistência aos tratamentos anti-tumorais, reprogramação metabólica, evasão imune e instabilidade genômica.	Supressor tumoral	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
<i>HRAS</i>	É uma GTPase associada à membrana. É um mediador de processos pró-proliferativos e anti-apoptóticos, especialmente nas rotas das MAPK e de PI3K. Mutações do tipo <i>gain of function</i> culminam em aumento da proliferação celular e angiogênese, independentemente da etapa do ciclo celular.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)

<i>AKT</i>	É uma quinase de serina/treonina. Seu principal efeito está relacionado com a via de PI3K. AKT pode ativar vários substratos como GSK3, FOXO e mTORC1, os quais estão relacionados com a sobrevivência, a proliferação e o metabolismo celular.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
<i>STAT3</i>	É um fator de transcrição ativado por citocinas e fatores de crescimento. A superexpressão resulta em aumento da sobrevivência celular, modulação do microambiente tumoral e invasão.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
<i>BCL2</i>	Gene regulador da apoptose, parte da família das proteínas Bcl2, atuando na via anti-apoptótica, permitindo a sobrevivência e o aumento da proliferação celular.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
<i>BRAF</i>	Gene regulador da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Quando superexpresso desencadeia o crescimento tumoral.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
<i>mTOR</i>	É uma serina/treonina quinase que coordena o crescimento celular, a síntese de proteínas e a sinalização metabólica. mTOR regula o citoesqueleto de actina, a progressão do ciclo celular e a sobrevivência celular.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)

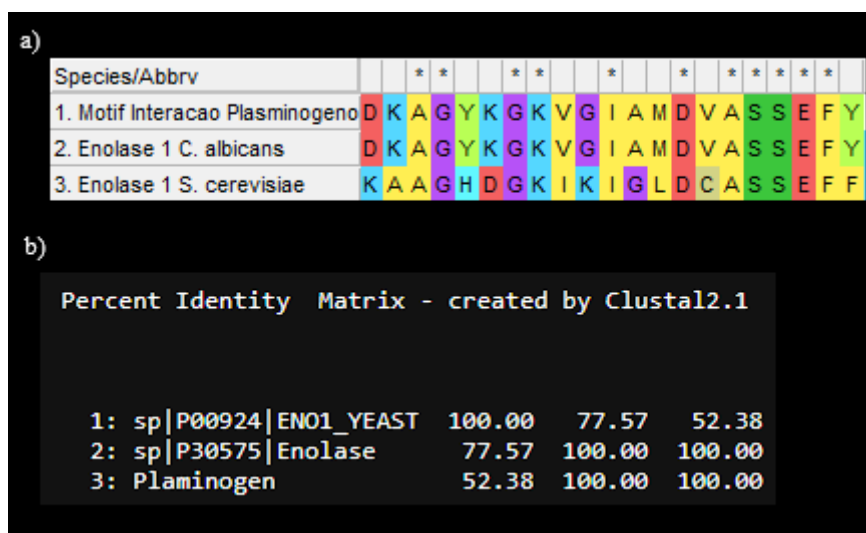
<i>PI3KCA</i>	É a parte catalítica da proteína PI3K. A PI3K é uma proteína que modifica o fosfatidilinositol – 4,5 – bifosfato em fosfatidilinositol – 3,4,5 – trifosfato. Esta modificação ativa cascatas intracelulares relacionadas com sobrevivência, proliferação e crescimento celular.	Oncogene	(Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra <i>et al.</i> , 2017; Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra <i>et al.</i> , 2024)
---------------	---	----------	--

Fonte: Aatoria Prória e Chakravarty; Gao; Phillips; Kundra *et al.* (2017); Suehnholz; Nissan; Zhang; Kundra *et al.* (2024).

2.10 Transformação da cepa Cai4 de *Candida albicans* pela técnica de CRISPR-Cas9

Esta etapa de protocolos, baseados em Tecnologia de DNA recombinante, foi realizada como parte do doutorado sanduíche, na University of Tennessee Health Science Center, com a supervisão do Prof. Brian M. Peters, no College of Pharmacy, Memphis, TN, Estados Unidos. O processo de transformação gênica foi realizado seguindo o protocolo detalhado por Liu; Vogel; Miao; Carnahan *et al.* (2022). A transformação gênica realizada teve como objetivo principal obter um transformante de *C. albicans* que apresentasse uma proteína funcional, Enolp, sem a sequência de união ao plasminogênio humano. A sequência de ligação ao plasminogênio, DKAGYKGKVGIAMDVASSEFY, foi obtida de acordo com o trabalho de Satala; Satala; Karkowska-Kuleta; Bukowski *et al.* (2020). O intuito desta transformação gênica foi substituir a sequência de união, com a sequência homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*, perdendo assim a região de ligação ao plasminogênio humano, mas mantendo a capacidade glicolítica, essencial para a sobrevivência das células fúngicas. Com isto, este mutante poderá ser utilizado em estudos futuros para entender a patogênese de *C. albicans* no que tange as cascatas de sinalização do domínio do plasminogênio (Figura 5).

Figura 5 - Alinhamento das sequências da Enolp de *C. albicans*, *S. cerevisiae* e a sequência de ligação ao plasminogênio.



Fonte: Autoria Própria e Madeira; Madhusoodanan; Lee; Eusebi *et al.* (2024); Tamura; Stecher e Kumar (2021)
a) Alinhamento foi realizado com o programa MEGAX mediante a alinhamento com ClustalW (Tamura; Stecher; Kumar, 2021). b) Matriz da porcentagem da identidade calculado com o algoritmo Clustal 2.1 na plataforma do EMBL's European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/>) (Madeira; Madhusoodanan; Lee; Eusebi *et al.*, 2024).

Para a transformação foram definidas duas variantes: A *Ca*, a qual tem uma deleção da *ENO1* cromossômica, em que foi adicionada uma cópia da *ENO1 wild type* sem nenhuma modificação, e a variante *Sc*, a qual também apresenta a deleção da *ENO1* cromossômica, mas com uma cópia da *ENO1* com a sequência do *motif* do plasminogênio substituído pela sequência homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe esclarecer que a deleção completa deste gene impossibilitaria a sobrevivência do mutante. A transformação foi realizada na cepa Cai4 de *C. albicans*, devido às padronizações prévias do Laboratório do Prof. Peters, além do fato desta cepa ser *ura3Δ/Δ* (precisa de uracila no meio de cultura), o que permite um processo de seleção através de plaqueamento em meios de cultivo específicos. Os primers utilizados, assim como o RNA guia (gRNA) e o DNA sintético, estão resumidos no Quadro 5 e 6.

Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados

Primer	Sequência (5' – 3')
ENO1DETF	GTGCCAATGCTATCTTGGGTGT
ENO1CalbDETR	CAGATGAAGCAACATCCATGGCAAT
ENO1ScervDETR	GGAGGCACAATCTAACCCAATCT
PrENO1INTF	GTATCTTTAGTAGACATGATTGTGCAATACCGT
PrENO1INTR	GACAATCATGGGCCGAAGGAGA

termENO1INTF	CCCATCTTTACTCTTAATCACTGAGCTGCA
termENO1INTR	CGTCATGGAACGAGTTAATGCGT
ENO1CC9KO-F	AAATGTCTCTTCTAGTTTCTTAGTGGTGTGCGCATAATA CACAATGGGTTTTCCAGTCACGACGT
ENO1CC9KO-R	ATTAATAAAATGTGCAATTAAAAAGAATCAACGCGTC TAAGTTAGGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
SynthGeneF	CGCAGTTACGGATCAGTCAC
SynthGeneR	GAATCATCGTAAGCTATCGTAGCG
LUXINTDETR	CAGTAGTACTTGTGTGTGTATCG

Fonte: Autoria Própria.

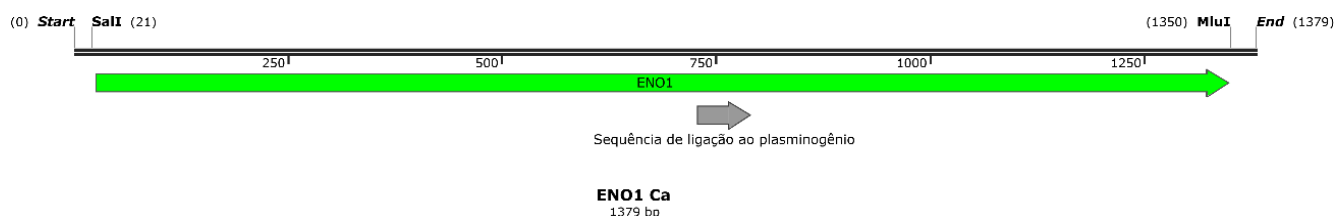
Quadro 6 - Sequência do gRNA utilizados no estudo.

gRNA	Sequência (5' – 3')
crENO1up	CGCTCAACAATCCACATTCC
crENO1down	TCTCCGTTTCATCTCTTCACC

Fonte: Autoria Própria.

As sequências de DNA sintético utilizadas no estudo encontram-se no apêndice A e B, e os mapas estão resumidos na figura 6 e 7.

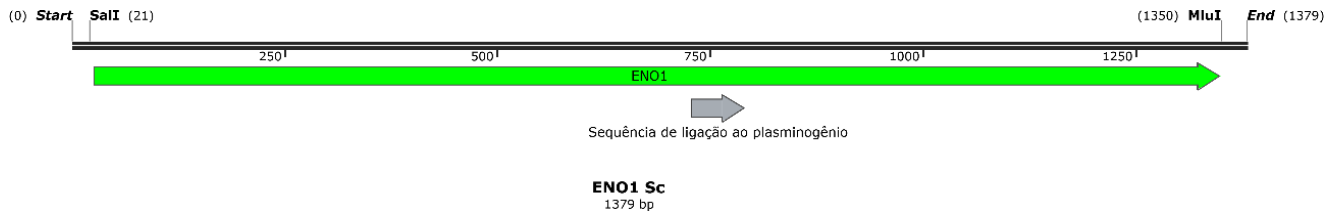
Figura 6 - Mapa da sequência do DNA sintético de *ENO1 Ca*



Fonte: SnapGene Software (www.snapgene.com).

Mapa da sequência do DNA sintético utilizado para a variante *ENO1 Ca*, apresenta as regiões de corte das enzimas de restrição Sali e MluI. Tamanho de 1.379 bp.

Figura 7 - Mapa da sequência do DNA sintético de *ENO1 Sc*



Fonte: SnapGene Software (www.snapgene.com).

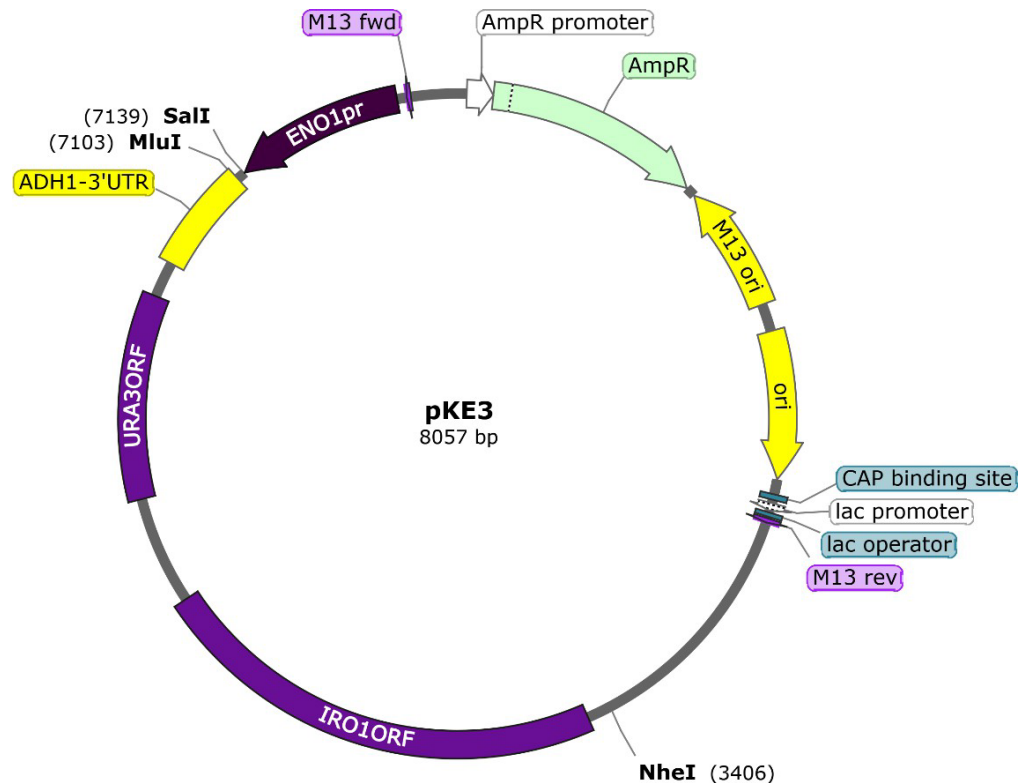
Mapa da sequência do DNA sintético utilizado para a variante *ENO1 Sc*, apresenta as regiões de corte das enzimas de restrição SalI e MluI. Tamanho de 1.379 bp.

Para a transformação gênica foram utilizados os plasmídeos pKE3 e pBSS2. As principais características do plasmídeo pKE3, (Figura 8), são:

- AmpR: Gene de resistência à ampicilina: permite que as bactérias transformadas sejam selecionadas pela presença da ampicilina no meio de cultivo;
- Eno1pr: Promotor *wild type* do gene *ENO1*;
- URA3ORF: Gene *URA3*, um gene de seleção para leveduras, permitindo o crescimento da cepa em meio sem uracila;
- ADH1-3'UTR: Terminador do gene *ADH1*.

O plasmídeo pKE3 foi replicado em *Escherichia coli* DH5 α .

Figura 8 - Mapa do plasmídeo pKE3 utilizado para a transformação de *C. albicans*.



Fonte: SnapGene Software (www.snapgene.com).

O plasmídeo com tamanho de 8.057 bp, com genes de resistência a ampicilina (*AmpR*) e com o gene da enzima orotidina-5'- fosfato descarboxilase, que permite crescer em ausência de uracila (*URA3*). Adicionalmente, o promotor *wild type* do gene *ENO1* e o terminador *ADH1*.

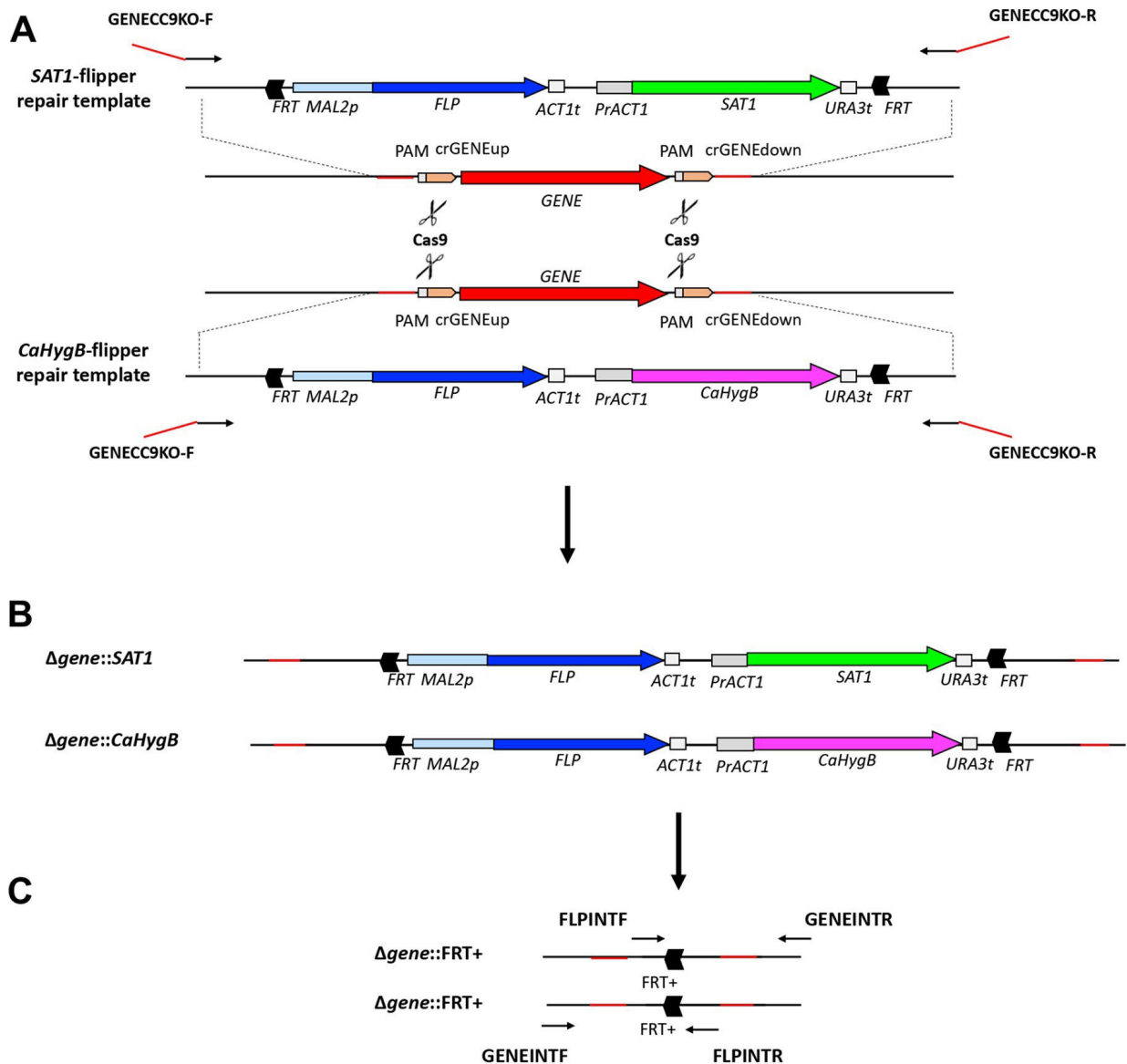
O plasmídeo pBSS2 foi utilizado para a eliminação do gene *ENO1* cromossômico (*wild type*). Este plasmídeo possui várias características importantes que merecem ser destacadas:

- *SAT1*: Gene de resistência à nourseotricina (NAT);
- *CaHygB*: Gene de resistência à nourseotricina (HygB); *cassette* otimizado para a resistência, em *C. albicans*, à higromicina;
- *FLP*: Gene que codifica a proteína Flp Recombinasse (FLP);
- FRT (*Flippase Recognition Target*): regiões reconhecidas pela FLP;

Os genes *SAT1* e *CaHygB* foram utilizados como gBlock do gene cromossômico *ENO1*. O plasmídeo pBSS2 permite a remoção do gene mediante a atividade da enzima FLP. A deleção mediante a enzima FLP ocorre mediante estimulação no meio condicionado com maltose (YPM, de *Yeast extract*, *Peptone*, *Maltose*), que permite a eliminação do gene presente entre as regiões FRT, mediante a junção dos sítios FRT. Devido a isto, os genes *SAT1* e *HygB* estão colocados entre duas regiões FRT. Para o reconhecimento da região cromossômica do gene *ENO1* e para a quebra da dupla fita, foi utilizado a enzima Cas9 do sistema CRISP-Cas, assim

como um gRNA de endereçamento. O processo de eliminação, integração do cassette e excisão dos genes *ENO1*, *SAT1* e *CaHygB* está resumido na figura 9.

Figura 9 - Processo de eliminação, integração do cassette e excisão dos genes *ENO1*, *SAT1* e *CaHygB* pela enzima Flip recombinase.



Fonte: Tomada de Liu; Vogel; Miao; Carnahan *et al.* (2022).

Os genes estão presentes no plasmídeo pBSS2, o qual foi modificado para inclusão dos genes *SAT1* e *CaHygB*.

Para o endereçamento do *cassette*, é necessária sua amplificação com primers que permitam a inserção das sequências homólogas ao corte realizado pela enzima Cas9. Para isto, o *cassette* linearizado foi amplificado com os primers ENO1CC9KO-F e ENO1CC9KO-R. Em A) pode-se observar os *cassettes* *SAT1* e *CaHygB*, amplificados na região a ser cortada pela enzima Cas9. Em B) pode-se observar a substituição, no cromossoma, das duas cópias de *ENO1* pelos genes *SAT1* e *CaHygB*. Em C) após a indução do sistema flipper, pode-se observar como os genes *SAT1* e *CaHygB* foram excisados do cromossoma mediante a "junção" dos sítios FRT.

Todo o protocolo seguido está descrito no trabalho de Liu; Vogel; Miao; Carnahan *et al.* (2022) e brevemente, resumem-se nas seguintes etapas:

2.10.1 Protocolo de clonagem e transformação em *E. coli*

2.10.1.1 Preparação do vetor

A cepa de *E. coli* DH5 α foi retirada do freezer -80 °C e semeada em ágar Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (100 μ g/mL). A placa foi colocada a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, uma colônia foi coletada e transferida para um tubo de 15 mL contendo 1,5 mL de LB + ampicilina. A cultura foi incubada a 37 °C com agitação (200 rpm) *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a extração do plasmídeo mediante o uso do kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. K0502). Na etapa final, o plasmídeo foi eluído em 30 μ L de dH₂O.

2.10.1.2 Preparação do inserto

O inserto foi o DNA sintético: ENO1 *Ca* e ENO1 *Sc*. Para a primeira amplificação, o Platinum™ SuperFi II PCR Master Mixes (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. 12368010) foi utilizado, seguindo-se os passos do Quadro 7.

Quadro 7 - Protocolo para a preparação da PCR com a polimerase SuperFi II.

Componente	Quantidade (μ L)
2X Superfi II Master Mix	25
SynthGeneF (10 μ M)	2,5
SynthGeneRv2 (10 μ M)	2,5
Molde (DNA Sintético para as variantes <i>Ca</i> e <i>Sc</i>)	3
dH ₂ O	17
Volume Total	50

Fonte: Autoria Própria.

No caso da variante *Ca* foram feitas duas amplificações, sendo a segunda amplificação realizada com a enzima Phusion™ Hot Start II DNA Polymerases (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. F549S). A reação foi montada seguindo-se os passos do Quadro 8.

Quadro 8 - Protocolo para preparo do mix de PCR utilizado para a enzima Phusion.

Componente	Quantidade (μ L)
Buffer 5X Phusion	10
MgSO ₄ 50 mM	2

dNTP (10 mM)	1,5
SynthGeneF (10 μ M)	2,5
SynthGeneRv2 (10 μ M)	2,5
Molde (DNA Sintético para a variante Ca)	1
Phusion Taq	0,5
dH ₂ O	30
Volume Total	50

Fonte: Autoria Própria.

A etapa de purificação do produto de PCR foi realizada mediante o uso do kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. K0701). O intuito desta etapa foi remover quaisquer nucleotídeos livres e outros componentes inespecíficos da reação. Por fim, o DNA foi eluído em 30 μ L de dH₂O.

Com o DNA purificado, foi realizada a quantificação e a medição da qualidade das amostras, utilizando-se o equipamento NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo-Scientific). Em seguida, realizou-se a etapa de digestão enzimática, através do uso da enzima de restrição SalI (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. FD0644) e MluI (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. FD0564). A preparação foi realizada conforme descrito no Quadro 9:

Quadro 9 - Preparação realizada para a digestão do plasmídeo e do inserto

Inserto		Plasmídeo	
Reagente	Quantidade (μ L)	Reagente	Quantidade (μ L)
10X Fast Digestion Buffer	2	10X Fast Digestion Buffer	2
Insert (Synthetic DNA)	5	Plasmídeo	3,8
SalI	1	SalI	1
MluI	1	MluI	1
dH ₂ O	11	dH ₂ O	12,2
Total volume	20	Total volume	20

Fonte: Autoria própria.

A digestão foi realizada a 37 °C por 3 h e 10 min a 65 °C para inativação da enzima. Após a digestão, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1% p/v). Para isto, 5 μ L das

amostras com 1 μL de 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. R1161) foram aplicados no gel, juntamente com 3 μL de GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. SM0313). A eletroforese foi realizada em buffer Tris Acetato EDTA 10X (TAE) a 120 V por 30 min. Todas as eletroforeses foram realizadas seguindo-se o mesmo protocolo.

2.10.1.3 Preparação do vetor e do inserto para ligação

Para a ligação do inserto ao plasmídeo foi calculado as proporções corretas para a preparação de uma reação 3:1 e outra 5:1, os cálculos foram feitos com ajuda da calculadora NEBio (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). A ligação foi realizada com a enzima ligase T4 (Thermo Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. EL0011). Para a reação vetor:inserto 3:1 foram utilizadas as seguintes quantidades (Quadro 10):

Quadro 10 - Protocolo de ligação do plasmídeo (vetor) e o inserto na proporção 3:1.

Reagente	Quantidade (μL)
Vetor digerido	2
Produto de PCR digerido	5,2
Buffer de ligase 10X T4	2
Ligase T4	0,2
dH ₂ O	10,6
Volume Total	20

Fonte: Autoria Própria.

Para a reação vetor:inserto 5:1 os volumes foram utilizados de acordo com o Quadro 11.

Quadro 11 - Quantidades utilizadas para a ligação do plasmídeo (vetor) e o inserto na proporção 5:1.

Reagente	Quantidade (μL)
Vetor digerido	2
Produto de PCR digerido	8,6
Buffer de ligase 10X T4	2
Ligase T4	0,2
dH ₂ O	7,2
Volume Total	20

Fonte: Autoria própria.

Para o processo de ligação, os tubos com as reações foram incubados *overnight* a 4 °C. Após a ligação, foi feita a transformação em *E. coli* DH5 α para a replicação do plasmídeo.

2.10.2 Transformação de *E. coli*

Para a transformação foram utilizadas *E. coli* competentes. Primeiramente, as células competentes foram descongeladas no gelo. O meio LB foi pré-aquecido a 42 °C e 45 μ L deste meio foram adicionados a um tubo de 15 mL. Na sequência, 5 μ L do produto de ligação foram adicionados nesta mistura. Incluiu-se um controle negativo ao qual foram adicionados 5 μ L de dH₂O. As soluções foram homogeneizadas delicadamente e incubadas no gelo por 10 min. A seguir realizou-se o choque térmico nas amostras a 42 °C por 30 s. Após os 30 s, os tubos foram incubados no gelo por mais 2 min, com a adição de 0,5 mL do caldo LB pré-aquecido em cada tubo. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h com agitação a 240 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas brevemente (4 000 x g por 1 min) e, em seguida, ~ 250 μ L do meio foram removidos. O pellet foi ressuspensionado no volume restante de meio LB e cultivado em uma placa de LB+Amp. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

2.10.3 Checagem da transformação por PCR e preparo para transformação gênica de *C. albicans*

Para a realização da PCR, foi selecionada uma (01) colônia de *E. coli* transformada por cada placa. A colônia foi transferida para um tubo de 15 mL contendo 1,5 mL de LB+Amp. Os tubos foram incubados *overnight* a 37 °C e 200 rpm. No dia seguinte, o plasmídeo foi extraído como já descrito anteriormente, e o produto foi digerido para confirmação da ligação. Para a digestão, foram utilizados os reagentes descritos no Quadro 12.

Quadro 12 - Reagentes usados para a digestão e ligação do vetor.

Reagentes	Quantidades (μ L)
10X Fast Digestion Buffer	2
Final vector	3
SalI	1
MluI	1
dH ₂ O	13
Total volume	20

Fonte: Autoria Própria.

Após a digestão, foi realizada uma eletroforese para checagem do processo de transformação. Para as amostras positivas, o plasmídeo foi enviado para sequenciamento na empresa Plasmidsaurus (<https://plasmidsaurus.com/>). Em seguida, as variantes positivas para a sequência do gene (*ENO1*) foram linearizadas com a enzima NheI (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. FD0974), para então utilização no processo final de transformação da cepa de interesse (*C. albicans*).

2.10.4 Protocolo de Transformação de Levedura (*C. albicans*) com Acetato de Lítio

Primeiramente foram preparadas as seguintes soluções (Quadro 13):

Quadro 13 - Soluções preparadas para a transformação de *C. albicans*.

Solução	Receita
Buffer Tris EDTA (TE) com acetato de lítio (LiAc) 1X (TELiAc)	100 mM LiAc, 1X TE
40% (v/v) polietilenoglicol (PEG)	100 mM LiAc, 1X TE, 40% PEG
1X TE	0,1 mL de 10X TE, 0,9 mL de dH ₂ O

Fonte: Autoria Própria.

Conforme já dito, esta transformação foi realizada com a cepa Cai4 de *C. albicans*. A cepa foi reativada em meio YPD suplementado com uridina (50 mM) e incubada a 30 °C *overnight*. Após a incubação, uma colônia foi coletada e transferida para 5 mL de YPD + uridina e incubada novamente *overnight* a 30°C. No dia seguinte, a cultura foi diluída 1:200 em novo meio YPD + uridina e foi cultivada por mais 6 h. Após as 6 h, as células foram coletadas mediante centrifugação a 3 000 rpm por 3 min. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de dH₂O estéril. A cultura, ressuscitada, foi transferida para um tubo de 1,5 mL e as células foram centrifugadas a 13 000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão 1X TELiAc, misturando-se suavemente as células com a pipeta. Após a homogeneização, as células foram centrifugadas por 30 s a 8 000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado novamente em tampão 1X TELiAc. Para a transformação foram adicionados 50 µL de suspensão celular em um tubo eppendorf, contendo 50 µL de DNA e 5 µL de DNA fragmentado de espermatozoides de salmão (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. AM9680). A solução foi homogeneizada. Em seguida foram adicionados 300 µL da solução de PEG a 40%, sob agitação suave. Os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C por 30 min. Após os 30 min, foi realizado um choque

térmico em banho-maria a 42 °C por 15 min. As células foram coletadas mediante centrifugação a 7 000 rpm por 30 s. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de tampão 1X TE. O pellet foi plaqueado em ágar *Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos, suplementado com sulfato de amônio. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias. Após os 2 dias, foram selecionadas 8 colônias, re-cultivadas em novas placas de YNB suplementado com sulfato de amônio. Para a confirmação da integração do gene da ENO1 no cromossomo, uma PCR foi realizada com o MasterMix DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo-Scientific, San Diego, Ca, EUA, Cód. K1081), seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito no quadro 14.

Quadro 14 - Preparação das reações com o Master Mix da DreamTaq.

Reagente	Quantidade
2X Dreamtaq Master Mix	12,5 µL
Primer F	1,25 µL
Primer R	1,25 µL
DNA	1 µL
dH ₂ O	9 µL
Volume Total	25 µL

Fonte: Autoria Própria.

Para esta PCR, três pares de primers foram utilizados: para *Ca*; ENO1DETF + ADH13SEQR, para *Sc*; ENO1DETF + ENO1SCERVDETR, e para ambas amostras; LUXINTDETF + LUXINTDETR.

2.10.5 Deleção de gene homozigótico direcionado em *C. albicans* utilizando-se CRISPR com flipper SAT1/HygR

Para a montagem da reação de digestão por Cas9, foram utilizados os seguintes reagentes: Alt-R™ CRISPR-Cas9 tracrRNA (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA, Cód. 1072532), Nuclease Free Duplex Buffer incluído no anterior e Alt-R™ S.p. Cas9 Nuclease 3NLS (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA, Cód. 1074181). Para a montagem da reação, o crRNA e o tracrRNA foram ressuspensionados nas concentrações de estoque de 100 µM em Nuclease-Free Duplex Buffer (ou Nuclease-Free IDTE Buffer). Primeiramente foram preparados os moldes de reparo, para isso o plasmídeo linearizado pBSS2 com *SAT1* e *CaHygB*

foi amplificado utilizando-se os primers ENO1CC9KO-F/R. A PCR foi realizada de acordo com o protocolo resumido no Quadro 15.

Quadro 15 - Reagentes utilizados para a PCR de amplificação do plasmídeo linearizado pBSS2.

Reagente	Quantidade (µL)
Molde: pBSS2/pHygR diluído 1:100	1
ECE1CC9KO-F	2,5
ECE1CC9KO-R	2,5
Phusion™ DNA Polymerase	0,5
5X Phusion™ HF Buffer	10
10 mM dNTPs	1,5
50 mM MgSO ₄	2
dH ₂ O	30
Volume Total	50

Fonte: Autoria Própria.

2.10.6 Transformação de *Candida* spp. mediada por CRISPR Cas9 por Eletroporação

Primeiramente, as cepas de *C. albicans* transformadas, obtidas na secção 10.4, foram inoculadas em 1 mL de YPD e incubadas a 30 °C overnight em agitação (200 rpm). No dia seguinte, 5 µL da cultura foram diluídos em 2 mL de YPD e incubada por mais 6 h nas mesmas condições. Após as 6 h, 50 µL da cultura foram adicionados a um tubo de 50 mL com 25 mL de YPD e incubado a 30 °C overnight. No dia seguinte, as células foram centrifugadas a 4 000 rpm por 5 min. O pellet foi ressuscitado em 8 mL de dH₂O, 1 mL de tampão 10X TE (pH 7,5) e 1 mL de tampão 1 M LiAc (pH 7,5). Os tubos foram incubados a 30 °C por 60 min sob agitação (220 rpm). Após a incubação das células por 60 min, 250 µL de Ditioneitol (DTT, 1 M) foram adicionados e os tubos foram agitados a 200 rpm por 30 min a 30 °C. Após os 30 min, as células foram diluídas em 40 mL de dH₂O gelada e centrifugadas a 4 000 rpm por 5 min. Passados os 5 min, o sobrenadante foi descartado e 25 mL de dH₂O gelada foram adicionados. Os tubos foram centrifugados a 4 000 rpm por 5 min. Os pellets foram ressuscitados em 5 mL de sorbitol 1 M gelado e centrifugados a 4 000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células competentes foram mantidas em gelo. Nesta sequência foram formadas então as ribonucleoproteínas Cas9 (RNP). Primeiramente foram feitos os duplex de gRNA e trRNA. Para isto, utilizou-se em tubos; 1 µL de trRNA, 1 µL de gRNA e 23 µL de H₂O livre de nuclease. Os tubos foram então incubados a 95 °C por 5 min, resfriados no gelo e mantidos assim até o uso. Após a formação do duplex, foram adicionados 3,6 µL de cada

duplex de gRNA e 2 μ L da diluição 1:10 da proteína Cas9 em H₂O livre de nuclease. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 min. Para a transformação das células competentes de *C. albicans*, a solução foi realizada em cubetas âmbar para eletroporação. Para o controle foram adicionados 9,2 μ L de H₂O livre de nuclease com 1,5 μ g de DNA amplificado de pBSS2 e pHygR e 40 μ L de células competentes. Para as amostras, foram adicionados 40 μ L de células; 9,2 μ L de RNP e 10 μ L dos moldes de reparo (ambos de pHygR e pBSS2). A eletroporação foi realizada a 1,8 kV usando um único pulso. Após a eletroporação, as células foram diluídas imediatamente em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e foram transferidas para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 4 000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1 mL de YPD. Os tubos foram incubados a 30 °C por 6 h em agitação (200 rpm). Após as 6 h, as células foram centrifugadas a 4 000 rpm por 1 min, descartando-se o sobrenadante. O pellet contendo as células transformadas foi ressuspensado em 1 mL de tampão TE 1X. As células foram plaqueadas em YPD agar suplementado com 200 μ g/mL NAT e 600 μ g/mL HygB (YPD + NAT/HygB). Outro par de placas foi preparado semeando-se uma diluição de 1:10 de cada amostra e plaqueando-se em YPD + NAT/HygB. As placas foram incubadas a 30 °C e mantidas até observação do crescimento de colônias. As colônias que cresceram foram selecionadas e usadas a seguir.

2.10.7 Processo de excisão com ajuda da enzima flip recombinasse.

Primeiramente foram selecionadas 2 colônias de *C. albicans* obtidas do processo de seleção anteriormente descrito. Estas colônias foram então transferidas para um tubo contendo de 1,5 mL contendo o meio *Yeast Peptone Maltose* (YPM, 2% w/v maltose) e incubadas *overnight* para ativação enzimática. No dia seguinte, as células foram centrifugadas a 4 000 rpm por 1 min. O pellet foi lavado duas vezes com PBS e as células foram diluídas 1:20 em PBS e contadas em Citômetro de fluxo. Após a contagem, as células foram ajustadas na concentração de 2 000 células/mL. As células foram plaqueadas em ágar YPD suplementado com 25 μ g/mL NAT e 75 μ g/mL HygB. As placas foram incubadas por até 48 h e as colônias menores foram selecionadas. As colônias menores foram ressuspensas em 15 μ L de PBS. Em seguida, 5 μ L de cada cultura foram semeados em placas de YPD, YPD suplementado com 200 μ g/mL NAT e YPD suplementado com 600 μ g/mL HygB, para rastrear colônias sensíveis a NAT e HygB. As placas foram incubadas a 30 °C *overnight*. No dia seguinte foram selecionadas as colônias que cresceram somente nas placas de YPD sem antibiótico. Para confirmação da deleção do

gene *ENO1* cromossômico o DNA genômico foi extraído, e uma PCR foi realizada, utilizando-se os primers de interesse: ENO1DETF + termENO1INTR (confirmação da deleção do gene cromossômico), PrENO1INTF + FlipINTR (Confirmação da presença das variantes *Ca* e *Sc* cromossomal na região do promotor de *ENO1*) e FlipINTF + termENO1INTR (Confirmação da presença das variantes *Ca* e *Sc* cromossomal na região terminal da *ENO1*). A PCR foi realizada com o MasterMix Dreamtaq seguindo-se as recomendações do fabricante, de acordo com os volumes resumidos no quadro 16.

Quadro 16 - Preparação dos reagentes da PCR para confirmação da deleção de *ENO1* cromossomal.

Reagente	Quantidade (µL)
2X Dreamtaq Master Mix	12,5
Primer F	1,25
Primer R	1,25
DNA	1
dH ₂ O	9
Volume Total	25

Fonte: Autoria Própria.

Como controle da PCR foi utilizado a cepa parental de *C. albicans* utilizada na transformação. Após a confirmação da deleção do *ENO1* cromossomal e da presença das variantes *Ca* e *Sc*, as colônias foram crescidas *overnight* a 30 °C em 1,5 mL de YPD. No dia seguinte as variantes foram congeladas com glicerol 25% e armazenadas a -80 °C para realização de futuros projetos.

2.11 Análise Estatística

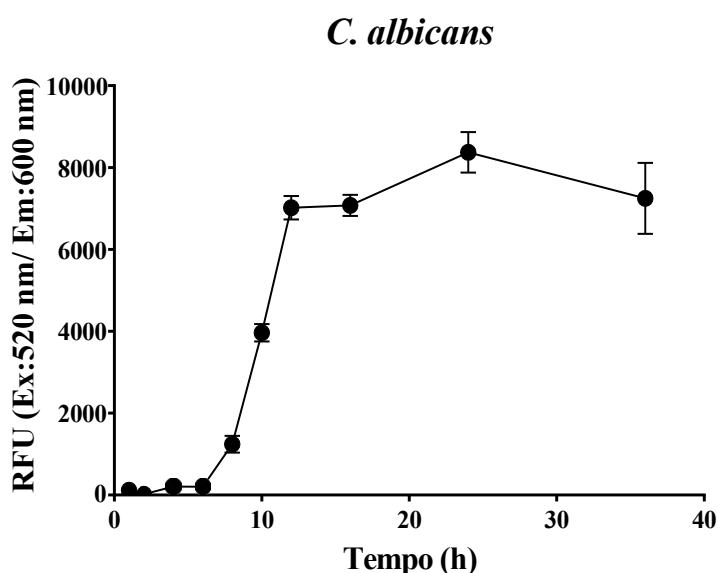
Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (teste de Shapiro-Wilk). As análises estatísticas dos ensaios UFC/mL, CLSM, Bradford e alamarBlue™ foram realizadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA One-way), com post hoc teste de Tukey. Na comparação de UFC/mL dos biofilmes simples e mistos foram realizadas análises de ANOVA two-way com post hoc teste de Tukey. Para os ensaios de CBA e RT-qPCR, a ANOVA One-way foi aplicada seguida do post hoc teste de Dunnett. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Padronização da curva de crescimento dos biofilmes de 36 h de *C. albicans*, *S. aureus* e misto

A padronização da curva de crescimento foi realizada mediante a realização do ensaio de alamarBlue™. No caso de *C. albicans* foi observado que a partir das 12 h, atinge-se a fase estacionária de crescimento do biofilme, caracterizada pela formação de um comportamento de crescimento em platô, que foi mantido até as 36 h (Figura 10).

Figura 10 - Curva de crescimento de *Candida albicans*.

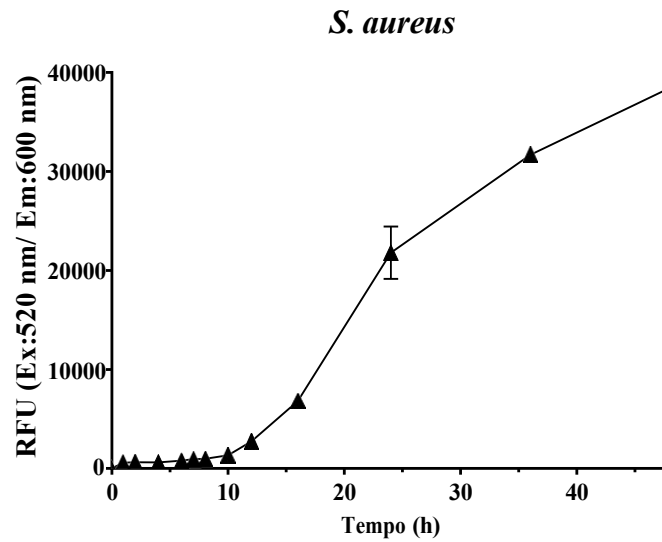


Fonte: Autoria própria.

Curva de crescimento por alamarBlue™. Os biofilmes foram mantidos em cultura durante 36 h (biofilme maduro), o tempo zero foi definido após a fase de adesão do biofilme (90 min).

No caso de *S. aureus*, observamos como o desenvolvimento da curva de crescimento se manteve em fase exponencial, a partir de 16 h, mantendo-se por pelo menos 48 h (último tempo medido no ensaio) (Figura 11). Finalmente, a curva de crescimento do biofilme misto (*C. albicans* WT + *S. aureus*) foi realizada por até 48 h (Figura 12). Neste tipo de biofilme existe um comportamento de crescimento logarítmico em 24 h. Após este período, o biofilme adquire um comportamento mais próximo de platô por até 48 h (último tempo medido neste ensaio).

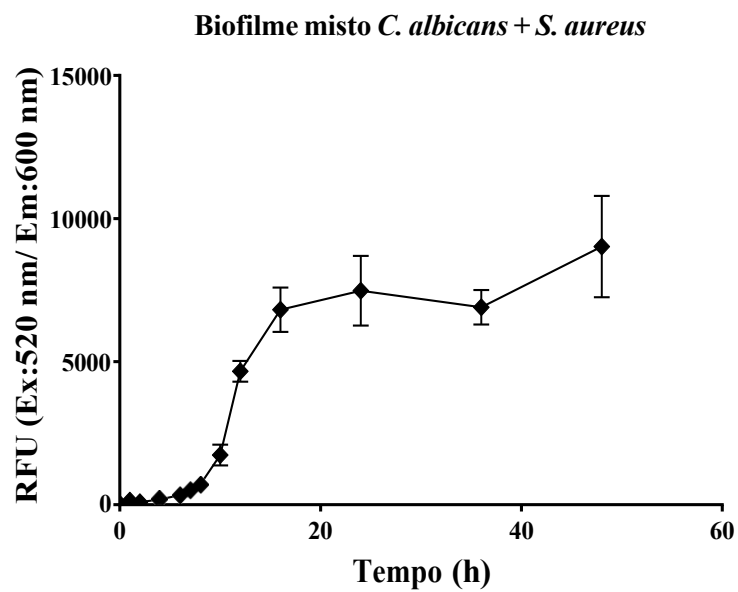
Figura 11 - Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autoria própria.

Curva de crescimento por alamarBlue™. Os biofilmes foram mantidos em cultura durante 48 h, o tempo zero foi definido após a fase de adesão do biofilme (90 min).

Figura 12 - Curva de crescimento do biofilme misto (*C. albicans* WT + *S. aureus*).



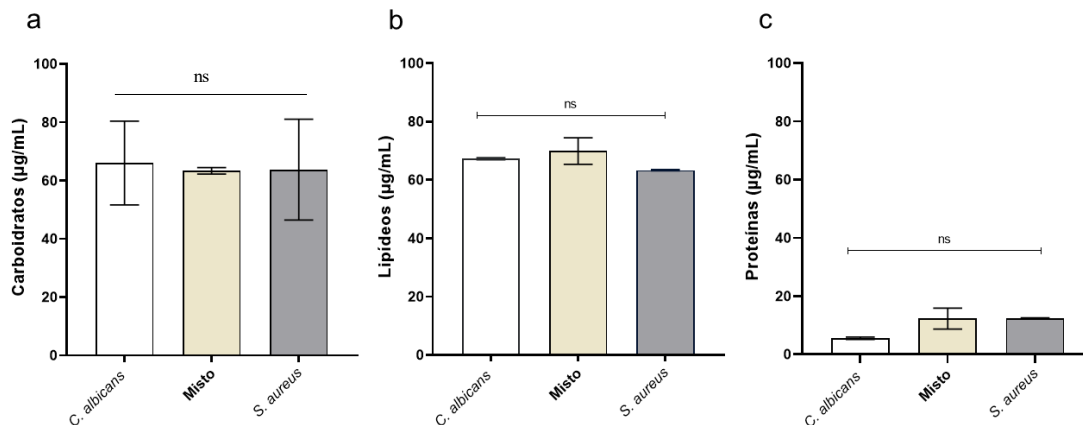
Fonte: Autoria própria.

Curva de crescimento por alamarBlue™. Os biofilmes foram mantidos em cultura durante 48 h, o tempo zero foi definido após a fase de adesão do biofilme (90 min).

3.2 Quantificação das biomoléculas, dos secretomas filtrados, dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.

As biomoléculas quantificadas foram carboidratos, lipídeos e proteínas. A quantificação dos carboidratos foi realizada após a filtragem dos sobrenadante dos biofilmes (secretoma). No caso do biofilme simples de *C. albicans* WT foi quantificado $66 \pm 14,3 \mu\text{g/mL}$ de carboidratos livres. No biofilme misto foram quantificados $63,4 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$. No biofilme simples de *S. aureus* foram quantificados $63,8 \pm 17,3 \mu\text{g/mL}$. Não houve diferença estatística entre os biofilmes simples e mistos (Figura 13a). Os lipídeos foram quantificados, nos biofilmes simples de *C. albicans* WT, em $67,3 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, em *S. aureus* $63,3 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ e em $69,9 \pm 4,56 \mu\text{g/mL}$ para o misto (Figura 13b). Não foram observadas diferenças entre os biofilmes simples e mistos. As proteínas presentes nos secretomas dos biofilmes simples de *C. albicans* WT foram quantificadas em $5,53 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$, no caso do biofilme simples de *S. aureus* foram quantificadas em $12,28 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ e no biofilme misto em $12,30 \pm 3,59 \mu\text{g/mL}$ (Figura 13c).

Figura 13 - Quantificações das biomoléculas do secretoma dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* WT e *S. aureus*.



Fonte: Autoria própria.

a) A quantificação dos carboidratos foi realizada mediante o kit *Total Carbohydrate Quantification Assay kit*. A quantificação foi realizada com o sobrenadante filtrado, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A comparação foi realizada com o teste ANOVA one-way e o post-hoc teste de Tukey; ns = não há diferença estatística. b) A quantificações dos lipídeos foi realizada mediante o kit *Lipid Assay Kit (Neutral Lipids)*. A quantificação foi realizada com o sobrenadante filtrado. Não foi observado diferença estatística entre os grupos. Para a comparação foi realizado o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey; ns = não há diferença estatística. c) A quantificações das proteínas foi realizada diretamente com o sobrenadante filtrado, sem prévio protocolo de extração. Para a comparação foi realizado um teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey; ns = não há diferença estatística.

3.3 Quantificação da capacidade hemolítica das proteínas extraídas das culturas simples e mistas de *C. albicans* e *S. aureus*.

A capacidade hemolítica das diferentes culturas, simples e mistas, planctônicas ou em biofilmes, foi realizada mediante a medição de halos de hemólise via ação de enzima hemolíticas presentes nos diferentes secretomas. Para uma comparação, foram quantificados os halos de hemólise das culturas planctônicas de *C. albicans* WT, *S. aureus* e a co-cultura de WT + *S. aureus*, além dos biofilmes simples de *C. albicans* WT e *S. aureus*; e dos biofilmes mistos de *C. albicans* (WT, *ece1*Δ/Δ, *ece1*Δ/Δ+ECE1, *als3*Δ/Δ, *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ) com *S. aureus*. As proteínas foram previamente extraídas, pelo método de precipitação em acetona, descrito na secção 1.10. Os valores de proteínas em µg/mL, presente nos diferentes secretomas estão reunidos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Quantificações das proteínas obtidas das culturas planctônicas.

Cultura	Proteínas (µg/mL)
Cultura planctônica de <i>S. aureus</i>	5,90 ± 1,94
Cultura planctônica de <i>C. albicans</i> WT	5,60 ± 0,92
Co-cultura planctônica de <i>C. albicans</i> WT + <i>S. aureus</i>	16,20 ± 0,67

Fonte: Autoria Própria

As quantificações das proteínas dos biofilmes estão resumidas na tabela 6.

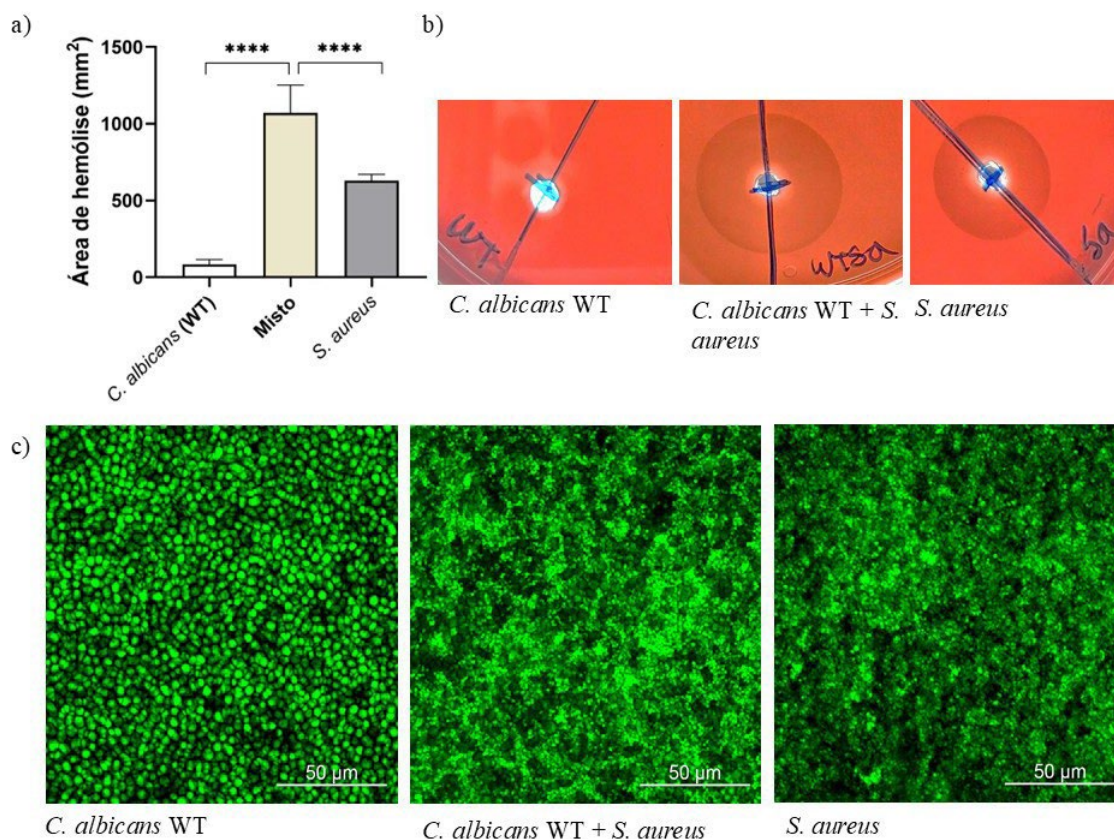
Tabela 6 - Quantificações das proteínas obtidas dos biofilmes.

Cultura	Proteínas (µg/mL)
Biofilme simples de <i>S. aureus</i>	36,76 ± 0,45
Biofilme simples de <i>C. albicans</i> WT	26,75 ± 1,20
Biofilme misto de <i>C. albicans</i> WT + <i>S. aureus</i>	31,30 ± 0,30
Biofilme misto de <i>C. albicans ece1</i> Δ/Δ + <i>S. aureus</i>	39,03 ± 3,48
Biofilme misto de <i>C. albicans ece1</i> Δ/Δ+ECE1 + <i>S. aureus</i>	38,87 ± 10,71
Biofilme misto de <i>C. albicans als3</i> Δ/Δ + <i>S. aureus</i>	44,93 ± 3,34
Biofilme misto de <i>C. albicans efg1</i> Δ/Δ/ <i>cph1</i> Δ/Δ + <i>S. aureus</i>	40,90 ± 1,36

Fonte: Autoria Própria

Nas culturas planctônicas a área de hemólise medida foi de 609,1 mm² para *S. aureus*, 107,8 mm² para WT, e 1117 mm² para a co-cultura de WT e *S. aureus* (Figura 14a), com diferença estatística entre todos os grupos. A co-cultura mista de *C. albicans* WT e *S. aureus* apresentou a maior área de hemólise, como observado na Figura 14b e conforme relatos da literatura (Todd; Fidel; Harro; Hilliard *et al.*, 2019). Para corroborar este comportamento com a morfologia das culturas, realizou-se uma microscopia de fluorescência convencional (Figura 14c).

Figura 14 - Ensaios de hemólise para as culturas planctônicas de *C. albicans* WT e *S. aureus*.



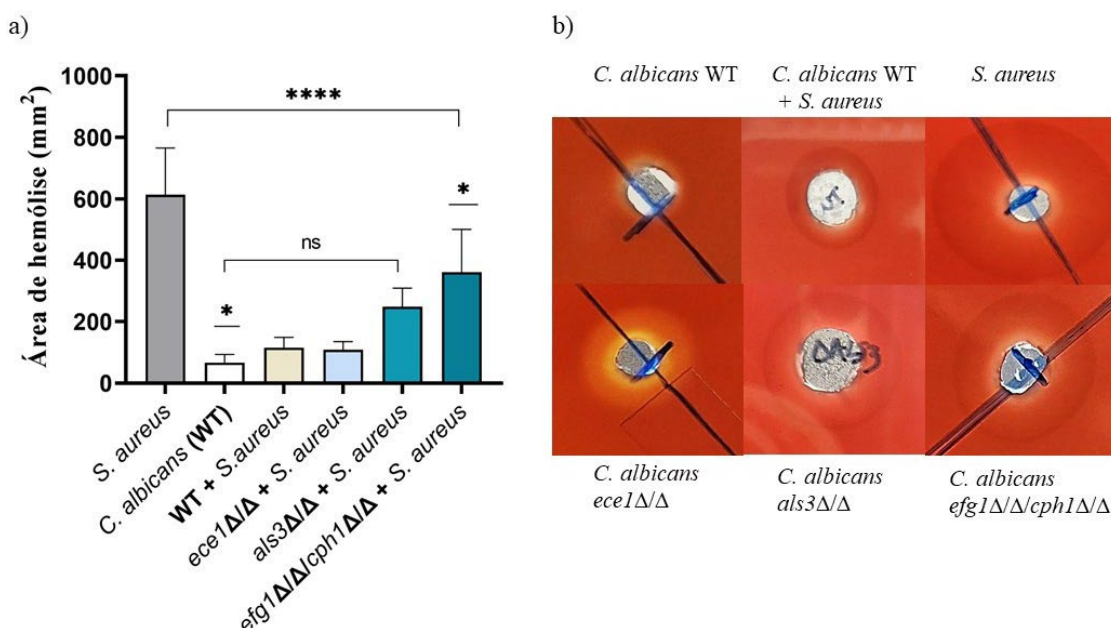
Fonte: Autoria Própria.

a) A capacidade hemolítica mediante a aplicação de 40 µL do extrato de proteínas em placas TSA 5%. A medição da área foi realizada com o programa ImageJ. ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey, sendo **** $p < 0,0001$. b) Fotográficas das placas de TSA + 5%. c) Imagens realizadas mediante marcação com Syto9 para análise da morfologia das culturas planctônicas.

No caso dos biofilmes foram obtidas as seguintes áreas: biofilme simples de *S. aureus*, 613,6 mm²; biofilme simples de *C. albicans* WT, 66,88 mm²; biofilme misto de WT e *S. aureus*, 115,3 mm²; biofilme misto de *ece1*Δ/Δ e *S. aureus*, 109,5 mm²; biofilme misto de *als3*Δ/Δ e *S. aureus*, 248,4 mm²; biofilme misto de *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ e *S. aureus*, 361,1 mm² (Figura 15a). Foi observado que o biofilme simples de *S. aureus* foi o que teve a maior área de hemólise (Figura 15b). Já a cultura mista de biofilmes teve um comportamento contrário ao observado na cultura mista planctônica, com menor halo de hemólise neste tipo de biofilme associativo. Este comportamento contraditório ao cultivo planctônico foi mantido não só com o uso da *C. albicans* WT, mas também com o mutante *ece1*Δ/Δ, demonstrando que o gene *ECE1* não desempenha função neste tipo de regulação. Por outro lado, foi observado um incremento na área hemolítica dos biofilmes mistos com cepas não capazes de produzir uma interação direta com *S. aureus* (*als3*Δ/Δ e *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ), sobretudo no mutante *efg1*Δ/Δ/*cph1*Δ/Δ, de morfologia leveduriforme, incapaz de formar hifas, *($p < 0,05$) (Figura 15b). Para corroborar o

comportamento hemolítico com a morfologia de *C. albicans* nos diversos biofilmes, realizou-se, na sequência, o ensaio de CLSM, descrito na Figura 16.

Figura 15 - Ensaio de hemólise para os biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.



Fonte: Autoria própria.

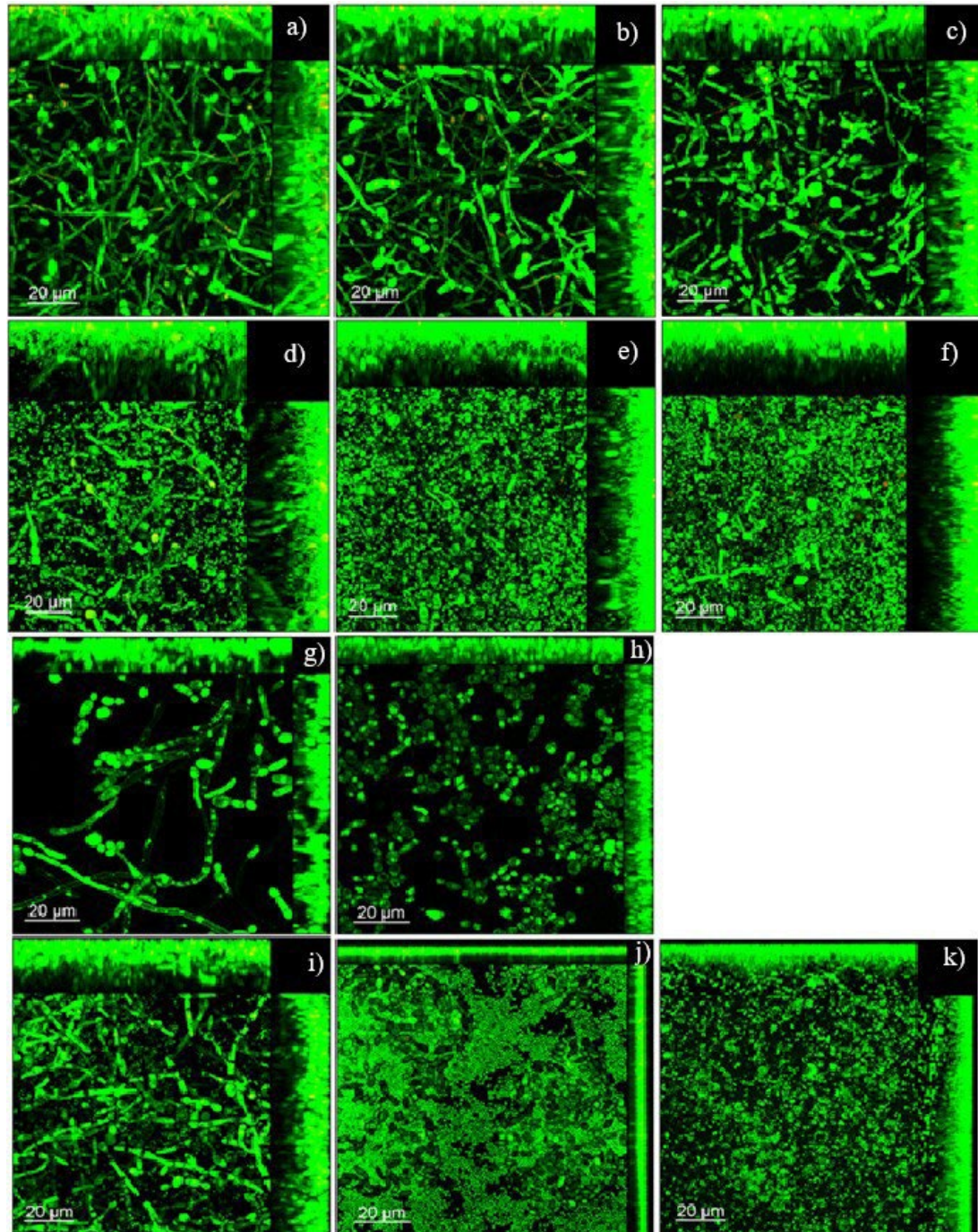
a) A capacidade hemolítica mediante a aplicação de 40 µL do extrato de proteínas em placas TSA 5%. A medição da área foi realizada com o programa ImageJ. ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey, sendo **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ e ns = não houve diferença estatística. b) Fotografias das placas de TSA + 5%.

3.4 Marcação dos biofilmes por Microscopia Confocal (CLSM)

Para avaliar os biofilmes, realizou-se a marcação com o kit *LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit*. Na Figura 16 pode ser observado o resultado da marcação para os biofilmes simples de *S. aureus* e *C. albicans* WT, *ece1Δ/Δ*, *ece1Δ/Δ+ECE1*, *als3Δ/Δ*, *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*. No caso de *C. albicans* WT podemos observar o desenvolvimento de um biofilme tridimensional, composto por hifas intercaladas umas às outras (Figura 16a). No caso do mutante *ece1Δ/Δ* o biofilme formado foi similar ao WT (Figura 16b), e esse mesmo comportamento foi observado com a cepa revertida *ece1Δ/Δ+ECE1* (Figura 16c). No biofilme misto de *S. aureus* e *C. albicans* WT pode ser observado um biofilme formado predominantemente pelas hifas de *C. albicans* e com aderência de *S. aureus* (Figura 16d). No caso do biofilme misto de *S. aureus* com o mutante *ece1Δ/Δ* (Figura 16e) e com a cepa revertida *ece1Δ/Δ+ECE1* (Figura 16f) foi observado o mesmo padrão descrito para o biofilme misto com WT. Um comportamento diferente foi observado nos mutantes *als3Δ/Δ* e *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*. No caso do biofilme simples de *als3Δ/Δ* foi observado um biofilme menos espesso, com mais

espaços vazios (em preto), porém com presença de hifas (Figura 16g). Para as culturas de *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* não foi observada a formação de um biofilme verdadeiro e apenas a presença de células leveduriformes, o que já era esperado para esta cepa (Figura 16h). No caso do biofilme misto de *als3Δ/Δ* pode-se notar na imagem a escassez de *S. aureus* junto às hifas, o que já era esperado, uma vez que este mutante inviabiliza a adesão de *S. aureus* em suas hifas (Figura 16i). Na cultura mista de *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* com *S. aureus* não foi observada a formação de um biofilme verdadeiro. Há uma ausência de hifas e observou-se a presença de clusters formados por leveduras de *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* rodeadas pelo *S. aureus* (Figura 16j). No caso do biofilme simples de *S. aureus* pode-se observar um biofilme presente em toda a superfície analisada e em padrão de *clusters* (Figura 16k).

Figura 16 - Marcação dos biofilmes simples e mistos com Syto 9 e iodeto de propídeo (PI).



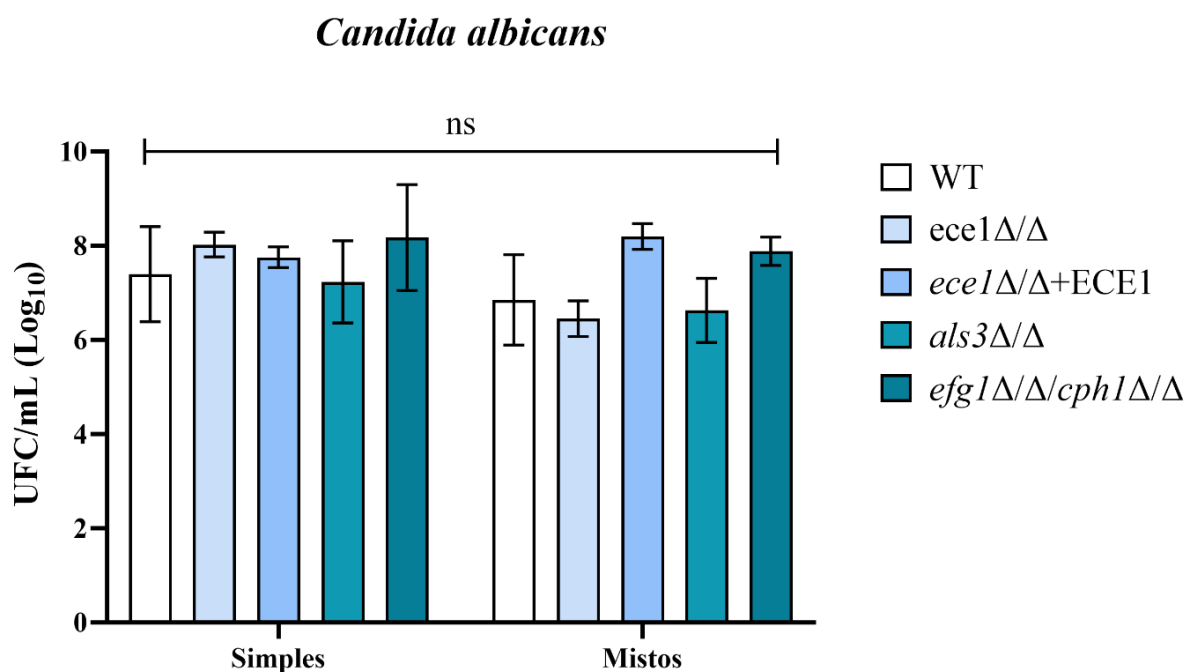
Fonte: Autoria própria.

a) Biofilme simples de *C. albicans* WT; b) Biofilme simples de *C. albicans ece1Δ/Δ*; c) Biofilme simples da cepa revertida *ece1Δ/Δ+ECE1*; d) Biofilme misto de *C. albicans* WT e *S. aureus*; e) Biofilme misto de *ece1Δ/Δ* e *S. aureus*; f) Biofilme misto da cepa revertida *ece1Δ/Δ+ECE1* e *S. aureus*; g) Biofilme simples de *C. albicans als3Δ/Δ*; h) Cultura simples do mutante *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*; i) Biofilme misto de *als3Δ/Δ* e *S. aureus*. j) Cultura mista de *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* e *S. aureus*. k) Biofilme simples de *S. aureus*. Todos os biofilmes apresentaram marcação predominantemente verde (vivo), em detrimento às marcações em vermelho (morto).

3.5 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL

Após a formação dos biofilmes simples e mistos foi realizada a contagem das UFC/mL, obtidas depois das 36 h de crescimento. No caso dos biofilmes simples não houve diferença estatística no crescimento das diferentes cepas de *C. albicans* WT, *ece1* Δ/Δ , *ece1* Δ/Δ +ECE1, *als3* Δ/Δ e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ (Figura 17). Para o WT foi obtido um UFC/mL de $9,15 \times 10^7$ (Log_{10} $7,40 \pm 1,0$), para *ece1* Δ/Δ foi quantificado $1,15 \times 10^8$ UFC/mL (Log_{10} $8,02 \pm 0,26$), para *ece1* Δ/Δ +ECE1 $6,06 \times 10^7$ UFC/mL (Log_{10} $7,75 \pm 0,22$), *als3* Δ/Δ $6,20 \times 10^7$ UFC/mL (Log_{10} $7,23 \pm 0,87$) e, finalmente *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ $1,01 \times 10^9$ UFC/mL (Log_{10} $8,17 \pm 1,12$). No caso dos biofilmes mistos não houve diferença estatística na comparação com os biofilmes simples (Figura 17) e nem entre as diferentes cepas. Para o WT + *S. aureus*, $2,36 \times 10^7$ (Log_{10} $6,84 \pm 0,96$); para *ece1* Δ/Δ , $3,52 \times 10^6$ (Log_{10} $6,45 \pm 0,38$); para *ece1* Δ/Δ +ECE1, $8,70 \times 10^7$ (Log_{10} $8,10 \pm 0,27$); para *als3* Δ/Δ , $7,69 \times 10^6$ (Log_{10} $6,62 \pm 0,68$); para *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ , $1,65 \times 10^7$ (Log_{10} $7,88 \pm 0,30$).

Figura 17 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *C. albicans* em biofilmes simples e mistos.

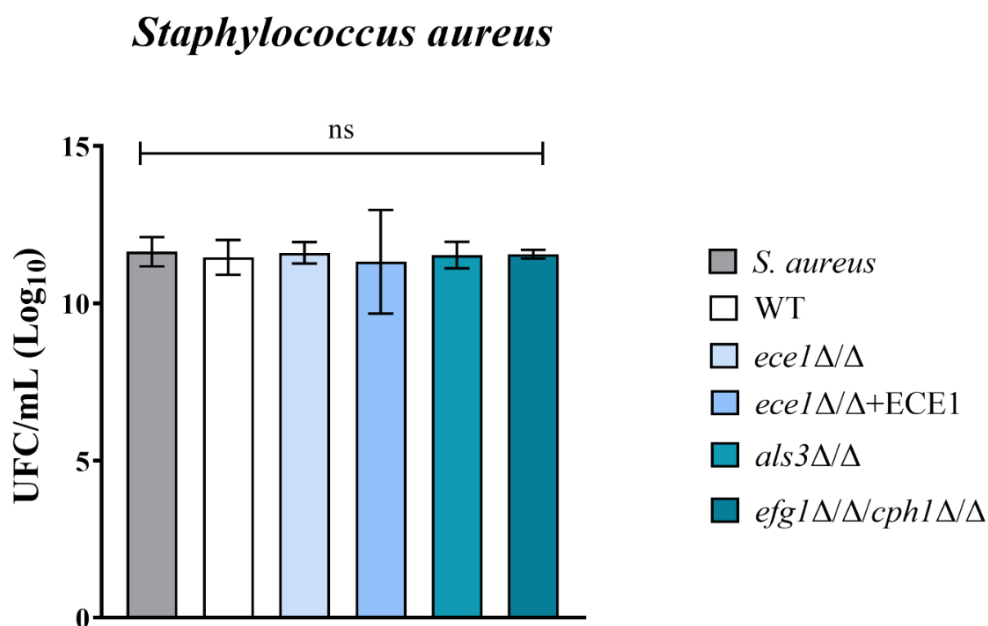


Fonte: Autoria própria.

Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) contadas a partir do biofilme de 36 h. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de ANOVA two-way com post-hoc teste de Tukey; ns = não houve diferença estatística entre grupos.

No biofilme simples de *S. aureus* foi quantificado um UFC/mL final de $6,72 \times 10^{11}$ (Log_{10} $11,64 \pm 0,46$). No biofilme misto com WT foi quantificado $4,28 \times 10^{11}$ UFC/mL (Log_{10} $11,46 \pm 0,55$), com *ece1* Δ/Δ ; $4,98 \times 10^{11}$ UFC/mL (Log_{10} $11,61 \pm 0,33$), com *ece1* Δ/Δ +ECE1; $4,40 \times 10^{12}$ UFC/mL (Log_{10} $11,32 \pm 1,64$), com *als3* Δ/Δ ; $4,39 \times 10^{11}$ UFC/mL (Log_{10} $11,53 \pm 0,41$), com *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ ; $3,76 \times 10^{11}$ UFC/mL (Log_{10} $11,53 \pm 0,13$), como observado na Figura 18.

Figura 18 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. aureus* em biofilmes simples e mistos.



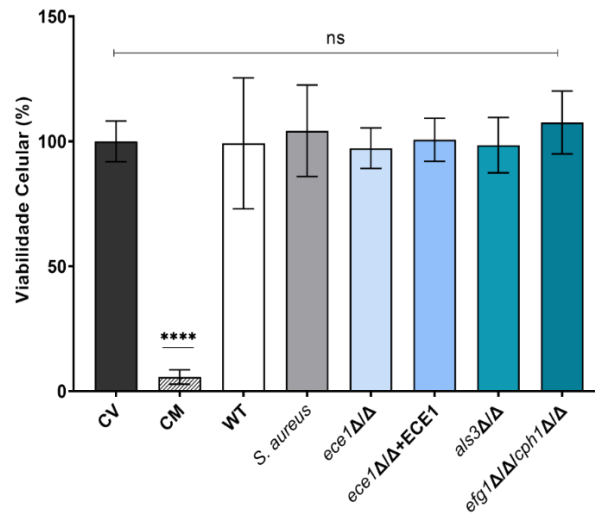
Fonte: Autoria própria.

Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) contadas a partir do biofilme de 36 h. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey; ns = não houve diferença estatística entre os grupos

3.6 Estimulo das células THP-1 naive, com os secretomas filtrados, dos biofilmes simples e mistos.

Os secretomas produzidos pelos biofilmes do estudo foram coletados para a estimulação das células THP-1. O estímulo das células foi realizado por 24 h e o meio condicionado obtido (mcTHP-1) foi armazenado em -20°C para os desafios nas células displásicas de cavidade oral (DOK) e para a dosagem de citocinas pelo ensaio de CBA. Para assegurar que os níveis de produção de citocinas não fossem resultado de processos de morte celular, realizou-se o ensaio de alamarBlueTM, checando a viabilidade das células THP-1 após contato com os diferentes secretomas (Figura 19 e Figura 20). Não houve queda na porcentagem de viabilidade celular.

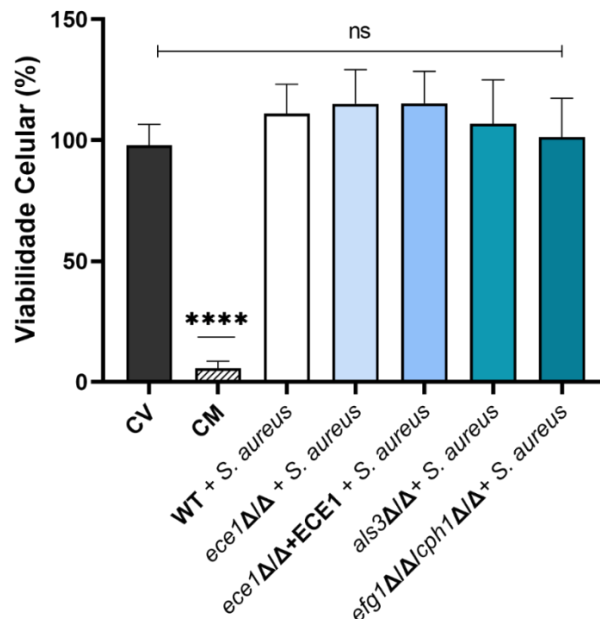
Figura 19 - Viabilidade das células THP-1, em porcentagem, estimuladas por 24 h com o secretoma dos biofilmes simples de *C. albicans* e *S. aureus*.



Fonte: Autoria Própria.

Porcentagem de células vivas (viabilidade celular %) calculada para os diferentes estímulos, provenientes dos biofilmes simples de *S. aureus* e simples de *C. albicans*, WT e cepas mutantes. As comparações foram feitas com o teste ANOVA one-way e post-hoc teste de Tukey, sem diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle vivo (CV). A queda na viabilidade celular ocorreu apenas para o controle morto (Triton-x100 1%) como já esperado (CM).

Figura 20 - Viabilidade das células THP-1, em porcentagem, estimuladas por 24 h com o secretoma dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.



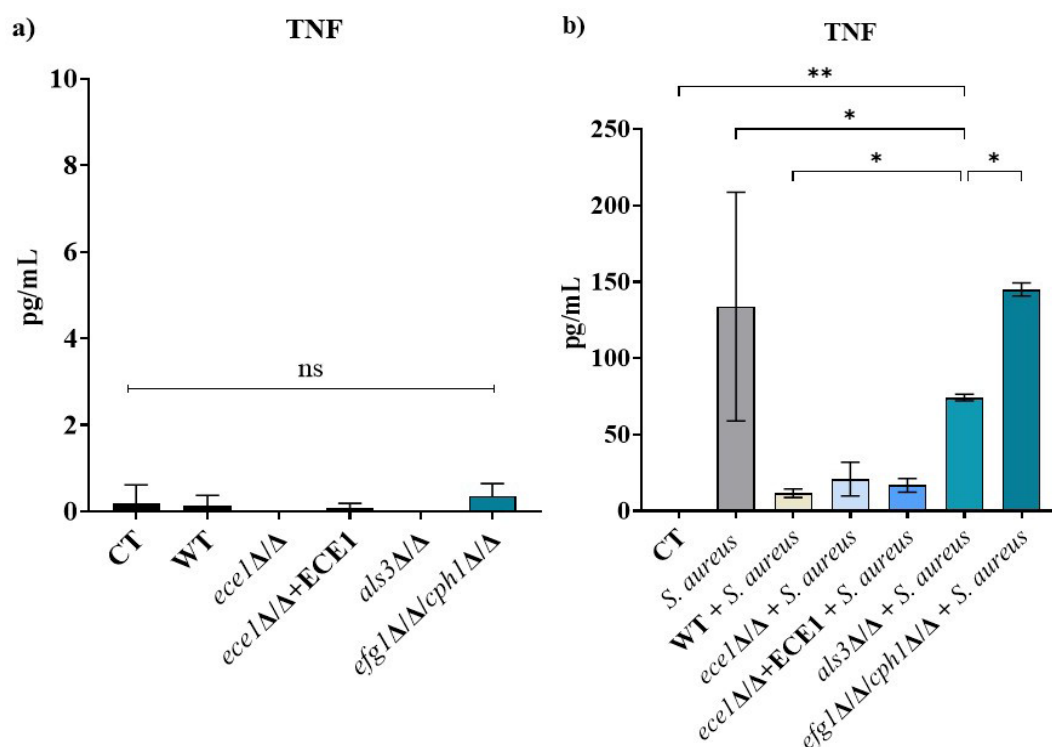
Fonte: Autoria Própria.

Porcentagem de células vivas (viabilidade celular %) calculada para os diferentes estímulos, provenientes dos biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans*, WT e cepas mutantes. As comparações foram feitas com o teste ANOVA one-way e post-hoc teste de Tukey, sem diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle vivo (CV). A queda na viabilidade celular ocorreu apenas para o controle morto (Triton-x100 1%) como já esperado (CM).

3.7 Ensaio de quantificação de citocinas inflamatórias mediante *Cytometric Bead Array* (CBA)

Neste *array*, as citocinas quantificadas foram: IL-8; IL-1 β ; IL-6; IL-10; TNF; IL-12p70. Foi observado uma produção de TNF, IL-1 β e IL-8 nas células THP-1 estimuladas com os diferentes secretomas estudados. A quantificação de TNF nos biofilmes simples foi baixa (irrelevante) e não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 21a). Nos biofilmes mistos foi observada uma maior produção de TNF nos grupos *S. aureus* simples, *als3* Δ/Δ + *S. aureus* e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ + *S. aureus* (Figura 21b). Foram quantificados 133,8 $\pm$ 74,89 pg/mL para o biofilme simples de *S. aureus*; 11,48 $\pm$ 2,78 pg/mL para misto de WT + *S. aureus*; 20,77 $\pm$ 11,04 pg/mL para o misto de *ece1* Δ/Δ + *S. aureus*; 16,74 $\pm$ 4,49 pg/mL para o misto de *ece1* Δ/Δ +ECE1 + *S. aureus*; 74,16 $\pm$ 2,17 pg/mL para o misto de *als3* Δ/Δ + *S. aureus*; e 145 $\pm$ 4,34 pg/mL para o misto de *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ + *S. aureus*.

Figura 21 - Quantificação da produção de TNF (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.

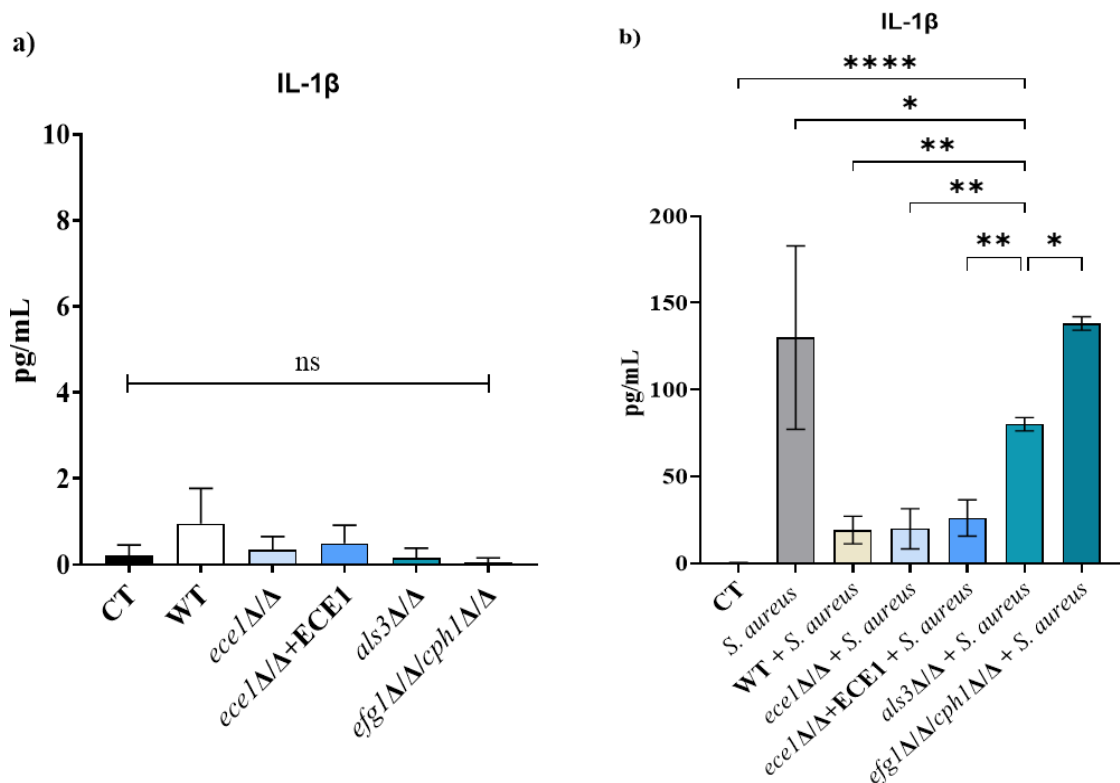


Fonte: Autoria Própria.

Quantificação de citocinas por *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines*. a) Quantificação de TNF nos biofilmes simples das diferentes cepas de *C. albicans*. Não houve produção de TNF. b) Quantificação de TNF nos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos de *S. aureus* com as diferentes cepas de *C. albicans*. As comparações foram feitas mediante o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey, sendo *p = 0,0311 e ** p = 0,0061.

A quantificação de IL-1 β nos biofilmes simples de *C. albicans* foi baixa e não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 22a). Nos biofilmes mistos foi observada uma maior produção de TNF nos grupos *S. aureus* simples, *als3* Δ/Δ + *S. aureus* e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ + *S. aureus* (Figura 22b). Foram quantificados $130 \pm 52,80$ pg/mL para o biofilme simples de *S. aureus*; $19,14 \pm 7,93$ pg/mL para misto de WT + *S. aureus*; $20,77 \pm 11,04$ pg/mL para o misto de *ece1* Δ/Δ + *S. aureus*; $26,04 \pm 10,48$ pg/mL para o misto de *ece1* Δ/Δ +ECE1 + *S. aureus*; $80,11 \pm 3,82$ pg/mL para o misto de *als3* Δ/Δ + *S. aureus*; e $138,2 \pm 3,89$ pg/mL para o misto de *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ + *S. aureus*.

Figura 22 - Quantificação da produção de IL-1 β (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.



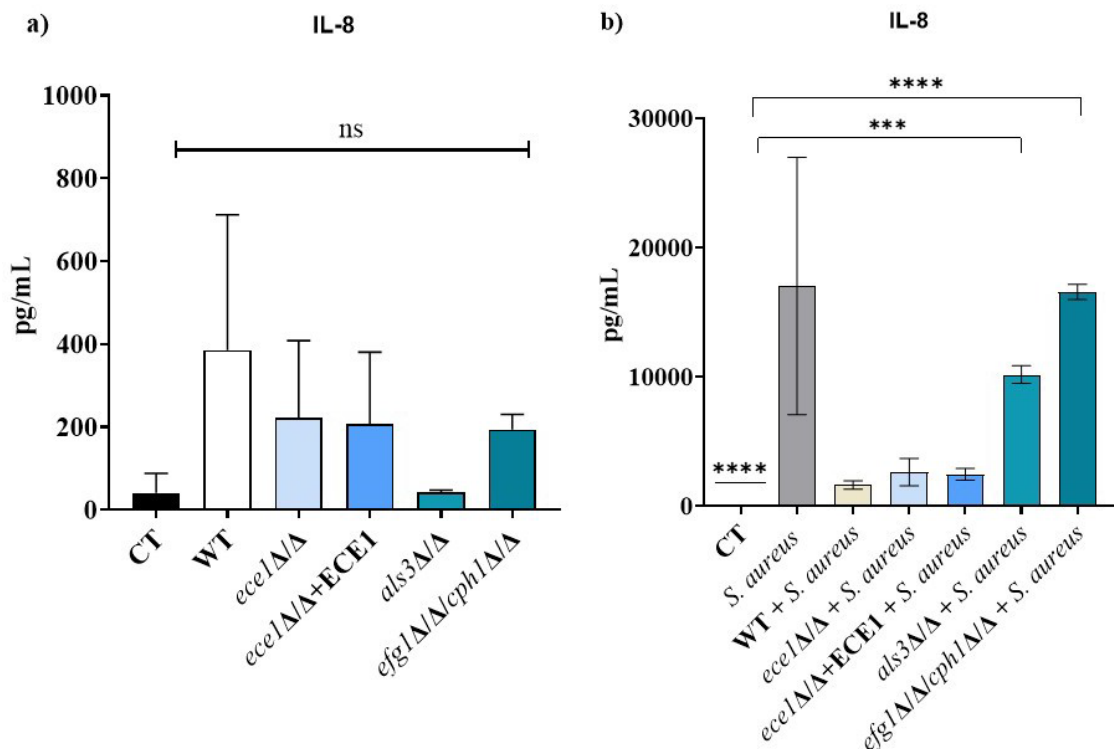
Fonte: Autoria Própria.

Quantificação de citocinas por *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines*. a) Quantificação de IL-1 β nos biofilmes simples das diferentes cepas de *C. albicans*. Não houve produção significativa de IL-1 β . b) Quantificação de IL-1 β nos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos de *S. aureus* com as diferentes cepas de *C. albicans*. As comparações foram feitas mediante o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey, sendo *p = 0,012, ** p = 0,0025 e **** p < 0,0001.

A quantificação de IL-8 nos biofilmes simples foi mais alta em comparação numérica com as quantificações de TNF e de IL-1 β (Figura 23a). As quantificações de IL-8 foram $40,96 \pm 47,08$ pg/mL para o CT; $385,9 \pm 246,8$ pg/mL para WT; $222,4 \pm 186,4$ pg/mL para *ece1* Δ/Δ ; $207,9 \pm 173,2$ pg/mL para *ece1* Δ/Δ +ECE1; $42,88 \pm 4,98$ pg/mL para *als3* Δ/Δ e $193,6 \pm 37,16$ pg/mL para *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ . Nos biofilmes mistos a produção de IL-8 foi numericamente maior, sobretudo

nos biofilmes simples de *S. aureus*, *als3Δ/Δ* + *S. aureus* e *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* + *S. aureus* (Figura 23b). Nos biofilmes mistos, assim como nas dosagens de TNF e IL-1 β , foi observada maior produção de IL-8 nos grupos *S. aureus* simples, *als3Δ/Δ* + *S. aureus* e *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* + *S. aureus*. As quantificações foram 17.046 ± 9.943 pg/mL para o biofilme simples de *S. aureus*; $1.651 \pm 326,2$ pg/mL para o biofilme misto de WT + *S. aureus*; 2.657 ± 1.057 pg/mL para o biofilme misto de *ece1Δ/Δ* + *S. aureus*; $2.485 \pm 446,5$ pg/mL para o biofilme misto de *ece1Δ/Δ*+ECE1 + *S. aureus*; $10.199 \pm 679,6$ pg/mL para o biofilme misto de *als3Δ/Δ* + *S. aureus* e finalmente $16.574 \pm 592,8$ pg/mL para o biofilme misto de *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* + *S. aureus*.

Figura 23 - Quantificação da produção de IL-8 (pg/mL) pelas células THP-1 após estímulo com o secretoma dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*.



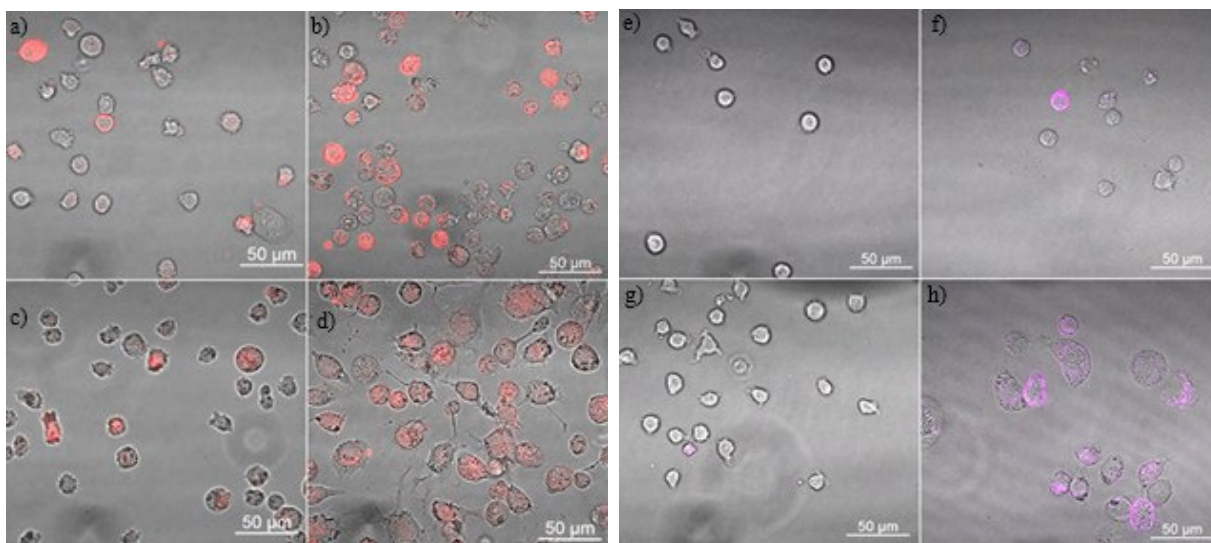
Fonte: Autoria Própria.

Quantificação de citocinas por *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines*. a) Quantificação de IL-8 nos biofilmes simples das diferentes cepas de *C. albicans*. Não houve diferença estatística entre os grupos b) Quantificação de IL-8 nos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos de *S. aureus* com as diferentes cepas de *C. albicans*. As comparações foram feitas mediante o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Tukey, sendo *** $p = 0,00266$ e **** $p < 0,0001$.

3.8 Marcação de Receptores de Superfície Celular para CD86 e CD163

A marcação foi realizada com o intuito de melhor entender a polarização das células THP-1 após o estímulo com o secretoma dos biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e misto. Células CD86⁺ estão relacionadas com a polarização de monócitos para macrófagos pro-inflamatórios (M1); já células CD163⁺ estão relacionadas com a polarização de macrófagos do tipo M2 (anti-inflamatórios). O biofilme simples de *S. aureus* promoveu o aumento da expressão dos receptores do tipo CD86 nas células de monócito THP-1 (Figura 24b), comparável com o controle realizado com PMA (Figura 24d). No biofilme simples de *C. albicans* WT também foi observada marcação positiva para CD86, porém em menor quantidade, assim como no biofilme misto (Figura 24a e 24c). Os receptores do tipo CD163 foram pobremente marcados, apenas discretamente após o estímulo com o biofilme simples de *S. aureus* (Figura 24f) e de forma mais intensa para o controle com PMA (Figura 24h). Não houve marcação do tipo CD163⁺ após o estímulo com os biofilmes simples e mistos de *C. albicans* WT (Figura 24e e 24g).

Figura 24 - Marcação das células THP-1 para os receptores de superfície do tipo CD86 e CD163, após o estímulo com o secretoma de biofilmes



Fonte: Autoria Própria.

Marcação feita com Violeta Brilhante (BV) 610 anti-CD86 ou Flúor Ficoeritrina-Cianina (PE-CF) 594 anti-CD163. a) Marcação anti-CD86 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes simples *C. albicans* WT. b) Marcação anti-CD86 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes simples de *S. aureus*. c) Marcação anti-CD86 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans* WT. d) Marcação anti-CD86 realizada em células de THP-1 estimuladas com PMA. e) Marcação anti-CD163 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes simples *C. albicans* WT. f) Marcação anti-CD163 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes simples de *S. aureus*. g) Marcação anti-CD163 realizada em células de THP-1 estimuladas com o secretoma dos biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans* WT. h) Marcação anti-CD163 realizada em células de THP-1 estimuladas com PMA.

3.9 Ensaio de expressão gênica nas células displásicas de cavidade oral (DOK)

A quantificação da expressão gênica, por RT-qPCR, foi realizada após o estímulo das células DOK, com os meios condicionados das células THP-1 (mcTHP-1) e de acordo com os diferentes grupos experimentais. As reações de RT-qPCR foram realizadas para o painel de genes descritos no item 9.5 em Materiais e Métodos. Todos os mRNAs foram extraídos das células DOK após 24 h de contato com os diferentes mcTHP-1. Para os genes *mTOR* (Tabela 7), *BRAF* (Tabela 8), *AKT* (Tabela 9) e *HRAS* (Tabela 10) não foram observadas modulações significativas nos níveis de expressão gênica (Fold Change).

Tabela 7 - Dados de Fold Change calculados para o gene *mTOR* nas células DOK

Grupo	Fold Change ($\pm$ Desvio Padrão)
RPMI (THP-1/+)	1 ($\pm$ 0)
CT (THP-1/-)	2,18 ($\pm$ 0,67)
<i>S. aureus</i>	1,81 ($\pm$ 0,21)
WT + <i>S. aureus</i>	1,87 ($\pm$ 0,56)
WT	Não Detectado (N.D.)

Fonte: Autoria Própria

Tabela 8 - Dados de Fold Change calculados para o gene *BRAF* nas células DOK

Grupo	Fold Change ($\pm$ Desvio Padrão)
RPMI (THP-1/+)	1 ($\pm$ 0)
CT (THP-1/-)	1,08 ($\pm$ 0,92)
<i>S. aureus</i>	0,74 ($\pm$ 0,51)
WT + <i>S. aureus</i>	1,32 ($\pm$ 0,27)
WT	N.D.

Fonte: Autoria Própria

Tabela 9 - Dados de Fold Change calculados para o gene *AKT* nas células DOK

Grupo	Fold Change ($\pm$ Desvio Padrão)
RPMI (THP-1/+)	1 ($\pm$ 0)
CT (THP-1/-)	1,6 ($\pm$ 0,21)
<i>S. aureus</i>	0,97 ($\pm$ 0,12)
WT + <i>S. aureus</i>	1,015 ($\pm$ 0,07)
WT	N.D.

Fonte: Autoria Própria

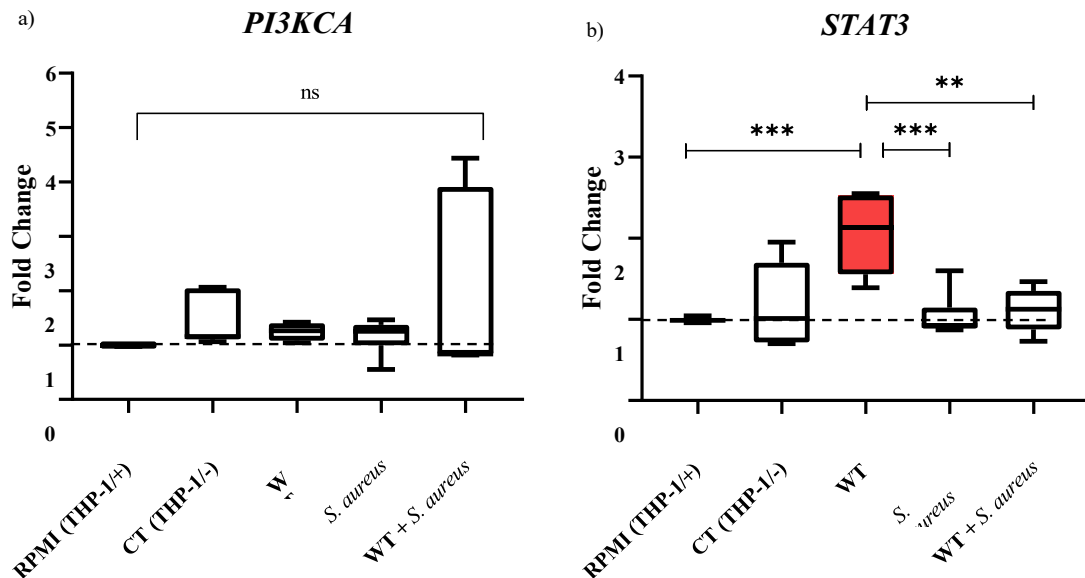
Tabela 10 - Dados de Fold Change calculados para o gene *hRAS* nas células DOK

Grupo	Fold Change ($\pm$ Desvio Padrão)
RPMI (THP-1/+)	1 ($\pm$ 0)
CT (THP-1/-)	1,89 ($\pm$ 0,58)
<i>S. aureus</i>	1,048 ($\pm$ 0,32)
WT + <i>S. aureus</i>	0,64 ($\pm$ 0,23)
WT	N.D.

Fonte: Autoria Própria

Para o gene *PI3KCA* (Figura 25a) não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos, apesar do estímulo proveniente dos biofilmes mistos terem resultados numéricos em valor de Fold Change iguais a $1,24 \pm 0,16$ para *C. albicans* WT, a $1,17 \pm 0,32$ para o biofilme simples de *S. aureus* e $2,058 \pm 2,72$ para o biofilme misto de *S. aureus* e *C. albicans* WT. No caso do gene *STAT3* (Figura 25b) o estímulo proveniente do biofilme simples de *C. albicans* WT causou um incremento de 100% na expressão deste gene, com diferença estatística na comparação com os demais grupos e controles (Figura 25b).

Figura 25 - Níveis de expressão gênica de *PI3KCA* e *STAT3* após estímulo com os meios condicionados das células THP-1



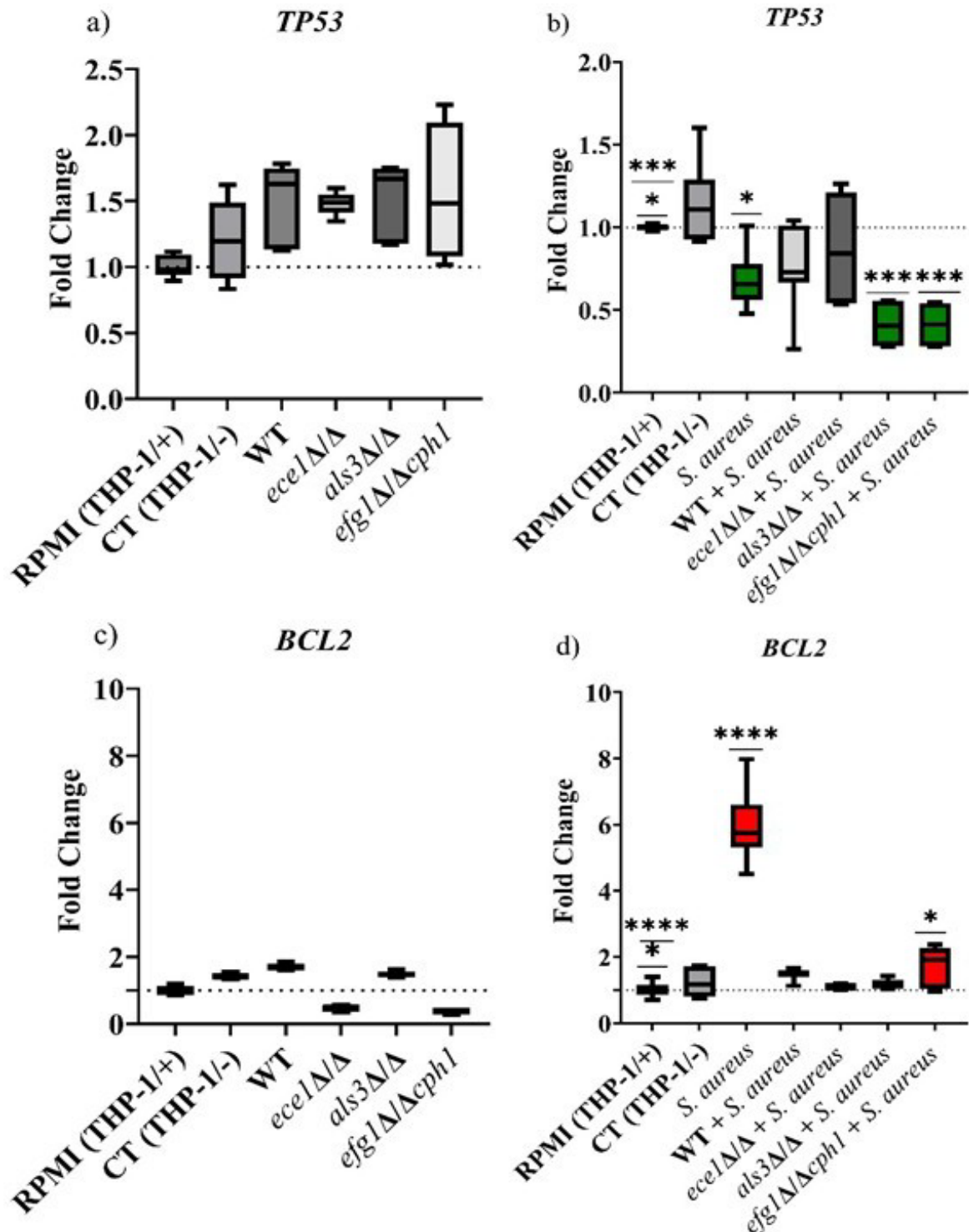
Fonte: Autoria própria.

A expressão gênica foi quantificada mediante comparação com o gene endógeno *HPRT*. a) Fold change calculados para a expressão de *PI3KCA*, não foi observada diferença estatística entre os grupos. Para as comparações foram utilizados o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Dunnett, ns = Não há diferença estatística. b) Fold change calculados para a expressão de *STAT3*, foi observado um aumento na expressão das células estimuladas com o mTHP-1 do biofilme de *C. albicans* WT. Para as comparações foi utilizado o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Dunnett, sendo $**p = 0,011$; $***p = 0,002$.

Por fim, considerando-se todo o painel de genes estudados, os resultados obtidos mostraram que apenas os genes *TP53* e *BCL2* tiveram os níveis de expressão alterados, de forma significativa, pelo estímulo com os meios condicionados provenientes, sobretudo, dos biofilmes simples de *S. aureus*. Desta maneira, resolvemos aprofundar o entendimento destas vias, estudando também os estímulos provenientes dos biofilmes com os mutantes de *C. albicans*, tanto simples, como em associação com *S. aureus*. A modulação da expressão de *TP53* e de *BCL2*, refletiram de forma muito direta o padrão de produção de citocinas das células THP-1. Assim como nos dados de TNF, IL-1 β e IL-8, o estímulo proveniente do biofilme simples de *S. aureus* foi capaz de modular respostas celulares e *C. albicans* atuou como um agente inibidor da ação promovida por *S. aureus*. A partir do estudo dos mutantes, mais uma vez, esta ação inibitória de *C. albicans* provou estar relacionada com a formação de biofilmes competentes em adesão (via Als3p) e em formação de hifas (via Efg1-Cph1).

O gráfico na Figura 26 ilustra os valores obtidos, sendo que, os biofilmes simples de *C. albicans* WT e todos os mutantes *ece1* Δ/Δ , *als3* Δ/Δ e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ , foram incapazes de modular *TP53* ou *BCL2* (Figura 26a e 26c). Já o biofilme simples de *S. aureus* promoveu uma diminuição em torno de 40% na expressão de *TP53* (Figura 26b), assim como um aumento de aproximadamente 495% na expressão de *BCL2* (Figura 26d). Essa ação de *S. aureus* foi completamente abolida pela presença de *C. albicans* WT para ambos os genes. O padrão de resposta de *S. aureus* só foi revertido em combinação com os mutantes *als3* Δ/Δ e *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ , que promoveram uma diminuição da expressão de *TP53* em torno de 60% (Figura 26b). Já com relação a *BCL2*, a ação inibitória de *C. albicans* em *S. aureus* foi ainda mais preponderante, com reversão discreta da ação de *S. aureus* apenas em combinação com o mutante *efg1* Δ/Δ /*cph1* Δ/Δ (níveis de expressão gênica aumentada em 87%) (Figura 26d).

Figura 26 - Níveis de expressão gênica de *TP53* e *BCL2* após estímulo com os meios condicionados das células THP-1



Fonte: Autoria própria.

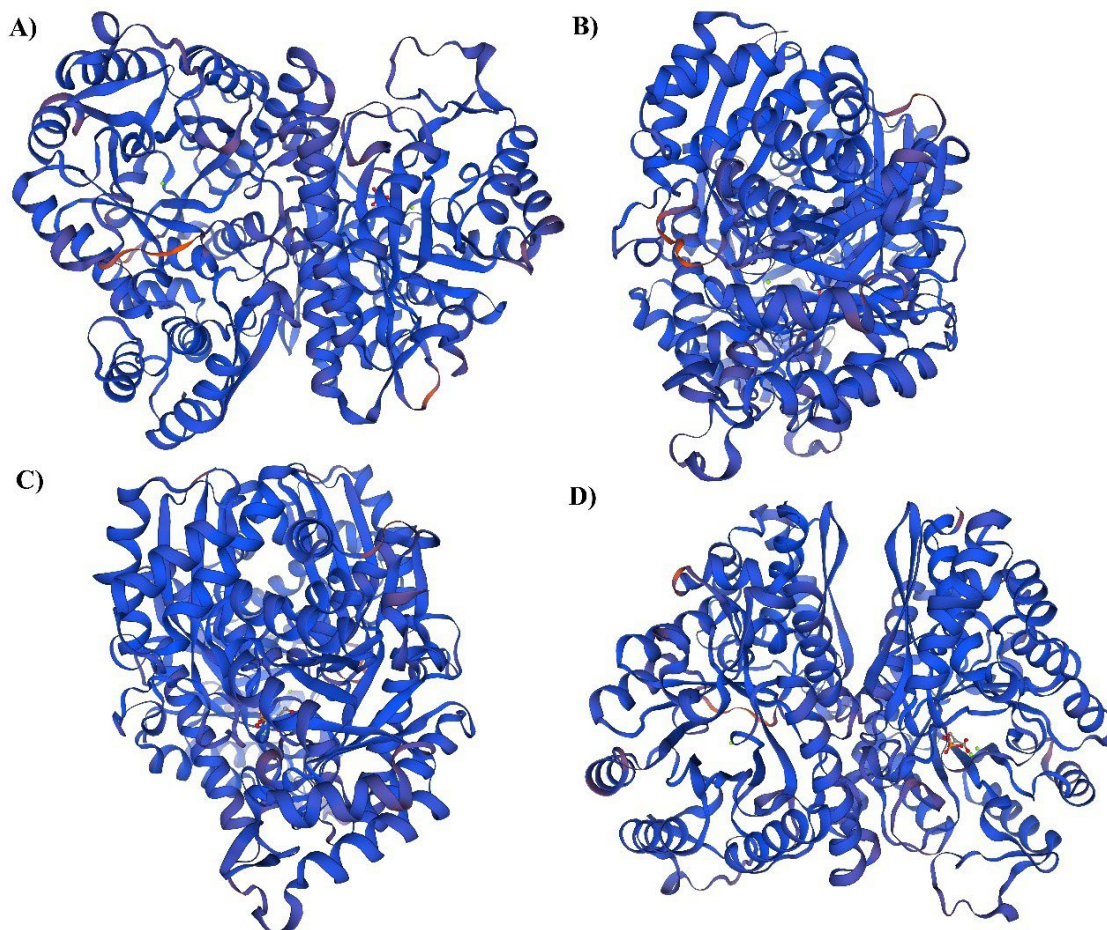
A expressão gênica foi quantificada mediante comparação com o gene endógeno *HPRT*. Para as comparações foram utilizados o teste de ANOVA one-way com post-hoc teste de Dunnett a) Fold change calculados para a expressão de *TP53* após estímulo mCTHP-1 dos biofilmes simples de *C. albicans* WT e mutantes. b) Fold Change calculados para a expressão de *TP53* após estímulo com mCTHP-1 dos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos de *C. albicans* WT e mutantes, sendo * $p = 0,0389$, *** $p = 0,001$. c) Fold change calculados para a expressão de *BCL2* após estímulo com mCTHP-1 dos biofilmes simples de *C. albicans* WT e mutantes. d) Fold

change calculados para a expressão de *BCL2* após estímulo com mcTHP-1 dos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos de *C. albicans* WT e mutantes, sendo *p = 0,0419 e ****p < 0,0001.

3.10 Transformação de *C. albicans* Cai4.

Este processo foi realizado durante o período de Doutorado Sanduiche na Universidade de Tennessee Health Science Center (UTHSC), sob orientação do Prof. Brian M. Peters, no College of Pharmacy, Memphis, TN, Estados Unidos. Para a transformação da proteína Eno1p primeiramente foram feitas simulações *in silico* do modelamento 3D da construção genética. O resultado da modelagem no programa AlphaFold e confirmação com o modelo Swiss-Model pode ser observado na Figura 27 (Benkert; Biasini; Schwede, 2010; Berman; Henrick; Nakamura; Markley, 2006; Berman; Battistuz; Bhat; Bluhm *et al.*, 2002; Bertoni; Kiefer; Biasini; Bordoli *et al.*, 2017; Bienert; Waterhouse; De beer; Tauriello *et al.*, 2016; Camacho; Coulouris; Avagyan; Ma *et al.*, 2009; Guex; Peitsch; Schwede, 2009; Mariani; Biasini; Barbato; Schwede, 2013; Studer; Biasini; Schwede, 2014; Studer; Rempfer; Waterhouse; Gumienny *et al.*, 2019; Studer; Tauriello; Bienert; Biasini *et al.*, 2021; Varadi; Anyango; Deshpande; Nair *et al.*, 2021; Waterhouse; Bertoni; Bienert; Studer *et al.*, 2018; Waterhouse; Studer; Robin; Bienert *et al.*, 2024). O resultado da modelagem mostra que a estrutura proteica seria estável e não apresentaria regiões de baixa confiança (Figura 27). A qualidade global estimada do modelo foi de 0,96; e quando tomado em conta cada um dos resíduos, de $0,86 \pm 0,05$. Adicionalmente, foi corroborada a identidade em comparação com a Eno1p *wild type*, obtendo um valor de 97,72% de cobertura. Estes resultados foram fundamentais para dar seguimento à construção dos transformantes.

Figura 27 - Modelamento 3D obtido da proteína Eno1p modificada com a sequência de *S. cerevisiae*.



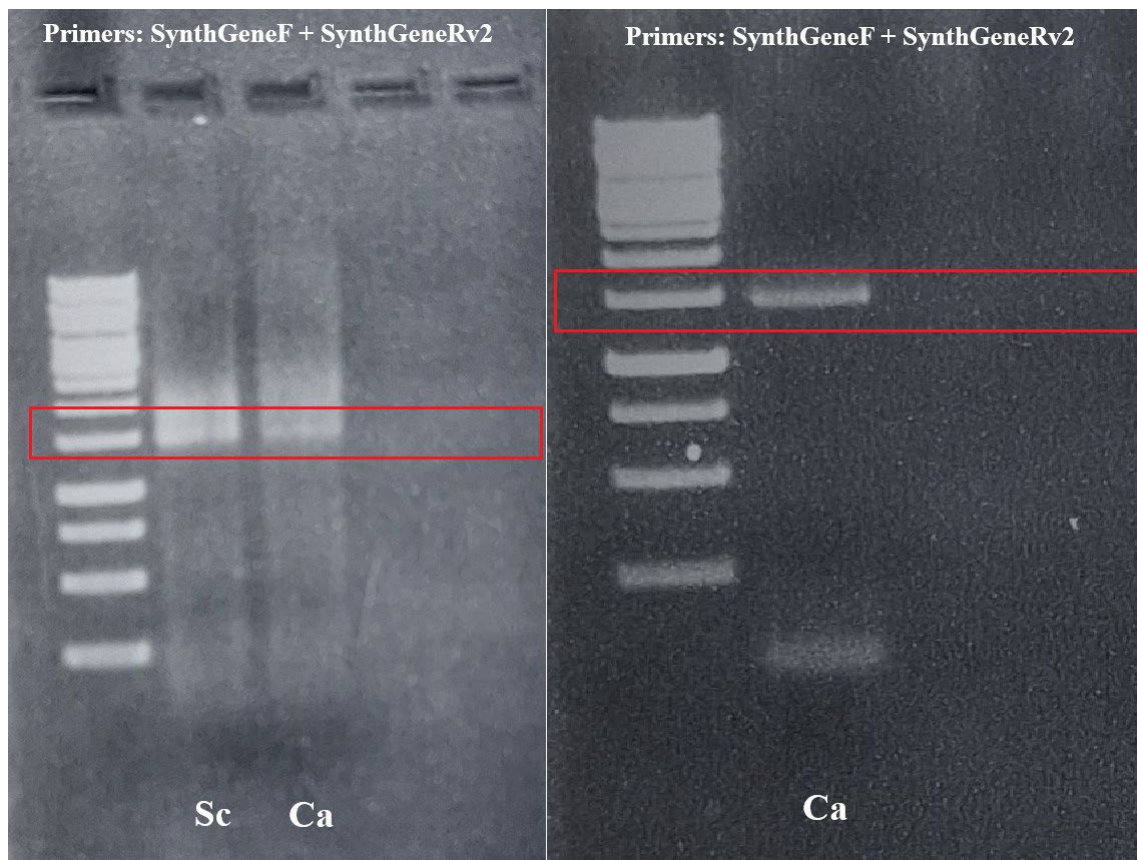
Fonte: Autoria Própria.

O modelamento foi realizado mediante o programa Swiss-Model, a partir da sequência modificada da proteína.

A cor azul demonstra um nível de confiança acima de 0,85. O modelo tem um nível de qualidade global (GMQE) estimada em 0,96 e uma estimativa, por cada resíduo aminoacídico, em $0,86 \pm 0,05$ (QMEANDisCo Global).

Para a validação do processo de transformação foram realizados vários *checkpoints*. Primeiramente, foi realizada uma eletroforese do DNA sintético a ser inserido nos plasmídeos. Foi observado que as amostras formaram uma banda na região de 1.379 bp, o que satisfaz o esperado (Figura 28).

Figura 28 - Gel de agarose após a eletroforese do DNA sintético, com as sequências de *ENO1* sem modificação (*Ca*) e o *ENO1* com modificação (*Sc*).

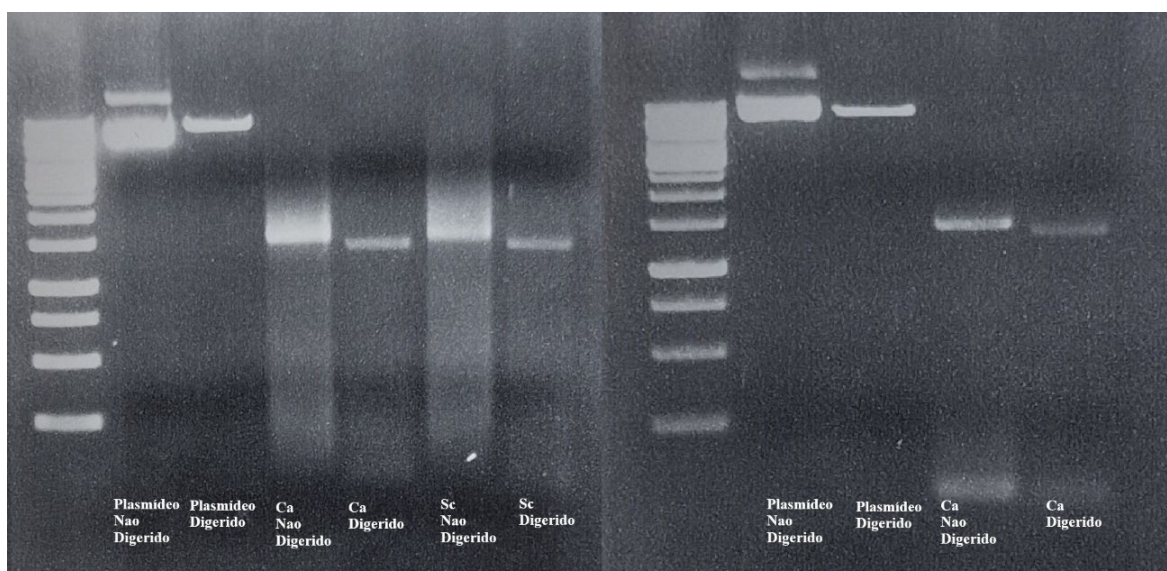


Fonte: Autoria Própria.

Eletroforese em um gel de agarose de 0,5%, por 30 min a 120 V. Sinalizado na imagem em vermelho a região de 1.379 bp, corroborando com a sequência correta. Os primers usados foram SynthGeneF e SynthGeneRv2.

Após a confirmação, o DNA sintético amplificado, assim como o plasmídeo do estudo pKE3, foram digeridos com as enzimas de restrição *Sall* e *MluI* para realização da ligação entre o inserto (DNA sintético) e o plasmídeo. Para checagem da digestão enzimática, assim como do tamanho do produto de digestão, uma nova eletroforese foi realizada (Figura 29). Foi observado uma banda na região de 1.329 bp para o DNA sintético e uma de 8.021 bp para o plasmídeo, conforme o esperado.

Figura 29 - Gel de agarose após a eletroforese realizada com as amostras do plasmídeo e o DNA sintético, antes e depois da digestão com as enzimas de restrição.

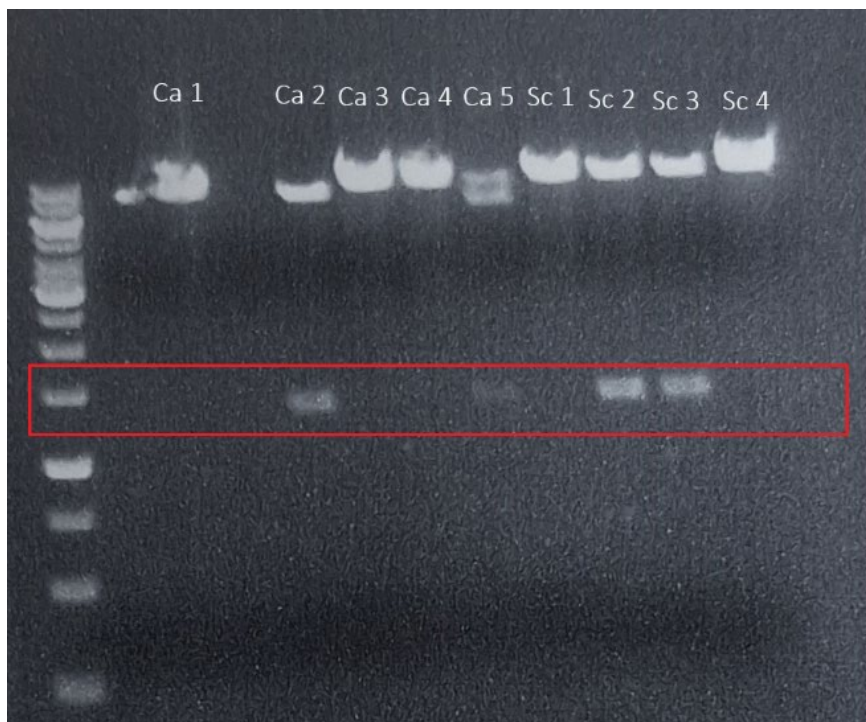


Fonte: Autoria Própria.

Gel de agarose resultante da eletroforese. O plasmídeo e o DNA sintético foram digeridos com as enzimas Sall e MluI. O produto digerido obtido foi de 1.329 bp para o DNA sintético e 8.021 bp para o plasmídeo. As bandas observadas estão de acordo com os resultados esperados.

Após a confirmação da digestão, foi realizado o processo de ligação do inserto (DNA sintético) com o plasmídeo, conforme descrito na secção 10.1.3 em Materiais e Métodos. O plasmídeo utilizado (pKE3), possui um gene de seleção de resistência à ampicilina, pôr o que, foram utilizados meios contendo este antibiótico para a seleção dos transformantes de *E. coli* DH5 α . Desta forma, apenas os transformantes que apresentassem o plasmídeo ligado com a sequência do inserto seriam capazes de crescer em meio LB suplementado com ampicilina. Após obtenção dos transformantes, o plasmídeo foi extraído. Após a extração, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição, e uma nova eletroforese foi realizada para checagem da presença das bandas nos tamanhos esperados: 1.329 bp para os insertos e 8.021 bp para o plasmídeo (Figura 30).

Figura 30 - Gel de agarose após a eletroforese dos plasmídeos extraídos de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo ligado.

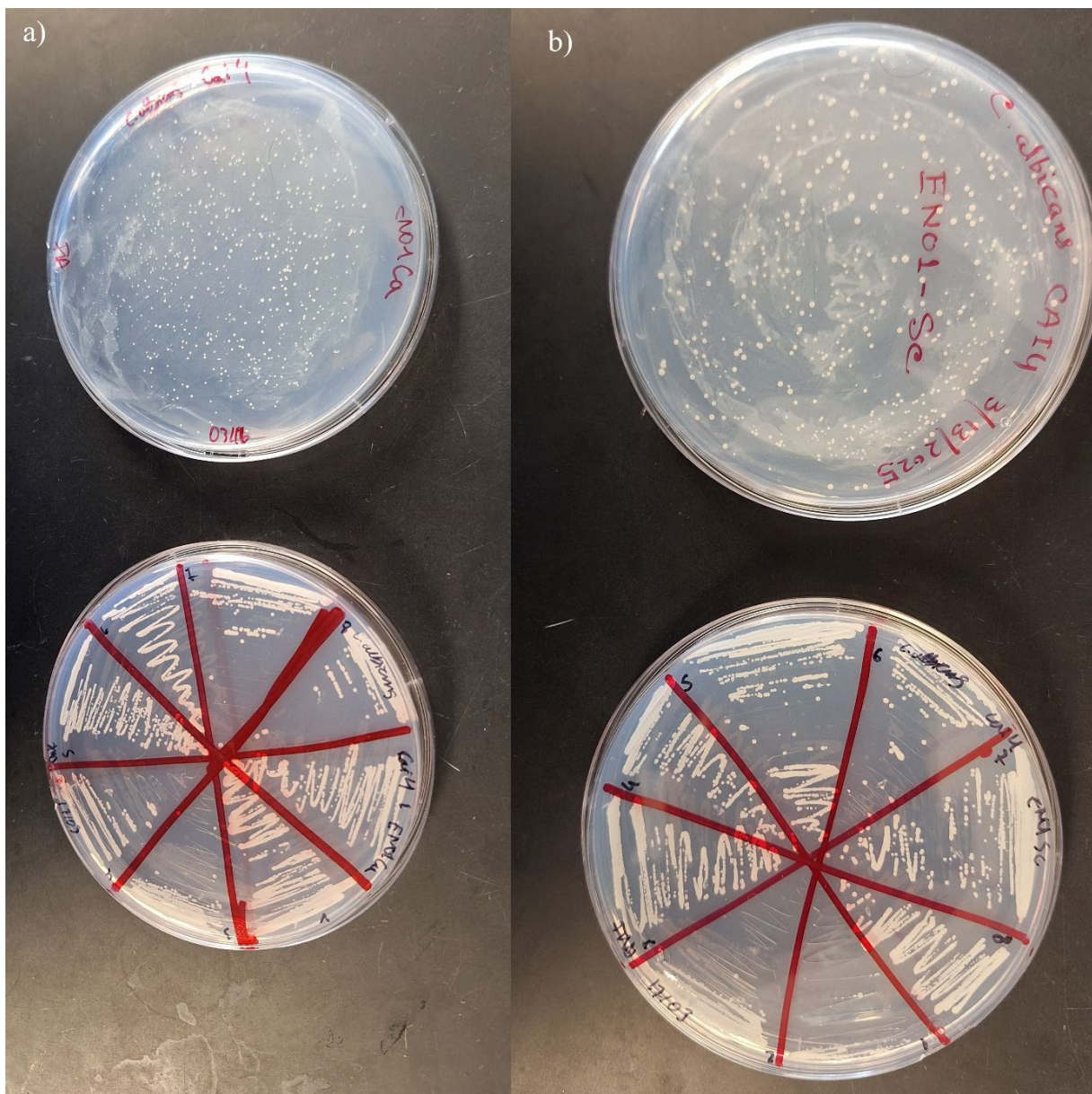


Fonte: Autoria Própria.

Gel de agarose resultante da eletroforese. O plasmídeo foi extraído de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo ligado (Inserto + Plasmídeo PKE3). Na caixa vermelha está sinalizado o tamanho esperado do inserto (1.329 bp). Foi observado o resultado positivo para 2 transformantes de *Ca* (Ca 2 e Ca 5) e 2 transformantes de *Sc* (Sc 2 e Sc 3).

Após confirmação das regiões de interesse, mediante técnica de Sequenciamento Genômico, foi dado continuidade aos ensaios para a transformação de *C. albicans* Cai4. Para isto, os plasmídeos selecionados foram linearizados com a enzima NheI. Com o plasmídeo linearizado foi realizada a transformação de Cai4, e sua cultura em meio contendo nitrato de amônio, seletivo para os transformantes de Cai4 positivos para a inserção do plasmídeo. Após 2 dias, foi observado o crescimento de colônias, as quais foram selecionadas novamente com uma passagem adicional no mesmo meio (Figura 31).

Figura 31 - Crescimento de *C. albicans* Cai4 transformada com o plasmídeo, em placas de YNB suplementado com nitrato de amônio.

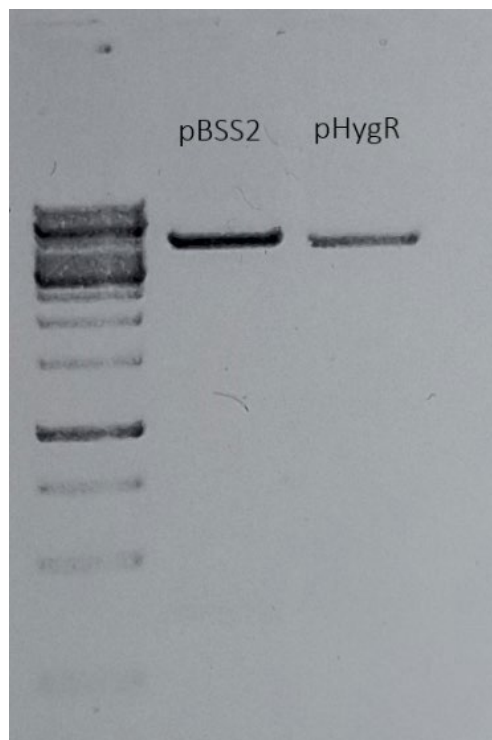


Fonte: Autoria Própria.

O crescimento da cepa Cai4 transformada, a partir dos 2 dias. a) Transformantes obtidos a partir da sequência *Ca*. b) Transformantes obtidos a partir da sequência *Sc*.

Na sequência foram selecionados dois transformantes e foi extraído o DNA para checar, por PCR, a inserção do plasmídeo na região correta do cromossoma. Para isto foram utilizados os seguintes primers: para *Ca*; ENO1DETF + ADH13SEQR (Figura 32, caixa amarela), para *Sc*; ENO1DETF + ENO1SCERVDETR (Figura 32, caixa azul) e para os dois; LUXINTDETF + LUXINTDETR (Figura 32, caixa vermelha). Desta maneira, como resultado, observou-se a amplificação das bandas de 1.077 bp para o par de primers de *Ca*, o que era esperado (Figura 32, caixa amarela). Também foi observada a amplificação das bandas de 431 bp nas amostras

Figura 33 - Fotomicrografia de gel de agarose após a eletroforese do produto amplificado dos plasmídeos pBS22 com os genes *SAT1* e *HygR*.

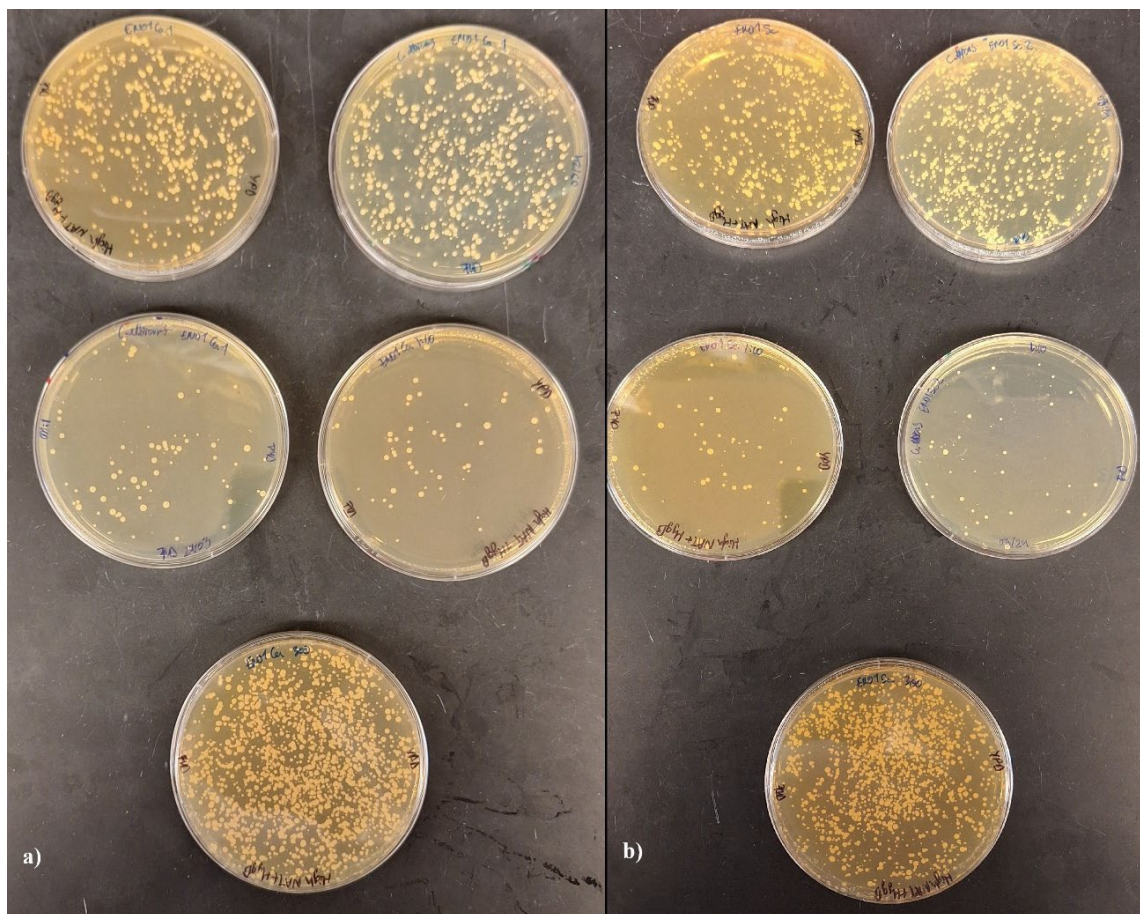


Fonte: Autoria própria.

Fotomicrografia do gel de agarose. A amplificação dos plasmídeos com os primers: ENO1CC9KO-F + ENO1CC9KO-R. Pode -se observar a amplificação dos dois plasmídeos pBSS2 e pHygR (bandas escuras isoladas).

A deleção do gene foi realizada mediante o gRNA e a proteína Cas9. A inserção do material foi realizado mediante eletroporação. Após a eletroporação foi realizado o cultivo da *Cai4* em meio suplementado com higromicina e nourseotricina, para então seleção dos transformantes. Na figura 34 pode ser observado o crescimento dos transformantes nas placas com higromicina e nourseotricina (resistência).

Figura 34 - Crescimento dos transformantes em placas YPD suplementadas com antibióticos.

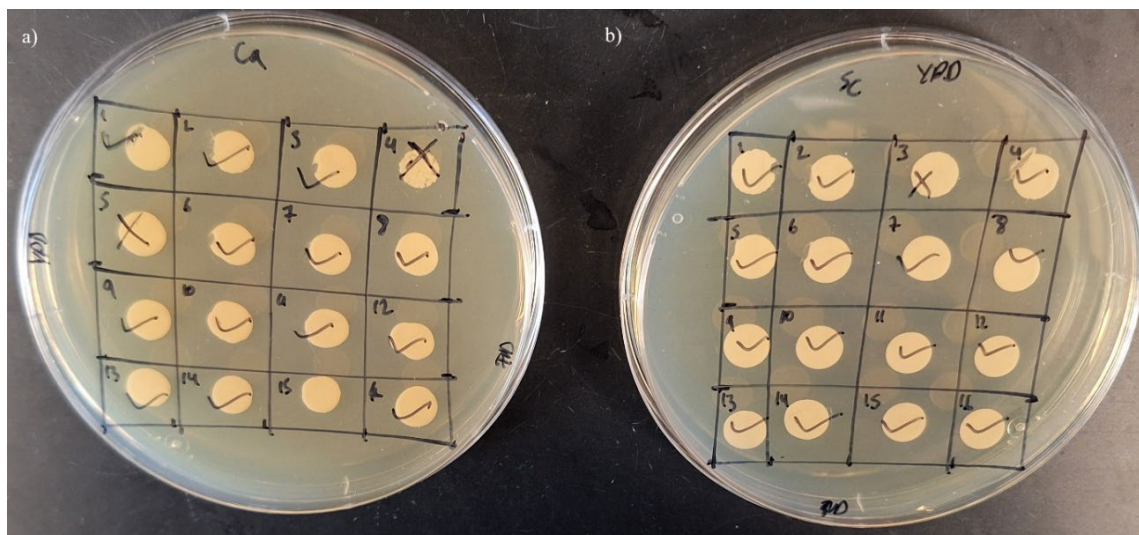


Fonte: Autoria Própria.

A seleção foi realizada com os antibióticos higromicina (HygB) e nourseotricina (NAT). a) Mutantes com a sequência *Ca*. De cima para abaixo são as diluições do inóculo utilizado, sendo as primeiras 1:10, a seguinte 1:100 e a final o inóculo sem diluição. b) Mutantes com a sequência *Sc*. De cima para abaixo são as diluições do inóculo utilizado, sendo as primeiras 1:10, a seguinte 1:100 e a final o inóculo sem diluição.

Para a ativação do Flipper, os transformantes foram crescidos em YPM *overnight*. Para a confirmação da eliminação dos genes de resistência, as cepas foram re-cultivadas nos meios seletivos e em meio YPD sem antibiótico. Na Figura 35, pode-se observar os transformantes que cresceram somente no YPD (assinalado com um visto em preto) e os transformantes que cresceram também nos meios com antibióticos (assinalados com um X). Desta maneira, foram selecionados somente os transformantes sensíveis aos antibióticos.

Figura 35 - Crescimento dos transformantes de Cai4 após a eliminação dos genes de sensibilidade.

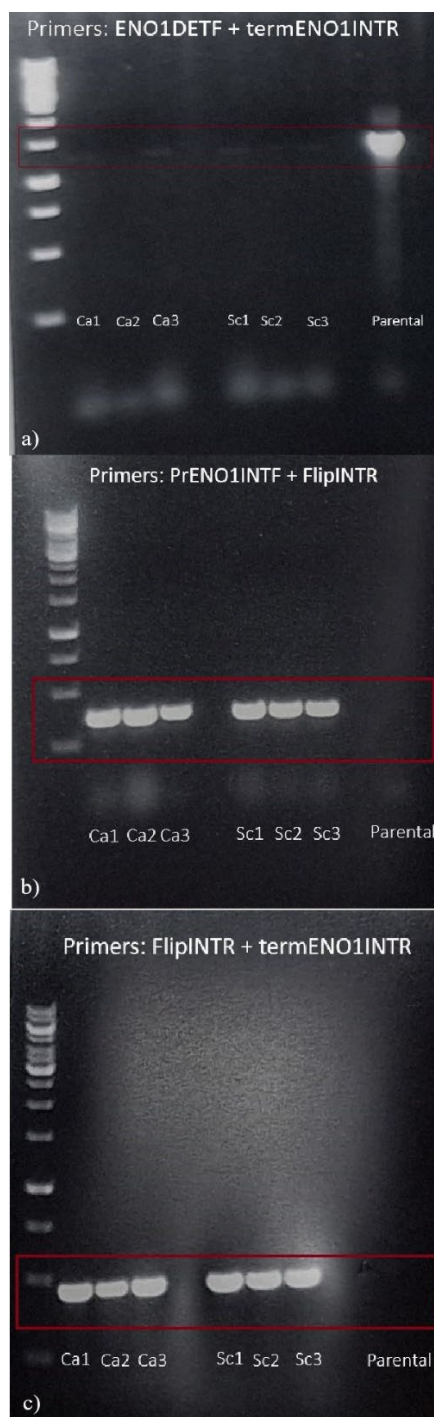


Fonte: Autoria própria.

O crescimento foi realizado em YPD sem antibióticos e em YPD suplementado com higromicina (HygB) e nourseotricina (NAT). a) Cai4 transformada com a sequência *Ca*, o X indica as células que cresceram na presença dos antibióticos, demonstrando que o gene não foi eliminado; os vistos assinalam as células sensíveis. b) Cai4 transformada com a sequência *Sc*, os X assinalam as células que cresceram na presença dos antibióticos, demonstrando que o gene não foi eliminado; os vistos assinalam as células sensíveis.

Finalmente, com os transformantes selecionados, foram realizadas PCR para a confirmação da eliminação do gene *ENO1 wild type*, mas contendo o inserto de interesse. Para isso foi utilizado os primers: ENO1DETF + termENO1INTR com tamanho de 1.406 bp, PrENO1INTF + FlipINTR com tamanho de 359 bp, FlipINTF + termENO1INTR com tamanho de 464 bp. Na Figura 36a pode-se observar a ausência de amplificação nos transformantes, mas a presença da banda na cepa parental, demonstrando a eliminação do gene *ENO1* nos transformantes. Na Figura 36b pode-se observar a amplificação da banda de 359 bp, demonstrando a presença do gene *ENO1* modificado com as sequências *Ca* e *Sc*. Não foi observada esta amplificação na cepa parental, o que comprova a especificidade da técnica realizada. Na Figura 36c pode-se observar a amplificação de bandas de 464 bp nos transformantes e a ausência desta banda na cepa parental, demonstrando o sucesso na transformação das sequências *Ca* e *Sc*.

Figura 36 - Gel de agarose após a eletroforese para a amplificação dos produtos de PCR, com o intuito de confirmação do processo de transformação por CRISPR-Cas9.



Fonte: Autoria Própria.

Gel de agarose, confirmatório da técnica de geração dos mutantes por CRISPR-Cas9. A amplificação foi realizada mediante PCR com os primers: ENO1DETF + termENO1INTR, PrENO1INTF + FlipINTR e FlipINTF + termENO1INTR. a) Eletroforese da amplificação evidenciando ausência de bandas nos transformantes e presença de banda na cepa parental (gene *ENO1* - caixa vermelha na região de 1.406 bp). b) Eletroforese da amplificação realizada com o segundo par de primers, onde pode-se observar ausência de bandas na cepa parental, mas amplificação nos transformantes. Na caixa vermelha está sinalizada a região dos 359 bp. c) Eletroforese da amplificação realizada com o terceiro par de primers, onde pode-se observar a presença de bandas nos transformantes. Não foi observada banda na cepa parental. Na caixa vermelha está sinalizada a região de interesse (464 bp).

4 DISCUSSÃO

Iniciamos a discussão deste trabalho com a padronização do crescimento dos biofilmes em garrafas de cultura de 75 cm². Para isto, foram realizados ensaios de curva de crescimento, visando entender o desenvolvimento e o metabolismo dos micro-organismos após o crescimento de 36 h. Para padronização dos biofilmes a comparação foi realizada com base nos próprios trabalhos do grupo (Amaya Arbeláez; De Paula E Silva; Navegante; Valente *et al.*, 2021; De Carvalho Dias; Barbugli; De Patto; Lordello *et al.*, 2017; Marin-Dett; Barbugli, 2021; Marin-Dett; Campanella; Trovatti; Bertolini *et al.*, 2022). O ensaio de alamarBlue™ foi utilizado para estabelecer uma curva padrão de crescimento. A escolha deste ensaio foi baseada na não toxicidade deste reagente, permitindo a avaliação do crescimento do biofilme por tempos mais longos. Adicionalmente, a técnica possui uma boa correlação com as contagens de UFC/mL e consome pouco tempo experimental, permitindo um estabelecimento fidedigno de uma curva de crescimento (Azeredo; Azevedo; Briandet; Cerca *et al.*, 2017). A curva obtida do biofilme simples de *C. albicans* WT foi similar ao já obtido previamente pelo grupo, demonstrando uma padronização no protocolo de formação deste biofilme (De Carvalho Dias; Barbugli; De Patto; Lordello *et al.*, 2017; Marin-Dett; Barbugli, 2021). Nas imagens de CLSM, podemos observar um biofilme espesso, robusto e formado principalmente por hifas, em acordo com os dados da literatura (Hernandez-Cuellar; Guerrero-Barrera; Avelar-Gonzalez; Díaz *et al.*, 2022), e com resultados prévios do grupo (Amaya Arbeláez; De Paula E Silva; Navegante; Valente *et al.*, 2021; De Carvalho Dias; Barbugli; De Patto; Lordello *et al.*, 2017). Como já mencionado nos métodos, adicionalmente à cepa WT (SC5314), no estudo foram incluídos mutantes de *C. albicans*. O mutante *ece1Δ/Δ* apresentou comportamento semelhante à cepa WT, tanto em termos de UFC, como em relação aos padrões morfológicos e de interação com *S. aureus* (Liu; Vogel; Miao; Carnahan *et al.*, 2022; Liu; Willems; Sansevere; Allert *et al.*, 2021), comprovando que o gene *ECE1* não interfere na formação de biofilme e nem na interação com *S. aureus*. Como já esperado, as mesmas características observadas em WT foram reproduzidas pela cepa revertida *ece1Δ/Δ*+ECE1. No caso do mutante *als3Δ/Δ*, observa-se um menor desenvolvimento de biofilme, devido principalmente à pouca capacidade de adesão desta cepa, mas nenhuma alteração em termos de UFC em comparação com a cepa WT (Deng; Jiang; Jiang; Deng *et al.*, 2021; Roudbarmohammadi; Roudbary; Bakhshi; Katiraei *et al.*, 2016; Schena; Baker; Stark; Thomas *et al.*, 2023; Zhao; Daniels; Oh; Green *et al.*, 2006; Zhao; Oh; Cheng; Green *et al.*, 2004). A baixa capacidade de adesão aos substratos e a não interação com

S. aureus em mutantes do tipo *als3Δ/Δ* já foi amplamente reportada na literatura e é devido à ausência da adesina Als3p (Peters; Ovchinnikova; Krom; Schlecht *et al.*, 2012; Zhao; Daniels; Oh; Green *et al.*, 2006; Zhao; Oh; Cheng; Green *et al.*, 2004). Finalmente, em relação ao mutante *efg1Δ/Δcph1Δ/Δ*, as UFC seguiram o mesmo padrão das outras cepas estudadas, no entanto, este mutante não foi capaz de formar um biofilme verdadeiro, tanto na forma simples, como em combinação com *S. aureus*, o que comprova a importância da formação de hifas para o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*. Nos biofilmes simples de *S. aureus*, foi observado um padrão de crescimento mais prolongado em função do tempo, sem que fosse atingida uma fase de platô dentro das 48 h. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios, como o de Nasser; Dallal; Jahanbakhshi; Azimi *et al.* (2022), em que foi observado que *S. aureus* demanda maior tempo de adesão ao substrato em comparação com *C. albicans*. No entanto, cabe ressaltar, pelos dados de CLSM, que após as 36 h de formação do biofilme, *S. aureus* atinge um padrão morfológico de biofilme maduro, espesso e com formação em *clusters* (De Carvalho Dias; Barbugli; De Patto; Lordello *et al.*, 2017; Hernandez-Cuellar; Guerrero-Barrera; Avelar-Gonzalez; Díaz *et al.*, 2022).

Previamente à inclusão dos mutantes no estudo, foram realizadas quantificações das biomoléculas secretadas pelos biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *S. aureus*. Primeiramente dosamos os carboidratos presentes nestes secretomas. Neste sentido, pesquisas recentes destacam o papel do metabolismo de fontes de carbono na modulação do pH e na atividade das toxinas de *S. aureus* em culturas mistas (Paul; Todd; Eichelberger; Tkaczyk *et al.*, 2024). Cabe destacar, no entanto, que nossos dados não evidenciaram quantidades distintas de carboidratos livres na comparação entre os biofilmes simples e misto. Em seguida, os lipídeos também foram biomoléculas alvo desta etapa do trabalho. Os secretomas provenientes dos biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. aureus* apresentaram também as mesmas quantidades de lipídeos totais por mL. Este padrão está de acordo com resultados anteriores do grupo (Marin-Dett; Campanella; Trovatti; Bertolini *et al.*, 2022), assim como na descrição do comportamento dos biofilmes destes micro-organismos, especialmente para *C. albicans* (Otto, 2018; Zarnowski; Westler; Lacmbouh; Marita *et al.*, 2014). Cabe aqui ressaltar a importância da regulação das rotas de biossíntese de lipídeos no estudo de biofilmes microbianos, sobretudo devido ao seu papel na estrutura das paredes celulares. A homeostase e a regulação destas vias são o alvo principal durante o desenvolvimento de fármacos com propriedades antifúngicas e antibióticas (Lattif; Mukherjee; Chandra; Roth *et al.*, 2011; Singh; Yadav; Prasad, 2012). Por fim, em relação às biomoléculas, a quantificação das proteínas foi realizada, neste primeiro momento, a partir do secretoma dos três biofilmes, sem prévio protocolo de extração ou

precipitação da fração proteica. Nestes resultados, apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas entre os grupos estudados, podemos dizer que, numericamente, os secretomas dos biofilmes simples de *C. albicans* apresentaram 2x menos proteínas totais que os secretomas dos biofilmes simples e misto de *S. aureus*.

Após estabelecimento da parceria com o Prof. Brian M. Peters, decidimos incluir no trabalho o estudo da capacidade hemolítica dos diferentes secretomas, tanto em culturas planctônicas, como nos biofilmes aqui estudados. Como já reportado pelo grupo do Prof. Peters, em co-cultivos planctônicos, *C. albicans* é capaz de aumentar consideravelmente a capacidade hemolítica de *S. aureus* (Todd; Fidel; Harro; Hilliard et al., 2019). No entanto, para nossa surpresa, o comportamento dos biofilmes foi exatamente o oposto já relatado pelo grupo do Prof. Peters. Em biofilmes, *C. albicans* contribuiu de forma negativa, diminuindo a capacidade hemolítica de *S. aureus*. Com o uso dos mutantes, conseguimos observar que este comportamento foi, em grande parte, devido à ação de Als3p e sobretudo à formação de hifas, característica própria dos biofilmes, uma vez que nas culturas planctônicas existem apenas as formas leveduriformes de *C. albicans*, ou seja, morfologia que não permite a interação físico-química direta com *S. aureus*. Estes dados são inéditos e merecem um maior aprofundamento em estudos futuros, uma vez que ressaltam a importância desta regulação em função da capacidade hemolítica (hemolisinas e toxinas hemolíticas de *S. aureus*).

Dando continuidade ao trabalho, agora de forma mais aplicada na resposta das células humanas, focamos em um melhor entendimento do eixo monócitos-células epiteliais, tendo como modelo células inflamatórias THP-1 e células de displasia de cavidade oral, DOK. Primeiramente, nos ensaios de CLSM, para receptores do tipo CD86 e CD163, conseguimos esclarecer, que no nosso modelo, a polarização das células THP-1 obedeceu a um fenótipo M1, com prevalência de marcação das células CD86+, em detrimento ao fenótipo M2 (CD163+). Isto foi ocasionado primordialmente pelo secretoma de *S. aureus* simples, e consideravelmente menor pela ação dos secretomas de *C. albicans* simples e misto.

Esta etapa teve como objetivo mimetizar in vitro as interações do eixo monócitos-células epiteliais, existentes no Microambiente Tumoral (TME). Neste sentido, destacamos a importância do TME como iniciador e regulador da biologia tumoral (Komohara; Jinushi; Takeya, 2014; Mantovani; Sozzani; Locati; Allavena et al., 2002). Outro ponto fundamental no entendimento do TME é a capacidade deste ambiente promover a transição epiteliomesenquima (EMT de *Epithelial-Mesenchymal Transicion*). A EMT consiste na capacidade das células epiteliais em adquirir um fenótipo mais invasivo e resistente à processos de morte celular, como a apoptose. (Ribatti; Tamma; Annese, 2020). De acordo com a literatura, a EMT

ocorre, sobretudo, via modulação de células inflamatórias no TME, principalmente através da secreção de citocinas como IL-8, IL-6 e TNF α (Fernando; Hamilton; Dominguez; David *et al.*, 2016; Ribatti; Tamma; Annese, 2020; Sullivan; Sasser; Axel; Vesuna *et al.*, 2009). Neste sentido, focamos o entendimento da atividade dos diferentes secretomas nas células monocíticas THP-1, uma vez que monócitos são consideradas células “sentinelas” dentro do TME (Ugel; Canè; De Sanctis; Bronte, 2021). Nossos resultados reportam que, após a estimulação com os diferentes secretomas, não houve diminuição da viabilidade das células THP-1, mas sim um aumento na produção das citocinas TNF, IL-1 β e IL-8.

Primeiramente, explorando os dados de TNF, podemos afirmar que *S. aureus* foi um agente indutor deste tipo de resposta e que *C. albicans*, assim como seus mutantes, foram incapazes de induzir a produção de TNF em biofilmes simples. Além disto, em biofilmes mistos, *C. albicans* atuou como um agente inibidor da antigenicidade de *S. aureus*. Esta ação de *C. albicans* foi independente da candidalisina, mas dependente de Als3p e da formação de hifas (*efg1 Δ /cph1 Δ*). Este padrão de resposta se manteve para as demais citocinas detectadas, IL-1 β e IL-8, sendo estes resultados inéditos na literatura.

Explorando o entendimento da relação destas citocinas no eixo monócitos-células epiteliais, começamos a discussão da participação de TNF em processos tumorais. Primeiramente, a literatura reporta que durante processos inflamatórios crônicos, TNF contribui na fuga do sistema imune e na progressão do câncer, mediante o recrutamento de células imunossupressoras (Montfort; Colacios; Levade; Andrieu-Abadie *et al.*, 2019). Além disso, TNF promove a desdiferenciação celular, facilitando o surgimento de células tronco tumorais (Ho; Tang; Chuang; Cha *et al.*, 2012; Li; Xia; Huo; Lim *et al.*, 2012; Montfort; Colacios; Levade; Andrieu-Abadie *et al.*, 2019). Assim como TNF, IL-1 β também está relacionada com a modulação do TME (Rébé; Ghiringhelli, 2020; Ribatti; Tamma; Annese, 2020) e neste sentido, está atrelada ao crescimento tumoral (Kaler; Augenlicht; Klampfer, 2009) e à progressão do câncer (Guo; Qian; Zhao; Li *et al.*, 2013; Kaplanov; Carmi; Kornetsky; Shemesh *et al.*, 2019). Na cavidade oral, estudos relatam que uma alta concentração IL-1 β salivar corresponde, de forma direta, com a severidade das lesões tumorais neste sítio anatômico (Lee; Chang; Syu; Wong *et al.*, 2015). Por fim, a IL-8 destaca-se como uma molécula chave no processo de iniciação da EMT (Fousek; Horn; Palena, 2021) e no processo de composição imunológica do TME. Neste sentido, IL-8 atua recrutando células imunes pro-tumorais, como os neutrófilos e aumenta a produção de NETs (Fousek; Horn; Palena, 2021; Li; Liu; Hu; Zhang *et al.*, 2019). No trabalho de Li; Liu; Hu; Zhang *et al.* (2019) foi observado que a produção de NETs está diretamente relacionada com as etapas mais agressivas do câncer de células

escamosas orais. A presença de IL-8 no TME também está relacionada com uma maior resistência aos tratamentos antitumorais (Robey; Pluchino; Hall; Fojo *et al.*, 2018; Zhai; Shen; Xie; Wu *et al.*, 2019).

Desta maneira, seguimos com o projeto, neste momento utilizando o meio condicionado das células THP-1 (mcTHP-1), previamente incubadas com os diferentes secretomas, dos diferentes biofilmes, simples e mistos, de *C. albicans* e *S. aureus*. Com o intuito de entender esta possível relação, foram realizados ensaios de expressão gênica nas células DOK após o estímulo com os diferentes mcTHP-1. Detalhando o entendimento dos ensaios de expressão gênica, devemos abordar, primeiramente, a escolha do gene endógeno. O gene *HPRT* foi escolhido com base em estudos prévios que asseguram a sua assertividade neste tipo de análise com células epiteliais (Valente; Teixeira; Neder; Okamoto *et al.*, 2009). Em seguida, em relação ao painel de genes selecionados, podemos afirmar que, em nosso estudo, não houve qualquer tipo de modulação nas vias de *mTOR*, *BRAF*, *HRAS* e *AKT*. Já em relação ao gene *PI3KCA*, apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas entre os grupos, podemos relatar que, numericamente, o mcTHP-1 do biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus* foi capaz de aumentar a expressão deste gene em torno de 300%. Aqui podemos aprofundar a discussão nas vias regulatórias de *PI3KCA*, na rota de sinalização mediada pela ativação do inflamassoma NLRP3, um componente fundamental no controle de processos infecciosos, assim como um modulador do TME (Wang; Kong; Zeng; Liu *et al.*, 2016; Zhang; Jiang; Zhang; Hu *et al.*, 2024; Zhao; Shi; Harrison; Hwang *et al.*, 2020).

Seguindo-se, relatamos a modulação do gene de *STAT3*, que apesar de discreta, foi estatisticamente diferente no biofilme simples de *C. albicans* WT, com um aumento de 2x no Fold Change, correspondente a 100% de aumento na expressão de *STAT3*. Neste sentido, este dado está de acordo com dados prévios da literatura, que reportam que *C. albicans* consegue ativar a rota reguladora JAK/STAT (Wang; Yang; Li; Wang *et al.*, 2022).

Por fim, os dados de expressão gênica mais explorados em nosso trabalho foram as modulações desencadeadas no gene de *TP53* e *BCL2*. Primeiramente, lembramos que o gene *TP53* codifica a proteína p53, que apresenta mutações em aproximadamente 65 % dos casos de tumores de cabeça e pescoço (Hernández Borrero; El-Deiry, 2021; Tornesello, 2025; Wang; Tan; Chitkara; Bhatt, 2024). As mutações na proteína p53 podem resultar em três modulações celulares principais. Primeiramente, via ganho de função, permitindo a proliferação celular descontrolada, contribuindo para maior agressividade e aumento da metástase e da resistência das células tumorais aos quimioterápicos (Hernández Borrero; El-Deiry, 2021; Tornesello, 2025). Também citamos as mutações mais comumente encontradas em p53, que são as

mutações na região de ligação com o DNA, e as mutações de perda de função. Na perda de função, p53 não consegue cumprir sua função principal de supressor tumoral, contribuindo para a oncogênese e para a progressão tumoral (Hernández Borrero; El-Deiry, 2021). Nossos resultados mostram que, nas células DOK, estimuladas com o mcTHP-1 proveniente dos biofilmes simples de *S. aureus* e mistos com *als3Δ/Δ* e com *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ*, o gene *TP53* foi *downregulated*. Estes resultados demonstram que, primeiramente *S. aureus* atuou, via THP-1, como um agente pró-tumoral, diminuindo a expressão do gene supressor tumoral *TP53*, e que, *C. albicans*, atuou como um agente antagonista desta ação de *S. aureus*, de maneira depende de Als3p e da formação de hifas, e independente do gene *ECE1*.

Em se tratando do oncogene *BCL2*, devemos reportar que este gene codifica uma proteína, cujo principal papel é atuar como uma proteína anti-apoptótica, ou seja, pró-proliferativa (Singh; Gupta; Comez; Paciaroni *et al.*, 2022). A superexpressão do gene *BCL2* é relatada em diversos tipos de tumores, sobretudo nos tumores hematopoiéticos, e está associada a um pior prognóstico dos casos clínicos (Kaloní; Diepstraten; Strasser; Kelly, 2023; Zhang; Lu; Zhao, 2021). Nossos resultados demonstram, mais uma vez, que *S. aureus* atuou, via THP-1, como um agente pró-tumoral, aumentando a expressão do gene anti-apoptótico *BCL2*, e que, *C. albicans*, atuou como um agente antagonista desta ação de *S. aureus*. No entanto, para *BCL2*, a ação de *C. albicans* foi independente de Als3p, independente do gene *ECE1* e discretamente dependente da formação de hifas, uma vez que, o mutante *efg1Δ/Δ/cph1Δ/Δ* conseguiu reverter esta ação, para um aumento na expressão de *BCL2* inferior a 100%, muito distante da modulação exercida por *S. aureus* simples (em torno de 500% de aumento). Adicionalmente, é importante lembrar que o TME é muito complexo e está mediado por várias respostas, tanto das células que o compõem como de estímulos exteriores. Este estudo permite observar a influência do secretoma de biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* em sinalizações bem específicas e pontuais, dentro da grande complexidade do TME. No entanto, destacamos a importância deste tipo de estudo, como ferramenta inicial para gerar conhecimento e dados científicos que visam elucidar a complexa relação entre micro-organismos e processos tumorais.

Por fim, cabe uma breve discussão sobre o sucesso na geração das cepas mutantes em *Eno1p*, deficiente no domínio de ligação ao plasminogênio humano. O interesse nesta proteína, se deve, em etapas prévias (Marin-Dett; Barbugli, 2021), que culminaram na identificação de sete (07) proteínas *moonlighting*, presentes no secretoma dos biofilmes simples de *C. albicans* de 36 h. Dentre elas, optamos por, em paralelo, aprofundar o entendimento da virulência da *Eno1p*. Primeiramente por se tratar da terceira proteína mais abundante neste secretoma, e a mais abundante dentre as proteínas *moonlighting* por nós encontrada (Marin-Dett; Barbugli,

2021). Ao mesmo tempo, vários estudos demonstram que a Eno1p é capaz de ativar a resposta imune, de maneira altamente especializada, através da geração de anticorpos anti-Eno1 de *C. albicans*, em quadros de infecções sistêmicas (Daud; Dasari; Adelfinger; Langenhorst *et al.*, 2023; Langenhorst; Fürst; Alberter; Vilhena *et al.*, 2023; Luo; Krüger; Knüpfer; Kasper *et al.*, 2016). Além disso, no que tange a patogênese desta proteína, no trabalho de Jong; Chen; Stins; Kim *et al.* (2003) foi descrito que a Eno1p tem a capacidade de se ligar, de maneira específica, ao plasminogênio humano, e que esta interação permite a invasão de *C. albicans* nas barreiras epiteliais. Posteriormente, no estudo de Satala; Satala; Karkowska-Kuleta; Bukowski *et al.* (2020) foi identificada a sequência da Eno1p responsável pela ligação no domínio do plasminogênio humano. Desta maneira, e através da parceria com o Prof. Peters, conseguimos obter mutantes de Eno1p que servirão de ferramenta para futuros estudos que abordem temas relacionados à patogênese de *C. albicans*.

5 CONCLUSÕES

- *C. albicans* e *S. aureus* são capazes de coexistir em cultivos mistos, sem alteração na capacidade de crescimento (UFC/mL), independentemente da ação do gene *ECE1*, das proteínas Als3p e da formação de hifas.
- A ausência de Als3p impossibilita a adesão de *S. aureus* nas hifas de *C. albicans*.
- A incapacidade de formação de hifas por *C. albicans*, impede a formação de biofilmes verdadeiros, sejam simples ou mistos com *S. aureus*.
- A presença de *C. albicans* induz um aumento da capacidade hemolítica de *S. aureus*, em culturas planctônicas; nos biofilmes a presença de *C. albicans* desempenha um papel oposto, diminuindo drasticamente a capacidade hemolítica de *S. aureus*.
- O secretoma do biofilme de *S. aureus* induz à polarização das células THP-1 para um fenótipo M1, ou seja, CD86+, sendo tal capacidade inibida pela presença de *C. albicans* em biofilmes mistos.
- O secretoma do biofilme de *S. aureus* induz à produção de TNF, IL-1 β e IL-8 nas células THP-1, sendo tal capacidade inibida pela presença de *C. albicans* em biofilmes mistos; de maneira dependente da adesina Als3p e da formação de hifas.
- Os meios condicionados das células THP-1 naive, estimulados com o secretoma do biofilme simples de *S. aureus*, foram capazes de modular a expressão gênica de *TP53* e *BCL2* nas células DOK.
- O secretoma do biofilme simples de *S. aureus* demonstrou ser potencialmente pró-inflamatório e pró-tumoral.
- A modulação da expressão gênica de *TP53* e *BCL2*, por *S. aureus*, foi inibida pela presença de *C. albicans* nestes biofilmes mistos, sendo tais respostas parcialmente relacionadas à Als3p e à formação de hifas.
- Como parte de estágio no exterior, desenvolveu-se com sucesso um mutante, via CRISPR Cas-9, de *C. albicans*, com deleção no domínio de ligação da Eno1p no plasminogênio humano, através da troca desta região, pela sequência homóloga, porém não funcional, de *S. cerevisiae*.

REFERÊNCIAS

ABCAM. Lipid Assay Kit (Neutral Lipids). Protocol Booklet. United Kingdom : A B C A M , 2020. (Protocol)

ABCAM. Total Carbohydrate Assay Kit - Quantification. Protocol Booklet. United Kingdom : A B C A M , 2020. (Protocol)

AHMAD-MANSOUR, N.; *et al.* Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 677, 2021. DOI doi:10.3390/toxins13100677.

ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. L. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 4, p. 140, DOI: 10.3390/jof4040140.

ALMSTÅHL, A.; *et al.* Mucosal microflora in head and neck cancer patients. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 16, n. 4, p. 459-466, 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/idh.12348>.

AMAYA ARBELÁEZ, M. I.; *et al.* Proto-Oncogenes and Cell Cycle Gene Expression in Normal and Neoplastic Oral Epithelial Cells Stimulated With Soluble Factors From Single and Dual Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 51, 2021-February-25 2021. Original Research. DOI 10.3389/fcimb.2021.627043.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921-R925, 2020. DOI 10.1016/j.cub.2020.06.081.

ARGIMÓN, S.; *et al.* Developmental Regulation of an Adhesin Gene during Cellular Morphogenesis in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 682-692, 2007. DOI doi:10.1128/ec.00340-06.

ASKEW, C.; *et al.* Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000612, 2009. DOI 10.1371/journal.ppat.1000612.

ATCC. **THP-1 (ATCC® TIB-202™)**. 2020. Disponível em: <https://www.atcc.org/en/Global/Products/1/6/6/6/TIB-202.aspx>. Acesso em: 16 fev. 2020.

AYUNINGTYAS, N. F.; *et al.* Role of *Candida albicans* in Oral Carcinogenesis. **Pathophysiology**, v. 29, n. 4, p. 650-662, Dec 7 2022. DOI 10.3390/pathophysiology29040051.

AZEREDO, J.; *et al.* Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313-351, 2017/05/04 2017. DOI 10.1080/1040841X.2016.1208146.

AZIMI, S.; KLEMENTIEV, A. D.; WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P. Bacterial Quorum Sensing During Infection. **Annu Rev Microbiol**, v. 74, p. 201-219, Sep 8 2020. DOI 10.1146/annurev-micro-032020-093845.

BADER, O.; KRAUKE, Y.; HUBE, B. Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 116, 2008/07/14 2008. DOI 10.1186/1471-2180-8-116.

BAKRI, M. M.; CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; RICH, A. M. Detection of *Candida albicans* ADH1 and ADH2 mRNAs in human archival oral biopsy samples. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 9, p. 704-710, 2014. DOI <https://doi.org/10.1111/jop.12193>.

BATLINER, M.; *et al.* The *Candida albicans* quorum-sensing molecule farnesol alters sphingolipid metabolism in human monocyte-derived dendritic cells. **mBio**, v. 15, n. 8, p. e00732-00724, 2024. DOI doi:10.1128/mbio.00732-24.

BECKER, R. E. N.; *et al.* Tissue- Specific Patterning of Host Innate Immune Responses by *Staphylococcus aureus* α -Toxin. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 5, p. 619-631, 2014. DOI 10.1159/000360006.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2010. DOI 10.1093/bioinformatics/btq662.

BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_1, p. D301-D303, 2006. DOI 10.1093/nar/gkl971.

BERMAN, H. M.; *et al.* The Protein Data Bank. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, n. 6 Part 1, p. 899-907, 2002. DOI doi:10.1107/S0907444902003451.

BERTONI, M.; *et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10480, 2017/09/05 2017. DOI 10.1038/s41598-017-09654-8.

BIENERT, S.; *et al.* The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313-D319, 2016. DOI 10.1093/nar/gkw1132.

BLAGOJEVIC, M.; *et al.* Candidalysin triggers epithelial cellular stresses that induce necrotic death. **Cellular Microbiology**, v. 23, n. 10, p. e13371, 2021. DOI <https://doi.org/10.1111/cmi.13371>.

BOJANG, E.; GHUMAN, H.; KUMWENDA, P.; HALL, R. A. Immune Sensing of *Candida albicans*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 119, 2021.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013/08/01/2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.007>.

BRAUN, B. R.; JOHNSON, A. D. TUP1, CPH1 and EFG1 Make Independent Contributions to Filamentation in *Candida albicans*. **Genetics**, v. 155, n. 1, p. 57-67, 2000. DOI 10.1093/genetics/155.1.57.

CAMACHO, C.; *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009/12/15 2009. DOI 10.1186/1471-2105-10-421.

CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019-September-18 2019. Mini Review. DOI 10.3389/fmicb.2019.02162.

CHAKRAVARTY, D.; *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. **JCO Precision Oncology**, n. 1, p. 1-16, 2017. DOI 10.1200/po.17.00011.

CHEN, Y.; *et al.* The role of the tumor microbiome in tumor development and its treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 13 - 2022, 2022-July-15 2022. Review. DOI 10.3389/fimmu.2022.935846.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021/12/31 2021. DOI 10.1080/21505594.2021.1878688.

CHO, T.; *et al.* Transcriptional changes in *Candida albicans* genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in *N*-acetyl-D-glucosamine medium. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 48, n. 4, p. 159-167, 2007. DOI 10.3314/jjmm.48.159.

COFFELT, S. B.; *et al.* Angiopoietin 2 stimulates tie2-expressing monocytes to suppress t cell activation and to promote regulatory t cell expansion. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4183-4190, 2011. DOI 10.4049/jimmunol.1002802.

COFFELT, S. B.; *et al.* Angiopoietin-2 regulates gene expression in tie2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. **Cancer Research**, v. 70, n. 13, p. 5270-5280, 2010. DOI 10.1158/0008-5472.Can-10-0012.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523-D531, 2022. DOI 10.1093/nar/gkac1052.

COSTA, A. F.; SILVA, L. D. C.; AMARAL, A. C. Farnesol: An approach on biofilms and nanotechnology. **Medical Mycology**, v. 59, n. 10, p. 958-969, 2021. DOI 10.1093/mmy/myab020.

DA SILVA DANTAS, A.; *et al.* Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111-118, 2016/12/01/ 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>.

DAUD, M.; *et al.* Enolase 1 of *Candida albicans* binds human CD4+ T cells and modulates naïve and memory responses. **European Journal of Immunology**, v. 53, n. 11, p. 2250284, 2023. DOI <https://doi.org/10.1002/eji.202250284>.

DE CARVALHO DIAS, K.; *et al.* Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 146-146, 2017. DOI 10.1186/s12866-017-1031-5.

DE VISSER, K. E.; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 374-403, 2023. DOI 10.1016/j.ccell.2023.02.016.

DENG, K.; *et al.* ALS3 Expression as an indicator for *Candida albicans* biofilm formation and drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021-April-29 2021. Original Research. DOI 10.3389/fmicb.2021.655242.

ENGKU NASRULLAH SATIMAN, E. A. F.; *et al.* The role of *Candida albicans* candidalysin ECE1 gene in oral carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 49, n. 9, p. 835-841, 2020. DOI <https://doi.org/10.1111/jop.13014>.

FAN, F.; *et al.* *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, n. 5, p. 106673, 2022/11/01/ 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106673>.

FAN, Y.; HE, H.; DONG, Y.; PAN, H. Hyphae-Specific Genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and Relevant Signaling Pathways in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5, p. 329-335, 2013/12/01 2013. DOI 10.1007/s11046-013-9684-6.

FERNANDO, R. I.; *et al.* IL-8 signaling is involved in resistance of lung carcinoma cells to erlotinib. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, 2016.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011/02/01 2011. DOI 10.1038/nrmicro2475.

FOSTER, T. J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 484-488, 1998. DOI 10.1016/S0966-842X(98)01400-0.

FOUSEK, K.; HORN, L. A.; PALENA, C. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 219, p. 107692, 2021/03/01/ 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107692>.

G, M.; *et al.* Role of *Candida albicans* in chronic inflammation and the development of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Pathogenesis and Therapy**, 2025/03/22/ 2025. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cpt.2025.03.002>.

GAÁLOVÁ-RADOCHOVÁ, B.; *et al.* Effect of quorum sensing molecule farnesol on mixed biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 441, 2023.

GAINZA-CIRAUQUI, M. L.; *et al.* Production of carcinogenic acetaldehyde by *Candida albicans* from patients with potentially malignant oral mucosal disorders. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 3, p. 243-249, 2013. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01203.x>.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; *et al.* *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 2, p. 536-545, 2004. DOI doi:10.1128/EC.3.2.536-545.2004.

GIL-BONA, A.; AMADOR-GARCÍA, A.; GIL, C.; MONTEOLIVA, L. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. **Journal of Proteomics**, v. 180, p. 70-79, 2018/05/30/ 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.002>.

GLAZIER, V. E.; KRYSAN, D. J. Transcription factor network efficiency in the regulation of *Candida albicans* biofilms: it is a small world. **Current Genetics**, v. 64, n. 4, p. 883-888, 2018/08/01 2018. DOI 10.1007/s00294-018-0804-1.

GLAZIER, V. E.; *et al.* Genetic analysis of the *Candida albicans* biofilm transcription factor network using simple and complex haploinsufficiency. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 8, p. e1006948, 2017. DOI 10.1371/journal.pgen.1006948.

GONG, Z.; *et al.* TLR2, TLR4, and NLRP3 mediated the balance between host immune-driven resistance and tolerance in *Staphylococcus aureus*- infected mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105671, 2022/08/01/ 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105671>.

GONZALEZ, J. J. I.; *et al.* TLR4 sensing of IsdB of *Staphylococcus aureus* induces a proinflammatory cytokine response via the NLRP3-caspase-1 inflammasome cascade. **mBio**, v. 15, n. 1, p. e00225-00223, 2024. DOI doi:10.1128/mbio.00225-23.

GOW, N. A. R.; *et al.* Immune Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 10, p. 1565-1571, 2007. DOI 10.1086/523110.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162-S173, 2009. DOI <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>.

GUO, T.; *et al.* Effects of IL-1 β on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells. **Mol Med Rep**, v. 7, n. 1, p. 299-305, 2013/01/01 2013. DOI 10.3892/mmr.2012.1165.

GUPTA, N.; *et al.* Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound. **Burns**, v. 31, n. 3, p. 375-378, 2005/05/01/ 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.11.012>.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-

108, 2004/02/01 2004. DOI 10.1038/nrmicro821.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3914-3922, 2009. DOI doi:10.1128/AAC.00657-09.

HE, Y.; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in *Candida albicans* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022-June-16 2022. Mini Review. DOI 10.3389/fimmu.2022.913028.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol**, v. 13, n. 1, p. 25-32, Mar 2019. DOI 10.1007/s12105-019-01004-6.

HERNANDEZ-CUELLAR, E.; *et al.* Characterization of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilm on different surfaces. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 39, n. 2, p. 36-43, 2022/04/01/ 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.riam.2022.04.001>.

HERNÁNDEZ BORRERO, L. J.; EL-DEIRY, W. S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 1, p. 188556, 2021/08/01/ 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>.

HO, M.-Y.; *et al.* TNF- α induces epithelial–mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a gsk3 β -dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 1109-1119, 2012. DOI 10.1158/1541-7786.Mcr-12-0160.

HONORATO, L.; *et al.* Extracellular Vesicles regulate biofilm formation and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. **mBio**, v. 13, n. 3, p. e00301-00322, 2022. DOI doi:10.1128/mbio.00301-22.

HORNBY, J. M.; KEBARA, B. W.; NICKERSON, K. W. Farnesol Biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid b. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2366-2369, 2003. DOI doi:10.1128/aac.47.7.2366-2369.2003.

HU, Y.; *et al.* *Staphylococcus aureus* Synergized with *Candida albicans* to Increase the Pathogenesis and Drug Resistance in Cutaneous Abscess and Peritonitis Murine Models. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1036, 2021.

INOSHIMA, I.; *et al.* A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1310-1314, 2011/10/01 2011. DOI 10.1038/nm.2451.

JANZON, L.; ARVIDSON, S. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 5, p. 1391-1399, 1990. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08254.x>.

JEFFERY, C. J. Enzymes, pseudoenzymes, and moonlighting proteins: diversity of function in protein superfamilies. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 19, p. 4141-4149, 2020. DOI <https://doi.org/10.1111/febs.15446>.

JEONG, G.-J.; *et al.* Bacterial extracellular vesicles: Modulation of biofilm and virulence properties. **Acta Biomaterialia**, v. 178, p. 13-23, 2024/04/01/ 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.02.029>.

JONG, A. Y.; *et al.* Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 615-622, 2003. DOI <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05060-0>.

JORDE, I.; SCHREIBER, J.; STEGEMANN-KONISZEWSKI, S. The Role of *Staphylococcus aureus* and its toxins in the pathogenesis of allergic asthma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 654, 2023.

KALER, P.; AUGENLICHT, L.; KLAMPFER, L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. **Oncogene**, v. 28, n. 44, p. 3892-3902, Nov 5 2009. DOI 10.1038/onc.2009.247.

KALONI, D.; DIEPSTRATEN, S. T.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis**, v. 28, n. 1, p. 20-38, 2023/02/01 2023. DOI 10.1007/s10495-022-01780-7.

KAPLANOV, I.; *et al.* Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 4, p. 1361-1369, Jan 22 2019. DOI 10.1073/pnas.1812266115.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102237, 2023/02/01/ 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>.

KEARNEY, A.; *et al.* The oral cavity revealed as a significant reservoir of *Staphylococcus aureus* in an acute hospital by extensive patient, healthcare worker and environmental sampling. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 3, p. 389-396, 2020. DOI 10.1016/j.jhin.2020.03.004.

KLOTZ, S. A.; *et al.* Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, n. 4, p. 401-406, 2007/12/01/ 2007. DOI <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.001>.

KÖHLER, J. R.; FINK, G. R. *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p. 13223-13228, 1996. DOI doi:10.1073/pnas.93.23.13223.

KOMOHARA, Y.; JINUSHI, M.; TAKEYA, M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Science**, v. 105, n. 1, p. 1-8, 2014. DOI <https://doi.org/10.1111/cas.12314>.

KONG, E. F.; *et al.* Modulation of *Staphylococcus aureus* Response to Antimicrobials by the *Candida albicans* Quorum Sensing Molecule Farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 10.1128/aac.01573-01517, 2017. DOI doi:10.1128/aac.01573-17.

KRAUSE, J.; GEGINAT, G.; TAMMER, I. Prostaglandin E2 from *Candida albicans* Stimulates the Growth of *Staphylococcus aureus* in Mixed Biofilms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135404, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0135404.

KRUEGER, A.; *et al.* Secreted toxins from *Staphylococcus aureus* strains isolated from keratinocyte skin cancers mediate pro-tumorigenic inflammatory responses in the skin. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2022- January-25 2022. Original Research. DOI 10.3389/fmicb.2021.789042.

KUSTRZEBA-WÓJCICKA, I.; GOLCZAK, M. Enolase from *Candida albicans* — purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 126, n. 1, p. 109-120, 2000/05/01/ 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00169-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00169-3).

LAMRET, F.; *et al.* Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 547, 2020.

LANGENHORST, D.; *et al.* Soluble Enolase 1 of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* Stimulates Human and Mouse B Cells and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 211, n. 5, p. 804-815, 2023. DOI 10.4049/jimmunol.2200318.

LATTIF, A. A.; *et al.* Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. **Microbiology**, v. 157, n. 11, p. 3232-3242, 2011. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.051086-0>.

LECHIEN, J. R.; *et al.* Chronic Maxillary Rhinosinusitis of Dental Origin: A Systematic Review of 674 Patient Cases. **International Journal of Otolaryngology**, v. 2014, p. 465173, 2014/04/08 2014. DOI 10.1155/2014/465173.

LEE, C.-H.; *et al.* IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 4, p. 875-884, 2015/04/01 2015. <https://doi.org/10.1002/jcp.24816>. DOI <https://doi.org/10.1002/jcp.24816>.

LEONHARDT, I.; *et al.* The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 10.1128/mbio.00143-00115, 2015. DOI doi:10.1128/mbio.00143-15.

LI, B.; *et al.* Neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 7, p. 1695-1707, 2019/07/01 2019. DOI 10.1007/s00432-019-02922-2.

LI, C.-W.; *et al.* Epithelial–Mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B–mediated transcriptional upregulation of Twist1. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1290-1300, 2012. DOI 10.1158/0008-5472.Can-11-3123.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2014-December-23 2014. Review. DOI 10.3389/fcimb.2014.00178.

LIU, H.; KÖHLER, J.; FINK, G. R. Suppression of Hyphal Formation in *Candida albicans* by Mutation of a STE12 Homolog. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1723-1726, 1994. DOI doi:10.1126/science.7992058.

LIU, J.; *et al.* Rapid hypothesis testing in *Candida albicans* clinical isolates using a cloning-free, modular, and recyclable system for CRISPR-Cas9 mediated mutant and revertant construction. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, p. e02630-02621, 2022. DOI doi:10.1128/spectrum.02630-21.

- LIU, J.; *et al.* A variant ECE1 allele contributes to reduced pathogenicity of *Candida albicans* during vulvovaginal candidiasis. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 9, p. e1009884, 2021. DOI 10.1371/journal.ppat.1009884.
- LIU, Y.; FILLER, S. G. Candida albicans Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168-173, 2011. DOI doi:10.1128/ec.00279-10.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- LÖFFLER, B.; TUCHSCHERR, L. Staphylococcus aureus Toxins: Promoter or Handicap during Infection? **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 287, 2021.
- LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022/12/31 2022. DOI 10.1080/21505594.2021.2019950.
- LUO, T.; *et al.* Immunoproteomic analysis of antibody responses to extracellular proteins of *Candida albicans* revealing the importance of glycosylation for antigen recognition. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 8, p. 2394- 2406, 2016/08/05 2016. DOI 10.1021/acs.jproteome.5b01065.
- MACDOUGALL, A.; *et al.* UniRule: a unified rule resource for automatic annotation in the UniProt Knowledgebase. **Bioinformatics**, v. 36, n. 17, p. 4643-4648, 2020. DOI 10.1093/bioinformatics/btaa485.
- MADEIRA, F.; *et al.* The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W521-W525, 2024. DOI 10.1093/nar/gkae241.
- MAH, T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061-1072, 2012. DOI 10.2217/fmb.12.76.
- MANTOVANI, A.; *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002. DOI 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
- MARIANI, V.; BIASINI, M.; BARBATO, A.; SCHWEDE, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2722-2728, 2013. DOI 10.1093/bioinformatics/btt473.
- MARIN-DETT, F. H. **Influence of lipids and proteins from *Candida albicans* biofilms in dysplastic and tumoral cells from the oral cavity**. 2021. Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/213767>. Acesso em: 13 abr. 2025
- MARIN-DETT, F. H.; *et al.* Extracellular lipids of *Candida albicans* biofilm induce lipid droplet formation and decreased response to a topoisomerase I inhibitor in dysplastic and neoplastic oral cells. **Journal of Applied Oral Science**, v. 30, 2022. DOI <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0319>.
- MARTIN, H.; KAVANAGH, K.; VELASCO-TORRIJOS, T. Targeting adhesion in fungal pathogen Candida albicans. **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 313-334, 2021. DOI 10.4155/fmc-2020-0052.

MARTORANO-FERNANDES, L.; *et al.* Candida albicans Adhesins Als1 and Hwp1 Modulate Interactions with Streptococcus mutans. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1391, 2023.

MATA-MARTÍNEZ, P.; BERGÓN-GUTIÉRREZ, M.; DEL FRESNO, C. Dectin-1 Signaling Update: New Perspectives for Trained Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13 - 2022, 2022-February-14 2022. Review. DOI 10.3389/fimmu.2022.812148.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251-264, DOI: 10.1007/s00294-013-0400-3.

MENG, Y.; DENG, J.; DENG, W.; SUN, Z. Intra-tumoral bacteria in head and neck cancer: holistic integrative insight. **Cancer Biology & Medicine**, p. 20240311, 2025. DOI 10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0311.

MONTFORT, A.; *et al.* The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10 - 2019, 2019-July-31 2019. Opinion. DOI 10.3389/fimmu.2019.01818.

MOYES, D. L.; *et al.* Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64-68, 2016/04/01 2016. DOI 10.1038/nature17625.

MUKAREMERA, L.; LEE, K. K.; MORA-MONTES, H. M.; GOW, N. A. R. Candida albicans yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. Original Research. DOI 10.3389/fimmu.2017.00629.

NANTEL, A.; *et al.* Transcription profiling of Candida albicans cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 10, p. 3452-3465, 2002. DOI 10.1091/mbc.e02-05-0272.

NASSER, A.; *et al.* Staphylococcus aureus: biofilm formation and strategies against it. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 664-678, 2022. DOI <http://dx.doi.org/10.2174/1389201022666210708171123>.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67-78, 2008/01/01 2008. DOI 10.1038/nrmicro1815.

NICKERSON, J. L.; DOUCETTE, A. A. Rapid and Quantitative Protein Precipitation for Proteome Analysis by Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 5, p. 2035-2042, 2020/05/01 2020. DOI 10.1021/acs.jproteome.9b00867.

NOBILE, C. J.; *et al.* Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. **PLOS Pathogens**, v. 2, n. 7, p. e63, 2006. DOI 10.1371/journal.ppat.0020063.

NOBILE, CLARISSA J.; *et al.* A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans. **Cell**, v. 148, n. 1, p. 126-138, 2012/01/20/ 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>.

NOVICK, R. P.; *et al.* The agr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 248, n. 4, p. 446-458, 1995/08/01 1995. DOI 10.1007/BF02191645.

NOVICK, R. P.; *et al.* Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 10, p. 3967-3975, 1993. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06074.x>.

OHARA-NEMOTO, Y.; HARAGA, H.; KIMURA, S.; NEMOTO, T. K. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal–oral trafficking of the bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 95-99, 2008. DOI <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47561-0>.

OLINGY, C. E.; DINH, H. Q.; HEDRICK, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 309-322, 2019. DOI 10.1002/jlb.4ri0818-311r.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.gpp1123-0023-2018, 2018. DOI doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 677-701, 2003. DOI 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.

PATE, J. C.; JONES, D. B.; WILHELMUS, K. R. Prevalence and spectrum of bacterial co-infection during fungal keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 90, n. 3, p. 289-292, 2006. DOI 10.1136/bjo.2005.081869.

PAUL, S.; *et al.* A fungal metabolic regulator underlies infectious synergism during *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* intra-abdominal co-infection. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 5746, 2024/07/09 2024. DOI 10.1038/s41467-024-50058-w.

PENG, Q.; *et al.* A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 12, 2023. DOI doi:10.3390/antibiotics12010012.

PEREIRA, R.; DOS SANTOS FONTENELLE, R. O.; DE BRITO, E. H. S.; DE MORAIS, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021. DOI 10.1111/jam.14949.

PETERS, B. M.; *et al.* *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology (Reading)**, v. 158, n. Pt 12, p. 2975-2986, Dec 2012. DOI 10.1099/mic.0.062109-0.

PIDWILL, G. R.; *et al.* The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2021- January-19 2021. Review. DOI 10.3389/fimmu.2020.620339.

PIVARD, M.; MOREAU, K.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus* arsenal to conquer the lower respiratory tract. **mSphere**, v. 6, n. 3, p. 10.1128/msphere.00059-00021, 2021. DOI doi:10.1128/msphere.00059-21.

POLKE, M.; LEONHARDT, I.; KURZAI, O.; JACOBSEN, I. D. Farnesol signalling in *Candida albicans* – more than just communication. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 230-243, 2018/03/04 2018. DOI 10.1080/1040841X.2017.1337711.

QIN, Y.; *et al.* Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 7, n. 5, p. 512-526, 2016/07/03 2016. DOI 10.1080/21505594.2016.1138201.

QUECK, S. Y.; *et al.* RNAIII-independent target gene control by the *agr* Quorum-Sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Cell**, v. 32, n. 1, p. 150-158, 2008. DOI 10.1016/j.molcel.2008.08.005.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 528521, 2012/02/08 2012. DOI 10.1155/2012/528521.

RÉBÉ, C.; GHIRINGHELLI, F. Interleukin-1 β and Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1791, 2020. DOI doi:10.3390/cancers12071791.

REYNA-BELTRÁN, E.; *et al.* The *Candida albicans* *ENO1* gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 12, p. 4304-4323, 2018. DOI 10.1074/jbc.M117.810440.

RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020/06/01/ 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>.

RIBEIRO, D. G.; *et al.* Prevalence of *Candida* spp. associated with bacteria species on complete dentures. **Gerodontology**, v. 29, n. 3, p. 203-208, 2012. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2011.00578.x>.

RICHARDSON, J. P.; *et al.* Candidalysin Drives Epithelial Signaling, Neutrophil Recruitment, and Immunopathology at the Vaginal Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 2, p. 10.1128/iai.00645-00617, 2018. DOI doi:10.1128/iai.00645-17.

ROBEY, R. W.; *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 7, p. 452- 464, 2018/07/01 2018. DOI 10.1038/s41568-018-0005-8.

ROUDBARMOHAMMADI, S.; *et al.* ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, n. 1, p. 105, 2016. DOI 10.4103/2277-9175.183666.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427, DOI: 10.1101/cshperspect.a012427.

SANKARI, S. L.; MAHALAKSHMI, K. Oral candidal carriage among patients with oral potential malignant disorders: a case-control study. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 19, 2019.

SATALA, D.; *et al.* Moonlighting proteins at the candidal cell surface. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1046, 2020.

SATALA, D.; *et al.* Structural insights into the interactions of candidal enolase with human vitronectin, fibronectin and plasminogen. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 7843, 2020.

SCHENA, N. C.; *et al.* Constitutive ALS3 expression in *Candida albicans* enhances adhesion and biofilm formation of *efg1*, but not *cph1* mutant strains. **PLOS ONE**, v. 18, n. 7, p. e0286547, 2023. DOI 10.1371/journal.pone.0286547.

SCHLECHT, L. M.; *et al.* Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. **Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 168-181, 2015. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.083485-0>.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012/07/01 2012. DOI 10.1038/nmeth.2089.

THERMO-SCIENTIFIC. Acetone precipitation of proteins. Thermo Scientific-Protein precipitation. Estados Unidos: Thermo Scientific 2009. (Protocols for Protein Precipitation).

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 76, 2019/05/16 2019. DOI 10.1186/s13756-019-0533-3.

SHARMA, S.; *et al.* Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1614, 2023.

SHEPPARD, D. C.; *et al.* Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30480-30489, 2004. DOI 10.1074/jbc.M401929200.

SIGMA-ALDRICH. **DOK**. 2020. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_94122104. Acesso em: 24 fev. 2020.

SINGH, A.; YADAV, V.; PRASAD, R. Comparative lipidomics in clinical isolates of *Candida albicans* reveal crosstalk between mitochondria, cell wall integrity and azole resistance. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39812, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0039812.

SINGH, M.; *et al.* BCL2 G quadruplex-binding small molecules: Current status and prospects for the development of next-generation anticancer therapeutics. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 9, p. 2551-2561, 2022/09/01/ 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.06.002>.

SINGH, T.; *et al.* Evaluation of microbial contamination in removable dental prosthesis at different time of usage. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 27, n. 2, p. 333-339, 2023. DOI 10.4103/jomfp.jomfp_157_23.

SOLL, D. R. *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? **Current Biology**, v. 18, n. 16, p. R717-R720, DOI: 10.1016/j.cub.2008.07.014.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008/03/01 2008. DOI 10.1038/nrmicro1838.

- STUDER, G.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Assessing the local structural quality of transmembrane protein models using statistical potentials (QMEANBrane). **Bioinformatics**, v. 30, n. 17, p. i505-i511, 2014. DOI 10.1093/bioinformatics/btu457.
- STUDER, G.; *et al.* QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765-1771, 2019. DOI 10.1093/bioinformatics/btz828.
- STUDER, G.; *et al.* ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. **PLOS Computational Biology**, v. 17, n. 1, p. e1008667, 2021. DOI 10.1371/journal.pcbi.1008667.
- SUEHNHOLZ, S. P.; *et al.* Quantifying the Expanding Landscape of Clinical Actionability for Patients with Cancer. **Cancer Discovery**, v. 14, n. 1, p. 49-65, 2024. DOI 10.1158/2159-8290.Cd-23-0467.
- SULLIVAN, N. J.; *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2940-2947, 2009/08/01 2009. DOI 10.1038/onc.2009.180.
- SWIDERGALL, M.; *et al.* Activation of EphA2-EGFR signaling in oral epithelial cells by *Candida albicans* virulence factors. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009221, 2021. DOI 10.1371/journal.ppat.1009221.
- TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.gpp1123-0039-2018, 2019. DOI doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0039-2018.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. DOI 10.1093/molbev/msab120.
- TAWARA, Y.; HONMA, K.; NAITO, Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 37, n. 3, p. 119-128, Aug 1996.
- THUL, P. J.; *et al.* A subcellular map of the human proteome. **Science**, v. 356, n. 6340, p. eaal3321, 2017. DOI doi:10.1126/science.aal3321.
- TIAN, X.; DING, H.; KE, W.; WANG, L. Quorum sensing in fungal species. **Annu Rev Microbiol**, v. 75, p. 449-469, Oct 8 2021. DOI 10.1146/annurev-micro-060321-045510.
- TODD, O. A.; *et al.* *Candida albicans* augments *Staphylococcus aureus* virulence by engaging the *Staphylococcal agr* Quorum Sensing System. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e00910-00919, 2019. DOI doi:10.1128/mBio.00910-19.
- TODD, O. A.; NOVERR, M. C.; PETERS, B. M. *Candida albicans* Impacts *Staphylococcus aureus* alpha-toxin production via extracellular alkalinization. **mSphere**, v. 4, n. 6, p. 10.1128/msphere.00780-00719, 2019. DOI doi:10.1128/msphere.00780-19.
- TODD, O. A.; PETERS, B. M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions: lessons beyond koch's postulates. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 81, 2019.

TORNESELLO, M. L. TP53 mutations in cancer: Molecular features and therapeutic opportunities (Review). **Int J Mol Med**, v. 55, n. 1, p. 7, 2025/01/01 2025. DOI 10.3892/ijmm.2024.5448.

TURK, S.; *et al.* Enterotoxins A and B produced by *Staphylococcus aureus* increase cell proliferation, invasion and cytarabine resistance in acute myeloid leukemia cell lines. **Heliyon**, v. 9, n. 9, 2023. DOI 10.1016/j.heliyon.2023.e19743.

UGEL, S.; CANÈ, S.; DE SANCTIS, F.; BRONTE, V. Monocytes in the Tumor Microenvironment. **Annu Rev Pathol**, v. 16, p. 93-122, Jan 24 2021. DOI 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013058.

UHLEN, M.; *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, v. 357, n. 6352, p. eaan2507, 2017. DOI doi:10.1126/science.aan2507.

VALENTE, V.; *et al.* Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 17, 2009/03/03 2009. DOI 10.1186/1471-2199-10-17.

VALENZA, G.; *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 2, p. 123-127, 2008. DOI 10.1016/j.jcf.2007.06.006.

VAN DYCK, K.; *et al.* Adhesion of *Staphylococcus aureus* to *Candida albicans* during co-infection promotes bacterial dissemination through the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10 - 2020, 2021-February-02 2021. Original Research. DOI 10.3389/fcimb.2020.624839.

VARADI, M.; *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439-D444, 2021. DOI 10.1093/nar/gkab1061.

WANG, C.; TAN, J. Y. M.; CHITKARA, N.; BHATT, S. TP53 Mutation-Mediated Immune Evasion in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Cancers**, v. 16, n. 17, p. 3069, 2024.

WANG, F.; *et al.* Mannan-binding lectin regulates the Th17/Treg axis through JAK/STAT and TGF- β /SMAD signaling against *Candida albicans* infection. **J Inflamm Res**, v. 15, p. 1797-1810, 2022. DOI 10.2147/jir.S344489.

WANG, Y.; *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 4, p. 2053-2064, 2016/04/01 2016. DOI 10.3892/or.2016.4569.

WATERHOUSE, A.; *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018. DOI 10.1093/nar/gky427.

WATERHOUSE, A. M.; *et al.* The structure assessment web server: for proteins, complexes and more. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W318-W323, 2024. DOI 10.1093/nar/gkae270.

WICAKSONO, S.; NGOKWE, Z. B.; MCCULLOUGH, M.; YAP, T. The role of oral yeasts in the development and progression of Oral Squamous Cell Carcinoma: A scoping review. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 4, p. 260, 2025.

WONG-ROLLE, A.; WEI, H. K.; ZHAO, C.; JIN, C. Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer. **Protein & Cell**, 2020/12/09 2020. DOI 10.1007/s13238-020-00813-8.

YAMAZAKI, Y.; *et al.* The role of Staphylococcus aureus quorum sensing in cutaneous and systemic infections. **Inflammation and Regeneration**, v. 44, n. 1, p. 9, 2024/03/01 2024. DOI 10.1186/s41232-024-00323-8.

YANG, Y.-L.; CHEN, H.-F.; KUO, T.-J.; LIN, C.-Y. Mutations on CaENO1 in Candida albicans inhibit cell growth in the presence of glucose. **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 3, p. 313-321, 2006/05/01 2006. DOI 10.1007/s11373-005-9054-6.

ZARNOWSKI, R.; *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-01314, 2014. DOI 10.1128/mBio.01333-14 %J mBio.

ZHAI, J.; *et al.* Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 454, p. 37-43, 2019/07/10/ 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.002>.

ZHANG, L.; LU, Z.; ZHAO, X. Targeting Bcl-2 for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 1, p. 188569, 2021/08/01/ 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188569>.

ZHANG, W.; *et al.* Malignant transformation and treatment recommendations of chronic hyperplastic Candidiasis—A six-year retrospective cohort study. **Mycoses**, v. 64, n. 11, p. 1422-1428, 2021. DOI <https://doi.org/10.1111/myc.13371>.

ZHANG, Y.; *et al.* Role of GLCCI1 in inhibiting PI3K- induced NLRP3 inflammasome activation in asthma. **Chinese Medical Journal Pulmonary and Critical Care Medicine**, v. 2, n. 4, p. 279-288, 2024. DOI doi:10.1016/j.pccm.2024.11.007.

ZHAO, W.; *et al.* AKT regulates NLRP3 inflammasome activation by phosphorylating NLRP3 serine 5. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 8, p. 2255-2264, 2020. DOI 10.4049/jimmunol.2000649.

ZHAO, X.; *et al.* Candida albicans Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2287-2299, 2006. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.28959-0>.

ZHAO, X.; *et al.* ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a Candida albicans adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2415-2428, 2004. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.26943-0>.

APÊNDICE A – SEQUÊNCIA DO DNA SINTÉTICO ENO1 CA

5’-

CGCAGTTACGGATCAGTCACGTCGACATGTCTTACGCCACTAAAATCCACGCCAG
 ATACGTCTACGACTCCAGAGGTAACCCAACCGTTGAAGTTGATTTACACCACCGAC
 AAAGGTTTATTTCAGATCAATTGTCCCATCTGGTGCCTCTACTGGTGTCCACGAAGC
 TTTGGAATTGAGAGATGGTGACAAATCCAAATGGTTAGGTAAAGGTGTTTTGAAA
 GCCGTTGCCAATGTTAATGACATCATTGCCCCAGCTTTAATAAAAGCCAAGATCG
 ATGTTGTGGACCAAGCTAAGATTGATGAATTCTTGTTGTCCTTGGACGGTACTCCA
 AACAAATCCAAATTGGGTGCCAATGCTATCTTGGGTGTTTCTTTGGCTGCTGCCAA
 TGCTGCCGCTGCTGCTCAAGGCATTCCATTGTACAAACACATTGCCAACATTTCCA
 ATGCCAAGAAAGGTAAATTCGTTTTGCCAGTTCCATTCCAAAACGTTTTGAACGG
 TGGTTCCCATGCTGGTGGTGCTTTAGCTTTCCAAGAATTTATGATTGCCCCAACTG
 GTGTCTCCACTTTCTCTGAAGCTTTGAGAATTGGTTCAGAAGTTTACCACAACCTG
 AAATCTTTGACCAAGAAGAAATACGGTCAATCCGCTGGTAACGTCGGTGACGAA
 GGTGGTGTGCTCCAGATATCAAACTCCAAAGGAAGCTTTGGACTTGATCATGG
 ATGCCATTGACAAAGCCGGTTACAAAGGTAAGGTTGGTATTGCCATGGATGTTGC
 TTCATCTGAATTCTACAAGGACGGTAAATACGACTTGGACTTTAAAAACCCAGAA
 TCCGACCCATCTAAATGGTTGTCTGGCCCACAATTGGCTGACTTATATGAACAATT
 GATTTCCGAATACCCAATTGTTTCTATTGAAGATCCATTCGCTGAAGATGACTGG
 GATGCTTGGGTCCACTTCTTTGAAAGAGTTGGTGACAAGATCCAAATTGTCGGTG
 ATGATTTGACTGTCACTAACCCTACCAGAATCAAGACTGCCATTGAAAAGAAAGC
 CGCTAATGCTTTGTTGTTGAAGGTTAACCAAATTGGTACTTTGACTGAATCTATAC
 AAGCTGCTAACGATTCTTACGCTGCTGGTTGGGGTGTCATGGTTTCCCACAGATCC
 GGTGAAACCGAAGATACTTTTCATTGCTGACTTGTGAGTTGGTTTAAGATCTGGTC
 AAATCAAGACTGGTGCTCCAGCCAGATCTGAAAGATTGGCCAAATTGAACCAAA
 TCTTGAGAATCGAAGAAGAATTAGGTTCTGAAGCTATCTACGCTGGTAAAGATTT
 CCAAAGGCTTCTCAATTGTAAACGCGTGAATCATCGTAAGCTATCGTAGCG – 3’

APÊNDICE B – SEQUÊNCIA DO DNA SINTÉTICO ENO1 SC

5'

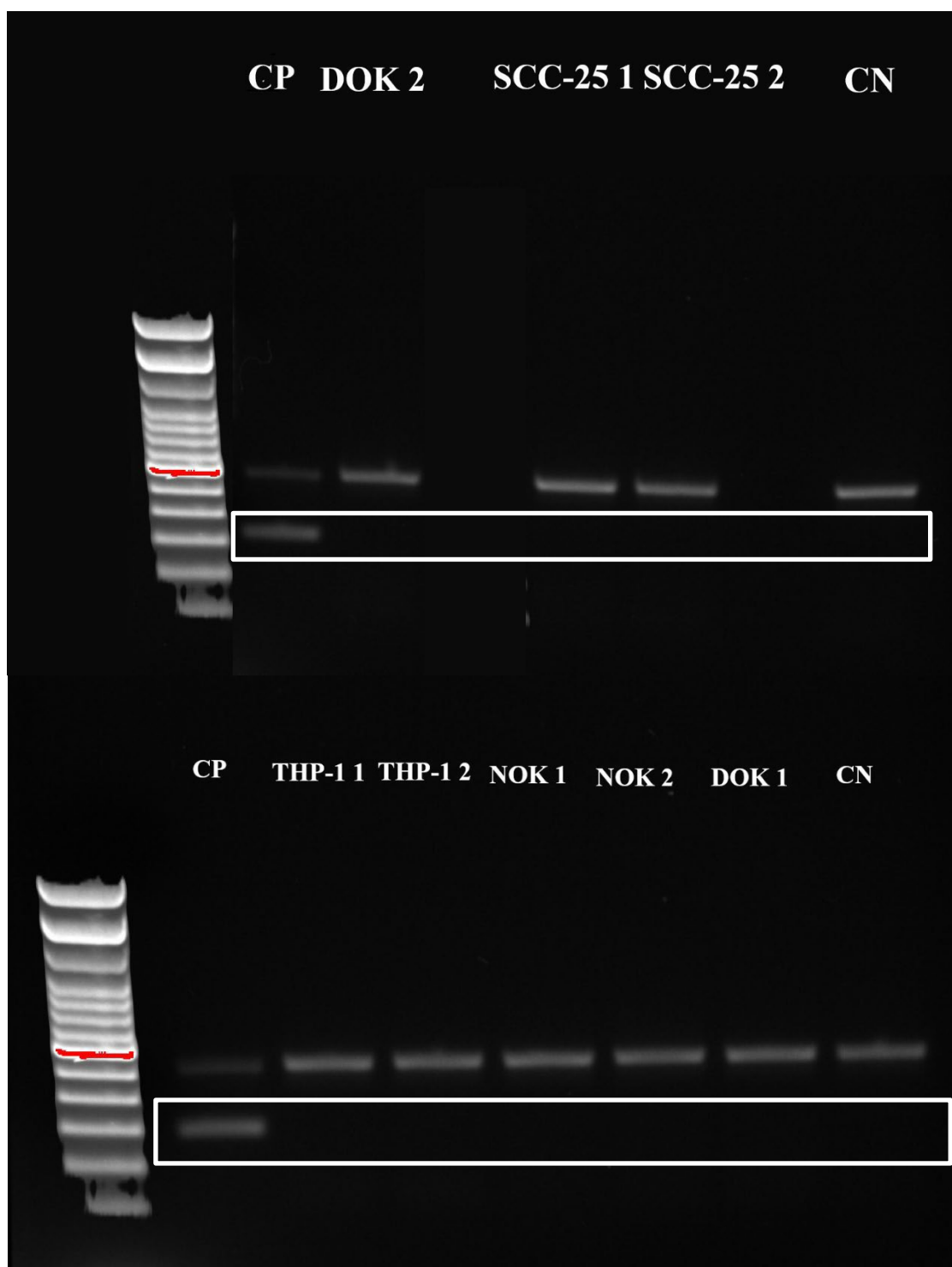
CGCAGTTACGGATCAGTCACGTCGACATGTCTTACGCCACTAAAATCCACGCCAG
 ATACGTCTACGACTCCAGAGGTAACCCAACCGTTGAAGTTGATTTACCACCGAC
 AAAGGTTTATTTCAGATCAATTGTCCCATCTGGTGCCTCTACTGGTGTCCACGAAGC
 TTTGGAATTGAGAGATGGTGACAAATCCAAATGGTTAGGTAAAGGTGTTTTGAAA
 GCCGTTGCCAATGTTAATGACATCATTGCCCCAGCTTTAATAAAAGCCAAGATCG
 ATGTTGTGGACCAAGCTAAGATTGATGAATTCTTGTTGTCCTTGGACGGTACTCCA
 AACAAATCCAAATTGGGTGCCAATGCTATCTTGGGTGTTTCTTTGGCTGCTGCCAA
 TGCTGCCGCTGCTGCTCAAGGCATTCCATTGTACAAACACATTGCCAACATTTCCA
 ATGCCAAGAAAGGTAAATTCGTTTTGCCAGTTCCATTCCAAAACGTTTTGAACGG
 TGGTTCCCATGCTGGTGGTGCTTTAGCTTTCCAAGAATTTATGATTGCCCCAACTG
 GTGTCTCCACTTTCTCTGAAGCTTTGAGAATTGGTTCAGAAGTTTACCACAACCTTG
 AAATCTTTGACCAAGAAGAAATACGGTCAATCCGCTGGTAACGTCGGTGACGAA
 GGTGGTGTGCTCCAGATATCAAACTCCAAAGGAAGCTTTGGACTTGATCATGG
 ATGCCATTAAGGCTGCCGGACATGACGGGAAGATCAAGATTGGGTTAGATTGTGC
 CTCCAGTGAATTTTTCAAGGACGGTAAATACGACTTGGACTTTAAAAACCCAGAA
 TCCGACCCATCTAAATGGTTGTCTGGCCCACAATTGGCTGACTTATATGAACAATT
 GATTTCCGAATACCCAATTGTTTCTATTGAAGATCCATTGCTGAAGATGACTGG
 GATGCTTGGGTCCACTTCTTTGAAAGAGTTGGTGACAAGATCCAAATTGTCGGTG
 ATGATTTGACTGTCACTAACCCTACCAGAATCAAGACTGCCATTGAAAAGAAAGC
 CGCTAATGCTTTGTTGTTGAAGGTTAACCAAATTGGTACTTTGACTGAATCTATAC
 AAGCTGCTAACGATTCTTACGCTGCTGGTTGGGGTGTCATGGTTTCCCACAGATCC
 GGTGAAACCGAAGATACTTTCATTGCTGACTTGTCAGTTGGTTTAAGATCTGGTC
 AAATCAAGACTGGTGCTCCAGCCAGATCTGAAAGATTGGCCAAATTGAACCAAA
 TCTTGAGAATCGAAGAAGAATTAGGTTCTGAAGCTATCTACGCTGGTAAAGATTT
 CCAAAAGGCTTCTCAATTGTAAACGCGTGAATCATCGTAAGCTATCGTAGCG – 3'

APÊNDICE C – TESTE DA PRESENÇA DE MICOPLASMA NAS CÉLULAS DO ESTUDO E VALIDAÇÃO DO GENE ENDÓGENO

Protocolo utilizado para o teste para verificação da presença de micoplasma

Para a avaliação da presença de micoplasma nas células a serem estudadas foi utilizado o kit LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, EUA, Cód. MP0035). Para os ensaios foram seguidas as instruções do fabricante. Para o ensaio foi utilizado meio de cultivo das garrafas de células com uma confluência do 90%. Primeiro, 100 µL deste meio foi transferido para um tubo de 1,5 mL, fervido a 95 °C por 5 min. As amostras foram centrifugadas brevemente (500 xg por 5 min) para remover os *debris* celulares. O meio foi transferido para novo tubo. Para a preparação da amostra, foram pipetados 23 µL do buffer de DNA polimerase/Reidratação (fornecido pelo kit) e 2 µL das amostras e do controle positivo (fornecido pelo kit). Para o controle negativo foram adicionados 2 µL de água destilada. Finalmente, foi adicionado 0,5 µL da JumpStart Taq polimerase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA, Cód. D9307). A PCR foi realizada por: Desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; após 40 ciclos formados por desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 40 s. Depois da PCR foi realizada a eletroforese para observação dos resultados. O gel de agarose usado na eletroforese foi de 1.2%. A eletroforese foi realizada a 70 V por 35 min. As células orais foram avaliadas para a presença de micoplasma antes da realização dos testes do painel de genes. O controle positivo corresponde à uma banda de 250 pares de bases (bp). O controle negativo apresenta uma banda em 481 bp (Figura 37).

Figura 37 - Resultados do teste de checagem de contaminação por micoplasmas.



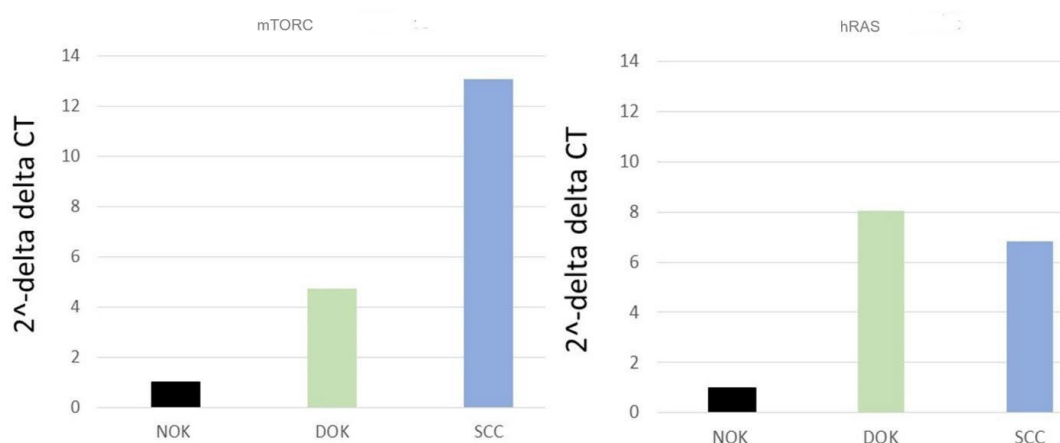
Fonte: Autoria própria.

Gel de agarose de produto de PCR, para checagem de contaminação com micoplasmas, nas linhagens celulares. O resultado do teste demonstrou a não contaminação por micoplasmas, devido à ausência de amplificações na região de 250 bp (quadro branco). (CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo).

Validação do gene endógeno

A validação do gene endógeno foi realizada nas linhagens celulares orais, NOK; DOK e SCC-25. Para a validação foram utilizados dois genes previamente reportados, com uma expressão anormal nas linhagens citadas. A expressão dos genes *mTOR* e *hRAS* nas células NOK, DOK e SCC-5 foram condizentes com a literatura (Figura 38) (Thul; Åkesson; Wiking; Mahdessian *et al.*, 2017; Uhlen; Zhang; Lee; Sjöstedt *et al.*, 2017). A figura 39a e 39b representam os valores de expressão gênica de acordo com a Base de Dados, *The Human Protein Atlas*.

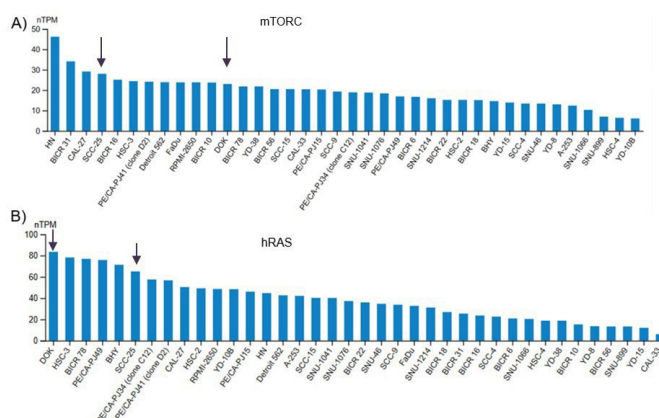
Figura 38 - Quantificação do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de *mTORC* e *hRAS* nas linhagens orais (NOK, DOK e SCC-25).



Fonte: Autoria própria.

PCR para validação do gene endógeno *HPRT*, mediante a quantificação de *mTORC* e *hRAS* nas linhagens NOK, DOK e SCC-25. Observou-se uma expressão destes oncogêneses em acordo com os graus de progressão de malignidade das linhagens testadas.

Figura 39 - Dados de *mTORC* e *hRAS* em câncer de cabeça e pescoço (CPP).



Fonte: Adaptado de Thul; Åkesson; Wiking; Mahdessian *et al.* (2017); Uhlen; Zhang; Lee; Sjöstedt *et al.* (2017).

Expressão de *mTORC* e *hRAS* no CPP. A). Expressão de *mTORC* em CPP, as setas marcam as células DOK e SCC-25. B) Expressão de *hRAS* em CPP, as setas marcam as células DOK e SCC-25.

REFERÊNCIAS

THUL, P. J.; *et al.* A subcellular map of the human proteome. **Science**, v. 356, n. 6340, p. eaal3321, 2017. DOI doi:10.1126/science.aal3321.

UHLEN, M.; *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, v. 357, n. 6352, p. eaan2507, 2017. DOI doi:10.1126/science.aan2507.