



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



Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Araraquara

2019



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



Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral- Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

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

Araraquara

2019

Jordão, Cláudia Carolina

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico / Cláudia Carolina Jordão. -- Araraquara: [s.n.], 2019 144 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Dra. Marlise Inêz Klein

1. Fotoquimioterapia 2. *Candida albicans* 3. Expressão gênica I. Título

Cláudia Carolina Jordão

Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia fotodinâmica associada ao antifúngico

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Araraquara, 22 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Cláudia Carolina Jordão

Nascimento: 01/06/1994 – Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo

Filiação: Claudio Roberto Jordão
Andréia Sirlene Pigato Jordão

2012 – 2016: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2013 – 2014: Bolsa de Extensão no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2014 – 2015: Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2015 – 2016: Bolsa de Extensão no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, área de Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2017 – 2018: Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”-UNESP.

2017 – 2019: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus** por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Pelas bênçãos concedidas para que esse trabalho fosse realizado e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.*

*Aos meus pais **Claudio e Andréia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas ao meu bem-estar. Por sempre abdicarem dos seus sonhos a favor dos meus. Pelo apoio, incentivo e compreensão que foram essenciais para essa caminhada. Obrigada por serem meus exemplos. Esse trabalho não seria possível sem o apoio de vocês. Amo vocês!*

*Ao meu irmão **Matheus e minhas tias**, pela ajuda, carinho e apoio durante toda a minha caminhada. Amo vocês!*

*Agradeço ao meu namorado, **Bruno**, com quem eu sei que passarei por muitos momentos de felicidade como este e que é a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins. Sendo mais que um namorado, o meu melhor amigo. Que me apoia, me incentiva a continuar e faz os momentos em Araraquara mais leves e felizes. Amo você!*

*Agradeço imensamente a minha orientadora, **Profª Drª Ana Cláudia Pavarina** pela orientação, competência, profissionalismo, apoio, ensinamentos e dedicação. Por aceitar me orientar no curso de mestrado nesta instituição de ensino e por todas as oportunidades de crescimento oferecidas. Agradeço de coração o cuidado, apoio e carinho que teve comigo nesta jornada.*

*Agradeço a **Profª Drª Marlise Inêz Klein** pela paciência e dedicação neste trabalho, os quais foram essenciais para o seu desenvolvimento. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e por permitir meu crescimento acadêmico. Agradeço o carinho ao longo dessa jornada, que me estimulou a continuar.*

*Aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profª Drª Janaína Habib Jorge e Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por todo apoio, ensinamentos e valiosa contribuição para minha formação profissional.*

Agradeço aos demais professores do **Departamento de Materiais Dentários e Prótese** pelos ensinamentos durante o curso, os quais foram essenciais para a minha formação profissional.

Agradeço à amiga **Camilla Tasso** por todos os momentos vividos, pelas conversas, pelo apoio e pela disposição em me ajudar. Obrigada pela convivência e amizade! Sem sua ajuda, calma e ânimo a jornada seria muito mais difícil. Muito obrigada!

As amigas **Juliana Cabrini e Luana Dias**, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e contribuições ao longo dessa jornada. Obrigada também pela ajuda com a realização da estatística. Sem a ajuda de vocês essa jornada seria mais árdua. Muito obrigada!

Aos amigos **Jaqueline Zoccolotti, Maria Isabel Amaya, Isadora Malavolta, Sabrina Ribeiro e Erick Dante**, obrigada pela amizade e apoio tanto dentro quanto fora da faculdade, durante todo o curso de mestrado.

Aos amigos companheiros da pós-graduação **Laís Medeiros, Camila Jabr, Diego Dantas, Thais Soares, Marcela Dantas, Bruna Valerini, Carlos Moura, Mônica Tinajero, Beatriz Panariello, Fernanda Alves, Gabriela Alonso, Elkin Florez, Guilherme Rocha, Bruna Pimentel, Jefferson Trigo, Midian Castlillo e Carmelia Lobo** obrigada pela amizade e convívio.

Agradeço também às técnicas dos laboratórios **Jaqueline Colin, Paula Barbugli, Geisiane Bueno, Luana Sales, Lígia Sabino e Bruna Novelli** pela ajuda com a execução da metodologia e pela amizade durante esta jornada.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)** por abrir as portas para meu conhecimento, proporcionando ótima estrutura para realização do curso de graduação e pós-graduação, bem como para a realização deste trabalho, contribuindo para minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP, por toda acessibilidade durante

este período.

Agradeço aos funcionários do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, pelo convívio, amizade e carinho.

Aos professores membros da banca, **Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima e Profº Drº Cássio do Nascimento**, pela disponibilidade em estar presente e contribuição com seus ensinamentos. Obrigada!

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de maio/2017 a março/2019.

Agradeço ao **CEPID (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão)** (2013/07276-1).

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
Madre Teresa de Calcutá

Jordão CC. Expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *Candida albicans* resistente a fluconazol submetidos à terapia aotodinâmica antimicrobiana associada ao antifúngico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

O estudo tem como objetivo avaliar a susceptibilidade ao fluconazol e a expressão de genes de virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol (ATCC 96901) presentes nas línguas de camundongos submetidos à aPDT associada a Nistatina. Para isso, colônias recuperadas de animais submetidos ao tratamento com aPDT e Nistatina (NIS) bem como a associação (NIS+aPDT e aPDT+NIS), foram armazenadas em glicerol 50% e utilizadas para o Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Além disso, as línguas dos animais submetidos aos tratamentos foram armazenadas em *RNAlater* (*RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion®*) em freezer -80°C para avaliação da expressão gênica. Para realização do teste CIM, as cepas foram reativadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), cultivadas em estufa 35°C por 48 h e avaliadas seguindo o método de microdiluição em caldo (CLSI) com algumas modificações. Foram realizadas diluições seriadas de fluconazol (variando de 2 a 1024 µg/ml) em meio RPMI 1640 (2 x concentrado), em suspensões ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL). As placas foram incubadas a 35°C e observadas quanto à presença ou ausência de crescimento após 24 h, além disso, foi realizado plaqueamento (CFM). Foram consideradas as menores concentrações de fluconazol que resultaram em inibição de pelo menos 50% do crescimento. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio da técnica quantitativa de Transcrição Reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR) utilizando *primers* específicos para os genes de virulência (ALS1; HWP1; EFG1; CAP1; CAT1; SOD1; SAP1; PLB1 e LIP3) e genes envolvidos na síntese do ergosterol (ERG1; ERG11; ERG3 e ERG25). Novos *primers* para os genes ERGs foram desenhados (*Oligo Software™*) a partir de seqüências obtidas do "Pubmed". Os *primers* foram sintetizados e testados in vitro pela técnica de PCR utilizando um painel de DNA genômico de diferentes espécies de *Candida*, com seus produtos visualizados em gel de agarose. Reações de qPCR foram realizadas para determinar a concentração ótima e a eficiência dos *primers*. Para análise da expressão gênica, as línguas foram submetidas à extração e purificação de RNA. O cDNA foi sintetizado e a técnica de RT-qPCR realizada. Os dados de CFM e expressão foram analisados por Análise de Variância ($\alpha = 0,05$). Os resultados do CFM pós CIM foram avaliados por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Foi verificado que, independente do tratamento aplicado e do momento da coleta (24h ou 7 dias após tratamento), as cepas recuperadas foram semelhantes ao grupo P-L (animais sem tratamento). Demonstrando que não houve modificação do perfil de resistência da cepa ao fluconazol nas concentrações testadas. Em relação a expressão gênica, os *primers* delineados não foram específicos somente para *C. albicans*. No presente estudo, foi observado que os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25 apresentaram comportamento semelhante, com redução da expressão gênica nos grupos onde foram realizados os tratamentos em comparação com o grupo controle (P-L). Os resultados demonstraram que os tratamentos reduziram a expressão dos genes

ALS1, EFG1, CAP1, LIP3, SAP1 e SOD1 em todos os grupos experimentais avaliados em relação ao controle (P-L-). Quando utilizada a terapia combinada (aPDT+NIS, NIS+aPDT), houve redução mais acentuada na expressão dos genes ALS1, LIP3, SAP1 e SOD1. A expressão do gene EFG1, foi estatisticamente semelhante em todos os grupos de tratamento e menor que no grupo controle (P-L-). Para os genes CAT1 e SOD1, não foi observada diferença estatística entre os grupos aPDT e aPDT+NIS. Para os genes CAP1, EFG1, HWP1 e LIP3, os grupos P-L+ e aPDT não apresentaram diferença estatística entre si. Para os genes CAP1, EFG1 e HWP1 não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento NIS e os que foram avaliados a associação das terapias (NIS+aPDT e aPDT+NIS). Não houve expressão detectada para o gene PLB1. A associação de terapias não alterou a susceptibilidade fúngica ao fluconazol e reduziu a expressão dos genes ERG1, ERG3, ERG11, ERG25, ALS1, EFG1, SAP1, LIP3, CAP1 e SOD1.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Expressão Gênica.

Jordão CC. Expression of virulence and involved in the synthesis of ergosterol of *Candida albicans* resistant to fluconazole submitted to antimicrobial photodynamic therapy associated with antifungal [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the susceptibility to fluconazole and the expression of virulence genes and involved in ergosterol synthesis of fluconazole resistant strain of *Candida albicans* (ATCC 96901) present in the mouse's tongue submitted to aPDT associated with Nystatin. For this, colonies recovered from animals submitted to treatment with aPDT and Nystatin (NIS) as well as their association (NIS + aPDT and aPDT + NIS) were stored in 50% glycerol and used for the Minimum Inhibitory Concentration Test (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). In addition, part of the tongue of the treated animals were stored in RNAlater (RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion®) in -80 °C freezer for evaluation of gene expression. To accomplish the MIC test, the strains were reactivate in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates, grown in a 35 °C oven for 48 h and evaluated using the broth microdilution method (CLSI) with some modifications. Serial dilutions of fluconazole (ranging from 2 to 1024 µg / ml) in RPMI 1640 medium (2x concentrate) were performed in suspensions (0.5×10^3 to 2.5×10^3 CFU / ml). The plates were incubated at 35 °C and observed for presence or absence of growth after 24 h, plating was also performed (CFM). The lowest concentrations of fluconazole that resulted in inhibition of at least 50% growth were consider. The quantification of the gene expression was performed using quantitative Reverse Transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) using specific *primers* for the virulence genes (ALS1; HWP1; EFG1; CAP1; CAT1; SOD1; SAP1; PLB1 and LIP3) and genes involved in the synthesis of ergosterol (ERG1; ERG11; ERG3 and ERG25). New *primers* for the ERG genes were designed (Oligo Software™) from sequences obtained from "Pubmed". The *primers* were design and tested in vitro by the PCR technique using a panel of genomic DNA from different *Candida* species, with their products visualized on agarose gel. Reactions of qPCR were performe to determine the optimum concentration and efficiency of the *primers*. For the analysis of the gene expression, the tongue were submitt to the extraction and purification of RNA. The cDNA was synthesized and the RT-qPCR technique was performed. The CFM and expression data were analyzed by Analysis of Variance ($\alpha = 0.05$). The results of the CFM before MIC were evaluated by ANOVA followed by the Tukey post-test ($\alpha = 0.05$). Regardless of the treatment applied and the time of collection (24h or 7 days after treatment), the recovered strains showed a similar behavior to the P-L- group. Demonstrating that there was no change in the resistance profile of the strain to fluconazole at the concentrations tested. Regarding the q-PCR data, the designed *primers* were not specific only for *C. albicans*. All *primers* presented ideal Melt Curves, correlation coefficient $\cong 1$ and efficiency between 90-110%, with slope $\cong -3.3$. In the present study, the expression of ERG1, ERG3, ERG11 and ERG25 genes presented similar behavior, with reduction expression in the groups that the treatments were performe in comparison with the control group (P-L-). The results showed that the treatments reduced the expression of ALS1, EFG1, CAP1, LIP3, SAP1 and SOD1 genes in all the experimental groups evaluated in relation to the control (P-L-). When combined therapy (aPDT + NIS, NIS + aPDT) was use, there was pronouce reduction in the

expression of ALS1, LIP3, SAP1 and SOD1 genes. EFG1 gene expression was statistically similar in all treatment groups and lower than in the control group (P-L-). For the CAT1 and SOD1 genes, no statistical difference was observe between aPDT and aPDT + NIS groups. For the CAP1, EFG1, HWP1 and LIP3 genes, the P-L + and aPDT groups showed no statistical difference between them. For the CAP1, EFG1 and HWP1 genes, there was no statistical difference between the NIS treatment groups and those that evaluated the association of the therapies (NIS + aPDT and aPDT + NIS). There was no expression detected for the PLB1 gene. The association of therapy did not change the fungal susceptibility to fluconazole and reduced expression of genes ERG1, ERG3, ERG11, ERG25, ALS1, EFG1, SAP1, LIP3, CAP1 and SOD1.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Gene Expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Infecções Causadas por <i>Candida spp.</i> e Tratamentos	23
3.2 Resistência Antifúngica.....	25
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	29
3.4 Expressão de Genes de Virulência e Envolvidos na Síntese de Ergosterol	34
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Coleta das Amostras	42
4.2 Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (MIC) das Células Recuperadas Após os Tratamentos	44
4.3 Expressão Gênica de <i>C. albicans</i> Presente nas Línguas dos Camundongos	45
4.3.1 Desenho de novos <i>primers</i>	47
4.3.1.1 Obtenção do gene no formato FASTA.....	47
4.3.1.2 Basic Local Alignment Search Tool.....	48
4.3.1.3 Mfold.....	48
4.3.1.4 Oligo Primer Analysis Software™	49
4.3.2 Extração de DNA para padronização do <i>primer</i>	49
4.3.2.1 Extração e isolamento do DNA	49
4.3.2.2 Eletroforese em gel de agarose	51
4.3.3 Padronização dos <i>primers</i>	52
4.3.3.1 Primer: diluição e armazenamento	52
4.3.3.2 Análise <i>in vitro</i> e padronização dos <i>primers</i>	53
4.3.3.2.1 Especificidade dos <i>primers</i> por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose.....	53
4.3.3.2.2 Determinação da concentração ótima de cada <i>primer</i>	54

4.3.3.2.3	Confecção de curvas padrão para análise de expressão gênica.....	56
4.3.3.2.4	Reação de qPCR para verificar a eficiência de cada Primer.....	58
4.3.3.2.5	Etapas realizadas para uso dos genes de virulência delineados por outros autores	59
4.3.4	Extração de RNA das línguas dos camundongos	59
4.3.5	Purificação do RNA.....	61
4.3.5.1	Primeira etapa de purificação	61
4.3.5.2	Segunda etapa de purificação: tratamento com DNase I em solução	63
4.3.5.3	Terceira etapa de purificação.....	63
4.3.6	Síntese de cDNA.....	64
4.3.7	Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR	65
4.4	Análise Estatística.....	66
5	RESULTADO	67
5.1	Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (CIM) das Células Recuperadas Após os Tratamentos	67
5.2	Padronização dos Primers	69
5.2.1	Extração de DNA de <i>Candida spp.</i>	69
5.2.2	Diluição e preparo dos primers.....	70
5.2.3	Especificidade dos primers testados	71
5.2.4	Determinação da concentração ótima de cada primer	72
5.2.5	Confecção da curva padrão de cada primer	74
5.2.6	qPCR para análise da curva padrão e eficiência de cada primer.....	77
5.3	Extração de RNA das Línguas dos Camundongos	81
5.4	Purificação do RNA	82
5.5	Síntese de cDNA.....	86
5.6	qPCR para Avaliação da Expressão Gênica	86
6	DISCUSSÃO	100

7 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112
APÊNDICE A	120

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* pertencem à microbiota da cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina de indivíduos saudáveis. Fatores predisponentes podem fazer com que esses micro-organismos atuem como patógenos oportunistas, sendo responsável pelo desenvolvimento de infecção. *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica¹. Essa espécie tem sido associada a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, tais como Candidose Orofaríngea (OPC) até formas disseminadas da infecção². A OPC tem sido relatada em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, diabéticos, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e não fazem uso de anti-retrovirais^{1,2}.

A patogenicidade das diferentes espécies de *Candida* parece ser mediada por diversos fatores de virulência, os quais podem ser entendidos como as características ou produtos microbianos que possibilitam a interação com as células do hospedeiro causando algum tipo de dano^{3,4}. Os principais fatores de virulência identificados nas espécies de *Candida* são: capacidade de contornar as defesas do hospedeiro, adesão e formação de biofilme em tecidos humanos e superfícies abióticas^{5,6} e a produção de enzimas hidrolíticas com capacidade de destruição tecidual⁴. A capacidade de adesão das células de *Candida albicans* ao hospedeiro tem sido relacionada com o gene aglutinina (ALS1), que é responsável por codificar a proteína de adesão celular, a adesina⁷. Ainda, este fungo possui a habilidade de adaptação às alterações no pH do ambiente, flexibilidade metabólica e resposta ao estresse oxidativo. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, o mesmo expressa genes antioxidantes, entre eles CAP1, CAT1 e SOD1 que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)⁸⁻¹². Além desses fatores, o gene EFG1 atua como um fator de transcrição, regulando a transcrição de genes que são responsáveis pela formação do biofilme¹³. A formação de hifas, mediada pelo gene HWP1, facilita a adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro¹⁴. As lipases são enzimas que degradam lipídeos e são codificadas por vários genes, entre eles o LIP3, que permite o crescimento do biofilme na mucosa¹⁵. Além disso, *C. albicans* também possui a capacidade de invasão tecidual pela ruptura da membrana celular do hospedeiro, por meio da secreção de enzimas degradativas como as fosfolipases (por exemplo, PLB1)¹⁶ e as proteinases (por exemplo, SAP1)¹¹. Além disso, a avaliação da

expressão desses genes após os tratamentos pode ajudar a entender os mecanismos de ação do microrganismo frente aos tratamentos propostos.

Para tratamento da OPC, têm sido utilizados os antifúngicos derivados poliênicos, azólicos e equinocandinas¹⁷. Os agentes poliênicos, particularmente a nistatina, são os medicamentos tópicos mais utilizados e tem se mostrado eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*^{1,18}. Os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações subterapêuticas, o que reduz a eficácia deste medicamento¹. Consequentemente, a re-colonização da mucosa bucal pelo microrganismo tem sido frequente após a utilização do antifúngico, o que leva a infecções recorrentes¹⁹. A prescrição de antifúngico sistêmico (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) tem sido instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes²⁰. Esses agentes vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose, especialmente em pacientes imuno-comprometidos, porém tem sido relatado a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos com a utilização desses medicamentos¹, além de resistência antifúngica²¹.

A utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*²¹⁻²³. Resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento²⁴. Em *C. albicans* essa resistência é principalmente secundária, que é aquela adquirida após longos períodos de exposição ao fármaco²⁴. Além disso, a organização dos microrganismos em biofilmes proporciona proteção adicional, possibilitando a sobrevivência desses patógenos mesmo quando aplicada a terapia antifúngica⁵.

Em *C. albicans*, a resistência ao fluconazol é um processo multifatorial^{21,23} com combinação de diferentes mecanismos moleculares. Um exemplo é a indução da expressão de genes que codificam proteínas de transporte de membrana (bombas de efluxo), as superfamílias ABC (cassete de ligação ao ATP) e MFS (facilitadores) que altera a interação entre agentes antifúngicos azóis, pois a superexpressão dessas proteínas transportadoras de membrana, reduzem o acúmulo do antifúngico no meio intracelular^{21,22,47-50}. Além disso, a resistência pode ser oriunda de fatores ambientais que promovem a colonização fúngica ou a substituição de espécies²¹. Os antifúngicos azóis apresentam ação na síntese de ergosterol, atuando na expressão de genes e

proteínas, alterações nesta via podem induzir resistência. Os genes ERGs regulam a síntese de ergosterol pela modulação da enzima alvo na via de síntese de esteróis, a 14 α -lanosterol-desmetilase. Esta enzima é fundamental para a produção de ergosterol e a inibição em sua atividade resulta em ruptura da membrana celular promovendo a inibição do crescimento do fungo⁴⁷. Assim, o fluconazol, contribui para a regulação positiva dos genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25, que poderia induzir resistência fenotípica⁴⁷. Outro mecanismo de resistência aos azóis, envolve a calcineurina, proteína envolvida na mediação da resposta celular aos antifúngicos e na modulação do estresse oxidativo. Essa proteína é ativada quando se liga à calmodulina na presença de íons Ca⁺² e afeta a expressão gênica via transcrição de reguladores como Crz1p, atua fazendo com que o fungo tolere meios mais salinos e alto pH, além do estresse de membrana⁴⁷. A resposta a esse estresse de membrana envolve Hsp90 ("Heat Shock Proteins"), que é uma chaperona essencial na sinalização celular e dependente da co-chaperona Sgt1. Essa via é capaz de ocasionar a perda da função do gene ERG3 na biossíntese do ergosterol, tendo assim uma redução significativa na concentração de ergosterol na membrana⁵¹.

Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para inviabilização de espécies fúngicas resistentes aos tratamentos convencionais. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma modalidade de tratamento que tem sido utilizada no combate ao câncer, e também sugerida para a inativação de microrganismos²⁵⁻²⁷. O processo fotodinâmico requer a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio²⁵. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS (fotossensibilização). Em seguida, uma fonte de luz de comprimento de onda adequado deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular²⁸. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio com formação de oxigênio singlete (reação do tipo II), induzindo à produção de espécies reativas^{29,30}. Ambos os caminhos podem levar à morte celular. As espécies reativas

possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas e podem causar danos irreversíveis em alvos celulares, tais como a lise da membrana e inativação de proteínas. Dessa forma, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerado o alvo inicial^{25,29}. Os FSs mais utilizados na aPDT são predominantemente das famílias das porfirinas³¹ e das fenotiazinas³². Alguns estudos in vivo^{33,34} associaram a iluminação a diferentes FSs (Photoghen® e azul de metileno) em modelo murino, reduzindo significativamente a viabilidade de *C. albicans*. A utilização da aPDT mediada pelo Photogem® também foi investigada como método para desinfecção clínica de próteses totais³⁵ e para tratamento de estomatite protética³⁶, e os resultados demonstraram uma redução significativa dos microrganismos e da inflamação.

Atualmente, uma nova classe de FS vem sendo empregada em aPDT, os FSs de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro eletromagnético. O Photodithazine ® (PDZ) é uma clorina e6, solúvel em água³⁷ e tem sido utilizada com sucesso na aPDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete³⁸. Esse FS apresenta períodos curtos de sensibilização e alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade os tecidos biológicos melhorando a ação da aPDT³⁹, além de produzir níveis mais elevados de oxigênio singlete³⁸. Em estudos preliminares foi observado que a aPDT mediada pelo PDZ associada a luz LED promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, além disso, cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT⁴⁰. Já para o biofilme, aPDT promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log₁₀ (UFC/mL) para *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, respectivamente⁴⁰. Quando um biofilme misto formado por *C. albicans*, *C. glabrata*, e *Streptococcus mutans* foi submetido à aPDT com o PDZ foi observada uma redução significativa na viabilidade das colônias das três espécies avaliadas e uma redução significativa na atividade metabólica dos biofilmes submetidos à aPDT⁴¹. Em estudo in vivo em modelo murino de candidose a associação de 100 mg/L de PDZ com LED promoveu redução fúngica de 4,36 log₁₀⁴².

Um estudo realizado recentemente modificou o protocolo de indução de

candidose em animais de forma a possibilitar o tratamento da lesão com a aplicação da aPDT⁴³. Neste estudo, os animais foram contaminados com uma cepa padrão de *C. albicans* suscetível ao fluconazol. E os autores observaram que o modelo de indução de candidose mimetiza e mantém a infecção, e que aPDT foi efetiva no tratamento da candidose oral em camundongos contaminados com a cepa suscetível. Em outro estudo⁴⁴, foi avaliado o efeito da aPDT isoladamente em camundongos infectados com CaR, e os resultados demonstraram que aPDT se comportou de forma semelhante a Nistatina. Nesse contexto, visando reduções maiores na contagem de colônias e remissão da infecção, os autores realizaram a combinação de terapêuticas (aPDT+NIS e NIS+aPDT) que promoveu redução de 2,6 log₁₀ e 2,1 log₁₀ para os grupos aPDT+NIS+ e NIS+aPDT, respectivamente, 24 horas após os tratamentos. Além disso, a análise macroscópica revelou remissão das lesões orais, e a análise histológica demonstrou expressiva redução da reação inflamatória tecidual com características histológicas de normalidade⁴⁴. Embora estudos já tenham avaliado o efeito da aPDT em suspensões planctônicas, biofilmes, em animais e humanos, os efeitos que as aplicações sucessivas da aPDT e das terapias combinadas causariam na expressão de genes envolvidos com fatores de virulência de *C. albicans* e síntese de ergosterol ainda não foram avaliados até o presente momento.

Como relatado, o mecanismo de ação da aPDT é baseado na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são as responsáveis por causar o dano celular por meio de stress oxidativo. Essas ROS, tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto, podem acarretar danos a integridade celular⁴⁵. Tem sido sugerido que a presença de íons Fe^{2+} , O_2 e H_2O_2 podem levar a reação química de Fenton, culminando na produção de radicais extremamente reativos aos constituintes celulares como DNA, lipídeos, proteínas e outras macromoléculas. Dessa forma, o dano oxidativo causado no DNA pode contribuir para a instabilidade genética e possível mutação nas células⁴⁵. Foi reportado efeito genotóxico da luz LED azul (455 nm) com aplicação de 37,5 J/cm² de dose de luz sobre *C. albicans*⁴⁶. Dessa forma, com base nos estudos acima citados, seria importante avaliar além do efeito antimicrobiano da luz LED, seu possível efeito na expressão de genes relacionados a virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de espécies de *Candida*.

Na literatura pertinente há poucos estudos que avaliaram a resposta da cepa ATCC 96901 (resistente a fluconazol) quando submetida a diferentes tratamentos in

vitro bem como o comportamento dos genes específicos ou produtos desses genes⁵²⁻⁵⁵. Não há relatos de estudos que investigaram os efeitos da aPDT e sua associação com a Nistatina sobre a expressão gênica. Além disso, com a finalidade de avaliar se a suscetibilidade de *C. albicans* ATCC 96901 ao fluconazol pode ser alterado pelos tratamentos propostos in vivo foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) após os tratamentos e a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo in vitro foi avaliar a expressão de genes envolvidos na síntese de ergosterol (ERG1; ERG11; ERG3 e ERG25) e relacionados a virulência (ALS1; HWP1; EFG1; CAP1; CAT1; SOD1; SAP1; PLB1 e LIP3) em *C. albicans* resistente a fluconazol presentes na língua de camundongos submetidos à aPDT, Nistatina ou associação de tratamentos (PDT+NIS ou NIS+PDT). Além disso, foi avaliada a Concentração Fungicida Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para verificar se o perfil de resistência do microrganismo foi alterado após os tratamentos in vivo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecções Causadas por *Candida spp* e Tratamentos

Em 1994, Kulak et al.¹⁸, compararam três diferentes tratamentos para estomatite protética. Neste estudo, 45 pacientes foram divididos em três grupos. No primeiro, pacientes foram tratados com 50 mg de fluconazol em tablete diariamente por duas semanas. O segundo grupo de pacientes foi orientado a fazer aplicações de solução de clorexidina a 2% na superfície da prótese duas vezes por dia em conjunto com a medicação de fluconazol por duas semanas. O terceiro grupo recebeu novas próteses sem nenhuma medicação. Amostras microbiológicas foram coletadas do palato por meio de *swabs* e espátula de metal antes dos tratamentos, após a finalização do tratamento e duas semanas após o término do tratamento. Os resultados demonstraram que 87% do primeiro grupo responderam positivamente ao tratamento, 40% foram curados e 47% apresentaram melhora com redução clínica da inflamação. No segundo grupo foi observado que 87% dos pacientes demonstraram resposta positiva ao tratamento, nos quais 54% foram curados enquanto que 33% apresentaram melhora. Este grupo também demonstrou melhora clínica da inflamação. Os pacientes do terceiro grupo, 33% apresentaram pequena melhora; 13% foram curados e 20% tiveram apenas redução da inflamação, sem melhora significativa clinicamente. Em controle posterior, os autores observaram recidiva das lesões, relatando que a incidência da recorrência da infecção nos pacientes que utilizaram fluconazol foi maior do que a recorrência naqueles tratados com fluconazol e clorexidina. Este último tratamento, com associação de um antifúngico e de um antimicrobiano de amplo espectro, resultou em eliminação total de hifas nas coletas microbiológicas. Os autores então concluíram que o tratamento realizado com fluconazol associado a clorexidina apresentou melhores resultados sendo uma opção viável para o tratamento da candidose oral.

Segundo Akpan e Morgan¹ em 2001, a candidose oral é a infecção mais prevalente e comum entre os humanos e, quando não tratada, pode ocasionar má nutrição e infecção generalizada. Nesta revisão, os autores citaram alguns artigos que estudaram a patogenicidade das espécies de *Candida*, ressaltando que quanto mais patogênico o fungo, maior a capacidade de causar a infecção. Destacaram que a presença de fatores locais e sistêmicos, como próteses, mal funcionamento das glândulas salivares, câncer oral, diabetes, fumo, idade, imunossupressão relacionada a AIDS, antibióticos e deficiências nutricionais podem levar a candidose. Por isso a importância de planejar o tratamento dos pacientes acometidos pela candidose oral,

conhecer tanto a história médica quanto a bucal e prescrever o antifúngico mais adequado, garantindo assim um bom prognóstico. Segundo os autores, o diagnóstico dessas lesões é realizado clinicamente, podendo solicitar exames laboratoriais para exclusão de outras lesões em potencial.

Em 2005, Ramage et al.⁶ em uma revisão de literatura, relataram que *C. albicans* ao se organizar em biofilme, aumenta significativamente a sua capacidade de resistência a antifúngicos rotineiramente utilizados, pois o biofilme atua como uma proteção contra as defesas do hospedeiro e as drogas antifúngicas. No entanto, novos agentes antifúngicos, como as equinocandinas e formulações lipossômicas de anfotericina B possuem uma maior atividade em biofilmes de *Candida*. Nesse contexto, os autores sugerem investigar novos materiais e estratégias para inibir a formação de biofilme e impedir com isso uma expressão aumentada da virulência dos fungos.

Em uma revisão, publicada em 2011, Silva et al.⁴ destacaram o aumento considerável de infecções causadas por espécies de *Candida*, devido ao envelhecimento da população, número maior de pacientes imunocomprometidos e uso de medicamentos. Segundo os autores, *C. albicans* é a espécie mais prevalente encontrada em condições de saúde e doença em um indivíduo. No entanto, as espécies de *Candida* não *albicans*, tais como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* tem sido frequentemente isoladas. Essa identificação poderia ser justificada pelo aparecimento de métodos mais refinados, bem como pelo grau de doença dos pacientes, as intervenções as quais foram submetidos e as drogas utilizadas por eles. Dentre os métodos de identificação, destaca-se o uso de *CHROMagars Candida* (CHROMagars, Paris, France), que é um meio a base de ágar que possibilita a diferenciação das diferentes espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Também são utilizados testes bioquímicos, marcação gênica (gene 28S do RNAr) e PCR no qual um par de nucleotídeos homólogos com sequência específica inicia a amplificação do DNA alvo. O mais importante nessa técnica é que os *primers* usados sejam específicos e não amplifiquem DNA não desejável (do hospedeiro ou de outro microrganismo quando o alvo é a identificação de *C. albicans*, por exemplo). Apesar do desenvolvimento de técnicas, a maioria dos diagnósticos clínicos baseiam-se em metodologias não moleculares, seja pela quantidade reduzida de equipamentos para desenvolver a técnica ou pela dificuldade no preparo das amostras. A patogenicidade de *Candida* deve-se a fatores de virulência, aderência a superfícies (seja do hospedeiro ou dispositivos médicos),

formação de biofilme e secreção de enzimas. Por isso a importância em compreender as espécies de *Candida albicans* ou *não-albicans*.

Em 2013, Sardi et al.¹⁷ relataram em sua revisão de literatura, que a incidência de infecções fúngicas aumentou significativamente, esse fato pode ter sido causado pelo aumento da resistência e pelo número reduzido de drogas antifúngicas, que ainda possuem muitos efeitos colaterais. Evidências sugerem que a maioria das infecções produzidas por espécies do gênero *Candida* estão associadas a organização desse fungo em biofilme. Essas comunidades biológicas estão inseridas em uma matriz extracelular auto-produzida, que garante uma proteção ao fungo, e associa-se a um alto nível de resistência antimicrobiana. Dessa forma, a busca por novas terapias vem ganhando destaque a fim de contornar a resistência. Há uma busca por novos compostos antifúngicos diferentes dos já existentes que incluem os polienos, azóis e equinocandinas. Os agentes poliênicos e azóis tem ação na membrana celular do fungo, enquanto as equinocandinas estão relacionadas a interrupção da síntese da parede celular do fungo. Ainda nessa revisão, os autores destacam diversos mecanismos de resistência de *C. albicans* aos antifúngicos. Essa resistência pode ser primária ou secundária, relacionadas as características intrínsecas ou adquiridas pelo patógeno. Devido ao desenvolvimento da resistência, a busca por novas terapias antifúngicas tem acontecido, dentre elas o uso de plantas, nanopartículas de prata, uso de anti-corpos e uso da Terapia Fotodinâmica visando combater a infecção e minimizar danos ao indivíduo acometido por ela.

3.2 Resistência Antifúngica

White et al.²⁴, em 1998, avaliaram os fatores clínicos, celulares e moleculares que contribuem para resistência fúngica frente aos medicamentos. Segundo os autores, a literatura demonstrou que a resistência fúngica varia conforme a droga avaliada. Um exemplo de mecanismo de ação de um dos medicamentos, os agentes azóis, que podem contribuir para a resistência fúngica dos microrganismos, é a inibição da biossíntese do ergosterol por esses medicamentos, alterando a função de enzimas e a integridade da membrana citoplasmática. Com essa alteração, os microrganismos resistentes apresentam mutações genéticas nas enzimas alvo do medicamento (envolvidas na formação do ergosterol) diminuindo assim a concentração intracelular da droga. Os autores também afirmam que o efeito fungistático do medicamento, a dose de aplicação, a farmacocinética (absorção, distribuição e metabolismo da droga) e as interações medicamentosas são

parâmetros que podem influenciar no surgimento de resistência dos microrganismos aos antifúngicos, além de fatores inerentes aos indivíduos como a imunidade, o local e severidade da infecção e a presença de fatores de risco, como as próteses. Embora muitos fatores que contribuem para a resistência foram identificados pelos autores, há apenas informações rudimentares sobre o mecanismo pelo qual esses fatores contribuem para a resistência aos medicamentos. Os autores concluíram que o avanço do conhecimento da resistência fúngica pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico e tratamento das infecções visto que novas drogas existentes podiam continuar gerando mecanismos diferentes de resistência fúngica.

Em 2001, Chandra et al.⁵, avaliaram a formação de biofilme sobre corpos-de-prova de metilmetacrilato e de silicone. Foram utilizadas duas espécies para formação do biofilme, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, cepa padrão e isolados clínicos. A atividade metabólica foi verificada por meio de fluoróforos e microscopia confocal a laser. Além disso, foi realizado teste de susceptibilidade dos microrganismos ao fluconazol, anfotericina B, Nistatina e Clorexidina (concentração de 0,5 a 256 mg/mL). Após a fase de adesão, os microrganismos se agrupam em comunidades celulares complexas e organizadas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos, o biofilme, que atua como uma barreira protetora contra as defesas do organismo e drogas antifúngicas. Por meio da Microscopia Confocal de Varredura, os autores observaram que os biofilmes de *C. albicans* são formados de elementos não celulares e celulares. Enquanto que *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, mas aderiu-se a superfície dos corpos-de-prova testados. Esse estudo, direcionou a investigação dos mecanismos moleculares de formação de biofilme, principalmente para *Candida*, bem como o desenvolvimento de resistência antifúngica ligada ao mecanismo de formação de biofilme.

Em 2014, Cowen et al.⁴⁷, publicaram uma revisão sobre os mecanismos de resistência das drogas antifúngicas. A terapia antifúngica é o tratamento mais recomendado para o manejo do paciente com doenças fúngicas agudas e crônicas. No entanto, as opções de tratamento são restritas por causa do número escasso de medicamentos antifúngicos disponíveis, além do desenvolvimento de resistência aos mesmos, o que limita as classes de medicamentos disponíveis como tratamento. Assim, tem-se a evolução de organismos multirresistentes a várias classes diferentes de agentes antifúngicos, especialmente fungos do gênero *Candida*. Há diversos mecanismos envolvidos na resistência, dentre eles a alteração em genes. Os

antifúngicos da classe dos azóis interferem na biossíntese do ergosterol, o que promove alteração na estabilidade, permeabilidade e na ação de enzimas ligadas a membrana. O alvo específico dos azóis é uma enzima do citocromo P450- e enzima 14- α lanosterol demetilase (gene conhecido como Erg11 em leveduras). A ligação do azol bloqueia essa enzima, interrompendo assim a via biossintética. Uma superexpressão de ERG11 é comumente relacionada com a resistência aos azóis em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Outro mecanismo de resistência é a ativação de bombas de efluxo associadas à membrana, que reconhecem diversos produtos químicos garantindo resistência a múltiplas drogas (MDR). Nos fungos, dois diferentes sistemas de efluxo modulam a resistência aos azóis, a superfamília de ligação ao ATP (ABC) e a superfamília de facilitadores de membrana (MFS). Em *C. albicans*, a classe dos principais transportadores envolvidos na resistência aos azóis inclui o MDR1, CDR1 e CDR2, bem como outros transportadores. Uma regulação aumentada de CDR1 e CDR2 modulam a resistência aos azóis por aumento do efluxo da droga e redução do seu acúmulo intracelular. Além disso, os autores relatam que anormalidades cromossômicas, defeitos mitocondriais, associação de mecanismos, organização em biofilmes, chaperona Hsp90 e outros fatores relacionam-se com a resistência principalmente aos azóis. Assim, uma compreensão detalhada dos principais mecanismos de resistência e os fatores que contribuem para sua evolução são importantes no desenvolvendo de novas drogas antifúngicas.

Em 2015, Freire et al.⁵⁶ avaliaram os efeitos da aPDT sobre biofilmes de *C. albicans* por meio da análise da expressão de genes envolvidos na produção de enzimas hidrolíticas (SAP5), lipase (LIP9) e fosfolipase (PLB2). Foram utilizadas 9 cepas clínicas de *C. albicans* isoladas dos pacientes portadores do vírus HIV, além de uma cepa padrão ATCC 18804. A quantificação da expressão gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Para o tratamento com aPDT, foi utilizado luz de baixa potência (vermelho visível, 660 nm) e o azul de metileno (300 μ M) como fotossensibilizador. Foram avaliados dois grupos experimentais: aPDT e o controle sem sensibilização com azul de metileno e ausência de luz. Os autores observaram que aPDT diminuiu a expressão do gene SAP5 em 60% enquanto observaram redução de 50% expressão dos genes LIP9 e PLB2. Quando os autores compararam o perfil de expressão de cada gene entre os grupos, foi observada diminuição na expressão gênica, o que pode levar a conclusão de que a aPDT tem potencial para reduzir a expressão de genes relacionados com a produção de enzimas hidrolíticas

em *C. albicans*.

Em 2017, Whaley et al.²¹, em uma revisão de literatura, investigaram a resistência à classe de antifúngicos azólicos utilizados habitualmente para tratamento de infecções por *Candida* spp. Há diversos relatos de resistência intrínseca (primária) ou desenvolvida (secundária) a essa classe de antifúngicos, sendo necessário compreender e desvendar os mecanismos envolvidos nesse processo. Um desses mecanismos é a mutação no gene ERG11, o qual participa ativamente na conversão de lanosterol em ergosterol. Essa mutação impede a ação do azol na membrana celular do fungo. Além disso, uma superexpressão desse mesmo gene é capaz de induzir resistência. Outro mecanismo, envolve a superexpressão de bombas de efluxo MDR1, CDR1 e CDR2. Essas moléculas transportadoras de membrana tornam-se mais numerosas na parede celular impedindo a permanência intra-celular do fármaco e consequente ação do mesmo. Além disso, foi relatada a inativação do gene ERG3, que também participa do processo de biossíntese do ergosterol, essa inativação acarreta em uma subprodução do ergosterol. Diante desses mecanismos, os autores consideram necessário uma compreensão melhor de como esses mecanismos de resistência realmente ocorrem nas espécies de *C. albicans* e não *albicans*.

Em 2018, Panariello et al.⁵⁷, investigaram o efeito do fluconazol na matriz extracelular de biofilmes de cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* sensível e resistente a esse fármaco. Os β -glucanos da matriz extracelular impedem a penetração do fluconazol em biofilmes de *Candida*, enquanto o DNA extracelular (eDNA) contribui para a arquitetura do biofilme e resistência. Nesse estudo foi caracterizada a matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* sensível e resistente ao fluconazol na presença ou ausência desse fármaco. Cepas de *C. albicans* susceptível (ATCC 90028 -CaS) e resistente ao fluconazol (ATCC 96901 -CaR), e *C. glabrata* susceptível (ATCC 2001 -CgS) e resistente ao fluconazol (ATCC 200918 -CgR) foram submetidas ao Teste de Mínima Concentração Inibitória (MIC), que revelou que para CaS a concentração de 16 μ g/mL promoveu redução, quando comparada ao controle, já para a CaR a concentração de 256 μ g/mL promoveu a redução esperada. Baseados nisso, os autores cultivaram biofilmes dessas cepas em meio RPMI com ou sem fluconazol a 5 $\times$ o MIC (37°C / 48 horas). Os biofilmes foram avaliados por unidade formadora de colônia (UFC) / mL, biomassa e componentes da matriz extracelular (polissacáridos alcalinos solúveis [ASP], polissacáridos solúveis em água [WSP], eDNA e proteínas). Nos biofilmes, o fluconazol reduziu UFC/mL de todas as cepas,

com exceção do CaS. O fluconazol afetou a morfologia celular e a estrutura do biofilme, impedindo a formação de hifas em biofilmes de CaS e CaR, diminuindo o número de células em biofilmes de CgS e CgR. Assim, os autores concluíram que o fluconazol impacta biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* pela redução da biomassa. Esta biomassa reduzida coincidiu com o menor número de células e a quantidade de WSPs. A produção de hifas por *C. albicans* também foi reduzida.

3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Em 2000, Machado et al.²⁸ relataram os princípios da PDT, suas aplicações e perspectivas. Essa terapia tem sido usada com sucesso no tratamento de uma variedade de tumores, e há tentativas para entender sua ação na inativação de vírus no sangue e nos componentes sanguíneos. O autor, relata sucesso na inativação do vírus herpes, pelo emprego de diferentes derivados da ftalocianina. A análise dos vírus demonstrou a ocorrência de dano ao envelope viral, o que inviabiliza sua adsorção ou penetração nas células saudáveis. Segundo os autores, a aPDT também tem se mostrado aplicável em um número considerável de outras doenças e na descontaminação de sangue. Em alguns casos, quando as doenças se tornam resistentes às terapias comumente utilizadas, a aPDT tem-se mostrado uma alternativa viável de tratamento. O desejável é que desenvolvam novos fotossensibilizadores com características melhoradas, como por exemplo maior seletividade frente às células e ou tecidos-alvo, e maior absorbância molar, de modo a permitir uma maior efetividade do tratamento.

Em 2007, Konopka et al.²⁶, em uma revisão de literatura, relataram que o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica consiste no uso de uma luz, em comprimento de onda adequado que promove a fotoativação do fotossensibilizador, na presença de oxigênio. O fotossensibilizador ativo, juntamente com o oxigênio disponível, ocasionam a formação de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete e radicais livres que promovem danos aos componentes celulares. Há um crescente aumento no emprego da aPDT na Odontologia, principalmente no tratamento do câncer oral, na inativação de microrganismos e no diagnóstico da malignidade das lesões orais. Além disso, a aPDT tem sido utilizada no tratamento de leucoplasia oral, líquen plano e câncer de cabeça e pescoço. Os autores destacam como pontos positivos dessa técnica o fato de não ser invasiva, tratar seletivamente a área afetada e melhorar a qualidade de vida do paciente. Citaram também que a aPDT é uma modalidade eficaz no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais. Segundo os autores, essa terapia não causa efeitos genotóxicos

ou mutagênicos às células do hospedeiro, sendo segura a longo prazo. Também foi relatado o emprego da PDT sobre biofilmes orais, segundo os autores, essa terapia promove a ruptura da matriz do biofilme, trazendo importantes consequências para a homeostase do mesmo. Os autores concluíram que os estudos deveriam ser direcionados na busca por fotossensibilizadores mais seletivos uma vez que a cavidade oral é especialmente adequada para aplicação da PDT, uma vez que é acessível à iluminação

Em 2011, Dovigo et al.⁵⁸ avaliaram a efetividade da PDT na inativação de suspensões celulares e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, susceptível e resistente a fluconazol, por meio da utilização do FS Photogem® e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul (455 nm). A solução estoque de Photogem® foi preparada por meio de diluição em salina estéril e mantida ao abrigo de luz até o momento de utilizá-la. As suspensões celulares de cada cepa de *Candida* foram tratadas com 5 concentrações de Photogem® e expostas a 4 tempos de iluminação segundo as doses de luz aplicadas (14, 24, 34 ou 50 minutos). Para avaliação da viabilidade celular após a PDT, os autores utilizaram o método da contagem das colônias viáveis (UFC/mL). Para isso, após a execução dos experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10^{-2} e 10^{-3}), foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Com relação aos biofilmes, os mesmos foram cultivados sobre um filtro de membrana de celulose e tratados com 25 mg/L de Photogem® e iluminados por 37,5 J/cm². Os resultados demonstraram que as culturas planctônicas das cepas sensíveis e resistentes foram inativadas após a PDT. Além disso, foi observado redução significativa na viabilidade do biofilme para todas as cepas de *C. albicans* e de *C. glabrata* avaliadas. Os autores demonstraram que as cepas resistentes a fluconazol apresentaram menor susceptibilidade à PDT, em comparação com as cepas susceptíveis, e que os biofilmes foram mais resistentes à terapia em relação às suspensões celulares.

Mima et al.³⁶, em 2012, realizaram um estudo clínico randomizado, investigando a eficácia da Terapia Fotodinâmica clinicamente e micologicamente quando comparada a terapia antifúngica tópica no tratamento da estomatite protética. Para isso, pacientes usuários de prótese totais (n=40) que respeitaram os critérios de inclusão e exclusão foram selecionados e de modo randomizado distribuídos nos grupos. No grupo tratado com Nistatina (n=20), os pacientes receberam tratamento com o antifúngico (100 000 UI) quatro vezes por dia durante 15 dias. Já no grupo da PDT, os pacientes recebiam o fotossensibilizador Photogem® (500mg/L) e após 30

minutos de incubação, tinham seu palato e prótese iluminados com luz a 455nm, três vezes por semana durante 15 dias. Foi realizada coleta microbiológica na prótese e no palato e realizadas fotografias nos seguintes períodos: antes do tratamento, último dia do tratamento e 30, 60 e 90 dias após tratamento. As colônias foram quantificadas (UFC/mL) e as espécies identificadas por testes bioquímicos. Os resultados demonstraram que os tratamentos avaliados reduziram significativamente a UFC/mL no final dos mesmos e no dia 30 do período de acompanhamento. Os grupos Nistatina e PDT apresentaram taxas de sucesso clínico de 53% e 45%, respectivamente. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente identificada. Os autores concluíram que a PDT foi tão eficaz quanto a Nistatina tópica no tratamento da estomatite protética.

Em 2013, Kato et al.⁵⁹, avaliaram o potencial da aPDT em uma dose subletal em alterar a patogeneicidade de *C. albicans* e se as alterações induzidas por essa terapia foram mantidas nas células-filhas. Para isso, *C. albicans* foi submetida ao tratamento com o fotossensibilizador azul de metileno (0,05 mM) combinado com laser de diodo GALAS. In vitro foi avaliado os efeitos da aPDT no crescimento do microorganismo, capacidade de formação de hifa, sensibilidade ao estresse oxidativo e osmótico, integridade da parede celular e susceptibilidade ao fluconazol. In vivo foi avaliada a patogeneicidade da inoculação de *C. albicans* em um modelo murino de infecção sistêmica. Os autores observaram redução na taxa de crescimento e a capacidade de o fungo formar hifas em comparação com o controle (células não tratadas). A taxa de sobrevivência dos animais tratados com aPDT foi significativamente aumentada em comparação ao grupo não tratado. A aPDT promoveu aumento na sensibilidade de *C. albicans* a alguns metabólitos testados, como sulfato de sódio, cafeína e peróxido de hidrogênio. O MIC para o fluconazol das células tratadas com a aPDT foi reduzido. Entretanto, nenhum desses parâmetros foi alterado nas células-filhas de *C. albicans* submetidas à aPDT, indicando que essa terapia apresenta efeitos transitórios. Os autores sugerem que essa terapia possa ser combinada ao fluconazol para tratar as infecções por *C. albicans*.

Em 2014, Pires et al.³⁷, investigaram o efeito da PDT in vitro sobre o crescimento de *Pythium insidiosum* utilizando três fotossensibilizadores distintos: azul de metileno, Photogem e Photodithazine. A resposta PDT, bem como a distribuição dos FS, para diferentes tempos de incubação de 30, 60 e 120 minutos foram avaliados. O azul de metileno não penetrou na célula do patógeno e, consequentemente, não houve inativação da PDT. Photogem mostrou distribuição

heterogênea, com pequena concentração no interior das células. O Photodithazine® mostrou uma distribuição mais homogênea dentro da célula localização específica no interior da célula dependendo do tempo de incubação. Esse FS acumula-se primeiro nos vacúolos intracelulares, e aproximadamente 1 hora depois, está localizado por toda a membrana celular. Os resultados desse estudo mostraram que os FS que atravessam a membrana são mais eficientes para o *Pythium insidiosum*, pois são capazes de causar danos extensos ao organismo sob iluminação e, portanto, podem ser boas opções para tratamento clínico.

Em 2015, Carmello et al.⁴², conduziram um estudo descrevendo a fotoinativação de *C. albicans* em um modelo murino de candidíase oral, mediada por Photodithazine® (PDZ) associado a luz LED. Os camundongos foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* para indução de candidose oral. Após cinco dias da imunossupressão, foi realizada uma aplicação de PDZ nas concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/L sobre a língua dos animais e estes foram submetidos a luz. Após o tratamento, *C. albicans* foi recuperada da língua dos animais por meio de swabs estéreis e foi realizada avaliação microbiológica para quantificação da população microbiana (UFC/ml). Após 24 h de tratamento, os animais foram sacrificados e as línguas foram removidas para análise histológica. De acordo com resultados a associação de PDZ (100 mg/L) e luz LED (aPDT) reduziu 4,36log₁₀ de *C. albicans* presente em lesões induzidas em língua de camundongo sendo eficaz na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer efeito prejudicial sobre os tecidos do hospedeiro.

Carmello et al.⁴³ em 2016, avaliaram a eficácia da aPDT no tratamento de candidose oral em um modelo murino utilizando Photodithazine (PDZ) com aplicações sucessivas da terapia. Os autores desenvolveram um modelo de indução de candidose oral para permitir melhor controle da infecção e o estabelecimento do tratamento. Camundongos fêmeas de seis semanas de idade foram imunossuprimidos e a espécie *C. albicans* foi inoculada para induzir candidose oral. Os tratamentos (aPDT mediada por PDZ e luz LED, PDZ, luz LED e Nistatina), foram realizados durante 5 dias consecutivos, sendo uma aplicação ao dia. Após o término do tratamento, foi realizado um esfregaço das línguas dos camundongos para recuperação das células de *C. albicans* e a avaliação macroscópica das lesões. Colônias viáveis foram quantificadas e o número de UFC/ml determinado. Um grupo de animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento e o outro grupo após 7 dias do tratamento para que as línguas fossem cirurgicamente removidas para análise

histológica e análise da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α e IL-6) por RT-qPCR. Os autores concluíram que a aPDT foi tão eficaz quanto Nistatina na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs₁₀ respectivamente, 24 h após o tratamento. Os animais submetidos a aPDT também apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto que os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões orais em ambos os períodos avaliados. A avaliação histológica revelou discreto infiltrado inflamatório nos grupos tratados com aPDT e Nistatina em ambos os períodos avaliados. A aPDT induziu a expressão de TNF- α quando comparado com o controle (sem FS e sem luz) 24 h e 7 dias após o tratamento. Em resumo, os autores demonstraram que o modelo murino desenvolvido neste estudo foi capaz de mimetizar a infecção por *C. albicans* bem como a aPDT foi eficaz para o tratamento dos camundongos com candidose oral.

Em 2017, Romano et al.⁶⁰, observaram que a captação do fotossensibilizador foi aumentada na aPDT quando as células de *C. albicans* foram previamente iluminadas com luz LED de baixa dose. O tratamento com a aPDT habitualmente consiste em aplicação do fotossensibilizador e a luz em um comprimento de onda específico, que leva a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a morte celular do microorganismo. Um adequado tempo de incubação do fotossensibilizador juntamente com a dose de luz desempenham papel chave no processo de inativação pela aPDT. Esse estudo demonstrou que, além do fato de o fotossensibilizador ser incubado no escuro, uma aplicação prévia de luz LED de baixa intensidade foi capaz de alterar a permeabilidade da célula fúngica, conduzindo mais moléculas de fotossensibilizador ao citosol celular.

Em 2018, Carvalho et al.⁶¹ investigaram os efeitos da aPDT, utilizando uma clorina e6 como fotossensibilizador sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231), formação de biofilme, produção de ROS e permeabilidade celular. Os autores observaram que a aPDT foi capaz de inibir o crescimento e a formação de biofilme. Além disso, a terapia mediada pelo fotossensibilizador clorina e6 produziu nível aumentado de ROS (seis vezes mais) e aumento em cinco vezes a permeabilidade da membrana celular de *C. albicans*. Assim, os autores concluíram que essa modalidade pode levar a danos irreversíveis na membrana celular do fungo, ocasionando morte celular.

Em 2018, Chien et al.⁶² avaliaram os mecanismos pelos quais *C. albicans* responde à aPDT. Para investigar esses mecanismos, fatores de transcrição como Hog1, SAPK e CAP1 foram avaliados por meio da deleção de cada um desses genes.

Supressão de qualquer um dos genes SSK2, PBS2 e HOG1 diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência, indicando que a mediação por Hog1 e SAPK é necessária para tolerância à aPDT. Além disso, o fator de transcrição CAP1 que regula vários genes antioxidantes, foi altamente expresso durante a resposta à aPDT. A deleção desse gene CAP1 também resultou na diminuição das taxas de sobrevivência de *C. albicans*. O estudo demonstrou a importância do Hog1 SAPK e CAP1, que intermedia a resposta ao estresse oxidativo ocasionado pela aPDT em *C. albicans*. Compreender os mecanismos pelos quais *C. albicans* responde à aPDT, e consequentemente a eliminação de ROS será muito útil para o desenvolvimento de terapêutica para controlar doenças infecciosas fúngicas, particularmente as da pele e infecções da mucosa.

3.4 Expressão de Genes de Virulência e Envolvidos na Síntese de Ergosterol

Em 1993, Cha e Tilly⁶³ discutiram a influência de cada componente da técnica de PCR na especificidade, eficiência e fidelidade da técnica. Segundo os autores, o PCR é uma técnica *in vitro* utilizada para amplificação rápida de um fragmento específico de DNA e, segundo eles, é uma técnica perfeita quando se obtém resultados com alta especificidade, rendimento (eficiência), e fidelidade. Essas características são influenciadas pela sequência alvo, bem como por cada um dos componentes de PCR. Neste estudo, além dos autores ressaltarem a importância de manter os parâmetros adequados, citaram estudos prévios, indicando três parâmetros essenciais que influenciam o PCR: as condições tampões; as características dos ciclos do PCR (temperatura de anelamento, duração de cada passo, entre outros); e a enzima DNA polimerase. Segundo os autores essas características devem ser atentamente avaliadas e planejadas anteriormente a realização da técnica.

Os autores Bustin⁶⁴ e Thornton e Basu⁶⁵, discorreram sobre as características ideais que os *primers* devem apresentar para serem utilizados na técnica de qPCR. Estas características incluem o tamanho do *primer* que deve ter tamanho adequado para ser específico e ser curto o suficiente para que se ligue ao gene alvo e não a outros genes. Geralmente o tamanho mais aceito é entre 18 e 24 pares de base^{64,65}. O tamanho do produto de PCR (*PCR product size*): deve estar entre 80 e 150 pares de base⁶⁵. Essa característica é importante para a reação de polimerização. A temperatura de *Melting* (*T_m*) é um importante parâmetro a ser respeitado, pois garante estabilidade na interação entre o *primer* e o seu alvo⁶⁴. A *T_m* do *Forward* deve ser próxima da temperatura do *Reverse*. Outro aspecto, relaciona-se a quantidade de

bases nitrogenadas do tipo guanina (G) e citosina (C) em relação ao total de bases, e essa porcentagem de GC% deve estar próxima a 50%⁶⁴. As bases G e C apresentam ligações de hidrogênio mais fortes, aumentando a eficiência da ligação. No entanto, se esta porcentagem for maior que 50%, não apresenta uma boa desnaturação, pois necessitam de uma temperatura alta, propiciando uma reação menos eficiente⁶⁴. O *GC Clame* se refere ao máximo de ΔG das últimas 5 bases nitrogenadas no sentido 3' do *primer*⁶⁵. Apresentar 1 a 2 CG Clamps é ideal pois permite que o *primers* tenha uma ligação forte a fita alvo, tornando-o mais específico⁶⁵. Estruturas secundárias são produzidas por interações intermoleculares ou intramoleculares e sua presença nos *primers* pode conduzir a um produto inespecífico^{64,65}. O *primer* pode estabelecer ligação com ele mesmo (interação intramolecular, como por exemplo, os *hairpins*) ou ligar-se ao outro *primer* (interação intermolecular, como por exemplo, os *self dimers* e os *cross dimers*). Essas estruturas devem ser evitadas⁶⁵.

Segundo Yin et al.⁶⁶, em 2001, o *Real Time RT-PCR* é o método de escolha para quantificação de citocinas e fatores de crescimento do RNA mensageiro (RNAm). Além disso, existem outros métodos, como Northern Blot, RNase, hibridização in situ, porém o método de RT-PCR é o mais sensível e específico para mensurar a expressão de RNAm na amostra. Nesse estudo foram avaliados dois métodos de detecção dos produtos de PCR: sondas fluorogênicas e coloração por SYBR Green. Ambos os métodos apresentaram detecção rápida e reprodutível da expressão de genes. A principal vantagem do método de SYBR Green frente as sondas fluorogênicas é a facilidade de uso e custo menor, porém as sondas apresentaram detecção e especificidade superior. Sendo assim, para genes expressos em níveis mais baixos seria mais adequado utilizar o método de sonda fluorogênica.

Em 2002, Hwang et al.⁶⁷ estudaram a ação da enzima superóxido desmutase contendo cobre e zinco (Cu/ZnSOD), umas das enzimas antioxidantes mais determinantes sobre a virulência de alguns microorganismos. Por meio da técnica de "*URA blaster*", foi realizada a disruptura do gene SOD1, seguida de análise. O resultado dessa mutação mostrou menor formação de hifa em meio específico "*Spider*". Os autores ainda relatam que esse mutante é mais sensível a menadiona, um agente redoxciclante. Porém ainda apresenta uma resposta ao estresse oxidativo. Além disso, as células mutantes de SOD1 apresentaram crescimento mais lento comparadas às cepas de referência. Esses resultados sugerem que a mutação de SOD1 em *C. albicans* proporciona uma susceptibilidade maior a atividade fungicida de macrófagos, quando comparada as cepas de referência. Assim, os autores

concluíram que a enzima Cu/Zn SOD desempenha um papel essencial para a proteção do fungo *C. albicans* contra os estresses oxidativo.

Martchenko et al.¹⁰, em 2004, conduziram um estudo no qual identificaram três potenciais de genes da família superóxido dismutase em *C. albicans*. E assim, estudaram a expressão, regulação e função desses genes em especial, o SOD5. Neste estudo caracterizam os genes da família “*Superóxido Dismutase*” (SOD) como responsáveis por converter ROS em espécies menos prejudiciais ao fungo *C. albicans*. Neste estudo ainda citam que o gene SOD1 é expresso no citosol enquanto que o SOD3, na mitocôndria. Com o intuito de avaliar 1 dos 3 novos genes (SOD4, SOD5 e SOD6) identificados na sequência do genoma de *C. albicans*, os autores cultivaram cepas padrão de *C. albicans* e de *Escherichia coli* e fizeram extração de RNA a partir do método de fenol seguido da análise pelo método de *Northern Blot*. Modelos experimentais em ratos também foram realizados pelo grupo para análises de macrófagos e de virulência bem como carga fúngica. O gene alvo para este estudo foi o SOD5. O gene ACT1 foi usado como controle interno. Também na metodologia, realizaram a confecção de genes mutantes do SOD5 para analisar se realmente a remoção deste gene alvo interferiria nos resultados. Os autores observaram que a transcrição do gene SOD5 foi super expressa durante a transformação morfológica de levedura para hifa de *C. albicans*, assim como a expressão desse gene foi aumentado quando células eram cultivadas em substratos não fermentados com única fonte de carbono. A supressão do gene SOD5, através do gene mutante, produziu uma cepa mutante viável que mostrou sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Portanto, os autores concluíram que o gene SOD5 é necessário para a virulência de *C. albicans* em um modelo de infecção. No entanto, a cepa mutante do gene SOD5 (*sod5*) apresentou a mesma resistência ao ataque de macrófagos que a cepa padrão, o que sugere que a perda de virulência não ocorre devido a uma sensibilidade aumentada ao ataque de macrófagos. Concluíram que o gene SOD5 está sob uma regulamentação complexa de expressão gênica sendo que os testes funcionais não mostram envolvimento de SOD5 na defesa contra a morte induzida por macrófagos. Porém, os efeitos da supressão do gene de virulência SOD5 podem sugerir o envolvimento de Sod5p na remoção de superóxidos produzido pelo hospedeiro. Com isso, a expressão gênica de SOD5 aumenta a formação de hifas, sendo que a ausência deste gene promove efeito na virulência deste microrganismo.

Em 2005, Pasrija et al.⁶⁸ caracterizaram a mutação do gene ERG1 no mecanismo de biossíntese do ergosterol. A interrupção do gene ERG1 de *C. albicans*,

que codifica esqualeno epoxidase, ocasiona desequilíbrio na produção de ergosterol e acúmulo do esqualeno, um dos seus precursores que pode ser tóxico no meio intracelular do fungo. Além disso, os autores observaram que as cepas mutantes com a deleção do gene *ERG1*, foram incapazes de formar hifas em vários meios. Neste estudo os autores concluíram que a ausência do ergosterol possui efeito direto na susceptibilidade e morfogênese de *C. albicans*.

Em 2009, Borecká-Melkusová et al.⁶⁹, por meio da técnica de transcrição reversa PCR e PCR em tempo real, avaliaram a expressão dos genes *ERG1*, *ERG3*, *ERG7*, *ERG9*, *ERG11* e *ERG25* em resposta a incubação com fluconazol e a formação de biofilme em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A expressão do gene *ERG11* foi encontrada como sendo baixa ou moderada e foi regulada pela adição de fluconazol mais do que pela formação de biofilme. Uma expressão muito baixa ou não detectável foi identificada para os genes *ERG1*, *ERG7* e *ERG25* em *C. albicans*. A expressão do *ERG9* aumentou na presença do fluconazol em alguns isolados. Após a incubação com fluconazol, a formação de biofilme por *C. dubliniensis* foi acompanhada de uma “*up-regulation*” dos genes *ERG3* e *ERG25* em *C. albicans*.

Visando investigar como a exposição ao fluconazol afeta os genes ERGs, Nailis et al.⁵⁰, em 2010, investigaram a resposta transcricional em biofilmes maduros e jovens, cultivados in vitro, após um curto e longo período de exposição a altas doses de fluconazol ou anfotericina B. O tratamento de biofilmes com altas doses de antifúngicos resultou em uma resposta transcricional específica. A exposição dos biofilme ao fluconazol induziu a regulação positiva de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol (*ERG1*, *ERG3*, *ERG11* e *ERG25*). O tratamento de biofilmes com anfotericina B resultou na superexpressão de *KRE1* e *SKN1*, dois genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de β -1,6-glucano. Os dados indicam que as células sésseis de *C. albicans* apresentam regulação controlada da expressão gênica, pois sintetizam rapidamente uma resposta transcricional específica para o fármaco na presença de altas doses de antifúngicos. Essas alterações transcricionais sugerem aumento da biossíntese de ergosterol (para o fluconazol) e aumento da biossíntese de β -1,6-glucano (para anfotericina B) em células sésseis de *C. albicans* que podem contribuir para um fenótipo de biofilme resistente.

Nesse mesmo ano, Nailis et al.¹⁵ investigaram a relação da patogenicidade da *C. albicans* e a formação de biofilme. Para isso, relacionaram outros estudos que comprovaram que a expressão de genes das famílias HWP (*hyphal wall protein*), ALS

(*agglutinin-like sequences*), SAP (*secreted aspartyl proteases*), PLB (*phospholipase B*) e LIP (lipase) associam-se com a formação do biofilme em superfícies mucosas. Através da técnica de qPCR, investigaram se esses genes que codificam potenciais fatores de virulência são expressos em maiores quantidades em biofilmes associados a superfícies abióticas. Para isso, biofilmes de *C. albicans* foram formados em placas com microtitulação de silicone (MTP), em reatores “Centre for Disease Control” (CDC) em um modelo de animal in vivo (modelo de cateter de poliuretano instalado subcutâneo -SCR), e em superfícies mucosas em um modelo reconstituído do epitélio humano -RHE). De acordo com os resultados observados, os genes HWP1 e os pertencentes às famílias dos genes ALS, SAP, PLB foram expressos nos biofilmes de *C. albicans*. Os genes ALS1 ao ALS5 foram ativados em todos os diferentes modelos, enquanto o gene ALS9 foi reprimido. Os genes HWP1 e ALS6 apresentaram super-expressão em todos os modelos, exceto no MTP e RHE, respectivamente. Os níveis de expressão do SAP1 foram mais evidenciados nos modelos in vitro, enquanto a expressão dos genes SAP2, SAP4 e SAP6 foram maiores no modelo in vivo. Além disso, SAP5 foi muito regulada nos modelos in vivo e RHE. Para SAP9 e SAP10, a expressão gênica observada foi similar em todos os modelos experimentais. Não houve aumento de expressão dos genes PLB nos biofilmes, enquanto que para os genes LIP1-3, LIP5-7 e LIP9-10, houve aumento da expressão nos modelos experimentais in vitro. Com isso, os autores concluíram que para o gene HWP1 e a maioria dos genes pertencentes às famílias ALS, SAP e LIP houve super expressão em biofilmes de *C. albicans*. Outra conclusão é que os resultados encontrados para os diferentes modelos mostram diferença estatística entre eles, portanto não podendo extrapolar os resultados de um modelo para o outro.

Em 2012, Yin e Chunyang ⁷⁰, em um estudo in vivo, compararam a produção de fosfolipase entre cepas de *C. albicans* resistentes e suscetíveis ao fluconazol, afim de correlacionar a resistência a essa classe de droga antifúngica com a virulência. Para isso, quinze cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (CIM $\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$) e sensíveis ao fluconazol (CIM $\leq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$) foram incubadas em ágar gema de ovo para detectar a atividade da fosfolipase. A virulência de *C. albicans* foi avaliada pelo tempo médio de sobrevivência de camundongos infectados. A expressão do RNAm e da proteína da fosfolipase B1 foi detectada pelo método de RT-PCR e *Western blot*. Diferenças significativas entre os dois grupos de cepas de *Candida* foram observadas na atividade da fosfolipase e no tempo médio de sobrevivência dos camundongos infectados. A expressão do RNAm e da proteína fosfolipase B1 (ambas das formas

secretadas extracelular e intracelular) foi maior nas cepas resistentes do que nas cepas suscetíveis. Os resultados indicam que a atividade da fosfolipase de *C. albicans* pode estar relacionada à sua resistência a drogas antifúngicas.

No ano de 2012, Nobile et al.⁷¹ estudaram a formação de biofilme de *C. albicans*. Para isso, combinou métodos da genética clássica, ferramentas do genoma, sequenciamento de RNA e dois modelos em animais in vivo para compreender o mapa do circuito de transcrição responsável pelo controle da formação de biofilme em *C. albicans*. Neste estudo, foram avaliados seis genes reguladores que controlam a expressão de mais de 1000 outros genes que participam da formação do biofilme: BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 e BRG1. Por meio de microscopia confocal, observaram que as cepas mutantes para estes genes formam biofilmes com arquitetura mais fina e com menor quantidade de hifas, quando comparados com o biofilme formado com a cepa padrão. Para comprovação do resultado encontrado, os genes foram reintroduzidos e os biofilmes formados apresentaram arquitetura muito semelhante ao da cepa parental. Assim, os autores comprovaram que os genes avaliados são essenciais para a formação do biofilme in vitro tanto para o modelo de cateter quanto o de prótese.

Nesse mesmo ano, Monroy-Pérez et al.⁷² conduziram um estudo in vivo que avaliou a frequência de expressão de oito genes da família ALS (ALS1-7, ALS9) bem como a característica genotípica do gene HWP1 em um grupo de isolados clínicos de *C. albicans* de 264 pacientes mexicanas acometidas com candidose vaginal. A espécie *C. albicans* foi identificada pela amplificação pela técnica de PCR. Os genes ALSs (adesão às células epiteliais) e HWP1 (codifica uma proteína envolvida no processo de adesão das células na morfologia de hifas) foram identificados pela técnica de PCR convencional, e os seus níveis de expressão foram determinados por RT-qPCR. A expressão gênica foi avaliada em um modelo de reconstituição de epitélio vaginal humano (RHVE). Os autores concluíram com este estudo que 19% das infecções vaginais foram causadas por *C. albicans*, e uma elevada proporção das cepas carregavam genes que codificam proteínas envolvidas na adesão ao epitélio. Portanto, os genes ALSs e HWP1 foram expressos em RHVE, sugerindo que as proteínas de ALSs e Hwp1 desempenham papel importante na patogenicidade da infecção.

Em 2014, Alves et al.⁷³ realizaram um estudo para avaliar in vitro a co-infecção por *C. albicans* e *C. glabrata* de um epitélio vaginal humano reconstituído (RHVE). A capacidade de invasão e colonização de cada espécie foi avaliada através da

hibridação de sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) específico para cada espécie, microscopia confocal (CLSM) e RT-qPCR. O dano ao RHVE foi avaliado pela medição da atividade de lactato desidrogenase (LDH); a expressão gênica dos genes de virulência HWP1, ALSs, EPA, PLBs, PLD e SAPs nas espécies de *Candida* foi avaliada pela técnica de qPCR para os genes testados. Foi observado que as duas espécies induziram danos ao RHVE, no entanto, foi significativamente menor para *C. glabrata*. Em contraste, essa espécie apresentou aumento significativo na capacidade de colonização e invasão do RHVE quando essa espécie foi associada com *C. albicans*. Dos genes de virulência testados, os autores verificaram que os genes HWP1, PLD1 e ALS3 estavam associados à patogenicidade. Também foi observado que a expressão dos genes ALS1 e HWP1 foi induzida no modelo de co-infecção (com ambas as espécies), enquanto que o gene ALS3 teve expressão semelhante em ambos modelos de infecção. Os autores concluíram que o modelo RHVE, juntamente com ferramentas específicas utilizadas nas análises, permitem a avaliação da colonização e invasão de *Candida* com uma única espécie ou co-infecção. Ainda com esse modelo, concluíram que *C. albicans* é um colonizador do modelo RHVE muito mais invasiva em comparação com *C. glabrata*. No entanto, foi ressaltado que a co-infecção do sítio por *C. albicans* juntamente com *C. glabrata* aumentou a colonização e invasão da *C. glabrata*. Os resultados deste estudo sugerem que os genes de virulência HWP1, PLD1 e ALS3 desempenham papel importante na patogenicidade das duas espécies.

C. albicans responde ao estresse oxidativo e, essas reações podem ser consideradas críticas para sua virulência uma vez que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são geradas pelas células do sistema imunológico do hospedeiro. Segundo Komalapriya et al.⁷⁴, 2015, o conhecimento dos processos dinâmicos envolvidos no estresse oxidativo de *C. albicans* é necessário para uma compreensão adequada das interações fungo-hospedeiro. No estudo, os autores adotaram uma abordagem interdisciplinar para explorar as respostas dinâmicas de *C. albicans* ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O modelo matemático proposto integrou duas vias principais de sinalização do estresse oxidativo (vias Cap1 e Hog1) com os três principais sistemas antioxidantes (catalase, glutatona e tioredoxina) e a via das pentoses fosfato, que fornece equivalentes redutores necessários para a adaptação ao estresse oxidativo. O modelo integrou o conhecimento existente desses sistemas com novos conjuntos de dados genômicos, proteômicos, transcriptômicos, moleculares e celulares. Segundo os autores, CAP1 é essencial na modulação ao

estresse oxidativo, sua ativação induz a transcrição de diversos genes antioxidantes, dentre eles CAT1, TSA1, TRR1, TRX1, GLR1, TTR1 e o próprio CAP1. A ativação de HOG1, contribui para indução de CAP1. Segundo os autores, o modelo avaliado pode fornecer dados quantitativos do estresse oxidativo que auxiliam na compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*.

Em 2017, Xu et al.⁷⁵ avaliaram se a associação da berberina (BBR) e fluconazol (FLC) apresentam ação sinérgica contra *C. albicans* resistente ao FLC in vitro. Nesse contexto, a BBR atuaria como antifúngico de ação nesse sinergismo, enquanto o FLC desempenharia um papel secundário de aumentar a penetração da BBR no interior da célula. O estudo elucidou o mecanismo que faz com que *C. albicans* resistente ao FLC seja tolerante à BBR e o mecanismo pelo qual o tratamento com FLC poderia ajudar na penetração da BBR intracelular. Os autores investigaram pela técnica de *Real Time RT-PCR* os genes envolvidos na síntese de ergosterol (ERG1, ERG2, ERG3, ERG4, ERG5, ERG6, ERG7, ERG10, ERG11, ERG13, ERG24, ERG25), além dos genes MDR1, CDR1 e CDR2. Todos esses genes estão envolvidos nos mecanismos de resistência de *C. albicans*. A análise quantitativa do ergosterol mostrou que o tratamento com a BBR poderia aumentar o conteúdo do ergosterol celular. A técnica de *Real Time RT-PCR* revelou uma regulação global de genes de síntese de ergosterol em resposta a exposição a BBR. Além disso, o ergosterol exógeno poderia diminuir a taxa intracelular e aumentar a expressão dos genes da bomba de efluxo (MDR1, CDR1 e CDR2) do fármaco, reduzindo a suscetibilidade de *C. albicans* à BBR. Semelhante ao FLC, outros agentes antifúngicos que atuam na biossíntese do ergosterol foram capazes de atuar sinergicamente com a BBR contra *C. albicans* resistente ao FLC. Contudo, os agentes antifúngicos que não atuam no ergosterol não foram sinérgicos com a BBR. Os resultados desse estudo, sugeriram que o ergosterol é necessário para a tolerância a BBR, e que o FLC aumenta a suscetibilidade de *C. albicans* resistente ao FLC a BBR, pois permite que essa droga penetre no interior da célula e promova a inibição da biossíntese do ergosterol.

Em 2018, Hosseini et al.⁷⁶, avaliaram os efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-np) em proteínas de adesão como a aglutinina (ALS1 e ALS3). Para isso, *Candida spp.* oriundas de infecções do trato urinário foram coletadas de 280 mulheres voluntárias admitidas no hospital Sayad Shirazi, no nordeste do Irã no ano de 2018. Um total de 115 cepas de *C. albicans* suscetíveis e 10 resistentes ao fluconazol foram expostas às partículas de ZnO-np (intervalo de 0,02 a 18,1 µg / ml). A expressão dos genes ALS1 e ALS3 foi avaliada por PCR em tempo real. Os autores observaram que

o ZnO-np é eficaz na redução da expressão de ALS1 e ALS3 em cepas resistentes ao fluconazol. Portanto, o ZnO-np pode ser um candidato no controle de cepas de *C. albicans* de infecções urinárias, particularmente em instrumentos médicos.

Em 2018, Alonso et al.⁷⁷ publicaram um artigo que investigou *primers* específicos para *C. albicans* em uma análise *in silico* e *in vitro*. A análise *in silico* foi realizada por meio de uma pesquisa no Pubmed de artigos que possuam sequências de *primers* específicos para análise da expressão gênica de *C. albicans*. Em seguida, a similaridade da sequência de vinte e oito *primers* foi verificada através dos programas BLASTn e ClustalW2. A análise das estruturas secundárias foi realizada usando MFold. Foram realizados testes com *primers* da literatura e quando esses não apresentaram características satisfatórias (presença de estruturas secundárias, temperatura de *melting* (Tm) discrepantes para o *forward* e *reverse* das sequências e falta de especificidade) após análise *in vitro*, novos *primers* foram projetados usando Beacon Designer™ e sequências obtidas a partir do "*Candida Genome Database*". Os *primers* selecionados foram testados *in vitro* por PCR utilizando DNA genômico de cinco espécies de *Candida* diferentes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*). Os produtos de PCR resultantes foram analisados quanto a sua integridade em gel de agarose. As reações de qPCR foram realizadas para determinar a concentração ótima dos *primers* e a eficiência. O PCR demonstrou que *primers* publicados para o SAP1 e HWP1 eram específicos para *C. albicans*, já o *primer* para o SOD1 reagiu com *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A sequência de *primers* designados para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foi específica para *C. albicans*, enquanto que as de CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 e PLB1 foram específicas para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Esses *primers* foram otimizados e todos apresentaram um único pico na "Melting Curve", coeficiente de correlação de $\cong 1$ e eficiência de reação de qPCR de 90-110%, com slope de $\cong -3,3$. Portanto, esses *primers* foram considerados adequados para futuras análises de expressão gênica a partir de amostras clínicas.

Em 2019, Barbosa et al.⁷⁸ isolaram *Candida spp.* da saliva de usuários de prótese e avaliaram fatores de virulência. Também investigaram o efeito antifúngico de três enxaguatórios bucais. Para isso, quarenta e três leveduras de *Candida* foram isoladas de 32 dos 70 pacientes selecionados, e os fatores de virulência das espécies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram investigados pela técnica de PCR. Apenas *C. albicans* apresentou genes relacionados à adesão e proteinases (ALS2, ALS3, SAP1 e SAP3). A atividade da aspartato proteinase (SAPs) foi encontrada em 60,46% dos isolados. Esses fatores desempenham um papel

fundamental no desenvolvimento da infecção, especialmente em indivíduos suscetíveis, como os idosos, pacientes imunocomprometidos e aidéticos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Coleta das Amostras

Para o desenvolvimento do presente estudo foram avaliadas isolados de cepa de *C. albicans* (ATCC 96901- resistente a fluconazol) (Rockville, MD) recuperadas de camundongos com candidose oral induzida que foram submetidos ao tratamento com aPDT mediada pelo Photodithazine® (PDZ) (derivado de clorina e6, produzido em Moscou, Rússia – VETADRAND, Co) associado a luz LED (LXHLPR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA) (660nm) de 50 J/cm² ⁴³, Nistatina (suspensão oral 100.000 UI) ou associação dos tratamentos (NIS+PDT ou PDT+NIS). Esse estudo corresponde a Dissertação foi intitulada “Avaliação da eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol” e foi desenvolvida pela aluna de mestrado Karem Janeth Rimachi Hidalgo (bolsista da CAPES)⁴⁴. A seguir estão descritos alguns detalhes desta pesquisa (Quadro 1 e Quadro 2).

Para indução da infecção, os animais foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona nos dias 1, 5, 9 e 13 do experimento na dose de 100 mg/kg de massa corporal. Tetraciclina (0,83 mg/mL) foi administrada durante todo período experimental. No dia 2, os animais foram sedados com 0,1mL de cloridrato de clorpromazina 10 mg/mL e Mini-swabs estéreis embebidos na suspensão de *C. albicans* serão friccionados por todo o dorso da língua dos animais, por 30 segundos, para assegurar a infecção (Quadro 1). No dia 7 a infecção estava presente e os tratamentos foram realizados (dias 7 a 11)⁴⁴.

Quadro 1 - Relação das etapas realizadas em cada dia do experimento em animais

Dias	Protocolo experimental (Procedimentos)
1 a 18	Antibioticoterapia
1, 5, 9 e 13	Imunossupressão
2	Inoculação por <i>C. albicans</i> (fricção mini-swab)
7 a 11	Realização dos tratamentos: aPDT, Nistatina ou associação dos tratamentos (aPDT+NIS ou NIS+aPDT)
12 e 18	Recuperação de <i>C. albicans</i> e sacrifício dos animais

Fonte: Elaboração própria.

Os tratamentos foram realizados durante 5 dias consecutivos (Quadro 2), e então, foi realizada a recuperação de *C. albicans*. Para isso, mini-swabs foram friccionados sobre o dorso lingual dos animais por 1 minuto. Estes swabs foram transferidos para tubos contendo 1 mL de solução salina e agitados por 1 minuto para o desprendimento das células de *C. albicans*. Essa amostra foi diluída (10^{-1} a 10^{-4}) e plaqueada em duplicata em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) incubadas em estufa durante 48 horas. Após esse período, a coleta das colônias foi realizada com auxílio de uma alça de inoculação. Uma colônia foi armazenada em ependorfs contendo 300µL de glicerol 50%, esses foram mantidos em freezer -80°C (Thermo Fisher Scientific™) até o momento da realização do teste de avaliação da suscetibilidade ao fluconazol (CIM e CFM).

Os animais foram sacrificados 24 hs e 7 dias após a finalização dos tratamentos, a língua foi removida cirurgicamente e parte dela foi armazenada em 700µL de RNAlater (RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution Protocol Ambion®) para análise da expressão gênica de *C. albicans*.

Quadro 2 – Descrição dos grupos de estudo e condições experimentais do estudo em camundongos

Grupos*	Descrição
aPDT (P+L+)	Na língua dos animais, foi aplicado 200 mg/L de PDZ, permanecendo incubado por 20 min, seguido por iluminação com luz LED 50 J/cm ² .
P+L-	Na língua dos animais, foi aplicado 200 mg/L de PDZ, permanecendo incubado por 20 min.
P-L+	As línguas dos animais foram iluminadas com 50 J/cm ² de luz LED (19 minutos).
P-L- (controle)	Os animais foram inoculados com a cepa e não receberam qualquer tipo de tratamento.
NIS	Os animais foram tratados com antifúngico Nistatina (100.000 UI) durante 5 dias.
aPDT+NIS	Na língua dos animais foi realizada a aPDT e em seguida receberam o tratamento com Nistatina (100.000 UI).
NIS+aPDT	Os animais foram tratados com antifúngico Nistatina (100.000 UI) e em seguida receberam o tratamento com aPDT.

*Para cada condição experimental foram utilizados 24 animais por grupo, sendo que 12 animais as cepas foram coletadas nos diferentes períodos de 24 horas e 7 dias após os tratamentos.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (CIM) das Células Recuperadas Após os Tratamentos

O teste de Mínima Concentração Inibitória (CIM) ao Fluconazol foi realizado nos isolados nas recuperados dos animais que receberam tratamento para avaliar se os tratamentos podem alterar o perfil de resistência das células de *C. albicans* ao fluconazol. Esses isolados foram descongelados e plaqueados. Assim, a susceptibilidade das células de *C. albicans* sem tratamento (P-L-) e após os tratamentos propostos foi avaliada de acordo com o método de microdiluição em caldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷⁹. O fluconazol (F8929, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em água estéril ultrapura⁵⁷. Como branco, foi utilizado 100 µL de RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 1640 (2×concentrado), mais 100 µL de água estéril ultrapura (sem células e agente antifúngico). Como controle, apenas as suspensões

celulares foram testadas sem agente antifúngico. Foram inoculadas diluições seriadas de fluconazol (variando de 2 a 1024 µg/ml) em placas de 96 poços com suspensão de microrganismo ajustada para obter uma concentração final de inóculo de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em meio RPMI 1640 2 x concentrado, tamponado com pH 7,0 com tampão de ácido 3-N-morfolino propanosulfônico 0,65 M (MOPS)⁵⁷.

As placas foram incubadas a 35°C e observadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento após 24 h. Além da leitura visual, a densidade óptica de cada poço da placa foi medida em leitor de placa (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom®) a 540 nm após 24 horas de incubação. Foi também realizado o plaqueamento em SDA em duplicata e a contagem de colônia viáveis da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A CIM foi calculada com base na densidade de crescimento e foram consideradas as menores concentrações de fármaco que resultaram em redução no crescimento em comparação com o controle de crescimento livre da droga. E foi considerada CFM a concentração mínima que resultou em ausência de colônias.

4.3 Expressão Gênica de *C. albicans* Presente nas Línguas dos Camundongos

A análise da expressão gênica de *C. albicans* foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara sob a supervisão da Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan. A metodologia RT-qPCR foi utilizada com objetivo avaliar a expressão de genes específicos de *C. albicans* relacionados a virulência e resistência conforme descritos nos Quadros 3 e 4:

Quadro 3 - Genes de virulência de *C. albicans*

Gene	Descrição dos Genes
ALS1	Agglutinin-Like Sequence 1 (Aglutinina). O gene ALS1 codifica proteínas da parede celular necessárias para adesão celular durante a fase inicial de formação do biofilme. Tem papel complementar na formação de biofilme ^{7,80} .
CAP1	Adenilato ciclase. CAP1 é responsável pela ativação de genes em resposta ao estresse oxidativo em <i>C. albicans</i> . A sua ativação induz a transcrição de vários genes antioxidantes ^{9,74} ajudando na proteção dos micro-organismos contra os mecanismos de defesa do hospedeiro.
CAT1	Catalase. Atua como gene do estresse oxidativo. Ele caracteriza a via central de desintoxicação de H ₂ O ₂ pela enzima catalase. CAT1 é um dos fatores de transcrição que contribuem significativamente para a virulência de <i>C. albicans</i> ^{12,74} .
EFG1	EFG1 é um gene regulador de transcrição. Controla a formação de biofilme em <i>C. albicans</i> . Faz parte do circuito regulador de hifas ¹³ .
HWP1	Codifica uma proteína da parede de hifas envolvida na adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais. Propicia a adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais ao agir como um substrato para transglutaminase apresentando um papel importante na patogênese deste fungo ^{15,72} .
LIP3	Lipase. Está associada ao crescimento do biofilme sobre superfícies mucosas ¹⁵ .
PLB1	Fosfolipase B promove a adesão e penetração do fungo na célula do hospedeiro, contribuindo para destruição tecidual ^{11,16} .
SAP1	Secreted Aspartyl Proteinase 1. SAP1 é um gene que codifica a expressão de proteinase nas fases iniciais da adesão, refletindo na colonização e contribuindo para a lesão do tecido pois degrada as proteínas do tecido ¹¹ .
SOD1	Superóxido dismutase. SOD1 é um gene que contribui para a virulência de <i>C. albicans</i> expressando proteínas para que o fungo dribles o estresse oxidativo e sobreviva aos mecanismos de defesa do organismo ^{10,67} .

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 4 - Genes envolvidos na biossíntese de ergosterol de *C. albicans*

Gene	Descrição dos Genes
ERG1	Squaleno epoxidase, catalisa um passo essencial na biossíntese do esterol ⁵⁰ .
ERG3	C-5 esterol desaturase, converte esteróis saturados, como o episterol, introduzindo ligações duplas, participando assim das reações finais da biossíntese de ergosterol ⁵⁰ .
ERG 11	Pertence ao citocromo da família P450, é uma enzima chave na biossíntese de ergosterol catalisando a conversão do lanosterol, por meio da remoção do grupo 14- α -metil ⁵⁰ .
ERG 25	Putative C-4 methyl esterol oxidase, importante para desmetilação C4 dos intermediários da biossíntese de ergosterol ⁵⁰ .

Fonte: Elaboração própria.

4.3.1 Desenho de novos *primers*

Além dos *primers* para genes de virulência desenhados e padronizados por Alonso et al.⁷⁷, Naglik et al.¹¹ e Zhu et al.⁸¹, novos *primers* foram desenhados e padronizados para os genes envolvidos na biossíntese de ergosterol de *C. albicans*. Em resumo, para padronização dos novos *primers*, foram realizadas as seguintes etapas: 1-obtenção do gene no formato FASTA na base de dados “Pubmed-NCBI”; 2- análise de homologias através do *Blast*; 3- análise de estruturas secundárias através da ferramenta *Mfold* e, finalmente, 4- análise no programa *Oligo Primer Analysis Software*TM.

4.3.1.1 Obtenção do gene no formato FASTA

Através de uma busca no site Pubmed-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), as sequências no formato FASTA foram obtidas para os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25. O nome do gene deve ser colocado na lacuna “search” selecionando a opção “Gene” ou “Nucleotide” do site, uma nova janela é aberta, devendo clicar em cima do gene correspondente a espécie de interesse (*Candida albicans*). As características desse gene irão aparecer, seleciona-se o FASTA. Essa sequência foi analisada em documento do Word. Os *primers* desenhados no presente estudo, tanto o *Forward* quando o *Reverse* foram encontrados na sequência e após esta etapa, o produto do PCR (Amplicon) pôde ser visualizado. Amplicon é o produto da

amplificação, conta-se a partir da primeira letra do *Forward* e termina-se na última letra do *Reverse* (espelho), o amplicon então determina o tamanho do produto. O *Forward* é encontrado com a mesma sequência descrita enquanto o *Reverse* é encontrado em sua forma de espelho (Figura 1), uma vez que a sequência FASTA refere-se à fita “sense” do gene.

Figura 1 - Exemplo *Primer* gene ERG1: Forward, Reverse e seu espelho

ERG1
<u>Forward:</u>
5'-TGACGAGACCATTACTATCC-3'
<u>Reverse:</u>
5'-AATCCCAGTCATCAACATTC-3'
Espelho: GAATGTTGATGACTGGGATT

Fonte: Elaboração própria.

4.3.1.2 Basic Local Alignment Search Tool

Após os *primers* serem encontrados nas sequências FASTA dos genes, estes foram analisados no *Basic Local Alignment Search Tool* (*Blast*). *Blast* é um programa utilizado para checar se as sequências dos *primers* são homólogas a outras sequências existentes que não as dos genes alvos do estudo. Esse programa busca homologia em todas as bases de dados (bactérias, fungos, entre outros), além disso, busca se a sequência dos *primers* desenhados são homólogas com outros genes da mesma espécie e com os genes de outras espécies. Esta análise é realizada através de uma interface da web redirecionada pelo site PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Após clicar no ícone BLAST, a página é redirecionada. Nesta nova página o campo “*nucleotide blast*” deve ser selecionado e uma nova página é aberta com os campos para colocarmos as sequências dos *primers* e as características que queremos que sejam analisadas. Depois de realizada essa busca, o resultado é apresentado em outra janela e as homologias encontradas são detalhadas.

4.3.1.3 Mfold

Para analisar a existência de estruturas secundárias nos *primers* escolhidos e nos produtos de qPCR, utiliza-se o programa Mfold. Mfold é um programa gratuito disponível na internet através do site <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>. Este programa apresenta como

principais vantagens a possibilidade de alterar as condições iônicas dos *primers* ($[Na^+]$ e $[Mg^{++}]$) e as temperaturas desejadas para o anelamento dos mesmos. A escolha dessas características permite melhor fidelidade dos resultados *in silico*, pois se assemelha mais as características da técnica *in vitro*. As características de escolha para a análise de estruturas secundárias nas sequências foram:

- Folding temperature: 60°C
- $[Na^+]$: 50 mM
- $[Mg^{++}]$: 3 mM

4.3.1.4 Oligo Primer Analysis Software™

Oligo Primer Analysis Software™ é um software desenvolvido para desenhar *primers* e sondas para ensaios de PCR. Além de desenhar *primers* novos com características pré-determinadas, essa ferramenta também analisa *primers* já desenhados. Com esta ferramenta, foi realizado o desenho dos *primers* para os genes envolvidos na biossíntese de ergosterol.

4.3.2 Extração de DNA para padronização do primer

Cepas de *Candida albicans* (Ca) (SC5314), *Candida glabrata* (Cg) (ATCC 2001), *Candida tropicalis* (Ct) (ATCC 4563) e *Candida dublinensis* (Cd) (CBS 7987) foram descongeladas e realizada a extração de DNA. O DNA extraído das diferentes espécies de *Candida* foi usado como *template* na reação de PCR para testar a especificidade dos *primers*. Posteriormente, para analisar a integridade do material genético, foi realizado gel de agarose com os produtos de PCR.

4.3.2.1 Extração e isolamento do DNA

Para a extração do DNA, as cepas das espécies de *Candida* foram descongeladas e reativadas em placas de petri contendo o meio SDA. Estas foram mantidas por 48 horas em estufa a 37°C. Decorrido este período, de 5 a 10 colônias foram coletadas da placa e cultivadas em 10 mL de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) *overnight* (pré-inóculo). Em seguida, preparou-se os inóculos incubando 500 µL de cada suspensão do pré-inóculo em 9,5 mL de YNB (1:20) por aproximadamente 8 horas a 37° C, para que as células

alcançassem o meio de sua fase exponencial de crescimento, o que proporcionaria maior quantidade de DNA íntegro. O crescimento dos microrganismos foi monitorado longitudinalmente por espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm para determinar a densidade ótica (DO). A DO de cada espécie correspondente ao meio da fase de crescimento exponencial foi: *C. albicans* DO_{540nm} 0,502; *C. dubliniensis* DO_{540nm} 0,499; *C. glabrata* DO_{540nm} 0,565; *C. krusei* DO_{540nm} 0,543; *C. tropicalis* DO_{540nm} 0,512. Decorrido esse período a suspensão foi centrifugada durante 10 minutos a 4 °C e rotação de 5,000 xg, o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -20 °C até o momento de sua utilização.

A extração do DNA dos microrganismos foi realizada utilizando-se o kit de purificação *EPICENTRE MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (ILLUMINA, INC, San Diego, CA, USA) seguindo a metodologia descrita a seguir:

Inicialmente, os *pellets* dos diferentes microrganismos foram transferidos para microtubos contendo 500 µL de Tris EDTA (TE) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), e esses foram centrifugados por 10 min a 10,000 xg a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de cada amostra foi então ressuspensão em 100 µL de TE, adicionou-se 10,9 µL da enzima lizosima (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) e 5 µL de mutanolisina (5U/µL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), e incubou-se a 37 °C por 30 min.

O volume dos reagentes do Kit de purificação foi ajustado para aumentar a eficiência da extração do DNA total da seguinte forma:

a) Alíquotas de 2 µL da enzima proteinase K (20 mg/mL) foram diluídas em 350 µL da Solução de Lise Celular e Tecidual (*Tissue and Cell Lysis Solution*);

b) Alíquotas de 350 µL da Solução preparada foram adicionadas nas amostras de *Candida* separadamente, estas foram misturadas vigorosamente e incubadas a 65 °C por 15 minutos;

c) Após essa incubação, as amostras ficaram a 37 °C, adicionou-se 2 µL da enzima RNase A (10 mg/mL) e incubou-se a 37 °C por 30 min;

d) As amostras foram colocadas no gelo por 5 min;

e) Alíquotas de 150 µL do Reagente para Precipitação de Proteína (*MPC*) foram adicionados à amostra lisada e esta foi vortexada por 10 seg;

f) Em seguida a amostra foi centrifugada por 10 min a 10,000 xg a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pellet descartado;

g) Foram adicionados 750 µL de isopropanol, a solução foi homogeneizada e incubada overnight;

h) A amostra foi novamente centrifugada por 10 min a 10,000 xg a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado;

i) Para lavar as amostras, foram adicionados 200 µL de etanol 75% sobre o DNA (2 vezes) com o acréscimo de 1 lavagem com 200 µL de etanol 99% para melhor secagem do pellet, decorrida essas lavagens, as amostras foram centrifugadas por 1 min e o sobrenadante descartado;

j) O DNA foi resuspenso em 35 µL de tampão TE e quantificado em nanoespectrofotômetro (DO 260nm e razão DO 260/280) (NanoDrop DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, USA). Estas foram mantidas em freezer -20°C.

4.3.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Para checar a integridade do material genético, as amostras foram submetidas a técnica de Eletroforese em Gel de Agarose. Preparou-se uma solução tampão 1X TAE, onde 100 mL da solução tampão 10x TAE Buffer (ThermoFisher) foi diluída em 900 mL de água miliQ. Este tampão foi utilizado para fazer o gel de agarose e para preenchimento da cuba de eletroforese. Como o DNA tem peso molecular superior ao do RNA, o gel de agarose foi feito na porcentagem de 1%:

a) Em um béquer 1 grama de agarose (1% agarose Life Technologies Corpor, Staley Road, New York, USA) foi adicionado para cada 100 mL da solução de 1x TAE (escala feita para um gel pequeno);

b) A mistura foi colocada sobre uma placa pré-aquecida a 65 °C de um agitador magnético e após, foi colocado em micro-ondas até que a solução ficasse homogênea;

c) Após a solução estar homogeneizada, esta foi colocada novamente sobre uma placa pré-aquecida a 65 °C de um agitador magnético e foi acrescentado 1,6 µL de brometo de etídio (10 mg/mL);

d) A solução foi colocada imediatamente em um suporte, anteriormente nivelado com a bancada e com os pentes em posição (para a confecção das canaletas para a inserção das amostras) para que o gel fosse solidificado.

Para realizar a corrida do gel, foram adicionados 1 µg de DNA por canaleta (volume dependendo da quantidade de DNA de cada amostra) homogeneizado com solução “Loading Buffer” (1 volume do buffer para cada 4 volumes da amostra de DNA). No primeiro slot de cada pente foram acrescentados 15 µL de DNA Ladder (Invitrogen) e o gel com as amostras foi submetido à corrida horizontal em cuba da *Bio-Rad*® com potência de 70 V por 45 minutos. As imagens foram obtidas e analisadas através do *Bio-Rad Gel Doc System*® (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

4.3.3 Padronização dos *primers*

4.3.3.1 *Primer: diluição e armazenamento*

As sequências dos *primers* (*Forward* e *Reverse*) para os genes ERGs foram enviadas para síntese (Life Technologies Brasil Com Ind Prod Bio LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Esses *primers* liofilizados foram centrifugados por 1 minuto a 10,000 gx para que resquícios do pó não ficassem na tampa. Em seguida, estes foram suspensos em 0.1 mM (100 µM) de TE, pH 8,0, adicionando-se 10 µL de TE por nmol de *primer* (cada *primer* traz em sua bula a informação sobre a quantidade em nmol, assim como seu peso molecular). Cada *primer* foi vortexado e deixado em temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido esse período, os *primers* foram quantificados em nanoespectrofotômetro (*NanoDrop* DS-11, DeNovix). Essas soluções constituiriam a solução estoque de cada *primer forward* e *reverse*.

A concentração de cada solução estoque foi verificada colocando-se 1,25 µL da solução no nanoespectrofotômetro. A concentração de 0.1mM da solução estoque deveria estar próxima a concentração esperada indicada pelo fabricante (podendo variar até 20% para mais ou para menos), e a razão A_{260}/A_{280} deveria estar entre 1,8 – 2,1. Para o preparo de soluções de trabalho, as soluções estoque foram diluídas em água de grau molecular (*Molecular Grade Water*, Ambion) a 1:10, para atingir a concentração de 10 µM (Ex: 100 µL de *primer forward* + 100 µL de *primer reverse* + 800 µL de H₂O = 1000 µL do *primer* na concentração de 10 µM). Alíquotas de 50 µL de cada solução trabalho foram

armazenadas em freezer -20°C. Após, as soluções estoque a 100 µM foram armazenadas também em freezer -20°C.

4.3.3.2 Análise *in vitro* e padronização dos primers

Para verificar o tamanho do produto de PCR e se os *primers* eram detectados em outras espécies de *Candida*, os *primers* sintetizados foram testados contra um painel de DNA genômico das diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), utilizando a técnica de PCR convencional seguida de eletroforese em gel de agarose. Foi realizado um controle negativo da expressão em água de grau molecular (*Molecular Grade Water*, Ambion). Em seguida, a concentração ótima de cada *primer* foi estabelecida e curvas padrão foram confeccionadas para cada gene a partir dos produtos de PCR. A concentração ótima de cada *primer* bem como a confecção das curvas de concentração foram analisadas pela técnica de qPCR.

4.3.3.2.1 Especificidade dos primers por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose

A técnica de PCR convencional foi realizada utilizando o kit *Taq DNA Polymerase, recombinant kit* (Life Technologies Corpor, Staley Road, New York, USA). Para uma reação de 50 µL, foi feito um master mix com os seguintes componentes para cada *primer* e para cada reação:

- 40,25 µL de Água de grau molecular
- 5µL 10X iTaq Buffer
- 1,5µL 50mM MgCl₂
- 1µL 10mM dNTP Mix
- 1µL da solução trabalho do *primer* (10µM)
- 0,25µL iTaq DNA Polymerase

Alíquotas de 49µL desse Master Mix + 1µL do DNA genômico de cada espécie de *Candida* na concentração de 200ng/µL foram submetidas ao seguinte ciclo de amplificação:

- Ciclo 1: 95°C por 3 minutos (ciclo de desnaturação inicial);
Ciclo 2: 95°C por 15 segundos (desnaturação);
Temperatura de anelamento de cada *primer* por 30 segundos;
72°C por 30 segundos (ciclo de polimerização);
Repetir Ciclo 2 por 39 vezes.
Ciclo 3: 4°C por tempo infinito (∞ hold)

Os produtos de PCR então foram submetidos imediatamente em análise em Gel de Agarose a 2% e depois armazenados em freezer -20°C. O Gel de Agarose foi confeccionado nas seguintes concentrações (escala feita para um gel pequeno):

- 50 mL de 1X TAE;
- 1 grama de agarose;
- 0,8 μ L de brometo de etídio.

O gel foi corrido no aparelho horizontal *Bio-Rad* na potência de 70 V pelo tempo de 40 minutos. As imagens foram obtidas e analisadas através do *Bio-Rad Gel Doc System*® (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

4.3.3.2.2 Determinação da concentração ótima de cada *primer*

A concentração ótima de cada par de *primer* foi determinada utilizando a técnica de qPCR com o fluoróforo SYBR Green (iQ™ SYBR® Green Supermix-BIO-RAD Cat#1708882) e DNA genômico de *C. albicans* na concentração de 10 ng/ μ L. Para chegar nessa concentração, 5 μ L da amostra de DNA de *C. albicans* (200 ng/ μ L) obtido na extração do material genético (item 4.3.2.1), foi diluído em 95 μ L de Água Molecular Grade. Cada *primer* foi testado com diferentes concentrações de acordo com a característica de cada um. Os *primers* desenhados tiveram as concentrações testadas baseadas no resultado do gel

de agarose corrido no teste de especificidade. As concentrações testadas estão descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Concentrações testadas para os diferentes *primers*

Primer	Concentrações testadas
ERG1	200nM;250nM;300nM;350nM
ERG3	250nM;300nM;350nM;400nM
ERG11	200nM;250nM;300nM;350nM
ERG25	300nM;350nM;400nM;450nM

Fonte: Elaboração própria.

Os reagentes foram misturados formando um *Master Mix* (sem DNA) nas quantidades necessárias para que as reações ficassem em duplicatas na placa de qPCR. Os volumes que variam para cada concentração são os volumes da solução trabalho dos *primers* e da água para que se atinja a concentração desejada (Quadro 6).

Quadro 6- Componentes do Master Mix para testar as diferentes concentrações do *primer*

Concentração	200nM	250nM	300nM	350Nm	400nM	450nM
Reagente	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
Água de grau molecular	11,5 µL	11,375 µL	11,25 µL	11,125 µL	11 µL	10,875 µL
2X SYBR Green Supermix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
10µM <i>primer</i> Mix	0,5 µL	0,625 µL	0,75 µL	0,875 µL	1 µL	1,125 µL
DNA template	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Total	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Fonte: Elaboração própria.

Após a preparação do Master Mix, 61,25 µL foram transferidos para tubos menores (0,65 mL) contendo alíquotas de 1,25 µL do DNA *template* de *C. albicans*, ou 1,25 µL de H₂O de grau molecular. O tubo foi vortexado gentilmente e 25 µL do master mix com o DNA template ou H₂O de grau molecular (controle) foram plaqueados em duplicata na placa de qPCR. Foi realizada a análise de

Amplification Plots (gráficos que mostram o padrão de amplificação exponencial de produtos de PCR) e valores de *Cq* ou *Quantification Cycle* obtidos durante a reação de qPCR para determinação da concentração ótima de cada *primer*. Considera-se a concentração ótima do *primer* aquela que apresentar menor *Cq*.

Ciclo do qPCR:

- Ciclo 1: 95°C por 10 minutos (ciclo de desnaturação inicial);
- Ciclo 2: 94°C por 15 segundos (desnaturação);
 Temperatura de anelamento de cada *primer* por 30 segundos;
 68°C por 15 segundos (ciclo de polimerização);
 Repetir Ciclo 2 por 39 vezes.
- Melt Curve: 55°C por 5 segundos;
 95°C

4.3.3.2.3. Confeccção de curvas padrão para análise da expressão gênica

A curva padrão de cada *primer* foi confeccionada baseada no Produto de PCR dos *primers* para o DNA genômico de *C. albicans* (resultados da reação de PCR convencional com a concentração ideal de cada *primer* já determinada). Foi realizado PCR convencional com um total de 6 reações para cada gene. Mais precisamente, foi feito um master mix para cada par de *primer* com os componentes nos seguintes volumes para cada reação:

- 40,25 µL de Água de grau molecular
- 5µL 10X iTaq Buffer
- 1,5µL 50mM MgCl₂
- 1µL 10mM dNTP Mix
- 1µL da solução trabalho do *primer* (10µM)
- 0,25µL iTaq DNA Polymerase

Os volumes de água de grau molecular (40,25 µL) e solução trabalho do *primer* (1 µL) foram alterados de acordo com a concentração ótima de cada *primer*. Os volumes acima detalhados foram para a concentração ótima do *primer* de 200 nM. Por exemplo, o *primer* ERG1 teve sua concentração ótima avaliada em 300 nM, portanto, a quantidade de água de grau molecular foi alterada para 39,75 µL, enquanto para o *primer*, o volume foi alterado para 1,5 µL para chegar na concentração desejada.

Realizado o preparo do Master Mix, pipetou-se 49 μL em tubos de 0,2 mL onde já estavam aliquotados 1 μL do DNA genômico de *C. albicans* ou água de grau molecular. Os tubos foram levados à máquina de PCR com o mesmo ciclo citado no item 4.3.3.2.1, alterando a temperatura de anelamento de acordo com cada *primer* (sendo 50°C para *CAP1*, *CAT1* e *EFG1*, 55°C para *ALS1*, *HWP1*, *LIP3* e *PLB1*, 60°C para *SAP1* e *SOD1*). Posteriormente, os produtos de PCR obtidos das 6 reações (6 tubos) para cada *primer* com o DNA de *C. albicans* foram combinados e foi corrido um gel de agarose a 2% para checar a integridade do produto de PCR.

Após verificada a integridade, seguiu-se o protocolo de purificação do produto de PCR com o kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os volumes aqui estabelecidos foram contados para 6 reações de PCR convencional. O protocolo para purificação dos produtos de PCR foi realizado da seguinte forma:

- a) Foi realizada a união dos 6 produtos de PCR em tubo 2 mL e adicionado 1500 μL do Buffer PB;
- b) Em uma coluna de purificação do kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) instalada em um tubo coletor de 2 mL, foram pipetados 700 μL da amostra “a” e este tubo foi centrifugado por 60 segundos a 10,000xg;
- c) O líquido que estava na parte debaixo da coluna (tubo coletor) foi descartado e mais 700 μL da amostra foi pipetado e a coluna levada para centrifugar;
- d) O passo “c” foi repetido para o volume restante da amostra;
- e) A coluna foi então lavada por meio da adição de 750 μL de Buffer PE e centrifugação por 60 segundos a 10,000xg;
- f) O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna juntamente com o tubo foi levada para nova centrifugação;
- g) O tubo coletor foi descartado e a coluna colocada em um novo tubo de 1,5mL com tampa;
- h) Para eluição do produto de PCR, acrescenta-se 50 μL de Buffer EB no centro da coluna com muita cautela e essa foi centrifugada por 60 segundos a 10,000xg;

- i) O eluente resultante é o produto de PCR purificado, que deve ser armazenado em freezer -20 °C.

Após purificação, os produtos de PCR foram quantificados em nanoespectrofotômetro (DO 260nm e razão DO 260/280) (NanoDrop DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, USA), e assim foi possível calcular o rendimento do produto de PCR e o número de cópias resultante para cada *primer*. Através da técnica de eletroforese em gel de agarose 2% verificou-se a integridade e o tamanho dos produtos de PCR purificados. O gel foi corrido com a quantidade de 250 ng de cada produto de PCR por canaleta.

O valor da concentração do produto de PCR foi utilizado para calcular o número de cópias de cada gene, utilizando a equação descrita por Yin et al.⁶⁶:

$$\text{Cópias/mL} = \frac{(6,023 \times 10^{23}) (\text{concentração do produto de PCR em g/ml})}{(\text{Tamanho do produto de PCR em pb}) (6,58 \times 10^2)}$$

Após calcular o número de cópias de cada *primer*, foi calculado o volume necessário de H₂O de grau molecular e de produto de PCR para que se tenha 2x10¹⁰ cópias/μL e então, realizar a diluição seriada para se obter a curva.

4.3.3.2.4 Reação de qPCR para verificar a eficiência de cada *primer*

Após a realização da diluição seriada, a técnica de qPCR foi realizada para avaliar a eficiência e observar a qualidade da diluição dos produtos de PCR de cada gene específico.

O *Master Mix* foi preparado [*Template*, 2x SYBR Green, *primer* (10 μM) e água de grau molecular atentando-se para a utilização da quantidade de *primer* e H₂O específicos para a concentração ótima estabelecida para cada gene. O *Master Mix* foi realizado em quantidade adequada para fazer a reação em duplicata na placa de qPCR. Ao invés do DNA genômico de *C. albicans*, nesta etapa o *template* foi o próprio produto de PCR purificado de cada gene específico ou a H₂O molecular grade para o *NTC* (controle - *No template control*). O ciclo de qPCR foi o mesmo do item 4.3.3.2.2.

Os resultados foram avaliados no programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

Para todos os genes testados, o coeficiente de correlação foi de aproximadamente 1 e a eficiência de reação de 90-110%, com slope de aproximadamente -3.3^{66,82}. Obtidas essas características, as curvas foram utilizadas para avaliar a expressão gênica das amostras.

4.3.3.2.5 Etapas realizadas para uso dos genes de virulência delineados por outros autores

Para os genes desenhados e padronizados por Alonso et al.⁷⁷, Naglik et al.¹¹ e Zhu et al.⁸¹, o DNA genômico de *C. albicans* obtido no passo 4.3.2 foi usado para realização de PCR convencional, em seguida esses produtos foram submetidos aos passos do item 4.3.3.2.3 para confecção da curva padrão (diluição seriada) e o item 4.3.3.2.4 foi realizado para verificar se as curvas apresentavam características ideais para serem utilizadas para análise da expressão dos genes ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, SAP1 e SOD1.

4.3.4 Extração de RNA das línguas dos camundongos

Para a extração do RNA das amostras de língua dos camundongos, os tubos foram descongelados e o protocolo para Extração de RNA “fenol – clorofórmio” descrito por Cury et al.⁸³ foi utilizado com algumas modificações conforme descrito a seguir:

a) Adição de 300 µL de 1x PBS pH 7,2 (GIBCO by Life technologies™) a 4°C nos microtubos contendo as línguas e centrifugação dos mesmos a 10,000 xg por 15 minutos a 4°C para que houvesse a formação do pellet e consequente descarte do sobrenadante para remoção do glicerol;

b) Lavagem do *pellet* com 600 µL de 1x PBS a 4°C;

c) Este tubo foi novamente lavado com 1 x PBS e centrifugado nas mesmas condições para que fosse realizada a segunda lavagem das células. (Nesse momento, a língua foi macerada utilizando mini-pistilo);

d) 750 µL de NAES [833 µL de Acetato de Sódio 3M (SIGMA Life Science) na concentração de 50 mM + 1 mL de 0,5 M EDTA (Ambion®), na concentração de 10 mM + 5 mL de Solução SDS (Ambion®) a 10% na concentração final de 1% + 43,167 ml de Água de grau Molecular] a temperatura ambiente foram

adicionados à solução e o *pellet* foi ressuspensionado e vortexado por 15 segundos até formar uma suspensão homogênea;

e) Foram adicionados 750 µL de Ácido Fenol (5:1, pH 4,5, Ambion®) em cada tubo e esta solução foi homogeneizada;

f) A mistura foi transferida para um tubo de 2 mL contendo 0,8 g de micro-esferas (Biospec Products) (0,1 mm) e este, depois de misturado, foi colocado no aparelho de ruptura mecânica das células (*BeadBeater*) por 1 minuto;

g) Após esse processo, as amostras foram colocadas em gelo por 1 minuto;

Observação: os passos “f” e “g” foram repetidos mais 5 vezes sem adição de micro-esferas;

h) Estes tubos foram centrifugados a 10,000 xg por 5 minutos a 4°C e a parte aquosa da solução (onde se encontra o material genético) foi recuperada o máximo possível para um novo microtubo, o restante da reação (solução oleosa correspondente ao fenol, proteínas e micro-esferas) foi descartado;

i) Em cada amostra foram adicionados mais 750µL de fenol ácido. O tubo foi invertido gentilmente, e estes foram deixados em temperatura ambiente por 1 minuto (para que o fenol tivesse maior efetividade) e os tubos foram novamente centrifugados a 12,000 xg por 5 minutos a 4°C;

j) O tratamento com Fenol ácido (passo “i”) foi repetido mais uma vez;

k) A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 750 µL de solução 24:1 de clorofórmio: álcool Isoamílico (CHLO: 48 mL de Clorofórmio(SIGMA) + 2 mL de álcool isoamílico(SIGMA);

l) Este tubo foi invertido gentilmente e novamente centrifugado a 14,000 xg por 5 minutos a 4°C;

m) Após centrifugação a parte aquosa foi novamente removida para um novo tubo e esta já foi caracterizada como o RNA bruto;

n) Foram adicionados 60 µL de acetato de sódio 3M, pH 5, homogeneizados com o RNA bruto e posteriormente adicionados 600 µL de isopropanol gelado;

o) As amostras ficaram incubadas *overnight* em freezer -80°C;

p) Decorrido o tempo de incubação, o pellet do RNA foi recuperado por centrifugação dos tubos a 12,000 xg por 30 minutos a 4°C;

q) O pellet foi lavado 3 vezes com 500 μ L de Álcool 75%(SIGMA), com centrifugações de 5 minutos nos intervalos das lavagens, e uma lavagem extra com álcool 99%(SIGMA) foi realizada no final para melhor secagem do *pellet*;

r) O excesso do álcool foi removido e os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente sobre lenços de papel para que os *pellets* secassem;

s) Cada *pellet* seco foi então ressuspendido em 100 μ L de H₂O de grau molecular e deixados em gelo por 1 hora para hidratação. A concentração do RNA bruto foi quantificada em nanoespectrofotômetro (1,25 μ L da amostra) a 260nm.

As amostras de RNA bruto (250 ng do RNA por *slot*) foram analisadas via eletroforese em gel de agarose (2%) para verificar a integridade do RNA antes de passar para a fase de Purificação do RNA.

4.3.5 Purificação do RNA

Para remoção de qualquer contaminação com DNA, utilizou-se o kit de purificação “*Qiagen Rneasy MinElute Protocol*” (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo metodologia proposta por Cury et al.⁸³ e recomendação do fabricante.

4.3.5.1 Primeira etapa da purificação

Foi preparado uma solução contendo 10 μ L de β -mercaptoetanol(SIGMA) para cada 1 mL do Buffer RLT(presente no Kit da *Qiagen*). Assim iniciou-se o protocolo com os seguintes passos:

a) As amostras foram ajustadas para o volume de 100 μ L utilizando água de grau molecular;

b) Adicionou-se alíquotas de 350 μ L do Buffer RLT contendo o β -mercaptoethanol e as amostras foram vortexadas;

c) Em seguida, foram adicionados 250 μ L de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (“*up and down*”);

d) 700 μ L de cada amostra foram colocados em colunas individuais com membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 segundos e o sobrenadante do tubo coletor foi descartado;

e) Foi preparado um *master mix* com os componentes: 50 μ L de H₂O de grau molecular; 175 μ L de Buffer RLT contendo β -mercaptoetanol; e 125 μ L de álcool

99% para cada amostra. Este *master mix* foi colocado sobre a membrana de purificação e esta foi novamente centrifugada em velocidade máxima por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado;

f) Posteriormente, foram adicionados 350 µL de Buffer RW1 (presente no kit da *Qiagen*) à coluna e esta foi novamente centrifugada em máxima velocidade por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado e um novo tubo coletor foi colocado sob a coluna de purificação;

g) Uma mistura de 10 µL de DNase I solução estoque com 70 µL de Buffer RDD (presente no kit da *Qiagen*) foi colocada sobre a coluna de purificação (com a amostra) e esta foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente;

h) Decorrido este período, foram adicionados 500 µL de Buffer RPE (presente no kit da *Qiagen*) sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;

i) Foram adicionados 500 µL de Álcool 75 % sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;

j) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;

k) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;

l) Para eluição adicionou-se 20 µL de H₂O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA resultando da primeira etapa de purificação;

m) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 µL da amostra. Leitura foi realizada em duplicata.

Observação: Este protocolo (Micro kit) é indicado para ser utilizado em amostras nas quais o rendimento do RNA esteve entre 1 e 45 µg.

4.3.5.2 Segunda etapa da purificação: tratamento com DNase I em solução

As amostras no volume de 100 µL foram incubadas com a enzima Turbo DNase (Ambion®) com o equivalente a 2 µL da enzima para cada 10 µg de RNA. A incubação foi realizada em banho seco na temperatura de 37°C por 30 minutos. Após este tratamento, as amostras foram imediatamente submetidas à terceira etapa da purificação que consiste na remoção dessa enzima através de colunas do kit de purificação *RNeasy MinElute clean-up kit* (Qiagen).

4.3.5.3 Terceira etapa de purificação

- a) À cada amostra, foi adicionado alíquota de 350 µL do Buffer RLT contendo o β-mercaptoetanol e as amostras foram vortexadas;
- b) Em seguida, foram adicionados 250 µL de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (*“up and down”*);
- c) O volume de 700 µL da amostra foi colocado nas membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas em velocidade máxima por 15 segundos e o volume no tudo coletor foi descartado;
- d) Foram adicionados 500 µL de Buffer RPE sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;
- e) Foram adicionados 500 µL de etanol 75% sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;
- f) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;
- g) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;
- h) Foram adicionados 20 µL de H₂O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA puro;

- i) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 µL da amostra (leitura em duplicata).
- j) As amostras foram submetidas a técnica de eletroforese em gel de agarose (2%) para analisar integridade e ausência de DNA. Foi utilizado 0,250 µg do total do RNA para cada canaleta.

4.3.6 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado com uma amostra de cada grupo experimental que apresentou rendimento de RNA igual ou superior a 3,5 µg. Foi utilizado o kit *Bio-Rad iScript cDNA Synthesis (BIO-RAD)*. Em um tubo estéril, foram pipetados os seguintes componentes:

- Água de grau molecular-volume variado dependendo do volume de RNA;
- 4µL 5 X iScript Rxn mix;
- 1µL Reverse Transcriptase;
- 1µg de RNA.

Esses volumes de reagentes devem ser suficientes para realização do cDNA em duplicata (RT+). É necessário preparar um controle negativo (RT-), os mesmos componentes acima são usados, exceto a Transcriptase Reversa, seu volume é substituído por Água de grau molecular. O RT- revela se houve contaminação da amostra com DNA.

O ciclo para conversão de RNA em cDNA foi realizado usando a PCR Machine (CFX96-Bio-Rad), com as seguintes condições:

- 5 min a 25°C;
- 20 min a 46°C;
- 1 min a 95°C;
- ∞ hold a 4°C.

Após o término do ciclo, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização para o teste de qPCR.

4.3.7 Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR

O cDNA foi amplificado com os *primers* descritos no item 4.3 – Quadro 3 e 4. Os *primers* descritos no item 4.3 – Quadro 3, foram padronizados por Alonso et al.⁷⁷, Naglik et al.¹¹ e Zhu et al.⁸¹, já os descritos no Quadro 4 foram desenhados e padronizados neste estudo.

Para as reações de qPCR, deve se basear na concentração ótima de cada *primer* utilizado, para selecionarmos o volume de cada componente para o *Master Mix*. No Quadro 7 estão descritas as concentrações ótimas dos *primers* para os genes de virulência.

Quadro 7- Características dos genes de virulência utilizados para análise da expressão gênica

Gene	Primers	T _m (°C) Ciclo qPCR	[] ótima (nM)	Referência
ALS1	F – CATCATTGACTCAGTTGT R – CAGTGGAAGTAGATTGTG	55	300	Alonso et al. ⁷⁷
CAP1	F – AGTCAATTCAATGTTCAAG R - AATGGTAATGTCCTCAAG	50	400	
CAT1	F – GACTGCTTACATTCAAAC R - AACTTACCAAATCTTCTCA	50	350	
EFG1	F - ACGAGTAACAACATCCAT R – TATCTGCTCTTCTGACAA	50	350	
HWP1 b	F – CTCCAAAATCATCAGCTC R - CACTAGCCAAAACAGAAG	55	300	
LIP3	F - AGAGAATGTATGAAGTTGT R - CCCTGTTCAAAGTATCTAT	55	300	
PLB1	F - GGCATTGAACATCCTATA R - GGTAACCTAATAGTCTTCCA	55	300	
SAP1	F – TCAATCAATTTACTCTTCCATTTCTA ACA R – CCAGTAGCATTAAACAGGAGTTTAAAT GACA	60	500	Naglik et al. ¹¹
SOD1	F - TTGAACAAGAATCCGAATCC R – AGCCAATGACACCACAAGCAG	60	400	Zhu et al. ⁸¹

Temperatura de anelamento (T_m), (Porcentagem dos pares de base C e G) CG % e Tamanho do produto detalhados.

Fonte: Elaboração própria.

Exemplo: Volumes de reagentes utilizados para o *primer* ALS1 (concentração ótima de 300nM).

- 11,25 µL de Água de grau molecular
- 12,5 µL 2 X SYBR Green Supermix
- 0,750 µL *Primer* mix 10 µM
- 0,5 µL da amostra.

Calcula-se a quantidade necessária de componentes, multiplicando o número de poços utilizados por 1,4, para que se tenha um volume “residual”. Foram aliquoteados 61,25 µL desse *master mix* em microtubos contendo 1,25 µL do *template* [cDNA dos diferentes grupos ou H₂O (NTC – *no template control*)] e esta solução foi distribuída em duplicata na placa para qPCR (25µL por poço). O ciclo térmico da máquina de qPCR (CFX 96 (Bio-Rad) foi o mesmo do item 4.3.3.2.2 alterando a temperatura de anelamento de cada primer.

O resultado foi analisado no programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

A análise da expressão gênica mostra se os tratamentos possuem efeito na indução ou repressão dos genes de *C. albicans*.

4.4 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir do RT-qPCR para os genes objetivos do estudo foram submetidos à análise estatística. Para isso, utilizou-se o *software SPSS Statistics* (IBM, USA). Os pressupostos avaliados foram: normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey (Homocedástico) ($p > 0,05$). Ou ANOVA com correção de Welch seguida de pós teste de Games-Howell (Heterocedástico) ($p < 0,05$) para comparação entre os grupos ($\alpha = 0,05$). Os dados de CIM e CFM foram submetidos a ANOVA-2-way seguida de pós-teste de Tukey.

5 RESULTADO

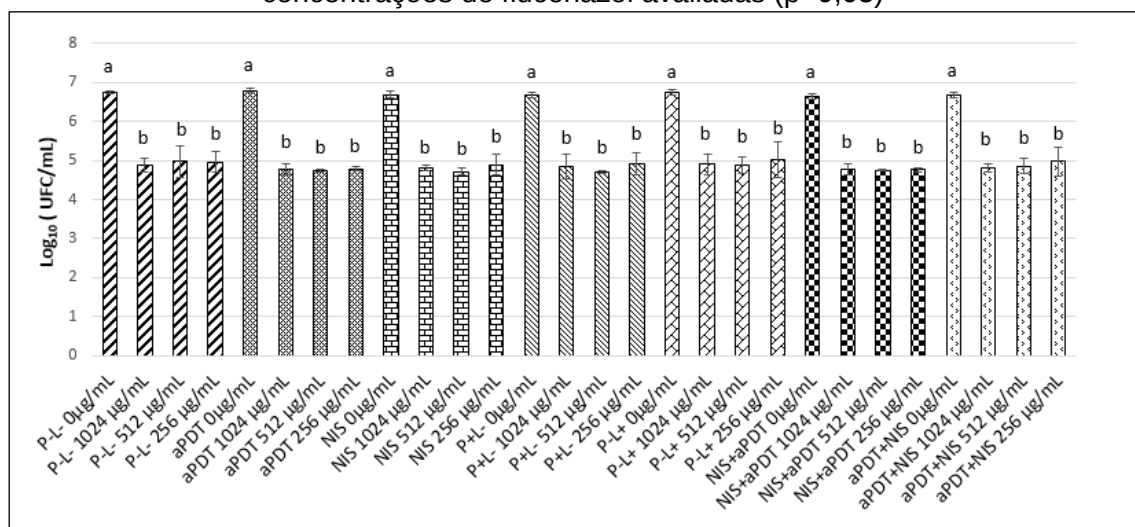
5.1 Avaliação da Susceptibilidade ao Fluconazol (CIM) das Células Recuperadas Após os Tratamentos

O teste de susceptibilidade ao fluconazol para a cepa ATCC 96901 recuperada dos animais revelou um CIM de 256µg/mL para todos os grupos experimentais, seja recuperado 24 horas ou 7 dias após os tratamentos.

A contagem de colônias (UFC/mL) foi transformada em logaritmo ($\log_{10}$). De acordo com a estatística descritiva, os dados apresentaram distribuição não normal ($p < 0,05$) e respeitaram a homocedasticidade ($p > 0,05$). Os valores de log de UFC/mL foram substituídos por seus postos médios que foram submetidos a Análise de Variância ANOVA Two-Way para verificação de interação entre grupo de tratamento e período de recuperação das cepas (24 horas e 7 dias após os tratamentos nos animais). Esse teste foi seguido do pós teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. (APÊNDICE A)

Como não houve interação entre os fatores tempo e grupos experimentais ($p > 0,05$), os dados de 24 h e 7 dias foram agrupados em uma única média para elaboração do gráfico (Figura 2).

Figura 2- Média de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos diferentes grupos de tratamento nas diferentes concentrações de fluconazol avaliadas ($p < 0,05$)



*Barras de erro: desvio-padrão. Letras diferentes denotam diferença estatística (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Não há evidências de diferenças significativas entre as médias, ou seja, esses grupos comportaram-se de maneira semelhante entre si. As cepas recuperadas dos animais submetidos aos tratamentos avaliados (aPDT, NIS, aPDT+NIS ou NIS+aPDT) quando inoculadas com concentrações de fluconazol de 1024, 512, 256 µg/mL comportaram-se estatisticamente semelhante entre si, indicando que as terapias avaliadas não promoveram alteração no perfil de resistência da cepa avaliada. A redução em log observada de “a” em relação a “b” foi de menos de 2 $\log_{10}$.

5.2 Padronização dos *Primers*

Abaixo seguem os dados para os genes desenhados no presente estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes ERGs desenhados

Gene	Sequência <i>primer</i>	T _m (°C)	CG%	Tamanho do produto (bp)
ERG1	F: TGACGAGACCATTACTATCC	58	45	139
	R: AATCCCAGTCATCAACATTC	56	40	
ERG3	F: CCACTACTGCCATTCCAGTT	60	50	133
	R: GGAATTTGCCACAAGATAGC	58	45	
ERG11	F: GGTGGTGGTAGACATAGA	58,7	50	159
	R: TGCTGGTTCAGTAGGTAA	58,9	44,4	
ERG25	F: AGATGTTTACCATGGGCTAT	56	40	93
	R: CCATTGTTCTTTATCACTAG	54	35	

Temperatura de anelamento (T_m), Porcentagem de pares de base G e C (GC%) e Tamanho de produto (bp).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.1 Extração de DNA de *Candida spp.*

Foi realizada a extração seguindo metodologia descrita no item 4.3.2.1 e após essa metodologia, foram realizadas as leituras (em duplicata) em nanoespectrofotômetro (DO 260nm e razão DO 260/280)(Tabela 2).

Tabela 2- Quantificação do DNA pós extração das espécies de *Candida*

Espécie de <i>Candida</i>	Leitura 1 (ng/μL)	Leitura 2 (ng/μL)	Média das leituras (ng/μL)	260/280 Leitura 1	260/280 Leitura 2
<i>C. albicans</i>	2854,07	2880,41	2867,24	2,13	2,12
<i>C. glabrata</i>	5859,84	5918,07	5888,96	2,29	2,26
<i>C. tropicalis</i>	5092,48	5107,91	5100,20	2,26	2,23
<i>C. dubliniensis</i>	2177,57	2189,49	2183,53	2,10	2,10

Leitura realizada em aparelho nanoespectrofotômetro (DO 260nm e razão DO 260/280).

Fonte: Elaboração própria.

E a seguir, foi realizada corrida em gel de agarose 1% com 1μg de DNA por canaleta para cada espécie de *Candida* (conforme descrito em 4.3.2.2) para verificar integridade do DNA. O resultado está ilustrado na Figura 3, onde é

possível observar que o DNA genômico das diferentes espécies de *Candida* estavam íntegros.

Figura 3- Gel de agarose 1% das diferentes espécies de *Candida*

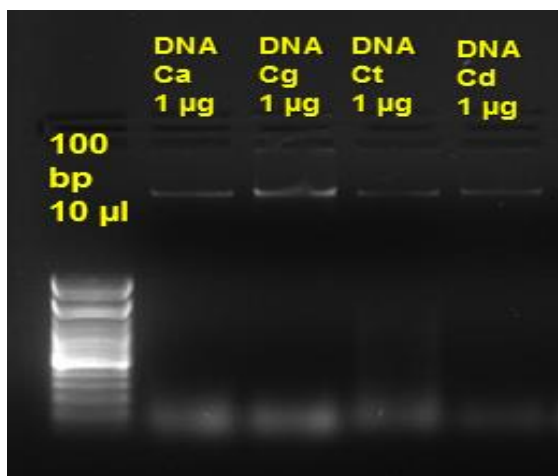


Imagem obtida através do equipamento BIO RAD Molecular Image Gel Doc™XR+ with Image Lab Software, após Eletroforese em Gel de agarose 1% das diferentes espécies de *Candida* (Ca= DNA genômico de *Candida albicans*; Cg= DNA genômico de *Candida glabrata*; Ct= DNA genômico de *Candida tropicalis* e Cd= DNA genômico de *Candida dubliniensis*).

Fonte: Elaboração própria.

Todas as amostras das diferentes espécies foram diluídas em H₂O grau molecular para se obter a concentração de 200ng/µL.

5.2.2 Diluição e preparo dos *primers*

Seguindo a metodologia descrita no item 4.3.3.1, os *primers* foram adquiridos liofilizados, centrifugados e então ressuspensos (volume de TE correspondente ao peso molecular em nmol) (Tabela 3), quantificados em nanoespectrofotômetro para checar se a concentração estava correta (Tabela 4).

Tabela 3- Volume TE necessário para diluição dos *primers*

Nome <i>Primer</i>	Concentração (nMol)	Volume TE(µL)
ERG1F	48,6	486
ERG1R	51,3	513
ERG3F	55,1	551
ERG3R	50,8	508
ERG11F	47,2	472
ERG11R	50,3	503
ERG25F	50,4	504
ERG25R	49,1	491

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4- Média das concentrações dos *primers*

Nome Primer	Média das leituras (ng/μL)	Concentração estimada (ng/μL)
ERG1F	601,17	606,10
ERG1R	600,64	600,50
ERG3F	604,93	598,80
ERG3R	612,65	615,20
ERG11F	610,45	605,20
ERG11R	623,17	613,70
ERG25F	612,48	614,70
ERG25R	600,20	603,30

Leitura realizada em duplicata em nanoespectrofotômetro.

Concentração estimada com base no peso molecular de cada *primer*.

Fonte: Elaboração própria.

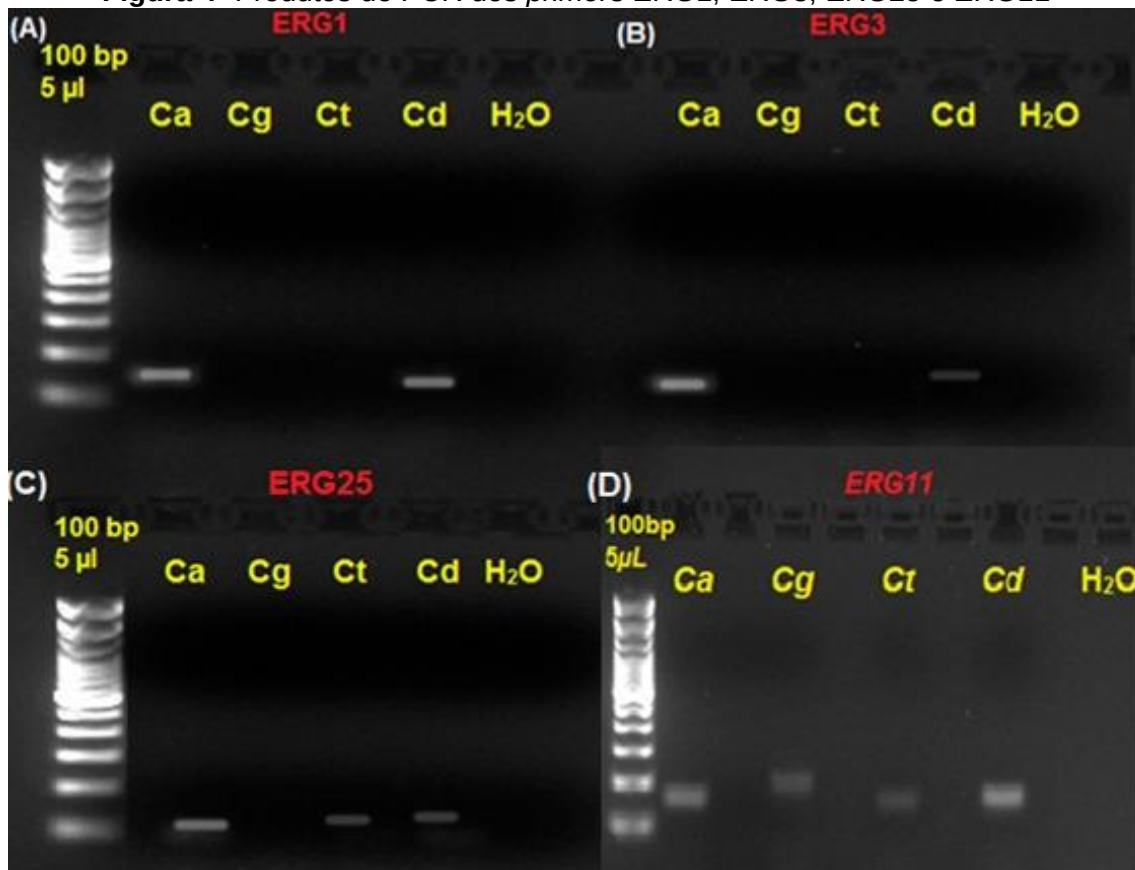
É importante ressaltar que essas concentrações estavam de acordo com o peso molecular de cada *primer*, não excedendo 20% em todos eles. Caso em algum deles a concentração fosse superior a 20% da estimada, seria necessário corrigir essa concentração por meio da adição de TE ou ainda realizar incubação em banho seco a 65 °C por 10 minutos para que ocorresse a solubilização, pois parte poderia não estar diluída.

Após isso, foi preparada a solução trabalho a 10μM, diluindo o estoque do *primer* (100μL do forward *primer*+100μL do reverse *primer*+800μL de H₂O de grau molecular). Essa solução foi armazenada em tubos com alíquotas de 50μL em freezer -20 °C.

5.2.3 Especificidade dos *primers* testados

Foi realizado PCR convencional (descrito item 4.3.3.2.1) para analisar a especificidade dos *primers* e o produto de PCR foi submetido à eletroforese. Os resultados estão demonstrados na Figura 4. A imagem mostra a detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis* do *primer* para o gene ERG1. Detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis* para o gene ERG3. Também mostra a detecção em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* para o gene ERG25. E detecção do *primer* para o gene ERG11 em todas as espécies de *Candida* testadas.

Figura 4- Produtos de PCR dos *primers* ERG1, ERG3, ERG25 e ERG11



Produtos de PCR visualizados em gel de agarose dos *primers* desenhados. Em A, a imagem mostra o *primer* para o gene ERG1. Em B, a imagem mostra o *primer* para o gene ERG3. Em C, a imagem mostra o *primer* para o gene ERG25. Em D, a imagem mostra o *primer* para o gene ERG11. Imagem obtida no equipamento *Gel Doc XR+* (*Bio-Rad*) e editada no *software Image Lab*. H₂O

Fonte: Elaboração própria.

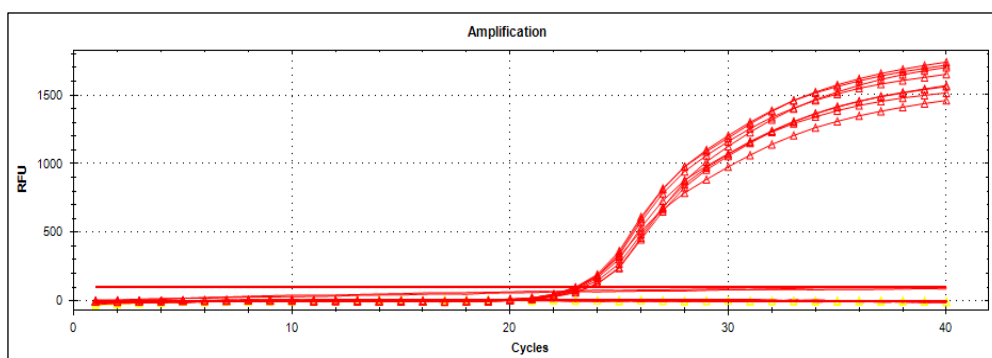
5.2.4 Determinação da concentração ótima de cada *primer*

Seguindo metodologia descrita no item 4.3.3.2.2, os *primers* para os genes ERGs foram submetidos ao q-PCR para verificar a concentração ideal. Considera-se como ideal aquela concentração que apresentar menor Cq. As concentrações ótimas encontradas para cada *primer*, estão descritas na Tabela 5. A Figura 5 mostra um gráfico como exemplo para análise de Cq.

Tabela 5- Características dos *primers*

Gene	Sequência <i>primer</i>	T _m (°C)	Tamanho do produto (bp)	[] ótima (nM)
ERG1	F: TGACGAGACCATTACTATCC	58	139	300
	R: AATCCCAGTCATCAACATTC	56		
ERG3	F: CCACTACTGCCATTCCAGTT	60	133	350
	R: GGAATTTGCCACAAGATAGC	58		
ERG11	F: GGTGGTGGTAGACATAGA	58,7	159	300
	R: TGCTGGTTCAGTAGGTAA	58,9		
ERG25	F: AGATGTTTACCATGGGCTAT	56	93	400
	R: CCATTGTTCTTTATCACTAG	54		

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5- Exemplo de gráfico de *amplification plot*

Estes gráficos foram obtidos durante a determinação da concentração ótima dos *primers* testados. Considera-se a concentração ótima aquela que apresentar menor *C_q* (*quantification cycle*). O gráfico representado acima foi obtido para o gene *ERG1* (desenhado pelo Oligo Explorer™), para o qual a concentração ótima foi de 300 nM, pois os valores médios de *C_q* obtidos foram: 23,61 para 200 nM; 23,22 para 250 nM; 23,09 para 300 nM; e 23,14 para 350 nM. *Observação:* para aqueles *primers* testados em que os valores de *C_q* foram próximos nas distintas concentrações de *primer*, as concentrações escolhidas foram aquelas com o menor valor. Gráficos gerados pelo Bio-Rad CFX Manager™ Software.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.5 Confeção da curva padrão de cada *primer*

Os produtos de PCR dos *primers* foram obtidos através da metodologia do PCR convencional, quantificados e checados quanto à integridade e tamanho com eletroforese em gel de agarose. Essa metodologia foi utilizada para os *primers* desenhados para os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25 e também para os *primers* dos genes padronizados por Alonso et al.⁶⁸, Naglik et al.⁷³ e Zhu et al.⁷⁴. O Quadro 8 mostra as características dos primers para os genes de virulência desenhados e padronizados pelos autores. A Figura 6 mostra a integridade dos produtos de PCR dos *primers* para os genes ERGs após a purificação.

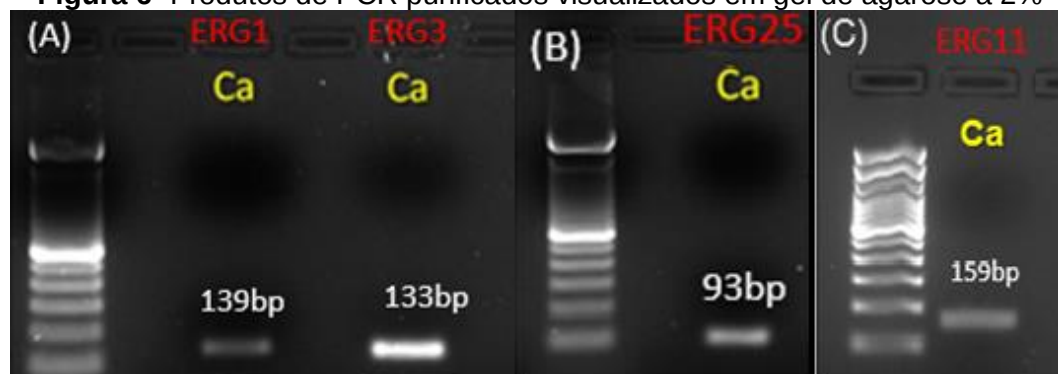
Quadro 8- Características dos genes de virulência utilizados

Gene	Primers	Tm (°C) Ciclo	Tamanho do produto	Referência
ALS1	F – CATCATTGACTCAGTTGT R – CAGTGGAAGTAGATTGTG	55	117	Alonso et al. ⁷⁷
CAP1	F – AGTCAATTCAATGTTCAAG R – AATGGTAATGTCCTCAAG	50	87	
CAT1	F – GACTGCTTACATTCAAAC R – AACTTACCAAATCTTCTCA	50	117	
EFG1	F – ACGAGTAACAACACTACCAT R – TATCTGCTCTTCTGACAA	50	89	
HWP1b	F – CTCCAAAATCATCAGCTC R – CACTAGCCAAAACAGAAG	55	114	
LIP3	F – AGAGAATGTATGAAGTTGT R – CCCTGTTCAAAGTATCTAT	55	136	
PLB1	F – GGCATTGAACATCCTATA R – GGTAACCTTAATAGTCTTCCA	55	124	Naglik et al. ¹¹
SAP1	F – TCAATCAATTTACTCTTCCATTTCTACA R – CCAGTAGCATTAAACAGGAGTTTTAATGACA	60	161	
SOD1	F – TTGAACAAGAATCCGAATCC R – AGCCAATGACACCACAAGCAG	60	396	Zhu et al. ⁸¹

Temperatura de anelamento (Tm), (Porcentagem dos pares de base C e G) CG % e Tamanho do produto detalhados.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6- Produtos de PCR purificados visualizados em gel de agarose a 2%



Em A estão os produtos de PCR purificados dos *primers* para os genes ERG1 e ERG3. Em B, está o produto de PCR purificado do *primer* para o gene ERG25. Em C, está o produto de PCR purificado do *primer* para o gene ERG11. As quantidades de pares de base de cada produto de PCR estão informadas acima da banda detectada em cada gene (Peso padrão molecular de 1 kb).

Fonte: Elaboração própria.

O valor da concentração do produto de PCR foi utilizado para calcular o número de cópias do gene utilizando a equação descrita na seção 4.3.3.2.3. A Tabela 6 mostra os valores das cópias dos produtos de PCR.

Tabela 6- Número de cópias de cada produto de PCR, obtidos a partir da equação de Yin et al.⁶⁶

Produto gene	Média da concentração (µg/mL)	Tamanho do Produto (bp)	Cópias/ ml (a partir da fórmula descrita)	Cópias/µL	Diluição para 2 x 10 ¹⁰ cópias/µL volume final 50 µL	
					Volume Prod. PCR (µL)	Volume H ₂ O(µL)
ERG1	42,62	139	2,81E+14	2,81E+11	3,56	46,44
ERG3	68,51	133	4,71E+14	4,71E+11	2,12	47,88
ERG11	8,15	159	4,69E+13	4,69E+10	21,33	28,67
ERG25	29,69	93	5,19E+14	5,19E+11	3,42	46,58
ALS1	16,16	117	1,26E+14	1,26E+11	7,91	42,09
CAP1	16,76	87	1,76E+14	1,76E+11	5,67	44,33
CAT1	39,71	117	3,11E+14	3,11E+11	3,22	46,78
EFG1	14,67	89	1,51E+14	1,51E+11	6,63	43,37
HWP1	33,97	114	2,73E+14	2,73E+11	3,67	46,33
LIP3	16,62	136	1,12E+14	1,12E+11	8,94	41,06
PLB1	24,11	124	1,78E+14	1,78E+11	5,62	44,38
SAP1	31,07	161	1,77E+14	1,77E+11	5,66	44,34
SOD1	58,86	396	1,36E+14	1,36E+11	7,49	42,51

Número de cópias de cada produto de PCR, obtidos a partir da equação de Yin et al.⁶⁶ e volumes de água molecular grade e produto de PCR para diluição dos mesmos para se obter a concentração de 2x 10¹⁰ cópias/µL para posterior diluição seriada. A exceção foi o gene ERG11, o qual foi iniciada diluição seriada a partir de 2x 10⁹ cópias/µL, pois o volume para ter 2x10¹⁰ cópias/µL seria muito elevado (21,33 µL).

Fonte: Elaboração própria.

A partir dessa diluição (2x10¹⁰ cópias/µL), foi realizada diluição seriada de 10 vezes, a qual foram misturados 10 µL do produto de PCR + 90 µL de água molecular grade sucessivamente até chegar à concentração de 2 x10² cópias/µL. Essas diluições foram utilizadas como “*template*” nas reações de qPCR para obter a curva de concentração de cada gene específico para analisar a eficiência dos mesmos usando a concentração ótima previamente determinada.

5.2.6 qPCR para análise da curva padrão e eficiência de cada *primer*

A técnica de qPCR foi realizada utilizando-se uma alíquota de 0,5 µL das diluições seriadas 2 x 10⁸ a 2 x 10² cópias/µL ou Água de Grau Molecular como *template* (NTC) por reação em um volume final de 25 µL. Para o Master Mix de cada *primer*, foi utilizado um volume do *primer* 10 mM (forward e reverse) que correspondesse a sua concentração ótima, 12,5 µL de 2X SYBR Green Supermix (Bio-Rad Cat#1708882), e Água de Grau Molecular até completar o

volume de 25 μL . O ciclos da técnica de qPCR são modificados dependente da Temperatura de *melting* (T_m) de cada *primer*.

O *amplification plot* mostra a equidistância entre os pontos na curva de concentração sendo a primeira curva de amplificação (em duplicata) (detectada próxima ao ciclo 10) a diluição do produto de PCR em 2×10^7 cópias/ μL , a segunda (em duplicata), detectadas na metade entre o ciclo 10 e o ciclo 20, a diluição dos produtos de PCR em 2×10^6 cópias/ μL , e assim por diante, até a última curva (em duplicata) próxima ao ciclo 30, que corresponde a diluição do produto de PCR em 2×10^2 cópias/ μL . Outra forma de analisar a diluição é através do coeficiente R^2 (dados mostrados abaixo da *Standard Curve*), que deve sempre estar próximo de 1,000. O coeficiente E, também situado abaixo da *Standard Curve*, caracteriza a eficiência do *primer* testado na reação de qPCR. Este valor é adequado quando se encontra entre 90 a 110%, sendo melhor estar entre 95 e 105%. O *melt peak* também foi analisado. A presença de apenas um pico na reação representa a não contaminação do material genético, bem como a não formação de produtos inespecíficos pelo *primer*, sendo, portanto, a característica ideal apresentar apenas um pico expressivo. Todos os *primers* ficaram padronizados nessas características e apresentarem coeficiente de correlação de aproximadamente 1 e eficiência de reação de 90-110%, com *slope* de aproximadamente -3.3.

Com os *primers* devidamente padronizados e otimizados, esses foram utilizados seguramente para avaliar a expressão gênica de *C. albicans* nas amostras recuperadas dos camundongos (Figura 7).

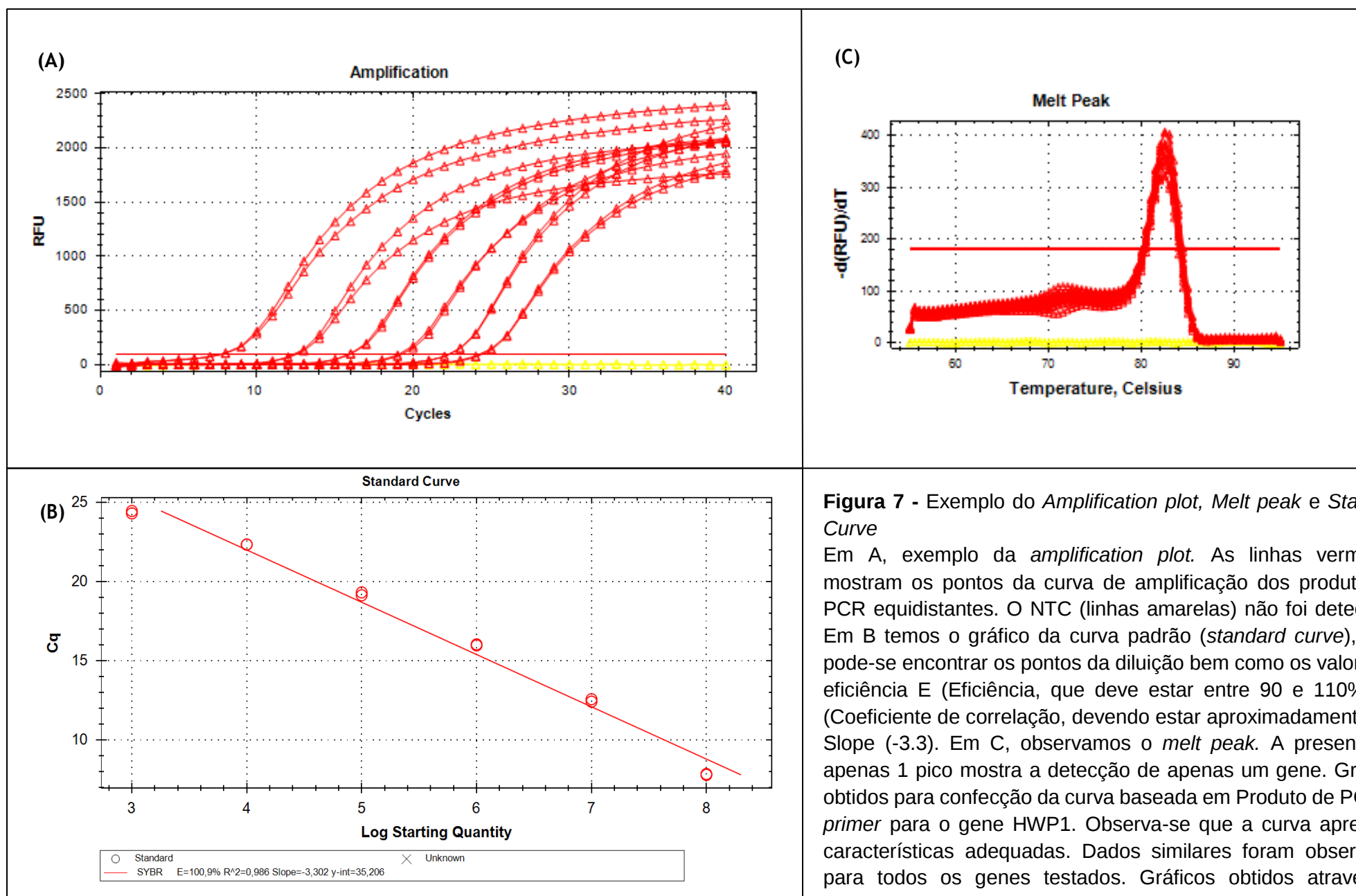


Figura 7 - Exemplo do Amplification plot, Melt peak e Standard Curve

Em A, exemplo da *amplification plot*. As linhas vermelhas mostram os pontos da curva de amplificação dos produtos de PCR equidistantes. O NTC (linhas amarelas) não foi detectado. Em B temos o gráfico da curva padrão (*standard curve*), onde pode-se encontrar os pontos da diluição bem como os valores da eficiência E (Eficiência, que deve estar entre 90 e 110%), R² (Coeficiente de correlação, devendo estar aproximadamente 1) e Slope (-3.3). Em C, observamos o *melt peak*. A presença de apenas 1 pico mostra a detecção de apenas um gene. Gráficos obtidos para confecção da curva baseada em Produto de PCR do *primer* para o gene HWP1. Observa-se que a curva apresenta características adequadas. Dados similares foram observados para todos os genes testados. Gráficos obtidos através do programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software*.

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Extração de RNA das Línguas dos Camundongos

As línguas removidas cirurgicamente dos camundongos foram armazenadas segundo a metodologia descrita em 4.1. A extração foi realizada em todas as línguas (n=4) para posterior análise do rendimento e integridade em gel de agarose.

Seguindo a metodologia proposta, o RNA das amostras foi isolado e denominado como RNA bruto. A quantificação de RNA das línguas está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7- Dados do rendimento de RNA das línguas dos animais, recuperação 24 horas após o tratamento

Amostra	Leitura1 (ng/μL)	Leitura 2 (ng/μL)	Média (ng/μL)	Rendimento RNA (μg)	Integridade em gel *
P-L- 1	106,37	101,07	103,72	9,85	OK
P-L- 2	187,73	185,97	186,85	17,75	OK
P-L- 3	374,65	348,29	361,47	34,34	OK
P-L- 4	203,75	205,77	204,76	19,45	OK
P+L- 1	227,31	229,53	228,42	21,70	OK
P+L- 2	175,65	181,18	178,415	16,95	OK
P+L- 3	137,48	138,07	137,775	13,09	OK
P+L- 4	223,34	224,76	224,05	21,28	OK
P-L+ 1	146,32	152,73	149,52	14,20	OK
P-L+ 2	227,38	225,46	226,42	21,51	OK
P-L+ 3	199,35	201,03	200,19	19,02	OK
P-L+ 4	249,67	248,56	249,115	23,67	OK
aPDT 1	218,42	221,24	219,83	20,88	OK
aPDT 2	185,70	184,34	185,02	17,58	OK
aPDT 3	135,13	141,02	138,075	13,12	OK
aPDT 4	249,67	246,26	247,965	23,56	OK
NIS 1	160,48	220,69	190,58	18,11	OK
NIS 2	159,31	160,89	160,10	15,21	OK
NIS 3	173,70	169,08	171,39	16,28	OK
NIS 4	141,17	143,86	142,515	13,54	OK
aPDT+NIS 1	365,00	334,28	349,64	33,22	OK
aPDT+NIS 2	481,42	479,53	480,475	45,65	OK
aPDT+NIS 3	264,89	266,52	265,705	25,24	OK
aPDT+NIS 4	175,32	163,49	169,405	16,09	OK
NIS+aPDT 1	203,69	208,03	205,86	19,56	OK
NIS+aPDT 2	377,73	379,45	378,59	35,97	OK
NIS+aPDT 3	155,69	156,98	156,335	14,85	OK
NIS+aPDT 4	256,89	265,32	261,105	24,80	OK

(Ok): Integridade do material genético. * Imagens dos géis não mostradas.

Fonte: Elaboração própria.

Todas as amostras dos diferentes grupos (P-L-, P+L-, P-L+, aPDT, NIS, aPDT+NIS, NIS+aPDT) apresentaram RNA íntegro durante a etapa de extração verificado através de gel de agarose.

5.4 Purificação do RNA

As amostras de RNA foram submetidas à metodologia descrita no item 4.3.5. Para todas as amostras o kit utilizado foi o *Micro kit* (rendimento entre 1-45μg).

Os dados de rendimento e integridade em gel de agarose após a Primeira etapa de purificação (metodologia descrita em 4.3.5.1) estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8- Dados quantitativos de RNA extraído das línguas dos animais após primeira etapa de purificação, 24 horas após o tratamento

Amostra	Leitura 1 (ng/μL)	Leitura 2 (ng/μL)	Média (ng/μL)	Rendimento RNA (μg)	Integridade em gel de agarose(*)
P-L- 1	653,47	649,08	651,28	5,40	OK
P-L- 2	98,9	101,03	99,97	1,75	OK
P-L- 3	433,76	415,77	424,77	7,43	OK
P-L- 4	532,76	540,03	536,40	9,39	OK
P+L- 1	499,76	488,97	494,37	8,65	OK
P+L- 2	401,02	399,15	400,09	7,00	OK
P+L- 3	115,42	122,33	118,88	2,08	OK
P+L- 4	549,35	541,02	545,19	9,54	OK
P-L+ 1	198,97	202,48	200,73	3,51	OK
P-L+ 2	701,22	711,34	706,28	12,36	OK
P-L+ 3	574,02	566,26	570,14	9,98	OK
P-L+ 4	487,67	471,56	479,62	8,39	OK
aPDT 1	102,34	108,02	105,18	1,84	OK
aPDT 2	198,87	202,04	200,46	3,51	OK
aPDT 3	495,22	489,98	492,60	8,62	OK
aPDT 4	528,56	534,79	531,68	9,30	OK
NIS 1	311,57	313,68	312,63	5,47	OK
NIS 2	178,22	184,32	181,27	3,17	OK
NIS 3	398,22	406,78	402,50	7,04	OK
NIS 4	544,25	549,97	547,11	9,57	OK
aPDT+NIS 1	689,73	694,52	692,13	12,11	OK
aPDT+NIS 2	524,87	531,86	528,37	9,25	OK
aPDT+NIS 3	148,54	139	143,77	2,52	OK
aPDT+NIS 4	322,45	329,65	326,05	5,71	OK
NIS+aPDT 1	636,75	642,54	639,65	11,19	OK
NIS+aPDT 2	102,34	99,76	101,05	1,77	OK
NIS+aPDT 3	599,02	605,87	602,45	10,54	OK
NIS+aPDT 4	198,33	205,67	202,00	3,54	OK

(Ok): Integridade do material genético. (*)Imagens dos géis não mostradas.

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado (Tabela 8), houve uma perda de material nessa etapa de purificação, o que pode ser justificado pelo fato do RNA ser instável e sensível a diversos fatores, como temperatura. As amostras que apresentaram rendimento satisfatório (superior ou igual a 3,5μg) foram submetidas ao tratamento com a Turbo DNase (Ambion) e posteriormente submetidas à Terceira etapa de purificação com kit RNeasy MinElute (Qiagen),

metodologia descrita no item 4.3.5.3. Os dados de rendimento estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9- Dados quantitativos de RNA extraído das línguas dos animais após terceira etapa de purificação, recuperação 24 horas após o tratamento

Amostra	Leitura1 (ng/μL)	Leitura 2 (ng/μL)	Média (ng/μL)	Rendimento RNA (μg)	Integridade em gel de agarose(*)
P-L- 1	248,99	241,4	245,195	4,29	OK
P-L- 2	12,48	10,94	11,71	0,20	-
P-L- 3	215,87	222,54	219,205	3,84	OK
P-L- 4	52,18	57,89	55,035	0,96	-
P+L- 1	463,46	459,76	461,61	8,08	OK
P+L- 2	128,12	124,56	126,34	2,21	OK
P+L- 3	19,06	20,15	19,605	0,34	-
P+L- 4	158,14	161	159,57	2,79	OK
P-L+ 1	65,09	71,68	68,385	1,20	OK
P-L+ 2	222,34	228,18	225,26	3,94	OK
P-L+ 3	298,56	301,98	300,27	5,25	OK
P-L+ 4	86,76	92,35	89,555	1,57	OK
aPDT 1	14,56	15,67	15,115	0,26	-
aPDT 2	87,98	91,16	89,57	1,57	OK
aPDT 3	369,04	361,02	365,03	6,39	OK
aPDT 4	223,48	225,98	224,73	3,93	OK
NIS 1	168,68	173,45	171,065	2,99	OK
NIS 2	74,35	76,98	75,665	1,32	-
NIS 3	242,86	244,56	243,71	4,26	OK
NIS 4	201,45	208,76	205,105	3,59	OK
aPDT+NIS 1	261,78	269,42	265,6	4,65	OK
aPDT+NIS 2	102,35	110,11	106,23	1,86	OK
aPDT+NIS 3	19,87	22,34	21,105	0,37	-
aPDT+NIS 4	198,15	202,47	200,31	3,51	OK
NIS+aPDT 1	368,56	370,59	369,575	6,47	OK
NIS+aPDT 2	301,14	311,26	306,2	5,36	OK
NIS+aPDT 3	67,12	61,32	64,22	1,12	-
NIS+aPDT 4	19,24	23,69	21,465	0,38	-

(Ok): Integridade do material genético. (-): Degradação do material genético. (*) Imagens dos géis não mostradas.

Fonte: Elaboração própria.

Conforme observado na Tabela 9, os resultados demonstraram que pelo menos duas amostras de cada grupo apresentaram rendimento satisfatório (superior a 3,5μg de RNA). Essa quantidade mínima é necessária para analisar a expressão por grupo, pois utiliza-se:

- ✓ 0,5μg de RNA para correr um gel de agarose e checar integridade do material genético;
- ✓ 2μg para síntese do cDNA para controle positivo (RT+ em duplicata);
- ✓ 1μg para síntese de cDNA para controle negativo (RT-).

Exceto para o grupo P+L-, nesse grupo foi realizada a combinação (“pool”) das amostras P+L- 2 e P+L- 4 (rendimento de 2,21 e 2,79 µg, respectivamente). A leitura em Nanoespectrofotômetro após a união foi de 100,26 ng/µL (média de duas leituras), resultando em um rendimento de 3,61 µg. Esse valor é suficiente para realização de gel de agarose e síntese de cDNA.

As amostras foram checadas quanto a integridade em gel de agarose 2%, mostrado na Figura 8.

Figura 8- Gel de agarose 2% das amostras após Terceira Purificação



Imagem obtida através do equipamento BIO RAD Molecular Image Gel Doc™XR+ with Image Lab Software, após Eletroforese em Gel de agarose 2% do RNA dos diferentes grupos (P-L-; P-L+; P+L-; aPDT; NIS; aPDT+NIS; NIS+aPDT, respectivamente). Nota-se integridade das bandas correspondentes à RNA ribossomal para todas as amostras em todos os grupos. Observa-se também ausência de DNA.

Fonte: Elaboração própria.

5.5 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram diluídas para que chegassem a concentração de 100 ng/µL. Então, o cDNA foi confeccionado com 1 µg de RNA seguindo a metodologia proposta em 4.3.6. Foram confeccionados dois cDNAs RT+ para cada amostra de cada grupo e um cDNA RT- (amostra em que não é colocada a enzima Transcriptase Reversa, a qual não deve apresentar expressão gênica se o material genético não estiver contaminado).

5.6 qPCR para Avaliação da Expressão Gênica

Utilizou-se a metodologia descrita no item 4.3.7. A placa apresentava a curva de concentração de cada gene com as características ideais, bem como o cDNA das amostras de todos os grupos. Devido a quantidade de grupos, uma placa só não foi suficiente, sendo necessário realizar duas placas para cada gene. Todas as reações de qPCR foram analisadas e apresentaram *Melt Curves*

ideais (com apenas 1 pico), coeficiente de correlação de aproximadamente 1 e eficiência da reação entre 90 – 110%, com slope de aproximadamente -3.3. (Figura 9). O *Threshold* foi estabelecido em 100 para todos os genes.

Houve alteração no “ciclo de polimerização” (Ciclo 2/*Step* 4) para os *primers* dos genes SAP1 e SOD1, ao invés de 15 segundos, foram utilizados 30 segundos. Esse fato pode ser justificado devido ao tamanho do produto de PCR desses genes (161 e 396 bp, respectivamente).

As médias dos dados Start Quantify “SQ mean” foram submetidas à análise estatística para analisar se os diferentes tratamentos influenciaram na expressão dos genes de virulência e envolvidos na síntese de ergosterol de *C. albicans* resistente ao fluconazol presente nas línguas dos camundongos. O fator “Grupos” foi considerado como variável independente e “SQ mean” como variável dependente.

Os dados de expressão gênica para os genes todos os genes passaram pelo pressuposto de normalidade ($p > 0,05$). Para o teste de Homogeneidade de Variâncias apenas os genes CAP1, CAT1, ERG25, HWP1, LIP3 foram considerados homocedásticos ($p > 0,05$). Já os genes ALS1, EFG1, ERG1, ERG3, ERG11, SAP1, SOD1 foram heterocedásticos ($p < 0,05$). Para esses que não foram homocedásticos, o teste estatístico utilizado foi ANOVA com correção de Welch e em caso de diferença estatística, o pós-teste utilizado foi Games-Howell. Para os genes que passaram nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade das variâncias ($p > 0,05$), o teste empregado foi ANOVA, seguida do pós teste de Tukey.

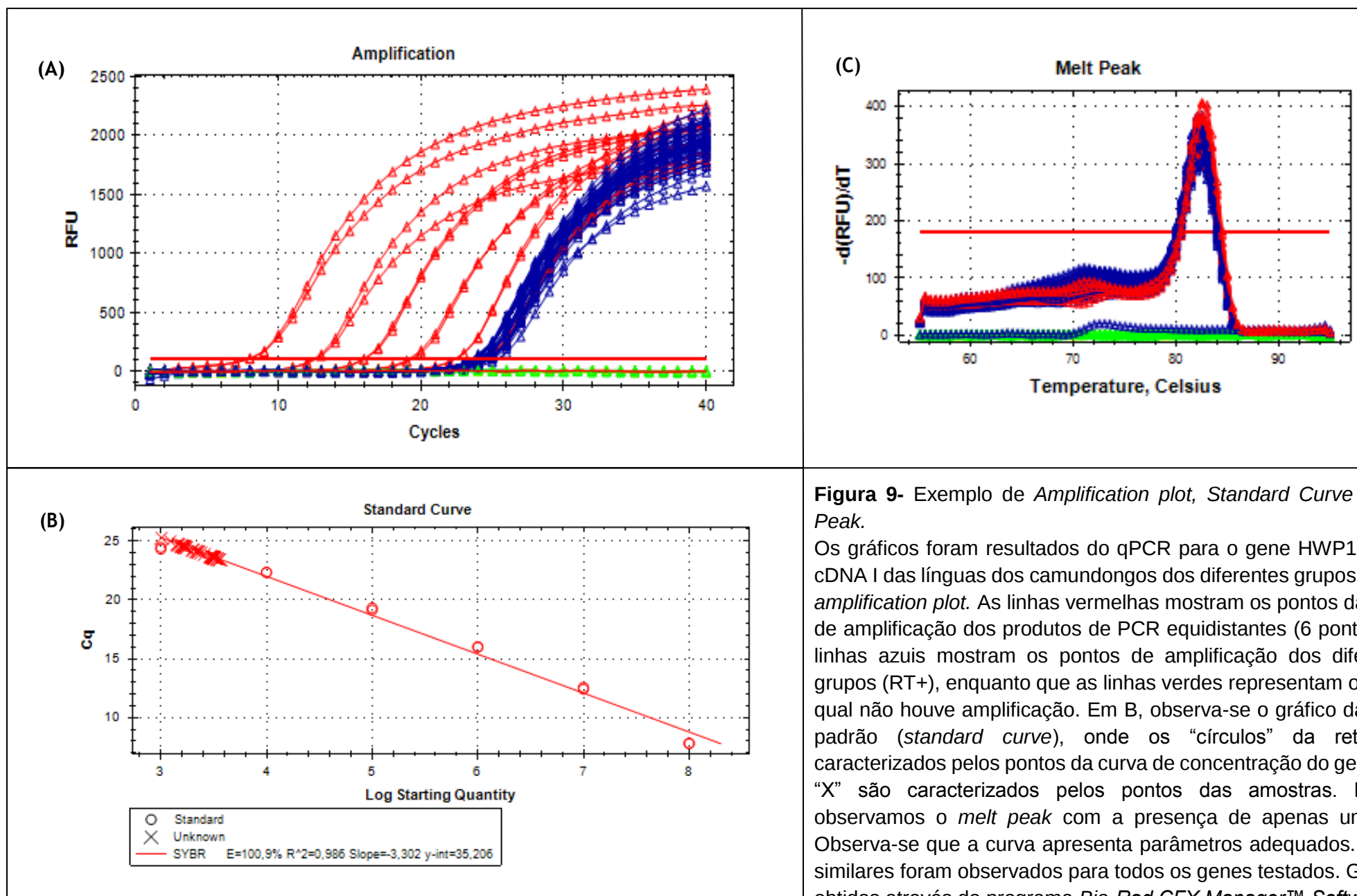
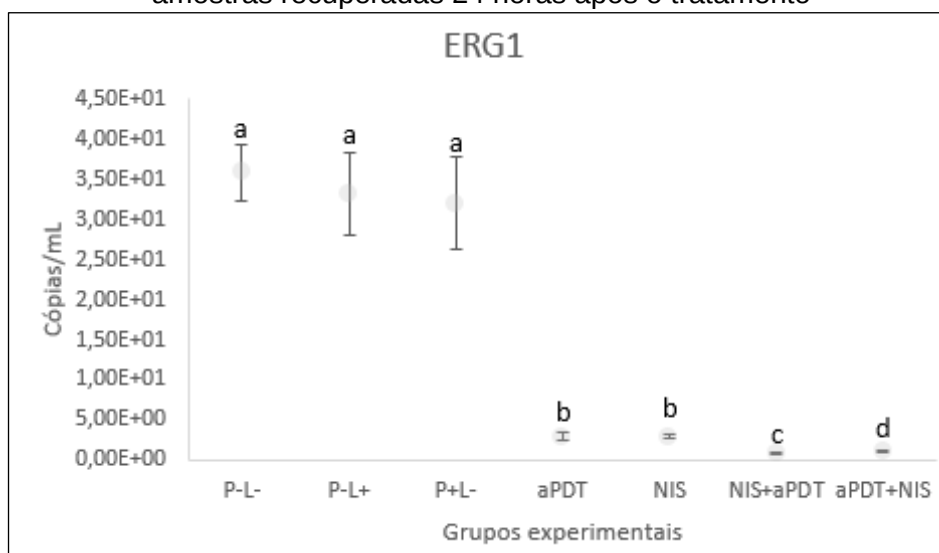


Figura 9- Exemplo de *Amplification plot*, *Standard Curve* e *Melt Peak*.

Os gráficos foram resultados do qPCR para o gene HWP1 com o cDNA I das línguas dos camundongos dos diferentes grupos. Em A, *amplification plot*. As linhas vermelhas mostram os pontos da curva de amplificação dos produtos de PCR equidistantes (6 pontos). As linhas azuis mostram os pontos de amplificação dos diferentes grupos (RT+), enquanto que as linhas verdes representam o RT-, o qual não houve amplificação. Em B, observa-se o gráfico da curva padrão (*standard curve*), onde os “círculos” da reta são caracterizados pelos pontos da curva de concentração do gene e os “X” são caracterizados pelos pontos das amostras. Em C, observamos o *melt peak* com a presença de apenas um pico. Observa-se que a curva apresenta parâmetros adequados. Dados similares foram observados para todos os genes testados. Gráficos obtidos através do programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software*. Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 10, os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene ERG1, essa diferença foi identificada pelo pós-teste de Games-Howell. Os grupos P-L-, P-L+, P+L- apresentaram os maiores valores de expressão genica e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$). Os grupos aPDT e NIS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p=1,000$) e apresentaram menores valores de expressão gênica comparado com o grupo P-L-. Os grupos em que foram utilizados terapia combinada (NIS+aPDT e aPDT+NIS) apresentaram os menores valores de expressão genica e foram estatisticamente diferentes entre si ($p=0,018$) e em relação aos demais grupos ($p<0,001$).

Figura 10- Expressão do gene ERG1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento

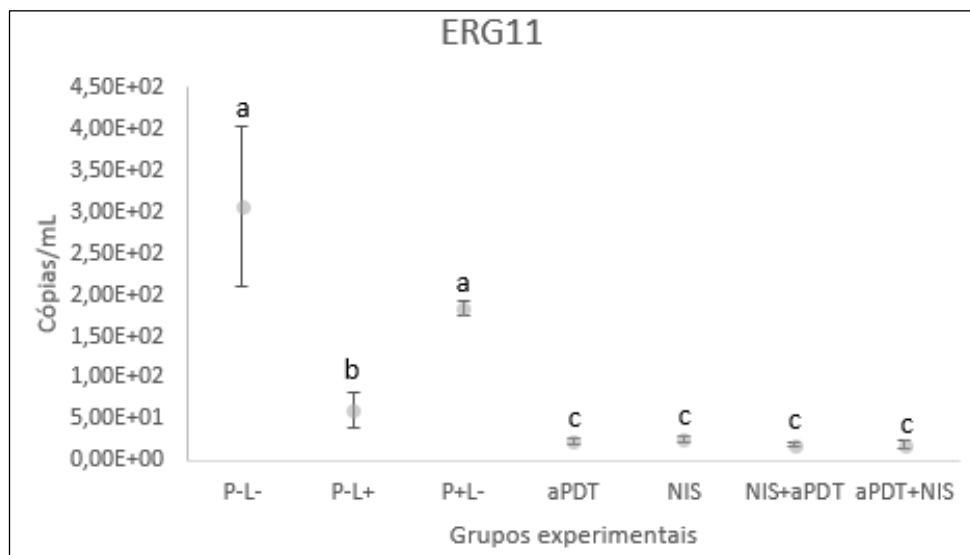


Média e desvio padrão da expressão do gene ERG1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p<0,05$) (pós-teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log₁₀ para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 11 podemos observar que os diferentes tratamentos influenciaram a expressão do gene ERG11. Essa diferença foi identificada pelo pós-teste de Games-Howell. Os grupos P-L- e P+L- foram estatisticamente semelhantes entre si ($p=0,079$) e apresentaram os maiores valores de expressão gênica. Os grupos aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$) e apresentaram os menores valores de expressão genica. Por outro lado, o grupo P-L+ foi estatisticamente diferente em relação aos demais grupos, sendo $p=0,012$; $p=0,018$; $p=0,007$; $p=0,007$ para os grupos aPDT, NIS, NIS+aPDT e

aPDT+NIS ($p < 0,05$) apresentando valores de expressão gênica intermediários em relação aos mesmos.

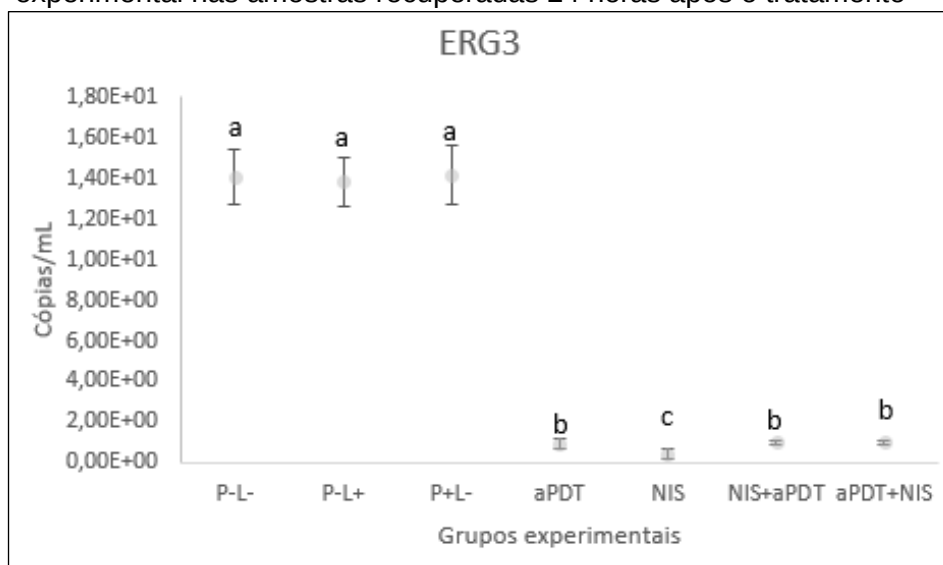
Figura 11- Expressão do gene ERG11 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene ERG11 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.
Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 12, os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene ERG3, essa diferença foi identificada pelo pós teste de Games-Howell. Os grupos P-L-, P-L+, P+L- não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) e apresentaram os maiores valores de expressão gênica. Os grupos aPDT, NIS+aPDT e aPDT+NIS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e apresentaram menores valores de expressão gênica comparado com o grupo P-L-. Também pode ser observado que o grupo NIS foi estatisticamente diferente dos demais grupos, sendo $p = 0,014$; $p = 0,003$ e $p = 0,003$ para os grupos aPDT, NIS+aPDT e aPDT+NIS, respectivamente. Apresentando o menor valor de expressão gênica dentre esses grupos.

Figura 12- Expressão do gene ERG3 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento

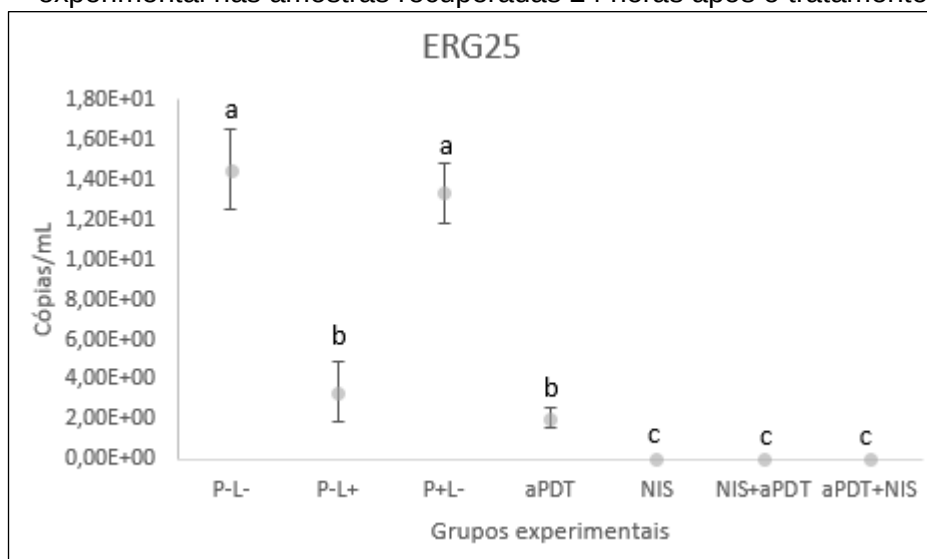


Média e desvio padrão da expressão do gene ERG3 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 13, os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene ERG25, essa diferença foi identificada pelo pós-teste de Tukey. Os grupos P-L- e P+L- não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,356$) e apresentaram os maiores valores de expressão gênica. Por outro lado, os grupos NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram os menores valores de expressão gênica comparado ao grupo P-L-. Os demais grupos (P-L+ e aPDT) foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 0,254$) e apresentaram valores de expressão gênica intermediários em relação aos demais grupos. O grupo P-L+ foi diferente dos grupos NIS, aPDT+NIS e NIS+aPDT, apresentando $p < 0,001$. Já o grupo aPDT apresentou valores de $p = 0,001$ em relação a esses grupos.

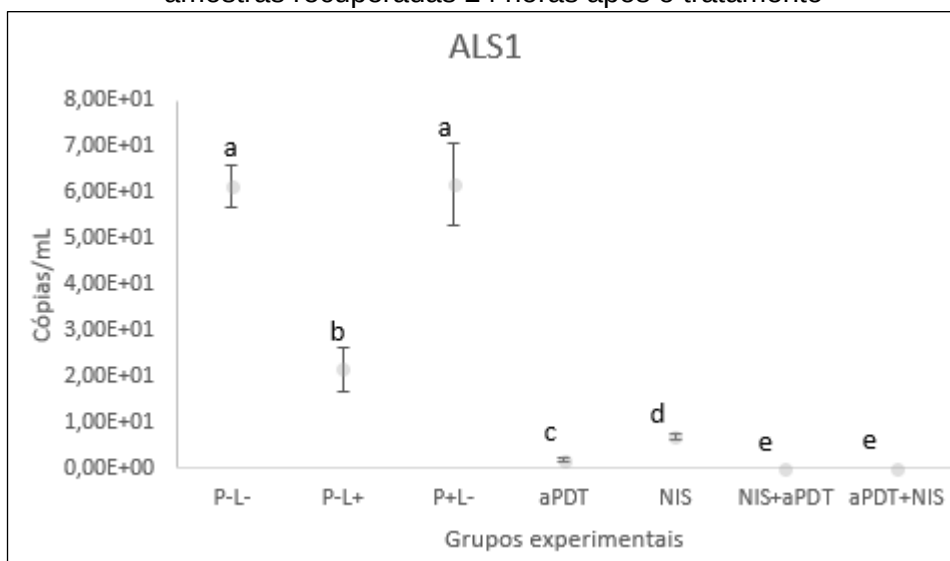
Figura 13- Expressão do gene ERG25 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene ERG25 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Tukey). O eixo "Y" está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados foi possível observar que, os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene ALS1 (Figura 14). As diferenças entre grupos de tratamento foram identificadas através pelo pós-teste de Games-Howell. Os grupos P-L- e P+L- foram estatisticamente semelhantes ($p = 1,000$) e apresentaram maiores valores de expressão. Os grupos onde foi aplicado a terapia combinada (NIS+aPDT ou aPDT+NIS) apresentaram os menores valores de expressão genica e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p < 0,05$). Já os demais grupos apresentaram menores valores de expressão gênica e foram estatisticamente diferentes entre si (P-L+, aPDT e NIS), sendo $p < 0,001$.

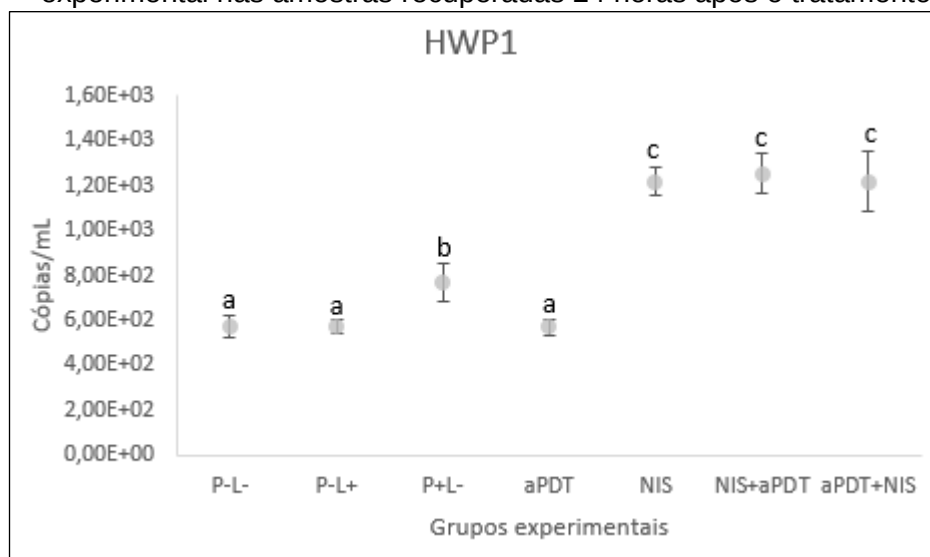
Figura 14- Expressão do gene ALS1 em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene ALS1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós-teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log₁₀ para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

Os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene HWP1 (Figura 15). As diferenças entre os diferentes grupos de tratamento foram identificadas através do pós-teste de Tukey. Os grupos P-L-, P-L+ e aPDT foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) apresentando os menores valores de expressão gênica. Por outro lado, os grupos NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS ($p > 0,05$) apresentaram os maiores valores de expressão gênica e apresentaram comportamento estatisticamente semelhantes entre si. O grupo P+L- foi estatisticamente diferente de todos os demais grupos ($p < 0,001$), apresentando valores intermediários de expressão gênica.

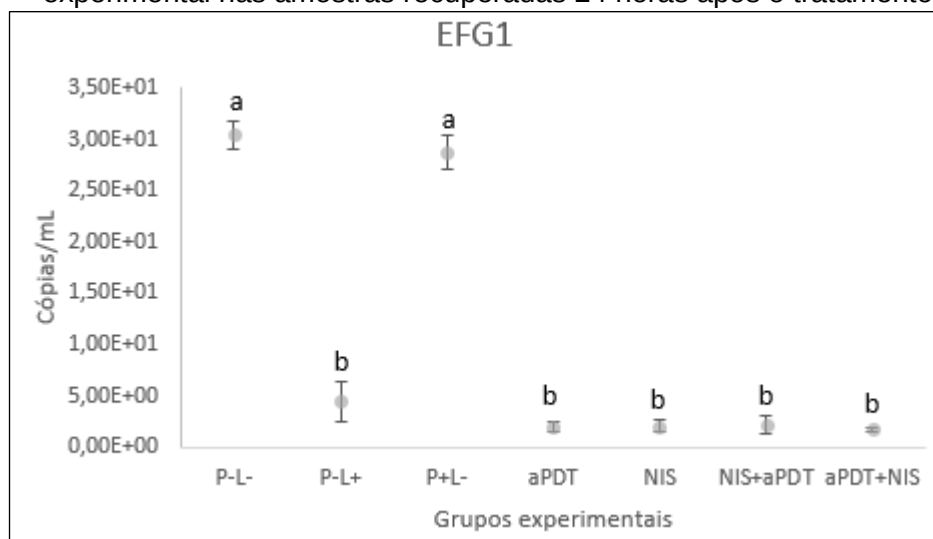
Figura 15- Expressão do gene HWP1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene HWP1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Tukey). O eixo "Y" está representado em escala Log₁₀ para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 16 podemos observar que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene EFG1. As diferenças entre os grupos de tratamento foram identificadas por meio do pós teste de Games-Howell. Os grupos P-L- e P+L- foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 0,320$). Os grupos P-L+, aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e apresentaram menores valores de expressão genica comparado ao grupo controle (P-L-).

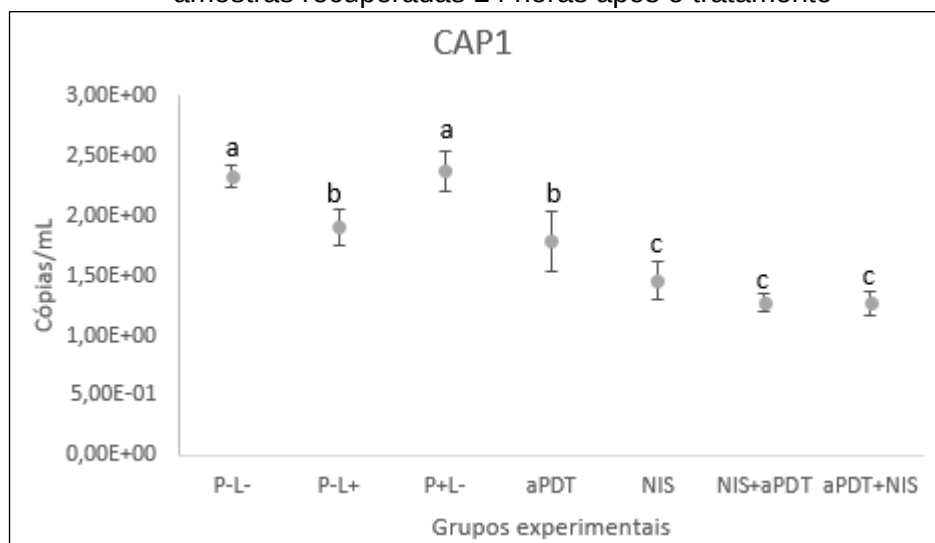
Figura 16- Expressão do gene EFG1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene EFG1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

A Figura 17 demonstra que os diferentes os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene CAP1, e essa diferença foi identificada pelo pós teste de Tukey. Os grupos P-L- e P+L- não apresentaram diferença estatística, sendo $p=0,998$. Os demais grupos apresentaram menores valores de expressão gênica. Os grupos P-L+ e aPDT foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram valores menores de expressão gênica comparados ao grupo P-L- ($p=0,740$). Os grupos NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e e apresentaram os menores valores de expressão gênica comparados aos demais grupos.

Figura 17- Expressão do gene CAP1 em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento

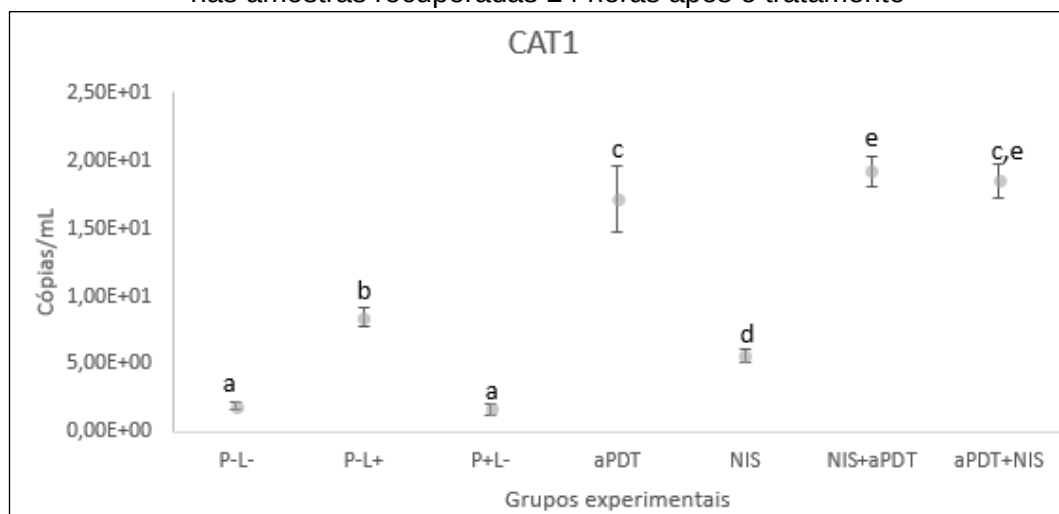


Média e desvio padrão da expressão do gene CAP1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Tukey). O eixo “Y” está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a expressão do gene CAT1 (Figura 18), foi observada diferença estatística nos diferentes grupos avaliados e essa diferença foi identificada pelo pós teste de Tukey. Os grupos P-L- e P+L- não apresentaram diferença estatística entre si, sendo $p=1,000$. Os grupos aPDT e aPDT+NIS também foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram maiores valores de expressão gênica ($p=0,255$) comparados ao grupo P-L-. Os grupos NIS+aPDT e aPDT+NIS também foram estatisticamente semelhantes entre si com maiores valores de expressão gênica ($p=0,909$) comparados ao grupo P-L+. Os demais grupos foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O grupo P-L+ foi estatisticamente diferente de todos os grupos, sendo $p < 0,001$. O grupo aPDT foi estatisticamente diferente do grupo (p=0,018) do grupo NIS+aPDT apesar da proximidade dos valores.

Figura 18- Expressão do gene CAT1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento

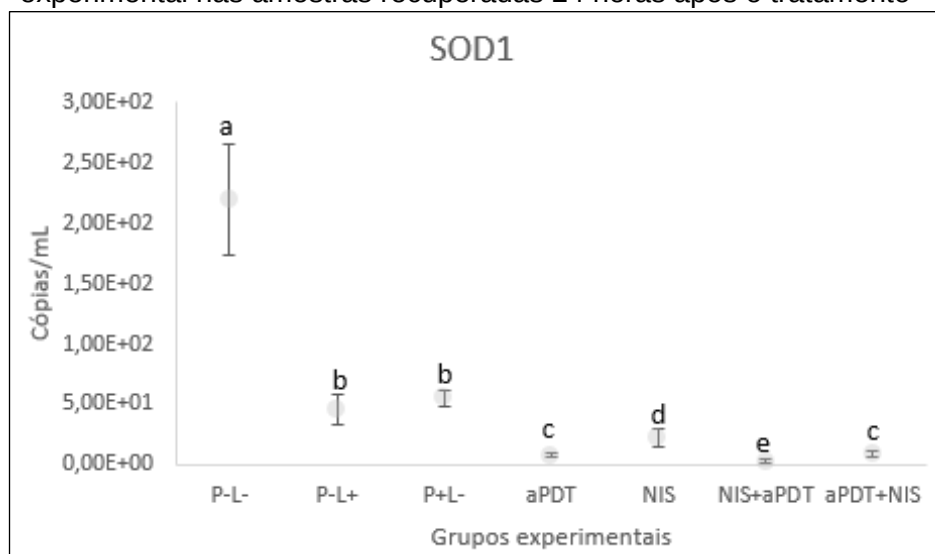


Média e desvio padrão da expressão do gene CAT1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Tukey). O eixo “Y” está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

O gene SOD1, apresentou diferença estatística na expressão gênica dos diferentes grupos de tratamento, essa diferença foi identificada através do pós teste de Games-Howell (Figura 19). O grupo P-L- apresentou os maiores valores de expressão gênica e foi estatisticamente diferente de todos os demais grupos ($p < 0,05$). O grupo NIS+aPDT foi estatisticamente diferente dos demais grupos e apresentou os menores valores de expressão gênica, seguidos dos grupos aPDT e aPDT+NIS que foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 0,844$). O grupo NIS foi estatisticamente diferente dos demais grupos e apresentou menor valor de expressão gênica comparado ao grupo P-L- ($p < 0,05$). Os grupos P-L+ e P+L- foram estatisticamente semelhantes ($p = 0,518$) e apresentaram valores de expressão gênica intermediários comparados aos demais grupos.

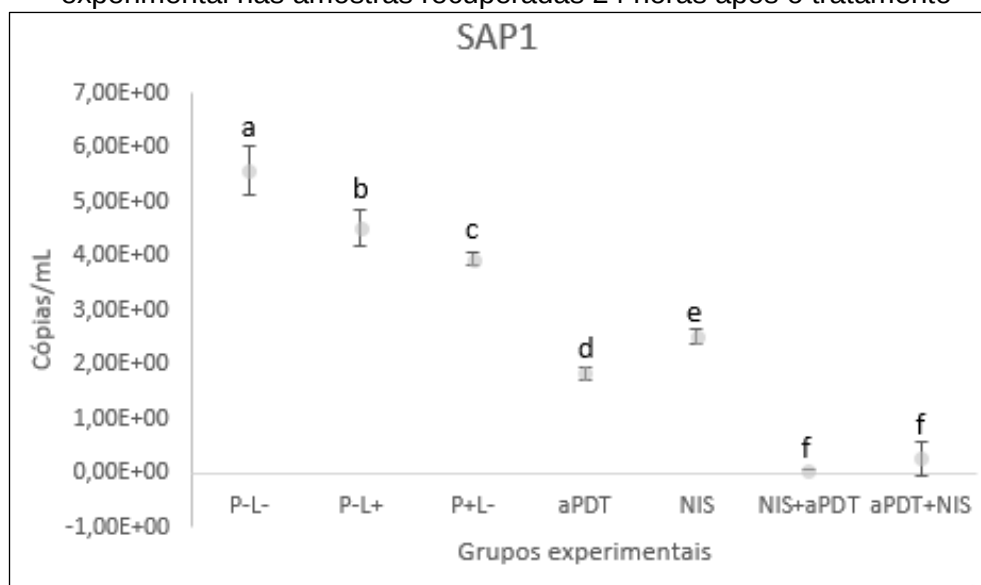
Figura 19- Expressão do gene SOD1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene SOD1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo "Y" está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

A Figura 20 demonstra que os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene SAP1 e essa diferença foi identificada pelo pós-teste de Games-Howell. Os grupos que foram tratados com terapia combinada (NIS+aPDT e aPDT+NIS) foram estatisticamente iguais entre si ($p = 0,668$) e apresentaram os menores valores de expressão gênica comparado ao grupo P-L-, seguida da aplicação da aPDT isoladamente. Os demais grupos (aPDT, P+L- e NIS) foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) e apresentaram valores intermediários de expressão gênica.

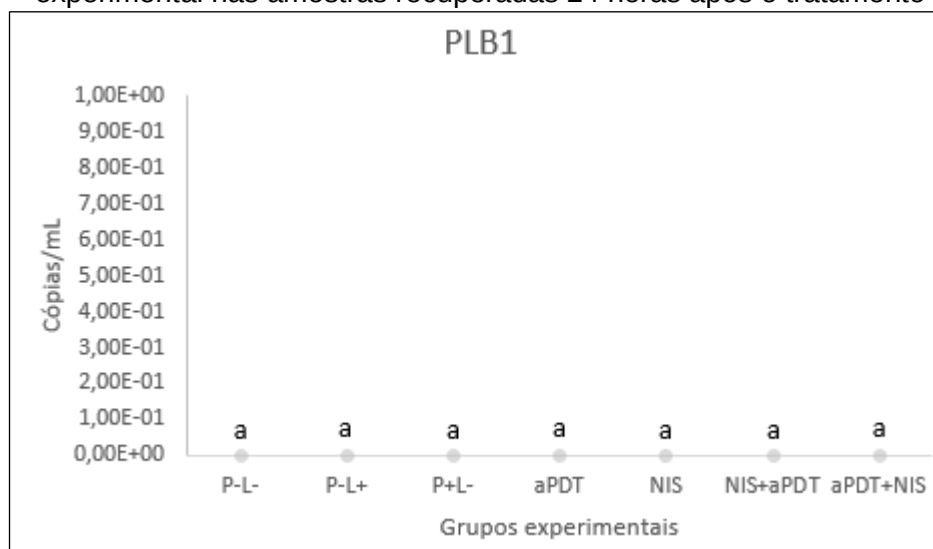
Figura 20- Expressão do gene SAP1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene SAP1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo “Y” está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

Em relação a expressão do gene PLB1 (Figura 21), não houve expressão em nenhum dos grupos experimentais do presente estudo.

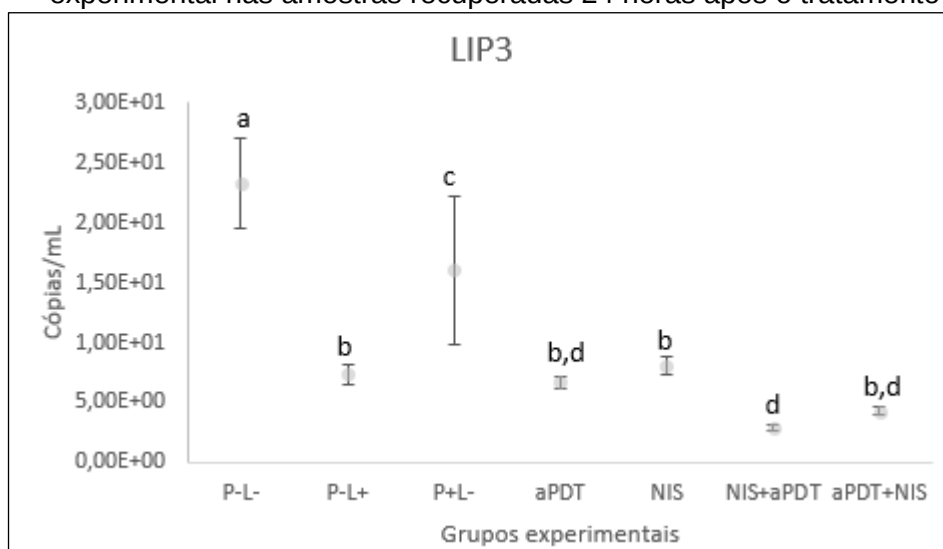
Figura 21- Expressão do gene PLB1 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene PLB1 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Games-Howell). O eixo “Y” está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 22, os diferentes tratamentos influenciaram na expressão gênica do gene LIP3, essa diferença foi identificada pelo pós-teste de Tukey. O grupo P-L- foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$) e apresentou os maiores valores de expressão gênica. Os grupos P-L+, aPDT, NIS e aPDT+NIS não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) e apresentaram os menores valores de expressão gênica comparado ao grupo P-L-. Os grupos aPDT, NIS+aPDT e aPDT+NIS também foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). Por outro lado, o grupo P+L- foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$) e apresentou valores intermediários de expressão gênica.

Figura 22- Expressão do gene LIP3 avaliada em cada grupo experimental nas amostras recuperadas 24 horas após o tratamento



Média e desvio padrão da expressão do gene LIP3 em cada grupo experimental de tratamento. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$) (pós teste de Tukey). O eixo "Y" está representado em escala Log₁₀ para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Desde o início dos anos 80, as infecções fúngicas têm sido consideradas um grave problema ao redor de mundo, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. A OPC representa uma das infecções fúngicas mais frequentes e seu principal agente etiológico é a espécie *C. albicans*¹. O fluconazol tem sido utilizado com frequência no tratamento de muitas infecções causadas por *Candida* uma vez que apresenta custo acessível, exibe toxicidade limitada, e está disponível para administração oral²¹. Essa droga atua na biossíntese do ergosterol, através da enzima P450 14- α desmetilase que catalisa a conversão da lanosterol em ergosterol⁴⁷. Contudo, o desenvolvimento de resistência antifúngica a estes medicamentos vem aumentando e relacionam-se com alterações genéticas na enzima alvo, além de sua super-expressão no citoplasma celular^{17,50}. Dessa forma, é necessário compreender os mecanismos de resistência que envolvem a expressão de genes, bem como encontrar modalidades alternativas de tratamento, além de investigar como essas modalidades poderiam interferir na expressão desses genes. Nesse contexto, a aPDT vem sendo sugerida como uma forma de tratamento. A aPDT associa a luz, em um comprimento de onda adequado ao fotossensibilizador, e, na presença do oxigênio leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)²⁹. Essas espécies reativas são capazes de promover a inativação celular. O FS Photodithazine® em meio biológico, apresenta carga negativa, o que facilita o seu transporte através da membrana celular do fungo, levando a seu acúmulo intracelular³⁹. Além disso, o PDZ possui um alto rendimento quântico na formação de oxigênio singlete, que apresenta importante papel na inativação microbiana³⁸.

Estudos em modelo animal de candidose mostram que a aPDT mediada pelo PDZ associada a luz LED apresentou resultados promissores na inativação cepas de *C. albicans* suscetíveis ao fluconazol⁴², bem como no tratamento de candidose induzida em modelo murino⁴³. Utilizando 200 mg/L of PDZ associada a 50 J/cm² de luz LED, Hidalgo et al.⁴⁴ avaliaram in vivo a eficácia da aPDT e do antifúngico Nistatina no tratamento de candidose em modelo murino cujos os animais foram contaminados com cepa padrão de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Os autores observaram que a aplicação isolada de Nistatina (NIS) e aPDT promoveu redução de 1,3 e 1,1 log₁₀ respectivamente, em relação ao grupo P-L- e o aspecto macroscópico da lesão permaneceu similar ao grupo controle. Por outro lado,

quando as terapias foram associadas, houve redução no número de colônias viáveis sendo $2,6 \log_{10}$ e $2,1 \log_{10}$, para os grupos aPDT+NIS e NIS+aPDT, respectivamente, e a lesão apresentou redução de aproximadamente 90%. No presente estudo, foi avaliada a expressão de genes de virulência (ALS1, HWP1, EFG1, CAP1, CAT1, SOD1, SAP1, PLB1 e LIP3) e genes envolvidos na síntese de ergosterol (ERG1, ERG11, ERG3 e ERG25) em *C. albicans* presentes em línguas de camundongos submetidos a diferentes modalidades de tratamento (NIS, aPDT, aPDT+NIS e NIS+aPDT). Além disso foi avaliado se os tratamentos alteram o perfil de resistência da cepa ao fluconazol (CaR) por meio da avaliação da CIM e CFM.

Com relação a CIM, os resultados demonstraram comportamento estatisticamente semelhante entre os grupos de tratamento para cepas recuperadas 24 horas e 7 dias, e não revelou diferença estatística na comparação com o grupo controle (CIM > 256 µg/mL). Dessa forma, os tratamentos avaliados não apresentam potencial para alterar a CIM de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Os dados de UFC/mL revelaram reduções de aproximadamente $2 \log_{10}$, mesmo na maior concentração de fluconazol testada (1024 µg/mL) para todos os grupos experimentais.

Não há na literatura pertinente estudos que tenham investigado o efeito da aPDT e associação com NIS em colônias recuperadas de animais submetidos as modalidades de tratamento avaliadas no presente estudo. Quando confrontados os dados do grupo P-L-(controle) com os existentes na literatura para a cepa ATCC 96901⁵⁷ foi observado comportamento semelhante (CIM > 256 µg/mL). Esses resultados demonstraram que ao ser inoculada em animal, essa cepa permaneceu com as mesmas características observadas in vitro e não houve modificação no seu perfil de resistência mesmo após ser submetida aos tratamentos (NIS, aPDT ou aPDT+NIS e NIS+aPDT).

Para análise da expressão dos genes de virulência e envolvidos na síntese de ergosterol em *C. albicans* presentes em línguas de camundongos submetidos a diferentes modalidades de tratamento (NIS, aPDT, aPDT+NIS e NIS+aPDT) foi utilizada a técnica RT-qPCR. Por meio dessa técnica é possível por transcrição reversa, detectar e quantificar a expressão gênica a partir da detecção de fluorescência. Essa técnica tem sido empregada em diversas áreas da biologia molecular devido a sua eficácia, especificidade e fidelidade⁶³. Para adequada análise da expressão gênica, é necessário o correto armazenamento e manipulação das

amostras, além de *primers* específicos e com boas características. Para análise dos genes envolvidos na virulência de *C. albicans* foram utilizados *primers* da literatura^{77,11,81}. Para possibilitar a análise dos genes envolvidos na síntese de ergosterol foi realizado delineamento dos *primers* respeitando as características consideradas como ideais pela literatura pertinente^{65,66,82} em que a temperatura de anelamento deve estar entre 55-60°C, o tamanho do produto deve ser de aproximadamente 150 bp e o peso ótimo de *primer* em torno de 18-25 bp.^{65,66}. O programa Oligo Explorer Design foi o escolhido para delineamento dos *primers* para os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25. Os resultados demonstraram que as T_m observadas para os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25 foram de 57, 59, 58 e 55°C, respectivamente. De acordo com Thornton et al.⁶⁵, a temperatura de anelamento ideal deve estar próxima de 59/60° C. Por outro lado, Bustin⁶⁵ descreveu que a temperatura ideal deve estar em torno dos 55° C pois a T_m de uma molécula de DNA depende do tamanho e da composição dos nucleotídeos, portanto, amplicons ricos em GC têm uma T_m maior do que aqueles com mais pares de bases AT⁸² sendo importante que a porcentagem de GC esteja em torno de 40%. Os resultados observados demonstraram que a porcentagem de GC foi adequada para todos os *primers*, variando entre 38 a 45%. Também foi observado que o tamanho do produto foi de 139, 133, 159 e 93 bp, para os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25, respectivamente. O peso ótimo para os genes ERG1, ERG3 e ERG25 foi de 20 bp, enquanto que para ERG11 foi de 18 bp. Além disso, foi observado que os *primers* desenhados apresentaram pico único e ausência de *dimers*. As curvas padrão foram feitas à partir de diluição seriada de produtos de PCR purificados e resultou em Eficiência de 90–110% e R² = 0.99, com slope de $\cong -3.3$. A análise da *Melt Curve* tem sido considerada uma poderosa ferramenta que fornece uma identificação dos produtos amplificados, distinguindo-os de produtos inespecíficos (artefatos) e dímeros de *primers*^{65,66,82}. Os *Amplification plots* dos genes delineados nesse estudo mostraram diluições equidistantes e um único pico na *Melt curve*, o que é um bom indicador da eficiência do *primer*.

No que se refere a especificidade, os *primers* delineados não foram específicos para *C. albicans*, uma vez que apresentaram reação cruzada com outras espécies de *Candida*. Tal característica é uma limitação, principalmente, nos estudos conduzidos em amostras clínicas uma vez que os pacientes com candidose oral podem apresentar mais de uma espécie de *Candida* em sua microbiota, além de

biofilmes mistos com diversas espécies de microrganismos. Sendo assim, os *primers* delineados no presente estudo estão indicados para serem utilizados em estudos *in vitro* e não devem ser utilizados para análise de amostras clínicas.

O ergosterol é um importante componente da membrana celular lipídica do fungo que modula a fluidez, permeabilidade e integridade da membrana de *C. albicans* sendo alvo dos antifúngicos⁸⁴. Os polienos estabelecem interações hidrofóbicas com o ergosterol, modificando a permeabilidade da membrana, podendo ocasionar a morte celular⁸⁴. Já os azóis atuam no gene responsável por codificar a enzima 14- α -lanosterol-demetilase (ERG11), uma superexpressão do gene ERG11 pode ocasionar desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos^{21,22}.

A via de biossíntese do ergosterol envolve diversas conversões realizadas por enzimas secretadas por diferentes genes. Pode-se destacar a ação de ERG1, que atua nas fases iniciais da conversão, de esqualeno para esqualeno epóxido. O gene ERG11, atua na conversão de lanosterol em C14-demetil-lanosterol. O gene ERG25 atua convertendo esse último esterol em metilzimosterol-carboxilato. Já o gene ERG3, atua nas vias finais convertendo fecosterol em ergosterol⁸⁴. Assim, julgou-se importante avaliar como diferentes tratamentos (aPDT, NIS, aPDT+NIS e NIS+aPDT) poderiam afetar a expressão desses genes envolvidos na biossíntese do ergosterol. No presente estudo, foi observado que os genes ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25 apresentaram comportamento semelhante, com redução da expressão gênica nos grupos onde foram realizados os tratamentos em comparação com o grupo controle (P-L-). Para o gene ERG1, a terapia combinada (aPDT+NIS; NIS+aPDT) promoveu maior redução na expressão, seguido da aPDT e NIS que foram estatisticamente semelhantes e menor que o controle (P-L-). Esse gene codifica a enzima esqualeno epoxidase. Outros autores⁶⁸ observaram que a mutação de ERG1 ocasiona redução no conteúdo de ergosterol e acúmulo do seu precursor (esqualeno), que em grandes quantidades pode ser tóxico à célula fúngica.

A redução na expressão do gene ERG11 nos diferentes grupos de tratamento (aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS) representa um resultado bastante positivo. Esse gene sintetiza a enzima 14- α -lanosterol que é o alvo do tratamento com o antifúngico fluconazol, essa ligação promove o bloqueio dessa síntese, e, consequente esgotamento do ergosterol na membrana celular fúngica^{21,22}. De acordo com Wu et al.⁸⁵ o ERG11 também desempenha um papel essencial no

desenvolvimento da hifa, na adaptação ao estresse oxidativo e na virulência em *C. albicans*. A cepa ATCC 96901 utilizada no presente estudo é resistente ao fluconazol, de forma que a redução na expressão do gene *ERG11* denota provável redução na sua resistência, indicando que a membrana fúngica estaria mais permeável, mecanismo que facilita a morte celular. Além disso, o acúmulo intracelular de esteróis intermediários, pode ser tóxico ao fungo ocasionando a inibição do mesmo⁶⁸.

Foi observada redução na expressão do gene *ERG3* para todos os grupos de tratamento (aPDT, NIS+aPDT e aPDT+NIS) em relação ao controle (P-L-), sendo essa redução mais acentuada no grupo NIS em relação aos demais grupos de tratamento. Esse gene é responsável por codificar a enzima C 5,6-desaturase que atua nas vias finais de biossíntese. A interação da Nistatina com os ergosteróis da membrana leva a formação de poros ou ainda pode ocasionar mudanças nas propriedades físicas da membrana lipídica, esses dois mecanismos não são mutuamente exclusivos⁸⁵. Como observado no estudo in vivo, não houve redução significativa na contagem de colônias viáveis para o grupo tratado apenas com a NIS ($1,3 \log_{10}$)⁴⁴ o que pode indicar que o antifúngico não alterou de maneira significativa a permeabilidade da membrana, apenas promoveu uma alteração pontual nas propriedades da bicamada lipídica do fungo. A ligação da Nistatina ao ergosterol pode ter promovido queda na reposição constante desse lipídeo da membrana.

Para o gene *ERG25*, também foi observada redução na expressão gênica para todos os grupos submetidos aos tratamentos em relação ao controle (P-L-), entretanto, essa redução foi mais acentuada nos grupos onde foi utilizado o antifúngico Nistatina. Esses resultados sugerem que a Nistatina possa ter alterado a via de biossíntese do ergosterol, prejudicando a produção e reposição de novos esteróis à membrana. Para o grupo aPDT foram observados valores de expressão gênica semelhantes ao grupo tratado apenas com a luz (P-L+). Tem sido relatado que a luz aplicada isoladamente apresenta efeito sobre a membrana da célula fúngica^{60,87}. Berg et al.⁸⁷ observaram que a aplicação da luz aumentou a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de macromoléculas no citosol celular. Segundo Romano et al.⁶⁰, a luz aplicada previamente a aPDT altera a permeabilidade da membrana de *C. albicans*, facilitando a incorporação do fotossensibilizador pelo fungo, potencializando o efeito da aPDT. A redução na

expressão do gene ERG25, pode ser atribuída a diminuição da disponibilidade de ergosterol na membrana, aumentando assim a sua permeabilidade.

De forma geral os resultados indicam redução na expressão dos genes relacionados com a biossíntese do ergosterol (ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25) pode promover redução significativa na produção desse componente da membrana fúngica, que é alvo de polienos e azóis⁸⁴. Esses resultados sugerem que os tratamentos são capazes de alterar a membrana celular, favorecendo a permeabilidade e vulnerabilidade do fungo. Efeito semelhante também foi observado para os genes ERG11 e ERG25 quando a luz LED foi aplicada isoladamente.

Na grande maioria dos casos, infecções causadas pelas espécies de *Candida* são resultados da capacidade do fungo em formar biofilmes sobre superfícies bióticas e abióticas^{3,6}. Tanto a morfologia de levedura quanto a de hifas de *C. albicans*, tem papel fundamental no processo de formação do biofilme⁶. A formação do biofilme pode ser dividida em: adesão de *C. albicans* em forma de levedura ao substrato (fase de adesão); proliferação celular e produção de projeções alongadas que são as formas filamentosas da *C. albicans*, incluindo hifas e pseudohifas (fase de iniciação); formação de matriz extracelular, fazendo com que o biofilme adquira tolerância medicamentosa (fase de maturação); e, por último, as células se desprendem do biofilme e são dispersas para o meio (fase de dispersão celular)^{5,7}.

O gene ALS1 é responsável por codificar a proteína de adesão celular, a adesina⁷ que é fundamental nas fases iniciais da adesão. O gene HWP1, além de atuar na adesão, facilita a invasão do fungo ao tecido do hospedeiro¹⁴ por atuar na fase de iniciação, juntamente com o gene EFG1 que atua na diferenciação de levedura para hifa¹³. Além disso, as lipases são enzimas que degradam lipídeos e são codificadas por vários genes, entre eles o LIP3, que permite o desenvolvimento do biofilme na mucosa¹⁵. *C. albicans* também possui a capacidade de invasão tecidual pela ruptura da membrana celular do hospedeiro, por meio da secreção de enzimas degradativas como as fosfolipases (por exemplo, PLB1)¹⁶ e as proteinases (por exemplo, SAP1)¹¹. De acordo com Nailis et al.¹⁵, todos os membros das famílias de genes ALS, SAP, LIP e PLB são expressos em biofilmes em diferentes modelos testados, seja ele sobre superfície abiótica ou biótica (modelo de epitélio humano reconstituído)¹⁵. Ainda nesse contexto de virulência, este fungo possui a habilidade de se adaptar às alterações no pH do ambiente, flexibilidade metabólica e resposta ao estresse oxidativo. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, o mesmo

expressa genes antioxidantes, entre eles CAP1, CAT1 e SOD1 que ativam vias que auxiliam na proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) ⁸⁻¹².

Os resultados demonstraram que os tratamentos reduziram a expressão dos genes ALS1, EFG1, CAP1, LIP3, SAP1 e SOD1 em todos os grupos experimentais avaliados em relação ao controle (P-L-). Quando utilizada a terapia combinada (aPDT+NIS, NIS+aPDT), houve redução mais acentuada na expressão dos genes ALS1, LIP3, SAP1 e SOD1. A expressão do gene EFG1, foi estatisticamente semelhante em todos os grupos de tratamento e menor que no grupo controle (P-L-). Para os genes CAT1 e SOD1, não foi observada diferença estatística entre os grupos aPDT e aPDT+NIS. Para os genes CAP1, EFG1, HWP1 e LIP3, os grupos P-L+ e aPDT não apresentaram diferença estatística entre si. Para os genes CAP1, EFG1 e HWP1 não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento NIS e os que foram avaliados a associação das terapias (NIS+aPDT e aPDT+NIS).

O processo inicial de virulência é a adesão do fungo às células do hospedeiro. Essa ação é de fundamental importância para que o fungo sobreviva aderido às células epiteliais¹. A aderência pode ser mediada por uma variedade de proteínas expressas na superfície do patógeno e envolve uma família de genes, Agglutinin-Like Sequence (ALS). Tem sido relatado^{72,88}, que o gene ALS1 é principal expresso na aderência das células e na formação do biofilme. No que se refere ao gene ALS1, no presente estudo, foi observado redução na expressão em todos os grupos de tratamento (aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS), juntamente com a luz isoladamente. Segundo Hosseini et al., a redução na expressão de ALS1 e ALS3, principalmente em cepas resistentes ao fluconazol isoladas de pacientes, indica efeito inibitório dos mesmos nas fases de adesão inicial e formação do biofilme em superfícies bióticas ou abióticas⁷⁶ o que indica redução na virulência do fungo.

O gene HWP1 é responsável por promover a interação das células de *C. albicans* com as do hospedeiro por meio da secreção de adesinas específicas para hifas⁸⁹ uma super-expressão desse gene indica capacidade do fungo em formar mais filamentos. Para o desenvolvimento do biofilme sobre um modelo de epitélio humano reconstituído, *C. albicans* invade e destrói as células epiteliais, e as hifas aumentam a capacidade de invasão⁵⁰. Os resultados do presente estudo demonstraram que a expressão desse gene para todos os grupos tratados com antifúngico NIS (isoladamente ou em terapia combinada) foi aumentada, diferente do observado para

o gene ALS1. Os resultados observados no presente estudo, sugerem um aumento da virulência do microrganismo quando tratado com o antifúngico. Esses resultados não eram esperados, uma vez que a Nistatina é um dos medicamentos tópicos mais utilizados para o tratamento da candidose¹. A alta frequência de expressão de HWP1 revela a capacidade do fungo em causar infecções crônicas, essa combinação facilita a formação de biofilme e pode desempenhar importante papel na resistência aos antifúngicos⁷². Esse resultado corrobora com um estudo prévio em modelo in vivo⁴³ de candidose em que o antifúngico Nistatina provocou remissão parcial das lesões nas línguas de camundongos infectados com uma cepa de *C. albicans* susceptível, enquanto que a aplicação da aPDT promoveu a remissão total das lesões⁴³.

A capacidade de *C. albicans* em se diferenciar da forma unicelular leveduriforme para a forma filamentosa (hifas ou pseudo-hifas) é denominada polimorfismo e esse mecanismo é uma capacidade adaptativa do fungo juntamente com a formação de biofilme⁷¹. O gene EFG1 está envolvido na formação de biofilme sobre superfícies abióticas e bióticas e tem sido relacionado com a transição do fungo de sua forma de levedura para hifa⁷¹. A super-expressão desse gene pode representar um passo importante para o início da doença contribuindo para a colonização de *C. albicans*⁷¹. No presente estudo foi observado que os diferentes tratamentos avaliados reduziram a expressão desse gene de forma estatisticamente semelhante, sugerindo que, após os tratamentos o fungo reduziu a capacidade de sofrer a transição morfológica de levedura para hifa quando submetidos aos diferentes tratamentos, portanto houve redução da virulência. Alguns estudos^{59,61,90} revelaram que a aPDT reprimiu a transição de levedura para hifa em cepas susceptíveis ao fluconazol. A redução na expressão do gene EFG1 é um resultado importante uma vez que sugere alterações na morfogênese fúngica e perda da capacidade de ativar a cascata indutória de polimorfismo¹³ requerida para a virulência de *C. albicans*⁹¹.

O fungo também apresenta capacidade de adaptação a alterações de pH, metabólicas e resposta ao estresse oxidativo. Uma resposta ao estresse oxidativo e as ROS é a indução rápida de genes que codificam a desintoxicação das células e os genes antioxidantes como CAP1, CAT1 e SOD1 são exemplos importantes dessa via. O gene CAP1 age como fator de transcrição em *C. albicans* atuando na redução das espécies reativas em resposta ao estresse oxidativo⁶². No presente estudo foi

observado que os tratamentos com NIS, aPDT, aPDT+NIS e NIS+aPDT provocaram redução na expressão do gene CAP1. Os resultados observados no presente estudo sugerem que os tratamentos avaliados foram capazes de deixar o fungo mais vulnerável aos mecanismos de defesa do hospedeiro e ação das terapias. Além disso, foi demonstrado que a deleção desse gene, torna a cepa avirulenta em modelo de camundongo com candidose sistêmica⁹². Por outro lado, os resultados demonstraram aumento da expressão do gene CAT1 nos grupos tratados com aPDT (aPDT, NIS+aPDT e aPDT+NIS) e somente luz (P+L-). Esse gene atua na produção de catalase, que é uma enzima essencial para desintoxicação celular de *C. albicans*, removendo o radical H_2O_2 do meio intracelular⁷⁴. Considerando que o mecanismo de ação da aPDT promove a produção de ROS, entre eles H_2O_2 ⁶¹, o aumento na expressão observado para esse gene pode ser justificado pela tentativa de desintoxicação do meio intra-celular do microrganismo.

Candida spp. também ativam um mecanismo de desintoxicação celular com a atuação da enzima peróxido dismutase que atua na conversão de radicais superóxidos em peróxidos de hidrogênio (H_2O_2)⁶⁷. Esse processo é mediado pelos genes da família SOD, entre eles o SOD1 (superóxido dismutase dependente de cobre-zinco)⁶⁷. Altos níveis de SOD protegem a célula fúngica contra o estresse oxidativo. Tem sido relatado que SOD5 é expresso em hifas de *C. albicans*, e que essas formas interagem com as células fagocitárias do hospedeiro^{10,67}. No presente estudo foi observado que o gene SOD1 apresentou expressão aumentada no grupo P-L-, visto que há uma situação de desequilíbrio celular provocado pela infecção fúngica e atividade fagocitária pelo hospedeiro⁷. Para os grupos de tratamento houve queda significativa na expressão de SOD1, principalmente nos grupos de tratamento onde a aPDT estava presente, denotando possível redução na virulência de *C. albicans*. Provavelmente, o fungo apresentou capacidade reduzida em controlar o estresse oxidativo gerado por essa terapia (aPDT). Os grupos P-L+ e P+L- também apresentaram redução na expressão gênica e foram estatisticamente semelhantes. Tem sido relatado que a ação da luz^{60,87} pode danificar a membrana celular fúngica, e esse tratamento modifica mecanismos de sinalização fagocitária do hospedeiro. O tratamento com o fotossensibilizador (P+L-) também resultou em redução na expressão gênica e esse resultado pode ser atribuído a relação do mesmo com íons do interior da célula³⁹, essa característica pode levar a um bloqueio da expressão do

gene SOD1, ou até mesmo sua repressão e substituição pela expressão de outros genes SOD dependentes de outros íons, como o Manganês (SOD3)⁹³.

Além disso, a secreção de proteases são de extrema importância no processo de invasão às células do hospedeiro, pois atuam na degradação das barreiras físicas (pele e mucosa), digerem proteínas e membranas celulares¹¹. Além disso, estão relacionadas ao mecanismo de fuga das defesas imunológicas do hospedeiro⁷⁸. *C. albicans* secreta três diferentes enzimas, as proteinases (SAP), fosfolipases (PLB) e lipases (LIP) que são importantes no processo de invasão tecidual⁷⁸. Aspartil-proteases (SAPs) são uma classe de enzimas com papel fundamental na colonização de leveduras e no desenvolvimento de biofilme⁷⁸. No presente estudo, os diferentes tratamentos ocasionaram redução na expressão do gene SAP1, resultado que pode indicar redução na virulência do fungo, principalmente nos grupos tratados com aPDT. Freire et al.⁵⁶, avaliaram a expressão dos genes SAP5, LIP9 e PLB1 em isolados clínicos após aPDT utilizando o fotossensibilizador azul de metileno associando com a luz vermelha 660 nm. Neste estudo⁵⁶, os autores observaram que a expressão desses genes relacionados as enzimas extracelulares (proteinase, lipase e fosfolipase), apresentaram uma discreta redução após o tratamento com a aPDT, fato que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

A expressão do gene PLB1 não foi observada em nenhum grupo experimental. A função desse gene é codificar fosfolipase que é considerado um dos principais fatores de virulência de *C. albicans*⁷⁰. Essas fosfolipases atuam facilitando o acesso e adesão às células epiteliais do hospedeiro, sendo expressas principalmente na corrente sanguínea do hospedeiro, uma vez que é secretada no meio extracelular do fungo⁹⁴. Estudos sugerem que esse gene é expresso em apenas 14% dos portadores de candidose oral^{70,94}. Em outros estudos⁹⁵⁻⁹⁷ que utilizaram um modelo de epitélio humano reconstituído foi observada expressão de ALS, HWP1, SAP, LIP e PLB2, mas não foi detectada expressão para o gene PLB1. Esses resultados corroboram com o presente estudo e podem justificar a ausência de expressão do gene PLB1. Por outro lado, Nailis et al.¹⁵ detectaram a expressão do gene PLB1, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Assim, além do tipo de amostra, a técnica utilizada para avaliar a expressão gênica pode explicar os resultados obtidos no presente estudo.

No que se refere a expressão de LIP3, responsável pela produção da lipase, uma das enzimas hidrolíticas secretadas por *C. albicans* envolvida no processo de adesão e formação do biofilme¹⁵, foi observada redução na expressão gênica nos grupos de tratamento com aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS indicando redução na capacidade de invasão tecidual e, conseqüentemente redução na virulência. Tem sido relatado o gene LIP3 está associado com a invasão tecidual, uma vez que as lipases digerem lipídeos do tecido epitelial do hospedeiro¹⁵. Assim, significativa expressão desse gene tem sido relatada apenas em modelo in vivo¹⁵. Os resultados do presente estudo confirmaram essa observação uma vez que foi observada uma super-expressão do gene LIP3 no grupo controle (P-L-), onde a infecção estava presente. Esses resultados remetem a importância da avaliação de um modelo in vivo, que pode favorecer a interpretação do dinamismo das interações que o patógeno estabelece com o hospedeiro ao promover a doença e como os diferentes tratamentos propostos no presente estudo influenciaram nessa expressão,

Considerando as limitações do presente estudo, podemos concluir que os diferentes tratamentos avaliados promoveram redução na expressão de genes de virulência e envolvidos na síntese do ergosterol sugerindo redução na virulência de *C. albicans* e alteração na membrana celular fúngica, sítio de ação de polienos (Nistatina) e azóis (Fluconazol). Apesar de ter havido redução na expressão dos genes relacionados a biossíntese de ergosterol, denotando possível redução da resistência, os dados de CIM e CFM não demonstraram tal efeito. Dessa forma, outros genes relacionados com os mecanismos de resistência em *C. albicans* deverão ser avaliados.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que:

- ✓ A PDT não alterou o perfil a resistência da cepa ao Fluconazol uma vez que todos os grupos avaliados (P+L-, P-L+, PDT, NIS, PDT +NIS, NIS+PDT) apresentaram comportamento semelhante ao grupo P-L- (controle positivo), independente do momento da coleta;
- ✓ Os diferentes tratamentos avaliados promoveram redução na expressão dos genes relacionados com a biossíntese do ergosterol (ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25);
- ✓ Foi observado redução na expressão do gene ALS1 quando realizadas as terapias combinadas (NIS+aPDT e aPDT+NIS), aPDT ou NIS isoladamente;
- ✓ Para o gene EFG1 foi observado redução na expressão em todos os grupos de tratamento avaliados (aPDT, NIS, NIS+aPDT, aPDT+NIS), sugerindo redução na capacidade de dimorfismo e formação de biofilme;
- ✓ Nos grupos de tratamento onde a nistatina estava presente (NIS, NIS+aPDT ou aPDT+NIS) foi observado aumento na expressão do gene HWP1, sugerindo aumento na capacidade de formação de biofilme e o dimorfismo;
- ✓ O gene SAP1 e o LIP3 apresentaram redução na expressão após terapia combinada (NIS+aPDT e aPDT+NIS), aPDT e NIS, sugerindo redução na capacidade de invasão tecidual;
- ✓ No que se refere ao estresse oxidativo, foi observado redução na expressão dos genes CAP1 e SOD1 nos grupos tratados com aPDT, NIS, NIS+aPDT e aPDT+NIS. Por outro lado, os tratamentos que envolveram aPDT provocaram aumento na expressão do gene CAT1;
- ✓ A expressão do gene PLB1 não foi identificada no tipo de amostra avaliada no presente estudo;

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922): 455-9.
2. Eggimman P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(11): 685-702.
3. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001; 9(12): 591-6.
4. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 36(2): 288–305.
5. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183(18): 5385-94.
6. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(4): 633-8.
7. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(2): 109-18.
8. Dantas AS, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*. 2015; 5(1): 142-65.
9. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP, Quinn J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2006; 17(2): 1018–32.
10. Martchenko M, Alarco AM, H Marcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell*. 2004; 15(2): 456–67.
11. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis*. 2003; 188(3): 469-79.
12. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamon RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. 1998; 66(5): 1953–61.

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

13. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. PLoS Genet. 2012; 8(12): e1003118.
14. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. J Biol Chem. 1996; 271(11): 6298–305.
15. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiol. 2010; 10: 114.
16. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem. 1998; 273(40): 26078–86.
17. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013; 62 (Pt 1): 10-24.
18. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1994; 72(3): 283-8.
19. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. J Oral Rehabil. 2008; 35(11): 836-46.
20. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida species* in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005; 93(3): 288-93.
21. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. Front Microbiol. 2017; 7: 2173.
22. Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, Perfect JR, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(5): 1163-9.
23. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002; 2(2): 73-85.
24. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 382-402.
25. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163(1): 1-12.

26. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707.
27. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. *Antimicrob AgentsChemother*. 2005; 49(5): 2026-34.
28. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. 2000; 32: 237-43.
29. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001; 57(47): 9513-47.
30. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras*. 1996; 42(4): 229-36.
31. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004; 47(16): 3897–915.
32. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 67-73.
33. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(3): 392–401.
34. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue–mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2): 155-60.
35. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 161-8.
36. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(10): E380-8.
37. Pires L, Bosco SMG, Baptista MS, Kurachi C. Photodynamic therapy in *Pythiuminsidiosum* - an in vitro study of the correlation of sensitizer localization and cell death. *PLoS One*. 2014; 9(1): E85431.
38. Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)* .2004; 69(1):45-9.

39. Engelman FM, Mayer I, Gabrielli DS, Toma HE, Kowaltowski AJ, Araki K, et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39(2): 175–85.
40. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling.* 2013; 29(9): 1057-67.
41. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 685-94.
42. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(7): 1319-28.
43. Carmello JC, Alves F, G Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0156947.
44. Hidalgo KJR. Eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana associada a nistatina no tratamento de candidose oral em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2017.
45. Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J Biol Chem.* 1996; 271(35): 21177-86.
46. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(4): fov018.
47. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 5(7): a019752.
48. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, Vanden Bossche H. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(6): 1660-70.
49. Liu TT, Lee RE, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, Rogers PD. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2226-36.
50. Nailis H, Vandenbosch D, Deforce D, Nelis HJ, Coenye T. Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in *Candida albicans* biofilms. *Res Microbiol.* 2010; 161(4): 284-92.
51. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(5): 747-64.

52. Benhamou RI, Bibi M, Steinbuch KB, Engel H, Levin M,, Roichman Y, et al. Real-Time Imaging of the azole class of antifungal drugs in live *Candida* cells. ACS Chem. Biol. 2017; 12(7): 1769–77.
53. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2): 225–9.
54. Pumeesat P, Muangkaew W, Ampawong S, Luplertlop N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. New Microbiol. 2017; 40(4): 279-83.
55. Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. PeerJ. 2016; 4: e2148.
56. Freire, F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GN, Junqueira JC, Jorge AO. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. Lasers Med Sci. 2015; 30(5): 1511-8.
57. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. J Oral Microbiol. 2018; 10(1): 1476644.
58. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011; 54(2): 123-30.
59. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(1): 445-51.
60. Romano RA, Pratavieira S, Silva APD, Kurachi C, Guimarães FEG. Light driven photosensitizer uptake increases *Candida albicans* photodynamic inactivation. J Biophotonics. 2017; 10(11): 1538-46.
61. Carvalho ML, Pinto AP, Raniero LJ, Costa MS. Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorin e6: increase in both ROS production and membrane permeability. Lasers Med Sci. 2018; 33(3): 647-53.
62. Chien CT, Chen YC, Liu YC, Liang SH, Lin HH, Lin CH. The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of *Candida albicans* is modulated by Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. Med Mycol. 2018 Oct 4.[epub ahead of print].
63. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. PCR Methods Appl. 1993; 3(3): S18-29.
64. Bustin SA, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; c2004.

65. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) *primer* design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011; 39(2): 145–54.
66. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79(3): 213-21.
67. Hwang CS, Rhie G, Oh J, Huh W, Yim H, Kang S. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 11): 3705–13.
68. Pasrija R, Krishnamurthy S, Prasad T, Ernst JF, Prasad R. Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(6): 905-13.
69. Borecká-Melkusová S, Moran GP, Sullivan DJ, Kucharíková S, Chorvát D Jr, Bujdáková H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses*. 2009; 52(2): 118-28.
70. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2012; 55(1): 50-5.
71. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012; 148(1-2): 126–38.
72. Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR, Vaca S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. *Mycoses*. 2012; 55(3): 151-7.
73. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014; 69(4): 396-407.
74. Komalapriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, et al. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0137750.
75. Xu Y, Quan H, Wang Y, Zhong H, Sun J, Xu J, Jia N, Jiang Y. Requirement for Ergosterol in Berberine Tolerance Underlies Synergism of Fluconazole and Berberine against Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Isolates. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 491.
76. Hosseini SS, Ghaemi E, Noroozi A, Niknejad F. Zinc Oxide nanoparticles inhibition of initial adhesion and ALS1 and ALS3 gene expression in *Candida albicans* strains from urinary tract infections. *Mycopathologia*. 2019; 184 (2): 261-71.

77. 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.
78. Barbosa AH, Damasceno JL, Casemiro LA, Martins CHG, Pires RH, Candido RC. Susceptibility to oral antiseptics and virulence factors ex vivo associated with *Candida spp.* isolated from dental prostheses. J Prosthodont. 2019; 28(4): 398-408.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 (Document M27-S4).
80. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. Curr Biol. 2008; 18(14): 1017–24.
81. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. PLoS One. 2011; 6 (12): e28830.
82. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006; 1(3): 1559–82.
83. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. Braz Oral Res. 2008; 22(3): 216-22.
84. Parks LW, Casey WM. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. Annu Rev Microbiol. 1995; 49: 95-116.
85. Wu Y, Wu M1, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2018 Nov 1 18(7).
86. Silva L, Coutinho A, Fedorov A, Prieto M. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. Biophys J. 2006; 90(10): 3625-31.
87. Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. Cancer Res. 1999; 59(6): 1180-3.
88. Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katiraei F, Mohammadi R, Falahati M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. Adv Biomed Res. 2016; 5:105.
89. Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. Curr Genet. 1998; 33: 451-9.

90. Huang MC, Shen M, Huang YJ, Lin HC, Chen CT. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2). pii:E434.
91. Desai JV, Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(3).
92. Bahn YS, Sundstrom P. CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 2001; 183(10): 3211-23
93. Broxton CN, Culotta VC. An adaptation to low copper in *Candida albicans* involving SOD enzymes and the alternative oxidase. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0168400.
94. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995; 63(5): 1993-8.
95. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology*. 2004; 150(Pt 2): 267-75.
96. Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 2004; 4(4-5): 401-8.
97. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*. 2008; 154(Pt 11): 3266-80.

APÊNDICE A – Sumário teste estatístico

Para analisar a expressão dos genes de interesse, foi realizado o teste estatístico “Análise de Variância”-ANOVA ($\alpha=0,05$), seguida de pós teste de Tukey, supondo homocedasticidade ($p>0,05$) ou pós teste de Games-Howell, caso os dados sejam heterocedásticos ($p<0,05$). O teste foi realizado para cada um dos genes individualmente, à partir dos valores obtidos do qPCR (*SQ mean*). O fator “*SQ mean*” foi considerado como variável dependente e “Tratamentos” como independente.

Tabela A1- Sumário da Análise de Variâncias para o gene ALS1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
ALS1					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	38069,672	6	6344,945	355,092	,000
Nos grupos	875,553	49	17,868		
Total	38945,226	55			

Tabela A2- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene ALS1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	39,93750*	2,31395	,000	32,0347	47,8403
	3	-,38750	3,57778	1,000	-13,2679	12,4929
	4	59,80000*	1,61148	,000	53,4410	66,1590
	5	54,53625*	1,61711	,000	48,1809	60,8916
	6	61,51250*	1,60540	,000	55,1490	67,8760
	7	61,51250*	1,60540	,000	55,1490	67,8760
2	1	-39,93750*	2,31395	,000	-47,8403	-32,0347
	3	-40,32500*	3,60559	,000	-53,2502	-27,3998
	4	19,86250*	1,67231	,000	13,2614	26,4636
	5	14,59875*	1,67773	,001	8,0012	21,1963
	6	21,57500*	1,66645	,000	14,9695	28,1805
	7	21,57500*	1,66645	,000	14,9695	28,1805
3	1	,38750	3,57778	1,000	-12,4929	13,2679
	2	40,32500*	3,60559	,000	27,3998	53,2502
	4	60,18750*	3,20044	,000	47,5160	72,8590
	5	54,92375*	3,20327	,000	42,2545	67,5930
	6	61,90000*	3,19738	,000	49,2261	74,5739
	7	61,90000*	3,19738	,000	49,2261	74,5739
4	1	-59,80000*	1,61148	,000	-66,1590	-53,4410
	2	-19,86250*	1,67231	,000	-26,4636	-13,2614
	3	-60,18750*	3,20044	,000	-72,8590	-47,5160
	5	-5,26375*	,23941	,000	-6,0935	-4,4340
	6	1,71250*	,13992	,000	1,1579	2,2671
	7	1,71250*	,13992	,000	1,1579	2,2671
5	1	-54,53625*	1,61711	,000	-60,8916	-48,1809
	2	-14,59875*	1,67773	,001	-21,1963	-8,0012
	3	-54,92375*	3,20327	,000	-67,5930	-42,2545
	4	5,26375*	,23941	,000	4,4340	6,0935
	6	6,97625*	,19427	,000	6,2062	7,7463
	7	6,97625*	,19427	,000	6,2062	7,7463
6	1	-61,51250*	1,60540	,000	-67,8760	-55,1490
	2	-21,57500*	1,66645	,000	-28,1805	-14,9695
	3	-61,90000*	3,19738	,000	-74,5739	-49,2261
	4	-1,71250*	,13992	,000	-2,2671	-1,1579
	5	-6,97625*	,19427	,000	-7,7463	-6,2062
	7	0,00000	0,00000		0,0000	0,0000
7	1	-61,51250*	1,60540	,000	-67,8760	-55,1490
	2	-21,57500*	1,66645	,000	-28,1805	-14,9695
	3	-61,90000*	3,19738	,000	-74,5739	-49,2261
	4	-1,71250*	,13992	,000	-2,2671	-1,1579
	5	-6,97625*	,19427	,000	-7,7463	-6,2062
	6	0,00000	0,00000		0,0000	0,0000

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A3- Sumário da Análise de Variâncias para o gene CAP1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
CAP1					
	Soma dos Quadrado s	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	8,749	6	1,458	17,722	,000
Nos grupos	4,032	49	,082		
Total	12,781	55			

Tabela A4- Pós- teste de Tukey entre grupos para o gene CAP1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Tukey HSD						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	,43000*	,07633	,000	,1954	,6646
	3	-,04125	,07633	,998	-,2759	,1934
	4	,54500*	,07633	,000	,3104	,7796
	5	,87875*	,07633	,000	,6441	1,1134
	6	1,05500*	,07633	,000	,8204	1,2896
	7	1,06125*	,07633	,000	,8266	1,2959
2	1	-,43000*	,07633	,000	-,6646	-,1954
	3	-,47125*	,07633	,000	-,7059	-,2366
	4	,11500	,07633	,740	-,1196	,3496
	5	,44875*	,07633	,000	,2141	,6834
	6	,62500*	,07633	,000	,3904	,8596
	7	,63125*	,07633	,000	,3966	,8659
3	1	,04125	,07633	,998	-,1934	,2759
	2	,47125*	,07633	,000	,2366	,7059
	4	,58625*	,07633	,000	,3516	,8209
	5	,92000*	,07633	,000	,6854	1,1546
	6	1,09625*	,07633	,000	,8616	1,3309
	7	1,10250*	,07633	,000	,8679	1,3371
4	1	-,54500*	,07633	,000	-,7796	-,3104
	2	-,11500	,07633	,740	-,3496	,1196
	3	-,58625*	,07633	,000	-,8209	-,3516
	5	,33375*	,07633	,001	,0991	,5684
	6	,51000*	,07633	,000	,2754	,7446
	7	,51625*	,07633	,000	,2816	,7509
5	1	-,87875*	,07633	,000	-1,1134	-,6441
	2	-,44875*	,07633	,000	-,6834	-,2141
	3	-,92000*	,07633	,000	-1,1546	-,6854
	4	-,33375*	,07633	,001	-,5684	-,0991
	6	,17625	,07633	,261	-,0584	,4109
	7	,18250	,07633	,224	-,0521	,4171
6	1	-1,05500*	,07633	,000	-1,2896	-,8204
	2	-,62500*	,07633	,000	-,8596	-,3904
	3	-1,09625*	,07633	,000	-1,3309	-,8616
	4	-,51000*	,07633	,000	-,7446	-,2754
	5	-,17625	,07633	,261	-,4109	,0584
	7	,00625	,07633	1,000	-,2284	,2409
7	1	-1,06125*	,07633	,000	-1,2959	-,8266
	2	-,63125*	,07633	,000	-,8659	-,3966
	3	-1,10250*	,07633	,000	-1,3371	-,8679
	4	-,51625*	,07633	,000	-,7509	-,2816
	5	-,18250	,07633	,224	-,4171	,0521
	6	-,00625	,07633	1,000	-,2409	,2284

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A5- Sumário da Análise de Variâncias para o gene CAT1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
CAT1					
	Soma dos Quadrado s	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	2929,405	6	488,234	341,267	,000
Nos grupos	70,102	49	1,431		
Total	2999,507	55			

Tabela A6- Pós- teste de Tukey entre grupos para o gene CAT1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Tukey HSD						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	-6,54500*	,59805	,000	-8,3834	-4,7066
	3	,24750	,59805	1,000	-1,5909	2,0859
	4	-15,27125*	,59805	,000	-17,1097	-13,4328
	5	-3,71250*	,59805	,000	-5,5509	-1,8741
	6	-17,34625*	,59805	,000	-19,1847	-15,5078
	7	-16,65875*	,59805	,000	-18,4972	-14,8203
2	1	6,54500*	,59805	,000	4,7066	8,3834
	3	6,79250*	,59805	,000	4,9541	8,6309
	4	-8,72625*	,59805	,000	-10,5647	-6,8878
	5	2,83250*	,59805	,000	,9941	4,6709
	6	-10,80125*	,59805	,000	-12,6397	-8,9628
	7	-10,11375*	,59805	,000	-11,9522	-8,2753
3	1	-,24750	,59805	1,000	-2,0859	1,5909
	2	-6,79250*	,59805	,000	-8,6309	-4,9541
	4	-15,51875*	,59805	,000	-17,3572	-13,6803
	5	-3,96000*	,59805	,000	-5,7984	-2,1216
	6	-17,59375*	,59805	,000	-19,4322	-15,7553
	7	-16,90625*	,59805	,000	-18,7447	-15,0678
4	1	15,27125*	,59805	,000	13,4328	17,1097
	2	8,72625*	,59805	,000	6,8878	10,5647
	3	15,51875*	,59805	,000	13,6803	17,3572
	5	11,55875*	,59805	,000	9,7203	13,3972
	6	-2,07500*	,59805	,018	-3,9134	-,2366
	7	-1,38750	,59805	,255	-3,2259	,4509
5	1	3,71250*	,59805	,000	1,8741	5,5509
	2	-2,83250*	,59805	,000	-4,6709	-,9941
	3	3,96000*	,59805	,000	2,1216	5,7984
	4	-11,55875*	,59805	,000	-13,3972	-9,7203
	6	-13,63375*	,59805	,000	-15,4722	-11,7953
	7	-12,94625*	,59805	,000	-14,7847	-11,1078
6	1	17,34625*	,59805	,000	15,5078	19,1847
	2	10,80125*	,59805	,000	8,9628	12,6397
	3	17,59375*	,59805	,000	15,7553	19,4322
	4	2,07500*	,59805	,018	,2366	3,9134
	5	13,63375*	,59805	,000	11,7953	15,4722
	7	,68750	,59805	,909	-1,1509	2,5259
7	1	16,65875*	,59805	,000	14,8203	18,4972
	2	10,11375*	,59805	,000	8,2753	11,9522
	3	16,90625*	,59805	,000	15,0678	18,7447
	4	1,38750	,59805	,255	-,4509	3,2259
	5	12,94625*	,59805	,000	11,1078	14,7847
	6	-,68750	,59805	,909	-2,5259	1,1509

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A7- Sumário da Análise de Variâncias para o gene EFG1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
Efg1					
	Soma dos Quadrado s	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	8449,241	6	1408,207	1042,553	,000
Nos grupos	66,186	49	1,351		
Total	8515,427	55			

Tabela A8- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene EFG1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	25,98750*	,82777	,000	23,1094	28,8656
	3	1,70000	,74591	,320	-,8619	4,2619
	4	28,44125*	,50437	,000	26,5681	30,3144
	5	28,39750*	,51341	,000	26,5157	30,2793
	6	28,26250*	,55464	,000	26,3113	30,2137
	7	28,70000*	,47841	,000	26,8328	30,5672
2	1	-25,98750*	,82777	,000	-28,8656	-23,1094
	3	-24,28750*	,89214	,000	-27,3456	-21,2294
	4	2,45375	,70279	,077	-,2337	5,1412
	5	2,41000	,70931	,084	-,2787	5,0987
	6	2,27500	,73970	,117	-,4358	4,9858
	7	2,71250*	,68440	,048	,0204	5,4046
3	1	-1,70000	,74591	,320	-4,2619	,8619
	2	24,28750*	,89214	,000	21,2294	27,3456
	4	26,74125*	,60424	,000	24,4570	29,0255
	5	26,69750*	,61180	,000	24,4096	28,9854
	6	26,56250*	,64679	,000	24,2351	28,8899
	7	27,00000*	,58274	,000	24,7143	29,2857
4	1	-28,44125*	,50437	,000	-30,3144	-26,5681
	2	-2,45375	,70279	,077	-5,1412	,2337
	3	-26,74125*	,60424	,000	-29,0255	-24,4570
	5	-,04375	,26890	1,000	-,9641	,8766
	6	-,17875	,34110	,998	-1,3801	1,0226
	7	,25875	,19390	,822	-,4502	,9677
5	1	-28,39750*	,51341	,000	-30,2793	-26,5157
	2	-2,41000	,70931	,084	-5,0987	,2787
	3	-26,69750*	,61180	,000	-28,9854	-24,4096
	4	,04375	,26890	1,000	-,8766	,9641
	6	-,13500	,35433	1,000	-1,3671	1,0971
	7	,30250	,21632	,791	-,4991	1,1041
6	1	-28,26250*	,55464	,000	-30,2137	-26,3113
	2	-2,27500	,73970	,117	-4,9858	,4358
	3	-26,56250*	,64679	,000	-28,8899	-24,2351
	4	,17875	,34110	,998	-1,0226	1,3801
	5	,13500	,35433	1,000	-1,0971	1,3671
	7	,43750	,30139	,764	-,7134	1,5884
7	1	-28,70000*	,47841	,000	-30,5672	-26,8328
	2	-2,71250*	,68440	,048	-5,4046	-,0204
	3	-27,00000*	,58274	,000	-29,2857	-24,7143
	4	-,25875	,19390	,822	-,9677	,4502
	5	-,30250	,21632	,791	-1,1041	,4991
	6	-,43750	,30139	,764	-1,5884	,7134

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A9- Sumário da Análise de Variâncias para o gene ERG1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
ERG1					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	13971,138	6	2328,523	228,564	,000
Nos grupos	499,193	49	10,188		
Total	14470,331	55			

Tabela A10- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene ERG1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente: Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	2,66250	2,18703	,875	-4,9547	10,2797
	3	3,90000	2,36768	,659	-4,4408	12,2408
	4	33,03375*	1,24368	,000	28,1602	37,9073
	5	32,97750*	1,23566	,000	28,0990	37,8560
	6	35,06875*	1,23193	,000	30,1874	39,9501
	7	34,90500*	1,23183	,000	30,0236	39,7864
2	1	-2,66250	2,18703	,875	-10,2797	4,9547
	3	1,23750	2,71212	,999	-8,0404	10,5154
	4	30,37125*	1,81561	,000	23,2135	37,5290
	5	30,31500*	1,81013	,000	23,1533	37,4767
	6	32,40625*	1,80758	,000	25,2425	39,5700
	7	32,24250*	1,80752	,000	25,0787	39,4063
3	1	-3,90000	2,36768	,659	-12,2408	4,4408
	2	-1,23750	2,71212	,999	-10,5154	8,0404
	4	29,13375*	2,02959	,000	21,1238	37,1437
	5	29,07750*	2,02469	,000	21,0639	37,0911
	6	31,16875*	2,02241	,000	23,1534	39,1841
	7	31,00500*	2,02235	,000	22,9896	39,0204
4	1	-33,03375*	1,24368	,000	-37,9073	-28,1602
	2	-30,37125*	1,81561	,000	-37,5290	-23,2135
	3	-29,13375*	2,02959	,000	-37,1437	-21,1238
	5	-,05625	,20049	1,000	-,7661	,6536
	6	2,03500*	,17606	,000	1,3496	2,7204
	7	1,87125*	,17536	,000	1,1855	2,5570
5	1	-32,97750*	1,23566	,000	-37,8560	-28,0990
	2	-30,31500*	1,81013	,000	-37,4767	-23,1533
	3	-29,07750*	2,02469	,000	-37,0911	-21,0639
	4	,05625	,20049	1,000	-,6536	,7661
	6	2,09125*	,10542	,000	1,6927	2,4898
	7	1,92750*	,10424	,000	1,5292	2,3258
6	1	-35,06875*	1,23193	,000	-39,9501	-30,1874
	2	-32,40625*	1,80758	,000	-39,5700	-25,2425
	3	-31,16875*	2,02241	,000	-39,1841	-23,1534
	4	-2,03500*	,17606	,000	-2,7204	-1,3496
	5	-2,09125*	,10542	,000	-2,4898	-1,6927
	7	-,16375*	,04084	,018	-,3036	-,0239
7	1	-34,90500*	1,23183	,000	-39,7864	-30,0236
	2	-32,24250*	1,80752	,000	-39,4063	-25,0787
	3	-31,00500*	2,02235	,000	-39,0204	-22,9896
	4	-1,87125*	,17536	,000	-2,5570	-1,1855
	5	-1,92750*	,10424	,000	-2,3258	-1,5292
	6	,16375*	,04084	,018	,0239	,3036

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A11- Sumário da Análise de Variâncias para o gene ERG3 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
ERG3					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	2392,773	6	398,796	508,427	,000
Nos grupos	38,434	49	,784		
Total	2431,207	55			

Tabela A12- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene ERG3.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	,18750	,64252	1,000	-2,0111	2,3861
	3	-,13750	,69832	1,000	-2,5230	2,2480
	4	13,12475 ⁺	,48773	,000	11,2235	15,0260
	5	13,63625 ⁺	,48952	,000	11,7357	15,5368
	6	13,05425 ⁺	,48142	,000	11,1494	14,9591
	7	13,06125 ⁺	,48158	,000	11,1565	14,9660
2	1	-,18750	,64252	1,000	-2,3861	2,0111
	3	-,32500	,66208	,999	-2,5955	1,9455
	4	12,93725 ⁺	,43425	,000	11,2516	14,6229
	5	13,44875 ⁺	,43626	,000	11,7636	15,1339
	6	12,86675 ⁺	,42715	,000	11,1774	14,5561
	7	12,87375 ⁺	,42733	,000	11,1846	14,5629
3	1	,13750	,69832	1,000	-2,2480	2,5230
	2	,32500	,66208	,999	-1,9455	2,5955
	4	13,26225 ⁺	,51322	,000	11,2585	15,2660
	5	13,77375 ⁺	,51492	,000	11,7707	15,7768
	6	13,19175 ⁺	,50722	,000	11,1844	15,1991
	7	13,19875 ⁺	,50737	,000	11,1916	15,2059
4	1	-13,12475 ⁺	,48773	,000	-15,0260	-11,2235
	2	-12,93725 ⁺	,43425	,000	-14,6229	-11,2516
	3	-13,26225 ⁺	,51322	,000	-15,2660	-11,2585
	5	,51150 ⁺	,12398	,014	,0873	,9357
	6	-,07050	,08660	,977	-,3970	,2560
	7	-,06350	,08748	,987	-,3904	,2634
5	1	-13,63625 ⁺	,48952	,000	-15,5368	-11,7357
	2	-13,44875 ⁺	,43626	,000	-15,1339	-11,7636
	3	-13,77375 ⁺	,51492	,000	-15,7768	-11,7707
	4	-,51150 ⁺	,12398	,014	-,9357	-,0873
	6	-,58200 ⁺	,09619	,003	-,9478	-,2162
	7	-,57500 ⁺	,09699	,003	-,9410	-,2090
6	1	-13,05425 ⁺	,48142	,000	-14,9591	-11,1494
	2	-12,86675 ⁺	,42715	,000	-14,5561	-11,1774
	3	-13,19175 ⁺	,50722	,000	-15,1991	-11,1844
	4	,07050	,08660	,977	-,2560	,3970
	5	,58200 ⁺	,09619	,003	,2162	,9478
	7	,00700	,03917	1,000	-,1269	,1409
7	1	-13,06125 ⁺	,48158	,000	-14,9660	-11,1565
	2	-12,87375 ⁺	,42733	,000	-14,5629	-11,1846
	3	-13,19875 ⁺	,50737	,000	-15,2059	-11,1916
	4	,06350	,08748	,987	-,2634	,3904
	5	,57500 ⁺	,09699	,003	,2090	,9410
	6	-,00700	,03917	1,000	-,1409	,1269

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A13- Sumário da Análise de Variâncias para o gene ERG11 ($\alpha=0,05$).**ANOVA**

ERG11b

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	603806,759	6	100634,460	69,929	,000
Nos grupos	70516,056	49	1439,103		
Total	674322,816	55			

Tabela A14- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene ERG11.

Variável de ERG11b						
Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	245,85000*	35,26059	,002	109,5508	382,1492
	3	123,37500	34,61223	,079	-13,2061	259,9561
	4	283,93750*	34,51158	,001	147,2818	420,5932
	5	281,51250*	34,49740	,001	144,8456	418,1794
	6	288,57500*	34,49188	,001	151,9037	425,2463
	7	287,93750*	34,52520	,001	151,2924	424,5826
2	1	-245,85000*	35,26059	,002	-382,1492	-109,5508
	3	-122,47500*	7,95965	,000	-151,7977	-93,1523
	4	38,08750*	7,50988	,012	8,9456	67,2294
	5	35,66250*	7,44447	,018	6,4945	64,8305
	6	42,72500*	7,41884	,007	13,5424	71,9076
	7	42,08750*	7,57223	,007	12,9564	71,2186
3	1	-123,37500	34,61223	,079	-259,9561	13,2061
	2	122,47500*	7,95965	,000	93,1523	151,7977
	4	160,56250*	3,33105	,000	148,5052	172,6198
	5	158,13750*	3,18083	,000	146,2363	170,0387
	6	165,20000*	3,12038	,000	153,3235	177,0765
	7	164,56250*	3,46933	,000	152,2693	176,8557
4	1	-283,93750*	34,51158	,001	-420,5932	-147,2818
	2	-38,08750*	7,50988	,012	-67,2294	-8,9456
	3	-160,56250*	3,33105	,000	-172,6198	-148,5052
	5	-2,42500	1,77763	,810	-8,5815	3,7315
	6	4,63750	1,66706	,163	-1,2601	10,5351
	7	4,00000	2,25356	,583	-3,7341	11,7341
5	1	-281,51250*	34,49740	,001	-418,1794	-144,8456
	2	-35,66250*	7,44447	,018	-64,8305	-6,4945
	3	-158,13750*	3,18083	,000	-170,0387	-146,2363
	4	2,42500	1,77763	,810	-3,7315	8,5815
	6	7,06250*	1,34197	,002	2,4498	11,6752
	7	6,42500	2,02492	,088	-,7172	13,5672
6	1	-288,57500*	34,49188	,001	-425,2463	-151,9037
	2	-42,72500*	7,41884	,007	-71,9076	-13,5424
	3	-165,20000*	3,12038	,000	-177,0765	-153,3235
	4	-4,63750	1,66706	,163	-10,5351	1,2601
	5	-7,06250*	1,34197	,002	-11,6752	-2,4498
	7	-,63750	1,92859	1,000	-7,6069	6,3319
7	1	-287,93750*	34,52520	,001	-424,5826	-151,2924
	2	-42,08750*	7,57223	,007	-71,2186	-12,9564
	3	-164,56250*	3,46933	,000	-176,8557	-152,2693
	4	-4,00000	2,25356	,583	-11,7341	3,7341
	5	-6,42500	2,02492	,088	-13,5672	-,7172
	6	-,63750	1,92859	1,000	-6,3319	7,6069

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A15- Sumário da Análise de Variâncias para o gene ERG25 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
ERG25					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	1965,542	6	327,590	261,795	,000
Nos grupos	61,315	49	1,251		
Total	2026,857	55			

Tabela A16- Pós- teste de Tukey entre grupos para o gene ERG25.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Tukey HSD						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	11,15250*	,55931	,000	9,4332	12,8718
	3	1,18750	,55931	,356	-,5318	2,9068
	4	12,45250*	,55931	,000	10,7332	14,1718
	5	14,51250*	,55931	,000	12,7932	16,2318
	6	14,51250*	,55931	,000	12,7932	16,2318
	7	14,51250*	,55931	,000	12,7932	16,2318
2	1	-11,15250*	,55931	,000	-12,8718	-9,4332
	3	-9,96500*	,55931	,000	-11,6843	-8,2457
	4	1,30000	,55931	,254	-,4193	3,0193
	5	3,36000*	,55931	,000	1,6407	5,0793
	6	3,36000*	,55931	,000	1,6407	5,0793
	7	3,36000*	,55931	,000	1,6407	5,0793
3	1	-1,18750	,55931	,356	-2,9068	,5318
	2	9,96500*	,55931	,000	8,2457	11,6843
	4	11,26500*	,55931	,000	9,5457	12,9843
	5	13,32500*	,55931	,000	11,6057	15,0443
	6	13,32500*	,55931	,000	11,6057	15,0443
	7	13,32500*	,55931	,000	11,6057	15,0443
4	1	-12,45250*	,55931	,000	-14,1718	-10,7332
	2	-1,30000	,55931	,254	-3,0193	,4193
	3	-11,26500*	,55931	,000	-12,9843	-9,5457
	5	2,06000*	,55931	,010	,3407	3,7793
	6	2,06000*	,55931	,010	,3407	3,7793
	7	2,06000*	,55931	,010	,3407	3,7793
5	1	-14,51250*	,55931	,000	-16,2318	-12,7932
	2	-3,36000*	,55931	,000	-5,0793	-1,6407
	3	-13,32500*	,55931	,000	-15,0443	-11,6057
	4	-2,06000*	,55931	,010	-3,7793	-,3407
	6	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193
	7	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193
6	1	-14,51250*	,55931	,000	-16,2318	-12,7932
	2	-3,36000*	,55931	,000	-5,0793	-1,6407
	3	-13,32500*	,55931	,000	-15,0443	-11,6057
	4	-2,06000*	,55931	,010	-3,7793	-,3407
	5	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193
	7	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193
7	1	-14,51250*	,55931	,000	-16,2318	-12,7932
	2	-3,36000*	,55931	,000	-5,0793	-1,6407
	3	-13,32500*	,55931	,000	-15,0443	-11,6057
	4	-2,06000*	,55931	,010	-3,7793	-,3407
	5	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193
	6	0,00000	,55931	1,000	-1,7193	1,7193

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A17- Sumário da Análise de Variâncias para o gene HWP1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA

HWP1

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	5305106,107	6	884184,351	147,898	,000
Nos grupos	292938,750	49	5978,342		
Total	5598044,857	55			

Tabela A18- Pós- teste de Tukey entre grupos para o gene HWP1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Tukey HSD						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	-2,37500	38,65987	1,000	-121,2168	116,4668
	3	199,12500*	38,65987	,000	-317,9668	-80,2832
	4	3,25000	38,65987	1,000	-115,5918	122,0918
	5	645,75000*	38,65987	,000	-764,5918	-526,9082
	6	679,50000*	38,65987	,000	-798,3418	-560,6582
	7	645,75000*	38,65987	,000	-764,5918	-526,9082
2	1	2,37500	38,65987	1,000	-116,4668	121,2168
	3	196,75000*	38,65987	,000	-315,5918	-77,9082
	4	5,62500	38,65987	1,000	-113,2168	124,4668
	5	643,37500*	38,65987	,000	-762,2168	-524,5332
	6	677,12500*	38,65987	,000	-795,9668	-558,2832
	7	643,37500*	38,65987	,000	-762,2168	-524,5332
3	1	199,12500*	38,65987	,000	80,2832	317,9668
	2	196,75000*	38,65987	,000	77,9082	315,5918
	4	202,37500*	38,65987	,000	83,5332	321,2168
	5	446,62500*	38,65987	,000	-565,4668	-327,7832
	6	480,37500*	38,65987	,000	-599,2168	-361,5332
	7	446,62500*	38,65987	,000	-565,4668	-327,7832
4	1	-3,25000	38,65987	1,000	-122,0918	115,5918
	2	-5,62500	38,65987	1,000	-124,4668	113,2168
	3	202,37500*	38,65987	,000	-321,2168	-83,5332
	5	649,00000*	38,65987	,000	-767,8418	-530,1582
	6	682,75000*	38,65987	,000	-801,5918	-563,9082
	7	649,00000*	38,65987	,000	-767,8418	-530,1582
5	1	645,75000*	38,65987	,000	526,9082	764,5918
	2	643,37500*	38,65987	,000	524,5332	762,2168
	3	446,62500*	38,65987	,000	327,7832	565,4668
	4	649,00000*	38,65987	,000	530,1582	767,8418
	6	-33,75000	38,65987	,975	-152,5918	85,0918
	7	0,00000	38,65987	1,000	-118,8418	118,8418
6	1	679,50000*	38,65987	,000	560,6582	798,3418
	2	677,12500*	38,65987	,000	558,2832	795,9668
	3	480,37500*	38,65987	,000	361,5332	599,2168
	4	682,75000*	38,65987	,000	563,9082	801,5918
	5	33,75000	38,65987	,975	-85,0918	152,5918
	7	33,75000	38,65987	,975	-85,0918	152,5918
7	1	645,75000*	38,65987	,000	526,9082	764,5918
	2	643,37500*	38,65987	,000	524,5332	762,2168
	3	446,62500*	38,65987	,000	327,7832	565,4668
	4	649,00000*	38,65987	,000	530,1582	767,8418
	5	0,00000	38,65987	1,000	-118,8418	118,8418
	6	-33,75000	38,65987	,975	-152,5918	85,0918

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A19- Sumário da Análise de Variâncias para o gene LIP3 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
LIP3					
	Soma dos Quadrado s	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	2540,201	6	423,367	55,731	,000
Nos grupos	372,234	49	7,597		
Total	2912,435	55			

Tabela A20- Pós- teste de Tukey entre grupos para o gene LIP3.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Tukey HSD						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	15,94250 [*]	1,37810	,000	11,7062	20,1788
	3	7,27375 [*]	1,37810	,000	3,0374	11,5101
	4	16,61625 [*]	1,37810	,000	12,3799	20,8526
	5	15,19375 [*]	1,37810	,000	10,9574	19,4301
	6	20,41250 [*]	1,37810	,000	16,1762	24,6488
	7	18,99375 [*]	1,37810	,000	14,7574	23,2301
2	1	-15,94250 [*]	1,37810	,000	-20,1788	-11,7062
	3	-8,66875 [*]	1,37810	,000	-12,9051	-4,4324
	4	,67375	1,37810	,999	-3,5626	4,9101
	5	-,74875	1,37810	,998	-4,9851	3,4876
	6	4,47000 [*]	1,37810	,032	,2337	8,7063
	7	3,05125	1,37810	,307	-1,1851	7,2876
3	1	-7,27375 [*]	1,37810	,000	-11,5101	-3,0374
	2	8,66875 [*]	1,37810	,000	4,4324	12,9051
	4	9,34250 [*]	1,37810	,000	5,1062	13,5788
	5	7,92000 [*]	1,37810	,000	3,6837	12,1563
	6	13,13875 [*]	1,37810	,000	8,9024	17,3751
	7	11,72000 [*]	1,37810	,000	7,4837	15,9563
4	1	-16,61625 [*]	1,37810	,000	-20,8526	-12,3799
	2	-,67375	1,37810	,999	-4,9101	3,5626
	3	-9,34250 [*]	1,37810	,000	-13,5788	-5,1062
	5	-1,42250	1,37810	,944	-5,6588	2,8138
	6	3,79625	1,37810	,106	-,4401	8,0326
	7	2,37750	1,37810	,603	-1,8588	6,6138
5	1	-15,19375 [*]	1,37810	,000	-19,4301	-10,9574
	2	,74875	1,37810	,998	-3,4876	4,9851
	3	-7,92000 [*]	1,37810	,000	-12,1563	-3,6837
	4	1,42250	1,37810	,944	-2,8138	5,6588
	6	5,21875 [*]	1,37810	,007	,9824	9,4551
	7	3,80000	1,37810	,106	-,4363	8,0363
6	1	-20,41250 [*]	1,37810	,000	-24,6488	-16,1762
	2	-4,47000 [*]	1,37810	,032	-8,7063	-,2337
	3	-13,13875 [*]	1,37810	,000	-17,3751	-8,9024
	4	-3,79625	1,37810	,106	-8,0326	-,4401
	5	-5,21875 [*]	1,37810	,007	-9,4551	-,9824
	7	-1,41875	1,37810	,945	-5,6551	2,8176
7	1	-18,99375 [*]	1,37810	,000	-23,2301	-14,7574
	2	-3,05125	1,37810	,307	-7,2876	1,1851
	3	-11,72000 [*]	1,37810	,000	-15,9563	-7,4837
	4	-2,37750	1,37810	,603	-6,6138	1,8588
	5	-3,80000	1,37810	,106	-8,0363	-,4363
	6	1,41875	1,37810	,945	-2,8176	5,6551

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A21- Sumário da Análise de Variâncias para o gene SAP1 ($\alpha=0,05$).

ANOVA					
SAP1					
	Soma dos Quadrado s	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	216,352	6	36,059	542,401	,000
Nos grupos	3,258	49	,066		
Total	219,609	55			

Tabela A22- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene SAP1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente:						
Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	1,07750*	,19738	,002	,3923	1,7627
	3	1,64375*	,16791	,000	1,0063	2,2812
	4	3,75875*	,16698	,000	3,1215	4,3960
	5	3,08375*	,16907	,000	2,4459	3,7216
	6	5,53625*	,16126	,000	4,8972	6,1753
	7	5,35288*	,19623	,000	4,6706	6,0352
2	1	-1,07750*	,19738	,002	-1,7627	-,3923
	3	,56625*	,12316	,014	,1130	1,0195
	4	2,68125*	,12189	,000	2,2292	3,1333
	5	2,00625*	,12474	,000	1,5513	2,4612
	6	4,45875*	,11393	,000	4,0074	4,9101
	7	4,27538*	,15963	,000	3,7303	4,8205
3	1	-1,64375*	,16791	,000	-2,2812	-1,0063
	2	-,56625*	,12316	,014	-1,0195	-,1130
	4	2,11500*	,06395	,000	1,8965	2,3335
	5	1,44000*	,06923	,000	1,2034	1,6766
	6	3,89250*	,04703	,000	3,7067	4,0783
	7	3,70913*	,12131	,000	3,2636	4,1547
4	1	-3,75875*	,16698	,000	-4,3960	-3,1215
	2	-2,68125*	,12189	,000	-3,1333	-2,2292
	3	-2,11500*	,06395	,000	-2,3335	-1,8965
	5	-,67500*	,06695	,000	-,9044	-,4456
	6	1,77750*	,04360	,000	1,6053	1,9497
	7	1,59413*	,12002	,000	1,1498	2,0384
5	1	-3,08375*	,16907	,000	-3,7216	-2,4459
	2	-2,00625*	,12474	,000	-2,4612	-1,5513
	3	-1,44000*	,06923	,000	-1,6766	-1,2034
	4	,67500*	,06695	,000	,4456	,9044
	6	2,45250*	,05104	,000	2,2508	2,6542
	7	2,26913*	,12292	,000	1,8217	2,7166
6	1	-5,53625*	,16126	,000	-6,1753	-4,8972
	2	-4,45875*	,11393	,000	-4,9101	-4,0074
	3	-3,89250*	,04703	,000	-4,0783	-3,7067
	4	-1,77750*	,04360	,000	-1,9497	-1,6053
	5	-2,45250*	,05104	,000	-2,6542	-2,2508
	7	-,18338	,11193	,668	-,6268	,2600
7	1	-5,35288*	,19623	,000	-6,0352	-4,6706
	2	-4,27538*	,15963	,000	-4,8205	-3,7303
	3	-3,70913*	,12131	,000	-4,1547	-3,2636
	4	-1,59413*	,12002	,000	-2,0384	-1,1498
	5	-2,26913*	,12292	,000	-2,7166	-1,8217
	6	,18338	,11193	,668	-,2600	,6268

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Tabela A23- Sumário da Análise de Variâncias para o gene SOD1 ($\alpha=0,05$).**ANOVA**

SOD1

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	283105,801	6	47184,300	136,025	,000
Nos grupos	16997,101	49	346,880		
Total	300102,902	55			

Tabela A24- Pós- teste de Games-Howell entre grupos para o gene SOD1.

Comparações múltiplas						
Variável dependente: Games-Howell						
(I) Grupos		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	2	173,80000*	16,96501	,000	108,9793	238,6207
	3	164,43750*	16,56542	,000	99,5373	229,3377
	4	212,52625*	16,41164	,000	147,5256	277,5269
	5	197,76250*	16,65621	,000	132,9024	262,6226
	6	217,03913*	16,41061	,000	152,0377	282,0405
	7	210,95000*	16,43518	,000	145,9675	275,9325
2	1	173,80000*	16,96501	,000	-238,6207	-108,9793
	3	-9,36250	4,92594	,518	-26,9601	8,2351
	4	38,72625*	4,38105	,000	21,5527	55,8998
	5	23,96250*	5,22313	,008	5,7412	42,1838
	6	43,23913*	4,37721	,000	26,0635	60,4147
	7	37,15000*	4,46844	,000	19,9996	54,3004
3	1	164,43750*	16,56542	,000	-229,3377	-99,5373
	2	9,36250	4,92594	,518	-8,2351	26,9601
	4	48,08875*	2,40730	,000	38,8765	57,3010
	5	33,32500*	3,72594	,000	20,5133	46,1367
	6	52,60163*	2,40030	,000	43,3895	61,8137
	7	46,51250*	2,56290	,000	37,1873	55,8377
4	1	212,52625*	16,41164	,000	-277,5269	-147,5256
	2	-38,72625*	4,38105	,000	-55,8998	-21,5527
	3	-48,08875*	2,40730	,000	-57,3010	-38,8765
	5	-14,76375*	2,96839	,013	-26,2546	-3,2729
	6	4,51288*	,83075	,001	1,6752	7,3506
	7	-1,57625	1,22359	,844	-5,9228	2,7703
5	1	197,76250*	16,65621	,000	-262,6226	-132,9024
	2	-23,96250*	5,22313	,008	-42,1838	-5,7412
	3	-33,32500*	3,72594	,000	-46,1367	-20,5133
	4	14,76375*	2,96839	,013	3,2729	26,2546
	6	19,27663*	2,96272	,003	7,7844	30,7688
	7	13,18750*	3,09592	,024	1,6608	24,7142
6	1	217,03913*	16,41061	,000	-282,0405	-152,0377
	2	-43,23913*	4,37721	,000	-60,4147	-26,0635
	3	-52,60163*	2,40030	,000	-61,8137	-43,3895
	4	-4,51288*	,83075	,001	-7,3506	-1,6752
	5	-19,27663*	2,96272	,003	-30,7688	-7,7844
	7	-6,08913*	1,20976	,005	-10,4104	-1,7679
7	1	210,95000*	16,43518	,000	-275,9325	-145,9675
	2	-37,15000*	4,46844	,000	-54,3004	-19,9996
	3	-46,51250*	2,56290	,000	-55,8377	-37,1873
	4	1,57625	1,22359	,844	-2,7703	5,9228
	5	-13,18750*	3,09592	,024	-24,7142	-1,6608
	6	6,08913*	1,20976	,005	1,7679	10,4104

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Teste Concentração Fungicida Mínima (CFM) após o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Tabela A25- Sumário da Análise de Variância empregada para comparar as médias de log (UFC/mL) dos diferentes grupos de tratamento e período de recuperação submetidos ao Teste de Mínima Concentração Inibitória.

Origem	Tipo III		Quadrado		Eta		Noncent. Parâmetro	Poder observado ^b
	Soma dos Quadrados	Gl	Médio	F	Sig.	parcial quadrado		
Modelo corrigido	300750,500 ^a	55	5468,191	6,562	,000	,763	360,933	1,000
Intercepto	1199562,000	1	1199562,000	1439,603	,000	,928	1439,603	1,000
Grupos	265120,000	27	9819,259	11,784	,000	,740	318,172	1,000
Tempo	11583,482	1	11583,482	13,901	,000	,110	13,901	,959
Grupos *								
Tempo	24047,018	27	890,630	1,069	,389	,205	28,859	,820
Erro	93325,000	112	833,259					
Total	1593637,500	168						
Total corrigido	394075,500	167						

Não autorizo a publicação desse trabalho até 22 de maio de 2021.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 22 de maio de 2019.

Cláudia Carolina Jordão