

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2025.



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



**Amanda Brandão Soares**

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

**Araraquara**

**2021**



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



**Amanda Brandão Soares**

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

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

**Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**

**Araraquara**

**2021**

S676a

Soares, Amanda Brandão

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

139 p. : il., tabs.

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

Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**Amanda Brandão Soares**

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

**Comissão julgadora**

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

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

3º Examinador: Prof. Dr. Heitor Marques Onório

Araraquara, 07 de julho de 2021

## **DADOS CURRICULARES**

**Amanda Brandão Soares**

**NASCIMENTO:** 11/11/1995 – Salvador, Bahia

**FILIAÇÃO:** Milton Carlos Soares  
Núbia Silva Brandão Soares

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

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

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

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

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pelo uso do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biologia Molecular.

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

## SUMÁRIO

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

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>136</b>

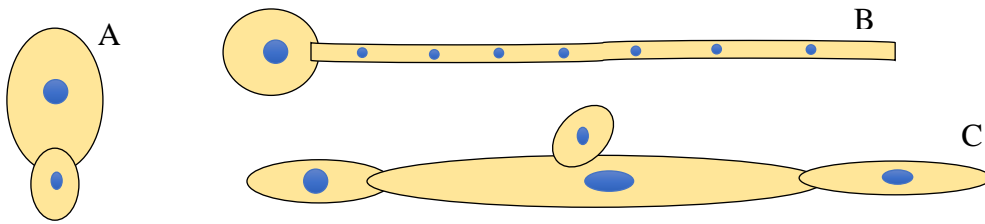
## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é um fungo patógeno oportunista que pode colonizar de forma comensal muitas áreas do corpo humano, como mucosas oral e genital, na qual sua proliferação é controlada pelo sistema imune do próprio hospedeiro<sup>1</sup>. Entretanto, sob condições específicas, como diabetes, medicamentos para câncer, antibioticoterapia, xerostomia, uso de próteses dentárias e, principalmente, supressão imunológica, *C. albicans* pode tornar-se patogênico, causando infecções superficiais (candidíase oral e vaginal) até infecções sistêmicas e generalizadas (candidemia)<sup>2-7</sup>.

A característica oportunista de *C. albicans* em fazer a transição de comensal para sua forma virulenta está fortemente associada a sua capacidade de alternar morfológicamente entre formas de levedura e filamentos (hifas e pseudo-hifas), propriedade esta denominada de polimorfismo, que é fundamental para sua patogênese e para sua capacidade de formação de biofilme (comunidade microbianas aderidas a uma superfície e envoltas de matriz polimérica produzida pelas próprias células microbianas)<sup>8-10</sup>. Levedura consiste em um brotamento unicelular com formato redondo e bem definido. Já a forma filamentar de pseudo-hifas são morfológicamente distinguíveis das hifas, pois pseudo-hifas têm constricções nos locais de septação e são mais largas do que hifas. Já as hifas são alongadas e com as paredes completamente paralelas e sem constricções no local da septação<sup>11</sup> (Figura 1). As morfologias também se diferenciam quanto a quantidade de núcleos; enquanto a levedura é uma estrutura uninucleada, hifas e pseudo-hifas são multinucleadas<sup>11</sup>.

O polimorfismo pode ser desencadeado por uma variedade de estímulos, como temperatura corporal (37 °C), presença de soro, baixo nível de nitrogênio, presença de glicose, disponibilidade de aminoácidos, pH neutro e condições de microaerofilia, como CO<sub>2</sub> a 5%<sup>12,13</sup>.

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



Fonte: Elaboração do autor.

Diversos métodos têm sido utilizados para se quantificar micro-organismos. O método de quantificação por unidades formadoras de colônias (UFC/mL), ou cultivo em ágar, apesar de ser um método amplamente utilizado, é considerado lento e laborioso<sup>14</sup>, pois o crescimento de colônias necessita de dias para seu desenvolvimento, além de requerer a homogeneização das células fúngicas previamente ao seu plaqueamento.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) também tem sido utilizada para identificação e quantificação de espécies, principalmente de micro-organismos não cultiváveis. A qPCR se baseia na replicação do DNA cromossomal extraído da célula, o qual é detectado, amplificado e quantificado por sinais de fluorescência de maneira específica, eficiente e fidedigna<sup>15</sup>. Um fator importante para a determinação de viabilidade por qPCR diz respeito à amplificação somente de células viáveis. Como todo o DNA presente na amostra pode ser ligado especificamente ao primer (sequência de oligonucleotídeos utilizada para se ligar ao DNA genômico), a qPCR não diferencia o DNA de células vivas, mortas e o DNA extracelular (eDNA) da matriz do biofilme. O DNA de células mortas se mantém

estável por períodos prolongados<sup>16</sup>, o que acarreta em uma quantificação sobreestimada da amostra avaliada.

Apesar de existir uma ampla disponibilidade de métodos para quantificação microbiana, a quantificação de fungos filamentosos ainda não é precisa. As diferenças morfológicas que o fungo apresenta comprometem a reprodutibilidade da quantificação por UFC/mL<sup>17</sup>, uma vez que uma única levedura produz um UFC/mL, assim como uma única pseudo-hifa com diversos compartimentos e ramos. Já quando esses compartimentos e ramos de uma única pseudo-hifa são separados, eles produzem um número maior de UFC/mL. Assim, o valor de UFC/mL para uma cultura de *C. albicans* com as diversas morfologias do micro-organismo não corresponde ao número exato de células, subestimando esse valor.

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

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

## 7 CONCLUSÃO

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

## REFERÊNCIAS\*

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

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

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

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

40. Kratzer C, Graninger W, Macfelda K, Buxbaum A, Georgopoulos A. Comparative activities of antibiotics against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. Wien Klin Wochenschr. 2007; 119(9–10): 297–302.
41. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57(10): 1539–50.
42. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008; 3(12): 1909–24.
43. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. Cell. 2012; 148: 126–38.
44. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol. 2006; 8(9): 1382–91.
45. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramanian A, Köhler JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. PLoS Pathog. 2010; 6(3): 1-14.
46. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. J Fungi (Basel). 2017; 3(1): 1-8.
47. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2018; 5(4): 1-13.
48. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(2): 510-20.
49. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112(13): 4092-7.
50. Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. PLoS Biol. 2018; 16(10): e2006872.
51. Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Modulation of *Candida albicans* biofilm by different carbon sources. Mycopathologia. 2016; 181(5-6): 341-52.

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

64. Scudiero D, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48: 4827-33.
65. Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol.* 2012; 50: 214–8.
66. Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, Thurnheer T. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res.* 2013; 48(4): 517–26.
67. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 1052–60.
68. Khot PD, Suci PA, Tyler BJ. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: Assessment using metabolic assays and colony forming units. *J Microbiol Methods.* 2008; 72(3): 268–74.
69. Walsh TJ, Venanzi WE, Dixon DM. Quantification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by a spiral inoculation system: correlation with pour plate and spread plate methods. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(5): 745–7.
70. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods.* 2018; 147: 1–13.
71. Gabrielli E, Roselletty E, Luciano E, Sabbatini S, Mosci P, Pericolini E. Comparison between bioluminescence imaging technique and CFU count for the study of oropharyngeal candidiasis in mice. *Cytometry A.* 2015; 87(5): 428-36.
72. Pietrella D, Angiolella L, Vavala E, Rachini A, Mondello F, Ragno R, et al. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11(18): 1-10.
73. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Front Immunol.* 2017; 8: 1-12.

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