



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

**Influência de lipídeos e proteínas do secretoma de biofilmes de
Candida albicans em células displásicas e tumorais da cavidade
oral**

Araraquara, SP

2021

FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

**Influência de lipídeos e proteínas do secretoma de biofilmes de
Candida albicans em células displásicas e tumorais da cavidade
oral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de Biotecnologia, UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Aboud Barbugli

Araraquara, SP

2021

D483i Dett, Freddy Humberto Marin.
Influência de lipídeos e proteínas do secretoma de biofilmes de
Candida albicans em células displásicas e tumorais da cavidade oral /
Freddy Humberto Marin Dett. – Araraquara: [S.n.], 2021.
130 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Paula Aboud Barbugli.

1. Biofilmes. 2. *C. albicans*. 3. Proteínas. 4. Lipídeos. 5. Câncer. I. Barbugli, Paula Aboud, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência de lipídeos e proteínas do secretoma de biofilme de *Candida albicans* em células displásicas e tumorais da cavidade oral

AUTOR: FREDDY HUMBERTO MARIN DETT

ORIENTADORA: PAULA ABOUD BARBUGLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

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

Prof. Dr. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia / Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de julho de 2021

Dedicatória

Quiero dedicar este trabajo especialmente a mis padres, por todo su amor, apoyo y soporte sin el cual no pudiese haber tomado esta decisión y este camino. Por ser un ejemplo para mí y por inculcarme y enseñarme a ser mejor persona cada día.

A mis hermanos por siempre estar presentes, por siempre hacerme sentir parte también de sus vidas a pesar de la distancia.

A toda mi familia por siempre apoyarme y todo el cariño que me han dado.

A mi novia por todo su apoyo y por acompañarme en este viaje, sin el cual hubiese sido mil veces más difícil.

A mi abuelo por siempre apoyarme, por siempre desearme lo mejor y por ser un ejemplo de vida para mí.

A la memoria de mis abuelas Mamá Rosa y Mamá Elda, quienes estoy seguro me apoyan desde donde estén y por quienes siempre seguiré adelante intentando ser mejor profesional y persona.

Agradecimentos

A minha orientadora, Dra. Paula Aboud Barbugli, pela confiança, pela oportunidade de trabalho, pela paciência, dedicação e tempo concedidos.

A todos os meus amigos, pelo apoio nos momentos que mais precisei e por entender minhas decisões.

A todos meus novos amigos no Brasil, pela amizade e os momentos que ficaram gravados nas minhas lembranças.

À CAPES (processo PROEX:88887.335189/2019-00) e CNPq pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste trabalho.

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

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

Ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara, ao laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos, à Profa. Dra. Maria Célia Bertolini e ao doutorando Jonatas Erick Maimoni Campanella pela colaboração, ensinamentos e parceria.

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

Resumo

Biofilmes são comunidades de micro-organismos com função e estrutura organizadas em uma matriz extracelular própria. A patogenicidade de *Candida albicans* é influenciada por componentes de matriz como proteínas, lipídeos, diversos tipos de carboidratos e ácidos nucleicos. Estas macromoléculas secretadas na matriz extracelular de biofilmes de diversos patógenos têm despertado interesse no estudo dos processos tumorais, no entanto não há consenso sobre os mecanismos e vias de sinalização, sendo controversa esta relação. O projeto em questão aborda o isolamento de frações lipídicas e proteicas provenientes de biofilmes devidamente padronizados de *C. albicans* com 36 h de formação; assim como aborda a influência de cada uma destas frações no comportamento de células da cavidade oral, tendo como modelo células displásicas (DOK), células de carcinoma escamoso primário (SCC-25) e células metastáticas (Detroit 562). Os resultados obtidos demonstram que as frações de lipídeos e proteínas do secretoma de biofilme de *C. albicans* não apresentam efeito citotóxico. Os lipídeos promoveram aumento na proliferação celular. Mediante microscopia confocal, observou-se que os lipídeos provenientes dos biofilmes de *C. albicans* foram capazes de aumentar a formação intracelular de *Lipid Droplets* (LDs) nas células da cavidade oral. Esta interação também foi evidente mediante o efeito de mitigação da atividade anti-tumoral promovida pela camptotecina (CPT). Finalmente, mediante microscopia confocal foi possível observar o uptake de CPT e acúmulo nas vesículas de LDs. Em conclusão, foi observado uma interação dos lipídeos do secretoma de biofilme de *C. albicans* com as células displásicas e tumorais da cavidade oral, desencadeando a formação de LDs e resistência ao antitumoral CPT.

Palavras Chave: Biofilmes, *C. albicans*, proteínas, lipídeos, câncer.

Abstract

Biofilms are formed by different communities of microorganisms with a function and structure organized within their own extracellular matrix. The *Candida albicans* pathogenicity is determined by the presence of components of the extracellular matrix such as proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids. In the last's years, some evidences in tumoral process and their relationships with macromolecules of microorganisms' biofilms are on discussion. Although there is no consensus about the mechanisms or the pathways, so their interactions are under described. This study addresses the isolation of lipidic and protein fractions of standardized biofilms of *Candida albicans* within 36 h of formation; as well as, the influence of each fraction in the behavior of cells from the oral cavity. The cells used where dysplastic cells (DOK), primary Squamous Cell Carcinoma (SCC-25) and metastatic cells (Detroit 562). The results demonstrate that the lipidic and protein fractions do not have a cytotoxic effect over the cells studied. The lipids promoted an increase in the cell proliferation. Throughout the confocal microscopy, it was achieved that the lipids from *C. albicans* biofilm were able to develop the Lipid Droplets (LDs) formation in the oral cells. A loss of the anti-tumoral activity of the camptothecin (CPT) was observed when the cells were cultured with *C. albicans* lipids. Finally, on behave of the confocal microscopy we observed the uptake of CPT by the cells and its accumulation into the LDs. In conclusion, it was described an interaction between *C. albicans* biofilm secretome and dysplastic and neoplastic cells, as well as, an increase in intracellular LDs and anti-tumoral resistance to CPT.

Keywords: Biofilm, *C. albicans*, proteins, lipids, cancer

Lista de Figuras

Figura 1. Interações entre os micro-organismos e células tumorais.....	5
Figura 2. Etapas de formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	12
Figura 3. Composição do matrix extracelular (ECM) do biofilme de <i>C. albicans</i>	13
Figura 4. Crescimento de <i>C. albicans</i> em garrafa de 75 cm ²	22
Figura 5. Ensaio de Cristal Violeta.....	24
Figura 6. Aspecto do “Pellet de proteínas” na etapa final de obtenção da fração proteica.	26
Figura 7. Fase de lipídeos coletada após precipitação.....	31
Figura 8. Ensaio de Sulfo-fosfo-vanilina.....	32
Figura 9. Distribuição dos ensaios de MTT com proteínas do biofilme de 36 h de <i>C. albicans</i>	34
Figura 10. Distribuição dos ensaios de MTT com lipídeos do biofilme de 36 h de <i>C. albicans</i>	36
Figura 11. Distribuição dos ensaios de Alamar Blue com lipídeos provenientes do biofilme de 36 h de <i>C. albicans</i> ; desafio com CPT.	37
Figura 12. Curva de crescimento do biofilme de <i>C. albicans</i> (0/30 h).	40
Figura 13. Comparação dos dados de UFC*mL ⁻¹ obtidos por duas técnicas de contagem distintas.....	41
Figura 14. Comparações das médias obtidas no ensaio com Cristal Violeta.	42
Figura 15. Padrão de marcação com Syto9/PI por microscopia confocal em biofilme de <i>C.</i> <i>albicans</i> de 36 h.....	43
Figura 16. Imagem da microscopia confocal da marcação com FUN1 (atividade metabólica).	44
Figura 17. Marcação do biofilme de <i>C. albicans</i> de 36 h com Sypro Ruby.	45
Figura 18. Gel marcado com nitrato de prata após eletroforese em condições denaturantes.	47
Figura 19. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem THP-1 em presença de <i>pool</i> de proteínas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.....	61
Figura 20. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem DOK em presença de <i>pool</i> de proteínas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.....	62
Figura 21. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem SCC-25 em presença de <i>pool</i> de proteínas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.....	63

Figura 22. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem Detroit 562 em presença de <i>pool</i> de proteínas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	63
Figura 23. Imagens obtidas por microscopia confocal mediante marcação de lipídeos feita com Nile Red (NR).....	65
Figura 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das amostras de lipídeos obtidas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.....	68
Figura 25. Estruturas químicas dos lipídeos identificados na RMN.	69
Figura 26. Determinação das concentrações de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h em células DOK.....	70
Figura 27. Determinação das concentrações de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h em células SCC-25.	71
Figura 28. Determinação das concentrações de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h em células Detroit 562.....	72
Figura 29. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem THP-1 em presença de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	73
Figura 30. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem DOK em presença de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	74
Figura 31. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem SCC-25 em presença de <i>pool</i> de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	75
Figura 32. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem Detroit 562 em presença de <i>pool</i> lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i>	76
Figura 33. Microscopias das células DOK; SCC-25 e Detroit 562 expostas aos lipídeos extraídos do secretoma dos biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.....	78
Figura 34. Gráfico da porcentagem de crescimento da linhagem DOK em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> e camptotecina (CPT).....	80
Figura 35. Gráfico da porcentagem de crescimento celular da linhagem SCC-25 em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> e camptotecina (CPT).81	
Figura 36. Gráfico da porcentagem de crescimento celular da linhagem Detroit 562 em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> e camptotecina (CPT).	82
Figura 37. Microscopia de campo claro das células DOK expostas à camptotecina (CPT) em presença ou ausência de lipídeos de <i>C. albicans</i>	83

Figura 38. Microscopia de campo claro das células SCC-25 expostas à camptotecina (CPT) em presença ou ausência de lipídeos de <i>C. albicans</i>	83
Figura 39. Internalização da camptotecina (CPT) em células DOK em presença ou ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i>	84
Figura 40. Internalização da camptotecina (CPT) em células SCC-25 em presença ou ausência de lipídeos dos secretomas de biofilmes de <i>C. albicans</i>	85

Lista de Quadros

Quadro 1. Curva padrão das concentrações de proteínas em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	27
Quadro 2. Concentrações do gel de resolução para SDS-Page.	28
Quadro 3. Concentrações do gel de estocagem para SDS-Page.	28
Quadro 4. Concentrações de lipídeos do secretoma de <i>C. albicans</i> testados em células.....	35
Quadro 5. Quantificações do pool de proteínas (proteínas totais em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e quantificação de atividade enzimática do pool em função do tempo.....	46
Quadro 6. Estatística descritiva das quantificações e atividade enzimática do pool de proteínas extraídas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	46
Quadro 7. Proteínas identificadas mediante Espectrometria de Massas.	48
Quadro 8. Funções das proteínas identificadas no Quadro 7 via Candida Genome Database.	52
Quadro 9. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PPT3.....	57
Quadro 10. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PPV6.	57
Quadro 11. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PD97.	58
Quadro 12. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PJ10.....	58
Quadro 13. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PF42.....	59
Quadro 14. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PEU9.....	59
Quadro 15. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PQE6.....	60
Quadro 16. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PMC0.....	60
Quadro 17. Quantificações de lipídeos realizadas em 3 ocasiões distintas.....	66
Quadro 18. Estatística descritiva das quantificações de lipídeos	66

Lista de Abreviaturas

CPP.....	Câncer de Cabeça e Pescoço
OSCC.....	Oral Squamous Cell Carcinoma
VPH.....	Vírus de Papiloma Humano
ECM.....	Matriz Extracelular
PC.....	Fosfatidilcolina
PE.....	Fosfatidiletanolamina
PI.....	Fosfatidilinositol
PS.....	Fosfatidilserina
PG.....	Fosfatidilglicerol
PBS.....	Tampão Fosfato Salino (Phosphate-Buffered Saline)
HEPES.....	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônias
RPM.....	Rotações Por Minuto
YNB.....	Yeast Nitrogen Base
SDA.....	Sabouraud Dextrose Agar
FCZ.....	Fluconazol
HCl.....	Ácido Clorídrico
SDS-PAGE.....	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
BSA.....	Bovine Serum Albumin
Cód.	Código de Compra
APS.	Ammonium PerSulphate
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
MTT.....	Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio
CPT.....	Camptotecina
RFU.....	Medidas Relativas à Fluorescência
NR.....	Nile Red

RMN..... Resonância Magnética Nuclear

LD..... Lipid Droplets

Sumario

I. Introdução.....	1
1. Relevância clínica dos biofilmes microbianos.....	1
2. Etiopatologia do câncer de cabeça e pescoço (CPP).....	2
3. Micro-organismos e câncer: a controversa relação com a biologia tumoral.	3
4. A importância dos produtos do metabolismo microbiano.....	8
5. Biofilmes de <i>C. albicans</i>	11
6. Proteínas presentes no biofilme de <i>C. albicans</i>	13
7. Lipídeos presentes no biofilme de <i>C. albicans</i>	16
Considerações	18
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos.....	19
II. Materiais e Métodos	19
• Micro-organismos e linhagens celulares utilizadas.	19
○ <i>Candida albicans</i>	19
○ Linhagens celulares.....	19
• Formação e caracterização do biofilme de <i>C. albicans</i>.	21
○ Padronização do biofilme de <i>C. albicans</i>	21
○ Curva de crescimento do biofilme com Alamar Blue.....	22
○ Contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC*mL ⁻¹) por diluição e mediante cultivo por esgotamento.....	23
○ Quantificação de biomassa do biofilme com Cristal Violeta	23
○ Marcação com Syto 9 e Iodeto de Propídeo (PI)	24
○ Marcação com FUN1	24
• Extração e caracterização das proteínas do biofilme de <i>C. albicans</i>.....	25
○ Marcação de componentes proteicos do biofilme de <i>C. albicans</i> com Sypro Ruby ..	25
○ Extração da fração proteica da matriz extracelular do biofilme de <i>C. albicans</i>	25
○ Quantificação de proteínas totais por metodologia de Bradford	26
○ Determinação de atividade proteásica: <i>EnzChek Protease C assay</i>	27
○ Análise do perfil proteico por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	27
○ Identificação das proteínas obtidas por Espectroscopia de Massas	29
• Extração e caracterização dos lipídeos do biofilme de <i>C. albicans</i>.	30

○	Marcação de componentes lipídicos do biofilme de <i>C. albicans</i> com <i>Nile Red</i>	30
○	Extração da fração lipídica da matriz extracelular do biofilme de <i>C. albicans</i>	31
○	Quantificação dos lipídeos extraídos por Sulfo-fosfo-vanilina (SFV)	31
○	Identificação dos lipídeos extraídos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). ...	32
●	Ensaio celular in vitro	33
○	Exposição às proteínas extraídas do biofilme de <i>C. albicans</i>	33
▪	<i>Ensaio de viabilidade celular através da metodologia de Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT)</i>	33
○	Exposição aos lipídeos extraídos do biofilme de <i>C. albicans</i>	34
▪	<i>Determinação das concentrações de trabalho para os lipídeos de C. albicans</i>	34
▪	<i>Ensaio de viabilidade celular através da metodologia de Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT)</i>	35
▪	<i>Ensaio de metabolismo celular por Alamar Blue em presença de Camptotecina (CPT)</i>	37
▪	<i>Formação de Lipid Droplets através da marcação com Nile Red</i>	38
▪	<i>Internalização (uptake) de CPT e ensaios de co-localização com Nile Red</i>	38
●	Análise estatística	39
III.	Resultados	39
●	Padronização do desenvolvimento do biofilme de <i>C. albicans</i> de 36 h.	39
○	Estabelecimento de curva de crescimento e determinação do tempo de formação do biofilme.	39
○	Padronização dos valores de contagens dos biofilmes de <i>C. albicans</i>	40
●	Marcação de moléculas de interesse nos biofilmes de <i>C. albicans</i>: PROTEÍNAS.	44
○	Determinação da presença de proteínas no biofilme de <i>C. albicans</i> mediante a marcação com <i>Sypro Ruby</i>	44
●	Quantificação, identificação e atividade das proteínas extraídas do secretoma dos biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	45
○	Identificação das proteínas isoladas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i>	47
○	Ensaio, in vitro, de viabilidade celular em presença de <i>pool</i> das proteínas do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> , mediante o ensaio de MTT.	61
●	Marcação de moléculas de interesse nos biofilmes de <i>C. albicans</i>: LIPÍDEOS	64
○	Determinação da presença de lipídeos mediante a marcação com <i>Nile Red</i> nos biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	64

•	Quantificação, identificação e atividade dos lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	66
○	Identificação dos lipídeos isolados do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> .	66
○	Determinação das concentrações dos lipídeos de <i>C. albicans</i> para testagem em cultura in vitro	69
○	Ensaio in vitro de viabilidade celular em presença dos lipídeos do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h, mediante o ensaio de MTT	72
○	Formação de <i>Lipid Droplets</i> em células neoplásicas após contato com lipídeos provenientes do secretoma de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 36 h.	76
○	Ensaio de metabolismo/crescimento celular por Alamar Blue em presença de Camptotecina (CPT)	79
○	Internalização de camptotecina (CPT) e ensaios de co-localização com <i>Nile Red</i>	82
IV.	Discussão	86
V.	Conclusões	95
VI.	Referências Bibliográficas	96

I. Introdução

1. Relevância clínica dos biofilmes microbianos

Biofilmes são comunidades de micro-organismos com função e estrutura organizadas em uma matriz extracelular própria (SARDI; SCORZONI; BERNARDI; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013). Estudos demonstram que durante processos infecciosos os micro-organismos praticamente não existem em sua forma planctônica, mas formando agregados multicelulares nos tecidos do hospedeiro (SOLL, 2008).

A maioria dos processos infecciosos está relacionada à presença de biofilmes polimicrobianos, formados, por exemplo, por micro-organismos da microbiota comensal juntamente com patógenos oportunistas. Este tipo de biofilme é de difícil diagnóstico, podendo funcionar como um reservatório infeccioso de difícil tratamento. Tais biofilmes polimicrobianos são formados por uma ampla variedade de espécies, incluindo bactérias e fungos, podendo ser encontrados em infecções sistêmicas, co-existindo, por exemplo, biofilmes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* em processos infecciosos no trato respiratório e urinário (CHILDERS; VAN LAAR; YOU; CLEGG *et al.*, 2013) ou *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, presentes em vários processos infecciosos em cateteres, pele, olhos e trato respiratório (HOFFMAN; DÉZIEL; D'ARGENIO; LÉPINE *et al.*, 2006). *Candida albicans*, normalmente encontra-se em biofilmes polimicrobianos com bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* espécies e *Staphylococcus aureus*. (HARRIOTT; NOVERR, 2011; KLOTZ; GAUR; DE ARMOND; SHEPPARD *et al.*, 2007).

Espécies de *Candida* são patógenos oportunistas, pertencentes à microbiota de indivíduos saudáveis, prevalentes nas mucosas do trato gastrointestinal, esôfago, boca e vagina, podendo colonizar diferentes sítios anatômicos (KIM; SUDBERY, 2011; LIM; ROSLI; SEOW; CHONG, 2012; VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009). *C. albicans* é a espécie predominante em infecções fúngicas invasivas (LAI; WANG; LIU; HUANG *et al.*, 2012). Pacientes com infecções fúngicas sistêmicas, *C. albicans* prevalece nos isolados clínicos (58%), sendo os pulmões o sítio de colonização preferencial (XIE; FANG; FANG; WU *et al.*, 2008). Em portadores de fibrose cística, a relação de *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* tem grande impacto na evolução clínica destes pacientes (HAIKO; SAEEDI; BAGGER; KARPATI *et al.*, 2019). Nestes indivíduos tem sido reportada a presença de *C. albicans* em até 75% dos casos, (GILELES-HILLEL; SHOSEYOV; POLACHECK; KOREM *et al.*, 2015). Uma das hipóteses

tem por base que *C. albicans* e *P. aeruginosa* formam um biofilme misto com grande capacidade de adesão. Além disto, estes micro-organismos competem entre si e o portador de fibrose cística termina sendo inundado por grande quantidade de moléculas secretadas por *C. albicans* e *P. aeruginosa* piorando o prognóstico dessas infecções (FOURIE; ELLS; SWART; SEBOLAI *et al.*, 2016; GRAINHA; JORGE; ALVES; LOPES *et al.*, 2020; HAIKO; SAEEDI; BAGGER; KARPATI *et al.*, 2019).

Na cavidade oral, *C. albicans* é um micro-organismo comensal sempre presente, capaz de se “relacionar” e se “comunicar” com outros micro-organismos mediante a secreção de moléculas *quorum sensing*. O *quorum sensing* é mediado por moléculas de baixa massa molecular, as quais modulam o comportamento e crescimento dos micro-organismos no biofilme. Este descobrimento foi fundamental no entendimento deste microambiente, pois permitiu estabelecer que os micro-organismos não só cresciam em comunidade, mas também se comunicavam e modulavam seu crescimento e a expressão gênica de fatores de virulência mediante moléculas *quorum sensing*. (WILSON, 2001).

O estudo de Ribeiro, Pavarina, Dovigo e Machado *et al.* (2012) demonstra a presença de *Candida* spp. em 65,5% das próteses dentárias, sendo 64,4% identificadas como *C. albicans*. A presença de *C. albicans* em próteses na cavidade oral é importante fonte de contaminação e disseminação deste fungo no hospedeiro, estando relacionada a uma maior mortalidade e morbidade, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, podendo evoluir para quadros de candidemia em pacientes mais debilitados (CHANG; TSAI; HUANG; SHIH, 2003). Quadros clínicos de candidemia estão presentes em quase 22% das infecções reportadas em pacientes hospitalizados (PAPPAS; LIONAKIS; ARENDRUP; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2018).

2. Etiopatologia do câncer de cabeça e pescoço (CPP)

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) reúne vários tipos de câncer em diversos sítios anatômicos nestas regiões. Dentre os CPP, os carcinomas de células escamosas desenvolvem-se nas mucosas de quatro sítios anatômicos preferenciais: cavidade oral; cavidade sinonasal; faringe e laringe. Anualmente registram-se cerca de 890.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço e 450.000 mortes; o que representa o sétimo câncer mais prevalente no mundo (CHOW, 2020). Entre estes, 500.000 casos novos anualmente correspondem à carcinomas de células escamosas (OSCC) de cabeça e pescoço, sendo este

tipo histológico o mais prevalente (MARUR; FORASTIERE, 2016; TORRE; BRAY; SIEGEL; FERLAY *et al.*, 2015). No Brasil, o câncer de cavidade oral é o mais prevalente em CCP. Este tipo de câncer apresenta uma incidência de 11,18 por 100.000 habitantes em homens, sendo o quinto mais prevalente nesta população, e 3,43 por 100.000 habitantes em mulheres (INCA, 2021a; b; c).

A etiopatologia do CCP relaciona-se com tabagismo e etilismo; no entanto vários estudos têm reportado a presença de alguns vírus como fatores de risco (MARUR; FORASTIERE, 2008; 2016; TORRE; BRAY; SIEGEL; FERLAY *et al.*, 2015). Nesta categoria, destacam-se o Epstein-Barr vírus e o vírus do papiloma humano (VPH). O Epstein-Barr vírus está relacionado com o desenvolvimento de carcinoma nasofaríngeo (MARUR; FORASTIERE, 2008). O VPH é reconhecido como um fator de risco importante em CPP; os estudos demonstram que VPH está presente em 25% dos cânceres de cabeça e pescoço (MARUR; FORASTIERE, 2008; 2016). Para um correto tratamento; o CPP é dividido em VPH positivo ou negativo. Esta diferenciação é importante pelas características específicas de cada um dos fenótipos. O CPP está intimamente relacionado com mutações no gene *TP53*; o qual está alterado em 84% dos casos VPH negativos, mas só em um 3% dos VPH positivos (MARUR; FORASTIERE, 2016). Diferenças fenotípicas e genotípicas, ainda pouco estudadas, somadas à localização dos carcinomas, dificultam os tratamentos e a detecção precoce, sendo pior o prognóstico quanto mais tardio o diagnóstico.

3. Micro-organismos e câncer: a controversa relação com a biologia tumoral.

A relação entre micro-organismos e desenvolvimento tumoral tem ganhado relevância nos últimos anos. Vários autores (DZUTSEV; BADGER; PEREZ-CHANONA; ROY *et al.*, 2017; GARRETT, 2015; RAMÍREZ-LABRADA; ISLA; ARTAL; ARIAS *et al.*, 2020; WONG-ROLLE; WEI; ZHAO; JIN, 2020) classificam os mecanismos de ação em 3 grupos principais: A facilitação direta da carcinogênese via aumento da mutagênese, a regulação de oncogenes ou rotas metabólicas oncogênicas e a regulação ou aumento da progressão do tumor mediante modulação do sistema imune (Figura 1). A facilitação da mutagênese é baseada na produção de componentes pelos micro-organismos que resultam em dano do DNA ou atraso do ciclo celular (GARRETT, 2015). As rotas metabólicas, que culminam em ativação de oncogenes, estão muito relacionadas com a apoptose e com a inflamação; os micro-organismos normalmente usam estas rotas para uma colonização efetiva (KOSTIC; CHUN; ROBERTSON; GLICKMAN *et al.*, 2013; RUBINSTEIN; WANG; LIU; HAO *et al.*, 2013). A microbiota é muito importante

para manter um sistema imune competente, que atue frente aos diferentes cenários de infecção ou desenvolvimento de células tumorais. Muitos estudos demonstram que a disbiose (desequilíbrio da microbiota local), promove uma resposta inflamatória crônica que pode promover o crescimento e desenvolvimento de tumores (GARRETT, 2015; KOSTIC; CHUN; ROBERTSON; GLICKMAN *et al.*, 2013; WONG-ROLLE; WEI; ZHAO; JIN, 2020). A correlação entre micro-organismos e câncer é descrita em vários sítios anatômicos, como por exemplo, a presença do *Mycobacterium tuberculosis* e o câncer de pulmão (KUO; HU; LIU; LEE *et al.*, 2013), *Chlamydia trachomatis* e o câncer de cérvix (ARNHEIM DAHLSTRÖM; ANDERSSON; LUOSTARINEN; THORESEN *et al.*, 2011; SHANMUGHAPRIYA; SENTHILKUMAR; VINODHINI; DAS *et al.*, 2012), *Chlamydia pneumonia* e o câncer de pulmão (CHATURVEDI; GAYDOS; AGREDA; HOLDEN *et al.*, 2010; ZHAN; SUO; QIAN; SHEN *et al.*, 2011), *Salmonella enterica* e o câncer de vesícula biliar (SCANU; SPAAPEN; BAKKER; PRATAP *et al.*, 2015), sendo alguns mecanismos desencadeados pela alteração da expressão de proteínas reguladoras dos processos de morte e proliferação celular, assim como metilação em histonas.

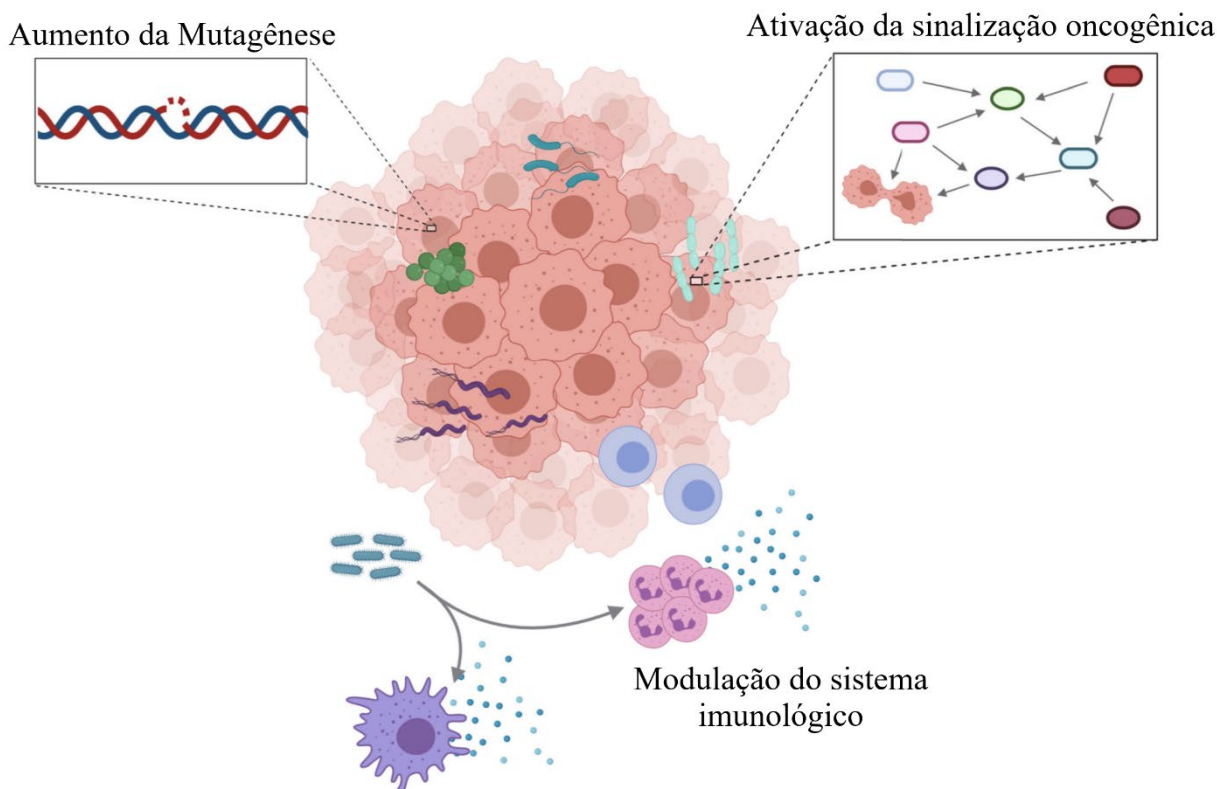


Figura 1. Interações entre os micro-organismos e células tumorais. A interação de micro-organismos com o câncer é ainda controversa. Há 3 mecanismos propostos de interação: o aumento da mutagênese (superior esquerdo), a ativação da sinalização oncogênica (superior direito) e a modulação do sistema imunológico (inferior direito). **Fonte:** Adaptado de WONG-ROLLE; WEI; ZHAO e JIN (2020).

A primeira descrição desta correlação se deve à bactéria *Helicobacter pylori* e sua influência no desenvolvimento do câncer de estômago (WOTHERSPOON; ORTIZ-HIDALGO; FALZON; ISAACSON, 1991). Nos estudos do grupo de Wotherspoon; Ortiz-Hidalgo; Falzon e Isaacson (1991) estabeleceram-se as primeiras relações de *H. pylori* com o desenvolvimento de linfoma associado à mucosa (MALT), relacionados intrinsecamente com a presença da bactéria e suas toxinas. No estudo de Watanabe; Tada; Nagai; Sasaki *et al.* (1998) demonstrou-se em modelo animal a relação de *H. pylori* com o desenvolvimento de carcinoma de estômago. Neste trabalho, as zonas infectadas com *H. pylori* desenvolveram tumores na mucosa gástrica com aspectos histológicos de invasão submucosa. *H. pylori* desencadeia o desenvolvimento tumoral na mucosa gástrica, através da expressão da oncoproteína *CagA*, que ajuda no processo de colonização da bactéria, mas também restringe a capacidade apoptótica das células gástricas (ALFAROUEK; BASHIR; ALJARBOU; RAMADAN *et al.*, 2019; HATAKEYAMA; HIGASHI, 2005).

Fusobacterium nucleatum é outra bactéria frequentemente encontrada em pacientes com câncer no sistema digestivo (KOSTIC; CHUN; ROBERTSON; GLICKMAN *et al.*, 2013). O estudo de Rubinstein; Wang; Liu; Hao *et al.* (2013) demonstra uma relação direta entre a infecção por *F. nucleatum* e o câncer colorretal. FadA é uma adesina secretada por *F. nucleatum*, a qual interage com a E-caderina vascular endotelial quando *F. nucleatum* infecta as células endoteliais. Nas células epiteliais, FadA se une à E-caderina provocando um aumento da proliferação celular. Este aumento da proliferação celular é mediado pela internalização de E-caderina e uma diminuição na fosforilação de β -catenina, que regulam a expressão de fatores de transcrição de oncogenes como *c-Myc* e ciclina *D1* (RUBINSTEIN; WANG; LIU; HAO *et al.*, 2013). Os estudos de Rubinstein; Wang; Liu; Hao *et al.* (2013) e de Kostic; Chun; Robertson; Glickman *et al.* (2013) demonstram que em pacientes com adenocarcinomas gastrointestinais há uma maior presença de *F. nucleatum* em comparação aos indivíduos saudáveis, sendo a presença de *F. nucleatum* considerada um fator de risco para o desenvolvimento ou progressão deste tipo de câncer.

Na literatura *F. nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* são citadas como bactérias que cooperam sinergicamente, sendo prevalentes em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e no trato gastrointestinal. *P. gingivalis*, modula duas rotas antiapoptóticas; PI3k/Akt e JAK/Stat (MAO; PARK; HASEGAWA; TRIBBLE *et al.*, 2007; NAKHJIRI; PARK; YILMAZ; CHUNG *et al.*, 2001; YILMAZ; JUNGAS; VERBEKE; OJCIUS, 2004). No trabalho de Yilmaz; Yao; Maeda; Rose *et al.* (2008) a quinase difosfato nucleosídeo (NDK de *Nucleoside diphosphate kinase*) secretada por *P. gingivalis* consome o ATP presente na célula tornando menos eficaz a dinâmica dos processos apoptóticos (YILMAZ; JUNGAS; VERBEKE; OJCIUS, 2004; YILMAZ; YAO; MAEDA; ROSE *et al.*, 2008). *P. gingivalis* também induz a ativação de metaloproteases de matriz (MMP de *Matrix Metalloproteinases*) (INABA; SUGITA; KUBONIWA; IWAI *et al.*, 2014; WHITMORE; LAMONT, 2014). As MMP têm um papel fundamental na degradação da matriz extracelular, promovendo a migração de células e a invasão em outros tecidos, processo conhecido como metástases tumorais (FRIEDL; WOLF, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001). No estudo realizado por Inaba; Sugita; Kuboniwa; Iwai *et al.* (2014) foi demonstrado que as gingipainas, que são invasinas secretadas por *P. gingivalis*, ativam MMP9 facilitando o processo de invasão das células de carcinoma oral (OSCC de *Oral Squamous Cell Carcinoma*).

A relação entre fungos e o desenvolvimento tumoral ainda é pouco descrita. Recentemente foi descrita a relação do fungo *Malassezia* spp., especificamente as espécies *M. restricta* e *M. globosa* com processos tumorais. *Malassezia* spp. é encontrada especialmente na pele, e está relacionada com doenças cutâneas, porém novos estudos têm encontrado *Malassezia* spp. no trato gastrointestinal. O grupo de Aykut; Pushalkar; Chen; Li *et al.* (2019) descreveram que *Malassezia* spp. é mais prevalente em tecidos tumorais em comparação aos tecidos saudáveis do trato gastrointestinal e pâncreas. Nos trabalhos de Limon; Tang; Li; Wolf *et al.* (2019) e Wolf; Limon; Nguyen; Prince *et al.* (2021) demonstrou-se que *Malassezia* spp. está presente em pacientes com doença de Crohn e outras doenças inflamatórias gástricas como colites. No caso da doença de Crohn, *Malassezia* spp. pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer ou inflamação severa. O estudo de Limon; Tang; Li; Wolf *et al.* (2019) constata uma maior presença de *Malassezia* spp. em pacientes com doença de Crohn com o polimorfismo no gene *CARD9*. Estudos mais recentes do mesmo grupo, Limon; Tang; Li; Wolf *et al.* (2019) e Wolf; Limon; Nguyen; Prince *et al.* (2021) concluem que a presença de *Malassezia* spp. provoca uma inflamação mais severa devido à deficiência causada pelo polimorfismo no gene *CARD9*. Esta deficiência provoca falhas na resposta imune inata, causando maior dano celular e uma inflamação severa. Por fim, esta inflamação e a presença de *Malassezia* spp., provocam uma disbiose e favorecem a colonização de outros micro-organismos.

Sabe-se que, *C. albicans* destaca-se pela alta prevalência em pacientes oncológicos, o que se deve à somatória de fatores relacionados como a presença de comorbidades, o tratamento quimioterápico e a imunossupressão (NØRGAARD; THOMSEN; FARKAS; MOGENSEN *et al.*, 2013). A literatura reporta que até 35% das candidemias foram encontradas em pacientes com tumores malignos ou com tumores sólidos. Estas infecções pioram o prognóstico dos pacientes, pois estão relacionadas ao aumento da mortalidade, à hospitalização prolongada e ao maior custo dos tratamentos (RAMIREZ-GARCIA; REMENTERIA; AGUIRRE-URIZAR; MORAGUES *et al.*, 2016). Alguns grupos de pesquisa (RAMIREZ-GARCIA; GALLOT; ABAD; MENDOZA *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-CUESTA; HERNANDO; MENDOZA; GALLOT *et al.*, 2010) apresentam evidências de que *C. albicans* poderia estimular o aparecimento e desenvolvimento de tumores. Estes trabalhos descrevem duas rotas principais pelas quais *C. albicans* contribuiria para o desenvolvimento tumoral: a produção de acetaldeídos e a indução do processo inflamatório crônico. Espécies de *Candida* como, *albicans*, *dubliniensis*, *tropicalis*, *pintolopesii*, e *glabrata*, assim como *Saccharomyces*

cerevisae, têm sido isoladas de candidíases crônica hiperplásticas, apresentando um nível de transformação displásica severa (MCCULLOUGH; JABER; BARRETT; BAIN *et al.*, 2002). No estudo de Perera; Al-Hebshi; Perera; Ipe *et al.* (2017), *C. albicans*, *C. etchellsii*, e um fungo semelhante a *Hannaella luteola* foram espécies presentes em maior quantidade em lesões de OSCC. A literatura também reporta uma associação direta entre OSCC e um microbioma dominado por *C. albicans*, assim como a prevalência de espécies de *Candida* em saliva antes e depois do tratamento oncológico. *C. albicans* foi o fungo mais prevalente antes e depois do tratamento de OSCC (TAMGADGE; TAMGADGE; PILLAI; CHANDE *et al.*, 2017).

4. A importância dos produtos do metabolismo microbiano

As bactérias e os fungos secretam vários tipos de toxinas e outros produtos do metabolismo durante o processo infeccioso e a colonização nos tecidos do hospedeiro. A bactéria *Pasteurella multocida* é responsável por doenças respiratórias em humanos e seu mecanismo de infecção depende da secreção da toxina de *Pasteurella Multocida* (PTM por *Pasteurella multocida toxin*) (LAX; GRIGORIADIS, 2001; ORTH; LANG; TANIGUCHI; AKTORIES, 2005; PREUß; HILDEBRAND; ORTH; AKTORIES *et al.*, 2010). A PTM é um mitógeno que promove o crescimento e a proliferação celular mediante a mobilização de cálcio e ativação da cascata de fosfolipase C diretamente; e indiretamente via MAP quinases (LAX; GRIGORIADIS, 2001). No estudo de Orth; Lang; Taniguchi e Aktories (2005) demonstrou-se que a PTM tem como alvo as proteínas $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$; através de união específica nas subunidades α destas proteínas. As proteínas $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$ ativam a rota de sinalização mediada por RhoA, que induz a reorganização da actina e a formação de fibras de estresse no citoesqueleto da célula do hospedeiro, provocando o crescimento descontrolado das mesmas (ORTH; LANG; TANIGUCHI; AKTORIES, 2005). Neste mesmo contexto, o estudo de Preuß; Hildebrand; Orth; Aktories *et al.* (2010) demonstrou a ativação da via de JAK-STAT, tendo como alvo o oncogene *Pim-1*. As proteínas Pim estão envolvidas em várias funções celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose e carcinogênese (BACHMANN; MÖRÖY, 2005; WANG; BHATTACHARYA; WEAVER; PETERSEN *et al.*, 2001).

Por outro lado, a literatura descreve diversas toxinas com ação anti-tumoral. De forma geral, pode-se citar a toxina botulínica, a toxina pertussi, a toxina colérica e a verotoxina (ALLAM; BERTRAND; ZHANG-SUN; PAPPAS *et al.*, 1997; FRANKEL; POWELL;

LILLY; MODIFIERS, 2002; GARIÉPY, 2001; JOHANSSON; BERGSTRÖM; HENRIKSSON; GRANKVIST *et al.*, 2006). No estudo de Johansson; Johansson e Behnam-Motlagh (2008) células de mesotelioma pulmonar foram sensibilizadas à ação de cisplatina mediante exposição com α -toxina de *S. aureus*. Este tipo de terapias denomina-se terapia do câncer mediada por bactérias (BCT de *bacteria-mediated cancer therapy*). Neste trabalho, observou-se que as células de mesotelioma resistentes à ação da cisplatina passaram a responder ao fármaco após a sensibilização com a α -toxina de *S. aureus*. Outras toxinas são reportadas como moléculas anti-tumorais de ação seletiva, entre elas: a enterotoxina de *Clostridium perfringens*, o pilus de hemaglutinação sensível a manose de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA de *mannose-sensitive hemagglutination pilus de Pseudomonas aeruginosa*), a toxina diftérica secretada pelo *Corynebacterium diphtheriae* e a leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CHANG; MARSZLOWICZ; WALDMAN; LI *et al.*, 2009; DUVIC; KUZEL; OLSEN; MARTIN *et al.*, 2002; KACHLANY, 2010; MICHL; BUCHHOLZ; ROLKE; KUNSCH *et al.*, 2001; XU; LIU; HOU; HONG *et al.*, 2014).

A patofisiologia de *C. albicans* está intimamente relacionada com a produção de fatores de virulência por esta espécie de fungo, o que torna relevante o estudo dos produtos de seu metabolismo. A patogenicidade de *C. albicans* é influenciada por diversos fatores de virulência relacionados à capacidade de adesão nos tecidos do hospedeiro, à secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas) e à capacidade de formação de biofilme (SARDI; SCORZONI; BERNARDI; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013). A adesão aos tecidos do hospedeiro é mediada por adesinas presentes na superfície do fungo, que reconhecem e se ligam ao fibrinogênio, fibrina e outras proteínas de superfície celular, assim como aminoácidos e carboidratos (CULLEN; SPRAGUE, 2012; LI; YAN; XU, 2003).

Enzimas hidrolíticas extracelulares são fatores de virulência que também desempenham um papel importante na capacidade de adesão, além de promoverem a destruição dos tecidos do hospedeiro. Diversos estudos demonstram uma relação direta entre enzimas hidrolíticas e o aumento da patogenicidade e severidade de infecções por *C. albicans* (BRAMONO; YAMAZAKI; TSUBOI; OGAWA, 2006; INGHAM; BOONSTRA; LEVELS; DE LANGE *et al.*, 2012). Proteases e fosfolipases são algumas das enzimas hidrolíticas secretadas pelos biofilmes de *C. albicans* (ZAGO; SILVA; SANITÁ; BARBUGLI *et al.*, 2015). “*Secreted Aspartic Proteinase*” (Sap) são proteases de massa molecular entre 35 e 50 kDa, decodificadas por 10 genes *SAP*. No hospedeiro, estas enzimas desempenham importante papel no dano celular e na resposta imune (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Com relação às

fosfolipases, 6 genes já foram identificados e estas enzimas atuam de forma direta na destruição dos tecidos do hospedeiro (SAMARANAYAKE; DASSANAYAKE; CHEUNG; JAYATILAKE *et al.*, 2006).

Algumas cepas de *C. albicans* são capazes secretar um “peptídeo-toxina”, denominada candidalisina. A candidalisina é um peptídeo resultante da proteólise da ECE1p por ação das proteases Kex2p/Kex1p (MOYES; WILSON; RICHARDSON; MOGAVERO *et al.*, 2016). A atividade tóxica da candidalisina depende do resíduo K (Lisina) no C-terminal. A candidalisina é um peptídeo em forma de α -hélice com carga positiva. Esta carga positiva assim como a lisina no C-terminal direciona este peptídeo para a célula do hospedeiro (MOYES; WILSON; RICHARDSON; MOGAVERO *et al.*, 2016). A candidalisina intercala, permeabiliza e aumenta o influxo de cálcio na membrana da célula do hospedeiro; é produzida pelas hifas durante o processo infeccioso no hospedeiro, provocando ativação do fator de transcrição AP-1 (Activating Protein-1), c-Fos (através da via p38-MAPK) e da fosfatase MKP1 (através da via ERK1/2-MAPK). (MOYES; WILSON; RICHARDSON; MOGAVERO *et al.*, 2016).

Em um trabalho prévio do grupo, foram realizados ensaios de exposição à fração solúvel (secretoma) de biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* em células da cavidade oral (AMAYA ARBELÁEZ; DE PAULA E SILVA; NAVEGANTE; VALENTE *et al.*, 2021). Foram testadas as frações solúveis (FS) de biofilmes de 16 e 36 horas, e a exposição foi realizada por 4 e 24 horas. Nas células de queratinócito normal oral (NOK-si) foi observado uma queda na viabilidade celular após a exposição aos FS, tanto em 4, como em 24 horas. Neste trabalho também foi demonstrado que o secretoma de biofilmes de *C. albicans* modificava a expressão de oncogenes de células tumorais de cabeça e pescoço (AMAYA ARBELÁEZ; DE PAULA E SILVA; NAVEGANTE; VALENTE *et al.*, 2021). A fração solúvel de biofilmes de *C. albicans* de 16-h estimulou a superexpressão dos genes *Bcl-2* e Fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3KCA* de *Phosphatidylinositol 3-kinase*) em células SCC-25, sendo estes genes relacionados com o crescimento celular, evasão da apoptose e invasão tumoral (AMAYA ARBELÁEZ; DE PAULA E SILVA; NAVEGANTE; VALENTE *et al.*, 2021). Em células metastáticas, Detroit 562, o secretoma atuou como mitógeno; estimulando a superexpressão dos genes *mTOR*, *hRAS* e *BRAF*; os quais fazem parte das vias das MAP quinases, responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular; assim como induziu a superexpressão de genes reguladores do ciclo celular, *Bcl-2* e *CDKN1A* (AMAYA ARBELÁEZ; DE PAULA E SILVA; NAVEGANTE; VALENTE *et al.*, 2021). Já o

secretoma dos biofilmes de 36-h provocou uma diminuição da expressão do gene *CDKN1B* nas células SCC-25. O gene *CDKN1B* codifica a proteína p27; que é conhecida como um supressor de tumor. A redução na expressão de *CDKN1B* tem sido relatada em displasias e lesões de OSCC com mau prognóstico (CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Muitos destes genes afetados pelo secretoma de biofilmes de *C. albicans* são conhecidos como “*drive mutations genes*”; devido à sua vantagem seletiva, as mutações “*drive*” se acumulam a taxas significativamente mais altas do que as “*passenger mutations*” que são neutras e não desempenham um papel importante no crescimento do tumor (BÁNYAI; TREXLER; KERÉKES; CSUKA *et al.*, 2021).

5. Biofilmes de *C. albicans*

A habilidade de *C. albicans* em formar biofilmes é um dos principais fatores de virulência deste fungo, além de ser um fungo dimórfico e com resistência acentuada aos agentes antimicrobianos. O processo de formação do biofilme de *C. albicans* ocorre em diversas etapas como exposto na figura 2. Primeiramente ocorre a adesão das células fúngicas na superfície (biótica ou abiótica). Este passo é mediado por dois importantes grupos de genes: os genes *ALS* (*ALS1* e *ALS3*) e o gene *HWP1*. Do grupo de genes *ALS* os mais importantes são *ALS3* e *ALS1* os quais permitem as primeiras interações com a superfície de adesão (SOLL, 2008). Este processo não é a única forma de adesão, sendo, as interações eletrostáticas ou a interação por hidrofobicidade com a superfície de contato também existentes (SOLL, 2008). As primeiras células aderentes formam uma camada de células sobre as quais o biofilme irá se desenvolver. Começa a formação e crescimento de pseudohifas, conhecida como a etapa de iniciação do biofilme (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). As formações de pseudohifas e hifas são essenciais para a maturação do biofilme de *C. albicans*. Nesta etapa ocorre a formação da ECM (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). Finalmente, após a maturação do biofilme, células fúngicas são dispersas como uma forma de “expansão” e “colonização” em outros lugares. Esta fase de dispersão tem grande relevância clínica já que as células liberadas podem colonizar outros sítios anatômicos dando lugar a novos pontos de infecção (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

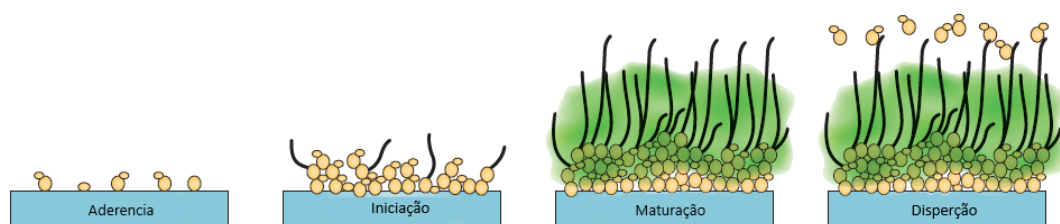


Figura 2. Etapas de formação do biofilme de *C. albicans*. A formação do biofilme está dividida em 4 etapas: aderência, iniciação, maturação e dispersão. A aderência começa quando as primeiras células leveduriformes se aderem na superfície onde se desenvolverá o biofilme. A iniciação do biofilme começa com a formação das primeiras pseudo-hifas, que irão formar as hifas. A maturação do biofilme começa quando as hifas estão totalmente desenvolvidas e começa a formação da ECM. Finalmente, a etapa de dispersão ocorre quando novas células leveduriformes se separam do biofilme e são dispersadas até um novo local. **Fonte:** Adaptado de FINKEL e MITCHELL (2011).

A estrutura do biofilme de *C. albicans* é diversa. A matriz extracelular (ECM) destes biofilmes é responsável pela coesão e adesão das células e pela fixação nas superfícies; a ECM funciona como um reservatório de nutrientes, metabólitos e fonte de substratos energéticos para a sobrevivência dos micro-organismos neste microambiente (GEDAS; OLSZEWSKA, 2020). A ECM de biofilmes de *C. albicans* é rica em carboidratos (25%), lipídeos (15%), proteínas (55%), fósforo, hexosaminas e ácidos nucleicos (5%) (figura 3) (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018; SARDI; SCORZONI; BERNARDI; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2013). O farnesol, uma molécula com atividade *quorum-sensing*, também é secretada por biofilmes de *C. albicans*; o farnesol é capaz de induzir a apoptose celular no hospedeiro via ativação de caspases, promover a formação de espécies reativas de oxigênio e a ruptura da integridade da membrana celular (HENNEBERRY; WRIGHT; MCMASTER, 2002; SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009; WISEMAN; WERNER; CROWELL, 2007).

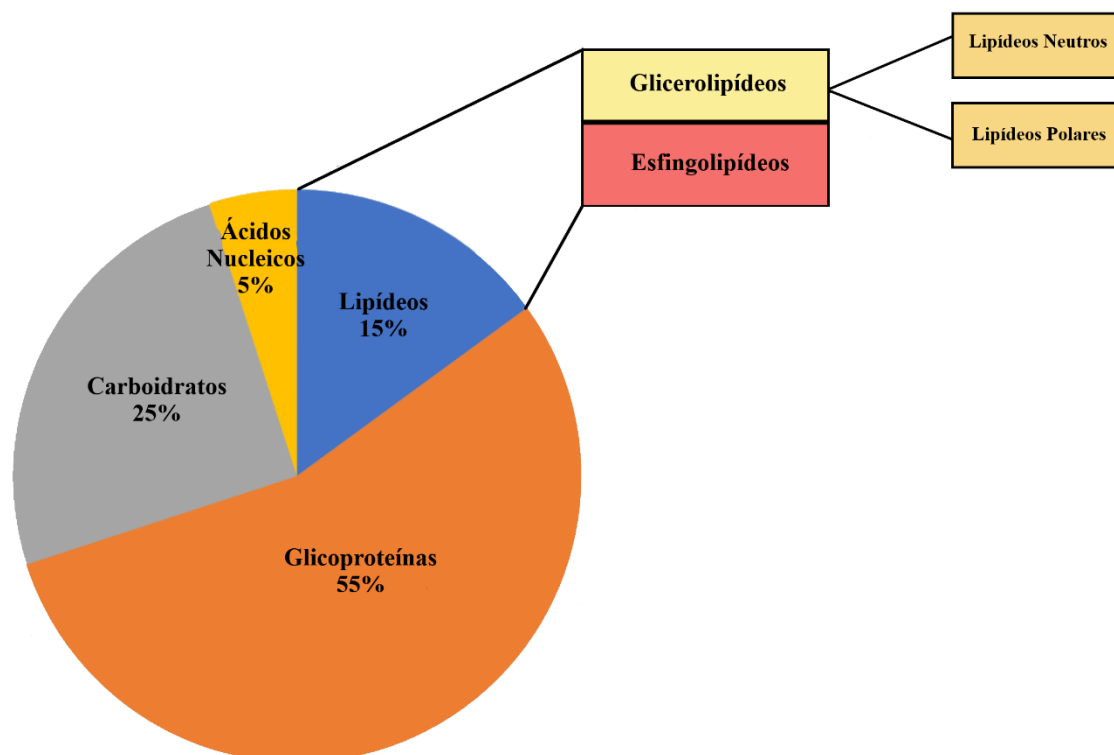


Figura 3. Composição do matrix extracelular (ECM) do biofilme de *C. albicans*. ECM do biofilme de *C. albicans* composta por glicoproteínas (55%), carboidratos (25%), lipídeos (15%) e ácidos nucleicos (5%). Dentre os lipídeos; os glicerolipídeos e esfingolipídeos estão presentes na ECM. Os glicerolipídeos são formados por lipídeos polares e neutros (ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S., 2018). **Fonte.** Adaptada de ALIM; SIRCAIK e PANWAR (2018).

6. Proteínas presentes no biofilme de *C. albicans*

As proteínas presentes no biofilme de *C. albicans* tem despertado muito interesse nos últimos anos, porém, as funções, o transporte e a importância de muitas destas proteínas ainda são desconhecidas, devido à complexidade e às particularidades de desenvolvimento dos biofilmes.

As proteínas de *C. albicans* presentes nos biofilmes e secretomas podem ser divididas em dois grandes grupos: As Proteínas Secretadas e as Proteínas Ligadas à Parede (CWP de *Cell Wall Proteins*). As Proteínas Secretas são liberadas mediante diversas rotas de transporte ainda em estudo. As CWP estão ligadas à parede celular de *C. albicans* e ainda assim podem ser encontradas em baixas quantidades no meio ou na ECM. As CWP estão unidas aos polissacáridos da parede de *C. albicans* de distintas formas; as uniões mais prevalentes são através da ligação de β -1,6-glucanos mediante os resíduos de glicosilfosfatidilinositol (GPI), conhecidas como proteínas ancoradas ao GPI. Existem também proteínas com sequências repetitivas internas (Pir) que se unem aos β -1,3-glucanos, e finalmente proteínas não ligadas,

ou livres (GIL-BONA; AMADOR-GARCÍA; GIL; MONTEOLIVA, 2018). Esta variedade na bioquímica destas proteínas dificulta o estudo desta classe de moléculas, uma vez que os processos de extração necessitam de grande especificidade.

Algumas proteínas secretadas por *C. albicans* possuem peptídeo sinal que viabiliza o transporte para o meio extracelular ou ECM. O peptídeo sinal é localizado no N-terminal das proteínas. O estudo de Lee; Wormsley; Kamoun; Lee *et al.* (2003) revelou que 3,1% das proteínas de *C. albicans* tinham um peptídeo sinal de secreção, enquanto que outras não apresentavam tal particularidade, sendo portanto, estas rotas de sinalização e transporte ainda desconhecidas. (SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010). As proteínas secretadas na ECM podem ser transportadas mediante vesículas extracelulares, porém, não possuem nenhum sinal específico para este tipo de transporte (GIL-BONA; AMADOR-GARCÍA; GIL; MONTEOLIVA, 2018). Atualmente, sabe-se que estas vesículas extracelulares podem transportar não só proteínas, mas também lipídeos, RNA e DNA. Estas vesículas são de diferentes tamanhos, variando de 50 nm até 850 nm. Entre as proteínas encontradas neste tipo de vesículas pode-se citar a Enolase 1 (Eno1 de *Enolase 1*); Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (Tdh3 de *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*); Proteína de Choque Térmico 70 (Hsp70 de *Heat Shock Protein 70*); enzimas como as Sap e Lisofosfolipases (Plb de *Lysophospholipase*); e algumas proteínas transmembrana e de parede celular como Fet3p (*Fet3*); Fet34p (*Fet34*); Adenosina Trifosfatase de Membrana Celular (Pma1 de *Plasma Membrane ATPase*); Bgl2p (*Bgl2*); Ecm33p (*Ecm33*); Mp65p (*Mp65*); ou Tos1p (*Tos1*) (GIL-BONA; AMADOR-GARCÍA; GIL; MONTEOLIVA, 2018). Diferentes cepas de *C. albicans* apresentam uma ampla variabilidade de moléculas encontradas nestas vesículas, sendo particularmente importante a detecção de proteínas relacionadas à interação com o hospedeiro (GIL-BONA; AMADOR-GARCÍA; GIL; MONTEOLIVA, 2018).

Com relação às interações com o hospedeiro, as proteínas secretadas na ECM mais reportadas são as enzimas hidrolíticas; especialmente lipases e proteases, que facilitam a adesão e obtenção de nutrientes para *C. albicans*. As Sap são o grupo de proteínas mais estudadas em *C. albicans*. As proteínas Sap1; Sap 2; Sap3; Sap4; Sap5; Sap6; Sap7 e Sap8 são secretadas no meio extracelular e as proteínas Sap 9 e Sap 10 estão ancoradas à membrana mediante o resíduo GPI. Como características gerais, estas proteínas são inibidas por pepstatina A e sua atividade ótima ocorre em pH ácido (SCHALLER; BORELLI; KORTING; HUBE, 2005). As diferenças entre os subtipos de Sap estão relacionadas

também ao tipo de substrato chave, o que comprova a plasticidade de *C. albicans* nos processos de adesão e infecção no hospedeiro (SCHALLER; BORELLI; KORTING; HUBE, 2005). A proteína Sap2 é a mais expressa em culturas in vitro do biofilme de *C. albicans* e tem sido demonstrada sua eficácia para degradar o estrato córneo humano, o colágeno, a laminina, a fibronectina e a mucina, a lactoferrina salivar, o inibidor de proteinases alfa-macroglobulina e a maioria das imunoglobulinas, incluindo IgA (SCHALLER; BORELLI; KORTING; HUBE, 2005). Estes dados demonstram a importância desta classe de proteínas no entendimento do processo patogênico promovido por *C. albicans*.

Outro grupo importante de enzimas secretadas são as fosfolipases (PL de *Phospholipases*); que hidrolisam uma ou mais ligações em glicerofosfolipídeos. As PL são consideradas fatores de virulência em outros fungos e bactérias além de *C. albicans*. No caso de *C. albicans* foram identificadas 4 subclasses de PL: PLA; PLB; PLC e PLD. De forma geral as PL ajudam na penetração celular, na adesão às células epiteliais e na invasão do epitélio oral (SCHALLER; BORELLI; KORTING; HUBE, 2005).

A transição de leveduras e pseudohifas a hifas é um processo importante durante a infecção, uma vez que o crescimento na forma de hifas faz com que *C. albicans* seja capaz de escapar da fagocitose por parte das células do hospedeiro. Esta transição é modulada por várias proteínas, especialmente quinases e fosfatases como: a proteína quinase A (PKA de *Protein Kinase A*) e suas subunidades catalíticas Tpk1 e Tpk2, que regulam positivamente o crescimento das hifas. Adicionalmente, são importantes as MAP quinases que controlam processos importantes como filamentação, formação de biofilme e resistência ao estresse mediante processos de fosforilação e defosforilação (WILLGER; LIU; OLARTE; ADAMO *et al.*, 2015).

As proteínas são as principais moléculas estudadas em processos tumorais devido à sua influência nas atividades celulares como um todo. As proteases são enzimas necessárias para o correto funcionamento celular e estão presentes em todas as células; sendo que muitas estão relacionadas com vários processos tumorais (KOBLENSKI; AHRAM; SLOANE, 2000). Os processos de metástase estão relacionados às proteases que atuam destruindo a matriz extracelular dos tecidos, permitindo a migração das células tumorais e a colonização em novos órgãos (KOBLENSKI; AHRAM; SLOANE, 2000).

Um bom exemplo é a catepsina B que tem uma atividade ou expressão aumentada em carcinomas de mama; colorretal; gástrico; pulmão e próstata (KOBLENSKI; AHRAM; SLOANE, 2000). A catepsina B ativa direta e indiretamente as MMP; diretamente mediante

ativação da estromelisina-1, que inicia a cascata de collagenase e gelatinase A. Indiretamente, a catepsina B converte o plasminogênio em plasmina que é capaz de degradar componentes da matriz extracelular, podendo ativar as MMPs (KOBLINSKI; AHRAM; SLOANE, 2000). Porém, as proteases não são as únicas enzimas com importância nos processos tumorais.

As fosfolipases são enzimas muito importantes para sinalização celular e metabólica (PARK; LEE; JANG; GHIM *et al.*, 2012). As fosfolipases participam de uma variedade de processos que estão relacionados com a carcinogênese e/ou metástases, como a secreção das MMPs, reorganização dos filamentos de actina, migração, proliferação, crescimento, inflamação e angiogênese (PARK; LEE; JANG; GHIM *et al.*, 2012). As funções executadas dependem das famílias de fosfolipases (fosfolipase A; B; C e D) e de suas subfamílias (PARK; LEE; JANG; GHIM *et al.*, 2012). A metástase é um processo multifatorial e as fosfolipases estão presentes em todas as suas etapas, afetando a sinalização intracelular e intercelular. A fosfolipase A2, quando superproduzida, induz a liberação de prostaglandinas e leucotrienos, que permitem que as células estromais migrem até as células tumorais. As células estromais recrutadas secretam fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e eicosanoides, modificando o microambiente tumoral. Este microambiente alterado favorece a migração e invasão das células tumorais via ativação da fosfolipase C e fosfolipase D (PARK; LEE; JANG; GHIM *et al.*, 2012). Nos processos tumorais é comum o recrutamento de proteínas de transporte (TZENG; WANG, 2016). Um exemplo é a proteína Rab25, a qual, quando em altos níveis, promove a rota anti-apoptótica via PI3K-Akt e inibe a expressão de moléculas pro-apoptóticas, incrementando a agressividade das células tumorais. (TZENG; WANG, 2016).

7. Lipídeos presentes no biofilme de *C. albicans*

Os lipídeos de *C. albicans* assim como os lipídeos de outros micro-organismos tem despertado interesse nos últimos anos devido às novas técnicas de isolamento e identificação desta classe de moléculas. De maneira geral, os lipídeos ainda são pouco explorados, mesmo sendo as enzimas das rotas de biossínteses de lipídeos os principais alvos dos antifúngicos. A literatura reporta os lipídeos mais prevalentes nos biofilmes de *C. albicans*, como sendo: Fosfatidilcolina (PC de *Phosphatidylcholine*), Fosfatidiletanolamina (PE de *Phosphatidylethanolamine*), Fosfatidilserina (PS de *Phosphatidylserine*),

Fosfatidilinositol (PI de *Phosphatidylinositol*), Fosfatidilglicerol (PG de *Phosphatidylglycerol*), e Cardiolipina (CL de *Cardiolipin*) (SINGH; KHYATI KAPOOR; MANDAL; ROTH *et al.*, 2010). Os lipídeos que pertencem aos fosfoglicerídeos são os mais prevalentes entre o gênero *Candida*; em *C. albicans* especificamente destacam-se PC, PE e PI por se encontrarem em quantidades superiores em comparação com os demais já nomeados. Porém, os fosfoglicerídeos não são os únicos lipídeos presentes em *C. albicans*, outro grupo importante são os esfingolipídeos com três classes importantes: Inositolfosforilceramida (IPC de *Inositolphosphorylceramide*), Manosil Fosfatidilinositol (MIPC de *Mannosylphosphatidylinositol*), e Manosildiinositolfosforilceramida (M(IP)₂C de *Mannosyldiinositolphosphorylceramide*). (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018; SINGH; KHYATI KAPOOR; MANDAL; ROTH *et al.*, 2010; ZARNOWSKI; WESTLER; LACMBOUH; MARITA *et al.*, 2014).

Os lipídeos de *C. albicans* tem demonstrado a sua importância em relação aos mecanismos de resistência, particularmente frente aos azóis. O PI tem sido relacionado à patogenicidade de *C. albicans* e à resistência de vários fármacos usados para o tratamento das infecções (LATTIF; MUKHERJEE; CHANDRA; ROTH *et al.*, 2011). O PI é o precursor dos esfingolipídeos discutidos anteriormente, os quais têm sido identificados como formadores de *lipids rafts*, sobretudo M(IP)₂C. O grupo de Lattif; Mukherjee; Chandra; Roth *et al.* (2011) estudou a composição dos lipídeos em biofilmes de *C. albicans* e demonstraram que o PI é super produzido nos biofilmes desta espécie de fungo.

Estudos comparativos sobre os perfis lipídicos de biofilmes de *C. albicans* demonstram que além de PI, vários lipídeos polares são produzidos em excesso, entre os quais estão PC, PE, PS e ácido fosfatídico (PA de *Phosphatidic Acid*), em comparação com células planctônicas. As diferenças não só correspondem às quantidades, mas também com relação à estrutura química, pois os lipídeos em biofilmes maduros têm menores quantidades de insaturações em comparação com os lipídeos de biofilmes jovens (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018).

Pesquisas realizadas nos últimos anos demonstram a importância dos lipídeos e do seu metabolismo no desenvolvimento e progressão do câncer (CHENG; GENG; CHENG; GUO, 2018; CURRIE; SCHULZE; ZECHNER; WALTHER *et al.*, 2013). As células tumorais são hiper-proliferativas e possuem maior quantidade de lipídeos sendo vários os mecanismos propostos, muitas vezes relacionados à maior absorção de lipídeos exógenos e lipoproteínas; e ao aumento de sínteses *de novo* de lipídeos (CURRIE; SCHULZE; ZECHNER; WALTHER *et*

al., 2013; LUO; ZHAO; CHENG; LI *et al.*, 2018). A ativação de rotas metabólicas oncogênicas normalmente provoca uma desregulação metabólica lipídica, o que provoca um acúmulo de lipídeos de sinalização. Este acúmulo de lipídeos de sinalização pode ser utilizado como uma forma secundária de comunicação, aumentando a proliferação celular, sobrevivência, resistência à quimioterapia e a formação de metástases (LUO; ZHAO; CHENG; LI *et al.*, 2018). Schmidt; Kajtár; Juhász; Péter *et al.* (2020) realizaram um estudo do perfil lipídico (*lipidomic assay*) em biopsias de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC de *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). Neste trabalho, constatou-se uma depleção de lisofosfatidilcolina (LPC de *Lysophosphatidylcholine*), assim como acúmulo de glicerofosfolipídeos, entre eles, PE e PC nas áreas neoplásicas. Os autores concluíram que o perfil lipídico das biópsias tem potencial para ser usado como marcador molecular para diagnóstico, prognóstico e ferramenta para um melhor entendimento do comportamento das lesões de HNSCC (SCHMIDT; KAJTÁR; JUHÁSZ; PÉTER *et al.*, 2020).

Considerações

A etiopatologia dos tumores de cabeça e pescoço (CPP) é multifatorial e ainda pouco consolidada. A revisão de literatura apresentada na introdução ilustra a necessidade de condução de estudos que corroborem ou não, a presença de micro-organismos prevalentes na cavidade orofaríngea como *C. albicans*, com a etiopatologia de tumores de cabeça e pescoço, sobretudo tendo em vista que, os processos de sinalização celular do hospedeiro podem ocorrer mesmo em sítios distantes do foco infeccioso, devido à ação de produtos do metabolismo microbiano (macromoléculas secretadas/fatores de virulência).

Objetivo Geral

Isolar e identificar as proteínas e os lipídeos oriundos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h, assim como avaliar o efeito destas moléculas em células inflamatórias, em células displásicas e em células neoplásicas de carcinoma de cabeça e pescoço.

Objetivos Específicos

1. Isolar e extrair as proteínas e os lipídeos provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans* devidamente padronizados;
2. Caracterizar e identificar as proteínas e os lipídeos obtidos;
3. Analisar a interação dos lipídeos e das proteínas provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans* em cultura de células inflamatórias e em células displásicas e neoplásicas de CPP;
4. Analisar a capacidade citotóxica dos lipídeos e das proteínas do secretoma;
5. Analisar as taxas de crescimento celular em células displásicas e neoplásicas de CPP, após o cultivo com os lipídeos provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans*; assim como verificar o padrão de resposta das células ao agente anti-tumoral Camptotecina, nestas condições.

II. Materiais e Métodos

- **Micro-organismos e linhagens celulares utilizadas.**

- *Candida albicans*.

Nos ensaios utilizou-se a cepa *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC MYA-2876) [SC 5314], “wild type strain”. Esta cepa é um isolado clínico com resistência intermediária ao fluconazol (80 µg/mL) (ATCC, 2021). A cepa foi estocada em -80 °C em tubos criogênicos de 1 mL, suplementado com meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (Difco, Sparks, Maryland, Estados Unidos, Cód.: 239210) 10 vezes concentrado, com glicerol 20% v/v. Para fazer o descongelamento, cultivou-se 100 µL de *C. albicans* em placas de Petri de *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Neogen, Lansing, Michigan, Estados Unidos, Cód.: 7150) com cloranfenicol (1 mg*L⁻¹), por 24 horas (h) à 37 °C.

- Linhagens celulares.

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos foram as seguintes:

- **THP-1:** trata-se de monócito humano, obtido de sangue periférico de paciente de 01 ano de idade portador de leucemia monocítica aguda (ATCC, 2020c). Estas células são particularmente utilizadas em pesquisas sobre o sistema imune e cultura celular 3D.

- **DOK:** trata-se de uma linhagem celular de queratinócito displásico oral, isolado do dorso da língua de um paciente de 57 anos, fumante, portador de lesão pré-maligna (displasia), que após 10 anos sofreu recidiva já na forma de carcinoma de células escamosas. Esta displasia é classificada como média à moderada. São células utilizadas em pesquisas sobre a carcinogênese oral (SIGMA-ALDRICH, 2020).
- **SCC-25:** trata-se de uma linhagem celular proveniente de paciente portador de carcinoma de células escamosas. Esta célula foi isolada da língua de um paciente de 70 anos. São células utilizadas na pesquisa de câncer, toxicologia e cultura de células 3D. (ATCC, 2020b).
- **Detroit 562:** trata-se de uma linhagem celular proveniente de uma metástase (em fluido pleural) originária de carcinoma de faringe. Esta célula foi isolada de paciente adulta sem idade documentada. São células utilizadas na pesquisa do câncer e em culturas de células 3D (ATCC, 2020a).

As linhagens epiteliais foram cultivadas em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM de *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Lonza, Walkersville, Maryland, Estados Unidos, Cód.: 12-741F) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Gibco, Brasil, Cód.: 12657), 2 mM de glutamina (Safc. Bioscience, Lenexa, Kansas, Estados Unidos, Cód.: 59202C), antibiótico e antimicótico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: A5955) (10 000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B por mL), de acordo com as especificações de cada célula, segundo os protocolos padrão de cultivo – DOK (SIGMA-ALDRICH, 2020), SCC-25 e Detroit 562 (ATCC, 2020a; b). A linhagem de sangue periférico, THP-1, foi cultivada em RPMI 1640 suplementado com HEPES [25 mM] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: R8755); antibiótico e antimicótico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: A5955) (10 000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B por mL); 2 mM de L-glutamina (Safc. Bioscience, Lenexa, Kansas, Estados Unidos, Cód.: 59202C); 10% v/v de soro fetal bovino (Gibco, Brasil, Cód.: 12657); e 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich; Saint Louis; Missouri; Estados Unidos, Cód.: M3148) (ATCC, 2020c). Os estoques das células foram descongelados e previamente aos experimentos, todas as culturas foram testadas quanto à presença de contaminação com micoplasma, através da marcação fluorescente com Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: H1398). A detecção positiva de micoplasma nas

culturas foi fator excludente para o uso das células em todas as etapas do estudo. As células foram cultivadas entre a 3ª e 8ª passagem para uso nos experimentos.

- **Formação e caracterização do biofilme de *C. albicans*.**

- Padronização do biofilme de *C. albicans*.

O biofilme de *C. albicans* alvo do estudo deste trabalho, foi baseado nos protocolos estabelecidos pelo grupo de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara (DE CARVALHO DIAS; BARBUGLI; DE PATTO; LORDELLO *et al.*, 2017; DE CARVALHO DIAS; DE SOUSA; BARBUGLI; CERRI *et al.*, 2018; ZAGO; SILVA; SANITÁ; BARBUGLI *et al.*, 2015). Após o descongelamento do fungo, foram coletadas 10 colônias e cultivadas em 10 mL de meio YNB. Os tubos foram incubados por 16 h a 37 °C, sem agitação, para formação do pré-inóculo. Padronizou-se a medição da densidade ótica (D.O) em 540 nm, para determinação da fase exponencial. Após 16 h, obteve-se a D.O de 0,845, correspondente à fase mid-log. O preparo do inóculo foi feito a partir de diluição do pré-inóculo (1:10) em YNB e incubou-se por mais 8 h a 37°C. Os tubos foram centrifugados (3.200 xg a 4 °C) por 10 min e ressuspensos em PBS 1X (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS 1X e finalmente ressuspendeu-se o pellet em 10 mL de meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: R8755) tamponado com HEPES (25 mM) e suplementado com glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, Lenexa, Wisconsin, Estados Unidos, Cód.: 59202C) (pH = 7,0). O biofilme foi formado em garrafas de cultura celular de 75 cm², nas quais foram adicionados 2 mL do inóculo em um volume final de 30 mL de RPMI 1640. Primeiramente, foi feita uma fase de adesão por 90 min a 37 °C em agitação orbital a 55 r.p.m. Após a fase de adesão, a cultura foi lavada duas vezes com PBS 1X para remoção das células não aderentes. Finalmente, adicionou-se 30 mL de RPMI 1640 a 37 °C e agitação orbital de 55 r.p.m. para a obtenção do biofilme maduro com 36 h de formação. Cabe ressaltar que toda formação de biofilmes em garrafas de 75 cm² teve um ensaio espelho em placas de 6 poços usados como controles.

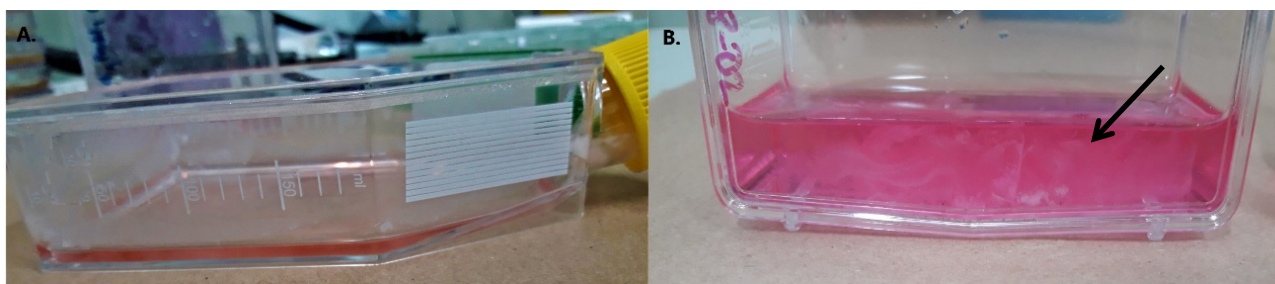


Figura 4. Crescimento de *C. albicans* em garrafa de 75 cm². O biofilme foi formado em RPMI 1640, a 37°C, 55 rpm por 36 h. A. Biofilme em cultura inicial. B. Biofilme (36 h de formação) já desprendido com auxílio de *cell scraper*. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Curva de crescimento do biofilme com Alamar Blue

Os biofilmes de *C. albicans* foram formados em placas de 6 poços obedecendo à relação de área/volume/inóculo previamente estabelecida para as garrafas de 75 cm² (240 µL do inóculo e 3,6 mL de meio de cultura RPMI 1640). O controle de interferência de crescimento foi feito mediante adição de fluconazol (FCZ; Sigma-Aldrich, Estados Unidos, Cód.: F8929) [100 µg*mL⁻¹] em cada poço e o branco consistiu de meio de cultivo com Alamar Blue (Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: DAL1100) sem *C. albicans*. A inclusão de FCZ como um controle de interferência foi realizada para estabelecer um ponto de comparação entre uma cultura em ótimas condições e uma cultura que tenha sofrido interferências durante as fases de desenvolvimento (suplementadas com FCZ neste caso). Neste controle, utilizou-se FCZ 100 µg*mL⁻¹, uma vez que esta concentração é capaz de interferir no crescimento adequado da cepa SC5314, sem contudo, exercer uma atividade fungicida robusta (não desejável). Em cada poço, foram adicionados 4 mL de meio RPMI 1640 e 100 µL do reagente Alamar Blue. As placas foram incubadas protegidas da luz a 37°C. As leituras foram realizadas hora a hora em equipamento Fluoroskan Ascent FL (Thermo-Scientific), com filtros de excitação em 544 nm e emissão em 590 nm. O método foi realizado em triplicata em três ocasiões distintas (n = 9).

- Contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC*mL⁻¹) por diluição e mediante cultivo por esgotamento.

Os biofilmes foram coletados das garrafas com ajuda de um *cell scraper* (Kasvi, Cód. K26-0025) após as 36 h de formação. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três ocasiões distintas (n = 9).

Para as contagens em Câmara de Neubauer, preparou-se uma diluição seriada a partir de 1 mL do biofilme desprendido e homogeneizado, ao qual adicionou-se 9 mL de água destilada estéril; repetiu-se o processo até atingir a diluição necessária. No microscópio foram contados 5 quadrantes e o número de UFC*mL⁻¹ foi calculado com a seguinte fórmula:

$$UFC * mL^{-1} = ((Média das contagens) * 1000) * Diluição utilizada$$

Para a contagem em placas Petri, foram adicionados 100 µL da diluição selecionada a uma placa Petri com meio SDA com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após 24 h, realizou-se a contagem do número de colônias e os valores de UFC*mL⁻¹ foram calculados com a seguinte fórmula:

$$UFC * mL^{-1} = \frac{(Média das contagens * Diluição utilizada)}{Volume utilizado para fazer a cultura}$$

- Quantificação de biomassa do biofilme com Cristal Violeta

Os biofilmes de *C. albicans* foram formados em placas de 6 poços mantendo as relações já mencionadas, conforme estabelecido nas garrafas de 75 cm². Após as 36 h de formação, o meio de cultivo foi retirado e fixaram-se as amostras em metanol 80% v/v por 15 minutos. Em seguida, removeu-se o metanol e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,02% v/v, em cada poço por 5 minutos (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Posteriormente, os poços foram lavados com PBS 1X e a biomassa foi solubilizada completamente em ácido acético (33% v/v). A medição espectrofotométrica foi realizada em leitor de ELISA (EZ Read 400 Microplate reader, BioChrom e Software Adap 2,0 Biocrom) em 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três ocasiões distintas (n = 9).

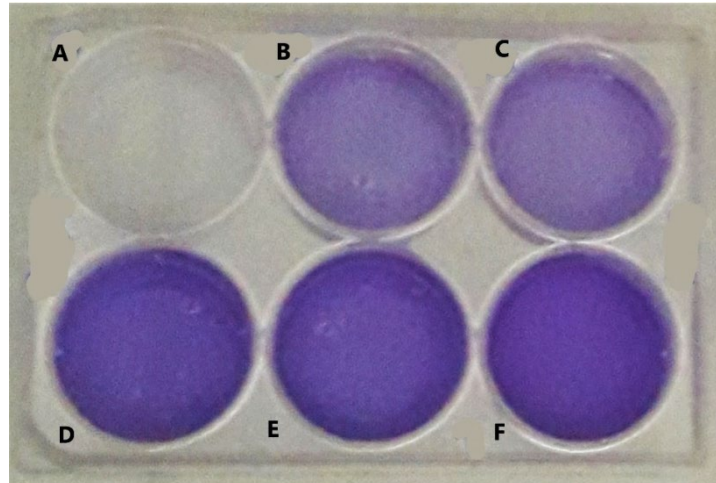


Figura 5. Ensaio de Cristal Violeta. O ensaio de cristal violeta foi realizado para quantificação da biomassa produzida pelo biofilme. Os ensaios foram realizados em placas de cultura de 6 poços após as 36 h de formação do biofilme de *C. albicans*. A: Branco, B e C: Controle com fluconazol (FCZ) [$100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$] em duplicata, D; E e F: Amostras do biofilme em triplicata. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Marcação com Syto 9 e Iodeto de Propídeo (PI)

Os biofilmes de *C. albicans* de 36 h foram formados em placas de 6 poços. Este ensaio foi realizado com o kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: L7012). Primeiramente, foi realizada uma diluição do iodeto de propídeo e do Syto 9, ambos 1:1000 em PBS 1X estéril. Adicionou-se 1 mL das diluições em cada poço por 30 minutos, seguindo-se de uma lavagem para retirar o excesso de marcadores. Os experimentos foram realizados em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800 com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue 2.3, utilizando-se o laser do 488 nm com 4% de potência para excitação de ambos os marcadores e faixas de emissão fixas em 530 nm para detecção do Syto9 e 610 nm para a detecção do PI, ambos com ganho em 700V nos eixos X, Y e Z. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

○ Marcação com FUN1

Os biofilmes de *C. albicans* de 36 h foram formados em placas de 6 poços. Este ensaio foi realizado com o kit FUN®1 *cell stain* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: F7030). Após as 36 h de formação do biofilme, o meio de cultura foi retirado

e lavou-se os poços com PBS 1X. Depois da lavagem, adicionou-se 2 mL de FUN1 (20 μ M). As placas foram incubadas a 37 °C no escuro por 30 min. Finalmente, os biofilmes foram lavados por 2 vezes com PBS 1X e observados em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800 com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue 2.3, utilizando-se o laser do 488 nm com 8% de potência para excitação de ambos os marcadores e faixas de emissão fixas em 510 nm até a faixa espectral de 700 nm nos eixos X, Y e Z, para detecção da fluorescência verde, verde-amarelada e laranja-avermelhada. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

- **Extração e caracterização das proteínas do biofilme de *C. albicans*.**

- Marcação de componentes proteicos do biofilme de *C. albicans* com *Sypro Ruby*

Este ensaio foi realizado com auxílio do reagente FilmTracer™ SYPRO™ Ruby Biofilm Matrix Stain (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: F10318). Inicialmente, os biofilmes foram marcados a fresco com 2 mL do reagente, em cada poço, seguindo-se por 30 minutos de incubação na bancada em temperatura ambiente e protegidos da luz. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1X por 2 vezes. A leitura foi realizada em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800, com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue 2.3, utilizando-se o laser em 488nm com detecção até 610 nm. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

- Extração da fração proteica da matriz extracelular do biofilme de *C. albicans*

Após as 36 h de formação, o biofilme foi completamente desprendido da garrafa de 75 cm² com auxílio de *cell scraper*; homogeneizado no próprio meio de cultivo, sendo toda a amostra coletada (cerca de 30 mL), para posterior filtragem em filtro de baixa ligação proteica SFCA 0,22 μ m. Em seguida, em tubos de vidro, cada 1 volume de filtrado foi misturado a 4 volumes de acetona P.A resfriada a -20 °C (SCIENTIFIC, 2009). Esta mistura foi incubada por 1 h no freezer à -20 °C em repouso. Após este tempo, centrifugou-se as amostras por 10 min a 12.000 xg (Avanti J-26 XPI; Beckman Coulter; com o rotor JA-25.50) a 4 °C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante até total evaporação da acetona remanescente em temperatura ambiente dentro de fluxo laminar estéril. Ao final do protocolo, ressuspendeu-se o pellet seco em 1 mL de tampão Tris HCl contendo Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF de *Phenylmethylsulfonyl*

fluoride) (1 mM, Merck; Alemanha; Cód.: 10837091001) (pH = 6,8). As amostras foram aliquotadas e estocadas em -20°C. Antes de serem usadas; cada amostra foi centrifugada por 5 min a 1 500 xg e 4 °C para remoção de partículas suspensas, utilizando-se apenas o sobrenadante para as análises.



Figura 6. Aspecto do “Pellet de proteínas” na etapa final de obtenção da fração proteica. A extração de proteínas foi realizada mediante o método de acetona previamente esfriada a -20°C. As amostras foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM e armazenadas em -80°C. **Fonte:** Autoria Própria

○ Quantificação de proteínas totais por metodologia de Bradford

Para estes experimentos foi utilizado o Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: B6916). Primeiramente, preparou-se uma solução de Soro Albumina Bovina (BSA) ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: P5369), para estabelecimento de uma curva padrão, cujo os valores estão resumidos no quadro 1 e seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976).

Quadro 1. Curva padrão das concentrações de proteínas em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Concentração	BSA	Água
$2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 μL	975 μL
$5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 μL	950 μL
$7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	75 μL	925 μL
$10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 μL	900 μL
$15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	150 μL	850 μL
$20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 μL	800 μL

Fonte. Autoria Própria.

Para as medições, foram adicionados 500 μL da amostra e 500 μL de reagente de Bradford. A leitura foi realizada em leitor de placas ELISA (EZ Read 400 Microplate reader, BioChrom e Software Adap 2,0 Biocrom) em 595 nm.

○ Determinação de atividade proteásica: *EnzChek Protease C assay*

Este ensaio foi realizado com auxílio do kit *EnzChek Protease C assay* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: E6639). Inicialmente, preparou-se o reagente BODIPY FL caseína ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) diretamente no tubo falcon. Seguindo as instruções do fabricante, foi preparado o tampão de digestão 1X. Para a concentração final da caseína, foi adicionado 0,2 mL de caseína à 19,8 mL do tampão de digestão 1X. Realizou-se uma curva padrão a partir de uma solução de tripsina (16000 unidades BAEE; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.:T0134). Para a quantificação, foram adicionados 100 μL das amostras e 100 μL do substrato e incubou-se por 1 h (1ª leitura) e por mais 24 h (2ª leitura) a 37 °C. A leitura foi feita em fluorímetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo-Scientific) com filtros de excitação em 485 nm e emissão em 538 nm.

○ Análise do perfil proteico por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Celia Bertolini e o doutorando Jonatas Maimoni Campanella no Laboratório de Bioquímica, prédio de Bioquímica

– Instituto de Química de Araraquara, UNESP-AQA. Os géis de poliacrilamida foram preparados segundo as concentrações indicadas nos quadros 2 e 3:

Quadro 2. Concentrações do gel de resolução para SDS-Page.

Gel de Resolução (Vf = 10 mL)			
Concentração	9% v/v	10% v/v	12% v/v
Tampão de Resolução 5X	2 mL	2 mL	2 mL
Água	5 mL	4,7 mL	4 mL
Acrilamida:bis (30:0,8)	3 mL	3,3 mL	4 mL
APS 10% v/v	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Fonte. Autoria Própria.

Quadro 3. Concentrações do gel de estocagem para SDS-Page.

Gel de Estocagem (Vf = 5 mL)			
Concentração	9% v/v	10% v/v	12% v/v
Tampão de Estocagem 5X	1 mL	1 mL	1 mL
Água	3,43 mL	3,35 mL	3,2 mL
Acrilamida:bis (30:0,8)	670 µL	750 µL	900 µL
APS 10% v/v	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

Fonte. Autoria Própria.

As amostras de proteínas foram tratadas com o sample buffer (100 mM TrisHCl, 4% v/v SDS, 20 mM Ditioneitol (DTT), 20% v/v glicerol, 0,1% v/v Bromo fenol azul) fervendo por 5 min. Em seguida, adicionou-se 10 µL de amostra por poço no gel e foi feita a corrida para empacotamento das amostras em 100 mV por 15 min. Finalmente, realizou-se a corrida das amostras em 300 mV por 30 min.

Após a corrida, foi feita a marcação do gel com nitrato de prata para observação das bandas. Para isto, fixou-se os géis durante 20 min em uma solução 50% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético dissolvido em água destilada. Em seguida, removeu-se toda a

solução fixadora inicial, seguindo-se de nova etapa de fixação com uma solução 50% v/v de etanol em água destilada, durante 20 min. Todo o etanol foi removido e os géis foram incubados em uma solução 0,02% v/v de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ durante 1 min. A solução de tiosulfato de sódio foi removida e os géis foram lavados 3 vezes em água destilada. Os géis foram incubados em solução 0,2% v/v de AgNO_3 durante 20 min, adicionando-se 0,075% v/v de formaldeído. Toda a solução foi removida e lavaram-se os géis 3x com água destilada. Os géis foram revelados com solução 6% v/v de Na_2CO_3 , 0,05% v/v de formaldeído (adicionado no momento da revelação). Após a revelação, lavaram-se os géis em água destilada. Em seguida, os géis foram lavados em solução 50% v/v de metanol, 12% v/v de ácido acético durante 1 min. Os géis foram mantidos em solução 1% v/v de ácido acético, a 4 °C e então fotografados.

○ Identificação das proteínas obtidas por Espectroscopia de Massas

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Célia Bertolini e o doutorando Jonatas Erik Maimoni Campanella, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos, no Instituto de Química de Araraquara, UNESP-AQA. As amostras foram enviadas para o Centro de Pesquisa – CEFAP, Instituto de Ciências Biomédicas ICB, USP, São Paulo. As proteínas foram sequenciadas por shotgun, através de cromatografia líquida de alta eficiência (Easy nanoLC II, Thermo Scientific) acoplada à espectrometria de massas (LTQ-Orbitrap Velos ETD) no modo ESI-TRAP MS/MS.

O protocolo utilizado foi adaptado de Olivares-Yañez; Emerson; Kettenbach; Loros *et al.* (2016). As amostras de proteínas obtidas do biofilme de *C. albicans* de 36 h, após o protocolo de precipitação já descrito, foram ressuspensas em 50 µL de Ureia 8 M, totalizando 100 µL de suspensão. Em seguida, adicionou-se 1 µL de Ditiotretol (DTT) (0,5 M) por 25 min a 56 °C. As amostras foram alquiladas com 3 µL de IAA (Iodoacetoamida) (0,5 M) por 30 min em temperatura ambiente protegidas da luz e então adicionou-se mais 1 µL de DTT. Após 15 min, foram adicionados 400 µL de tampão bicarbonato e 5 µL de CaCl_2 (100 mM), 10 µL da tripsina Gold (Promega; Madison; Wisconsin; Estados Unidos; Cód.: V5280) 1:50 a 37°C por 16 h. As amostras foram centrifugadas em 1.000 rpm por 5 minutos, coletando-se apenas o sobrenadante. Os peptídeos tripticos foram então acidificados com 1 µL de ácido trifluoracético (TFA) e dessalinizados em colunas C18 (ZipTip Pipette Tips; Millipore; Cód.: Z720070), de acordo com as seguintes etapas de lavagens: com Acetonitrila (ACN) 100% v/v; com solução ACN 60% v/v contendo TFA 0,1% v/v; com solução 0,1% v/v de TFA. A ligação da amostra na

coluna foi feita por pipetagem “*up down*” por cerca de 1 min e então descartou-se o material não ligado na coluna. A coluna foi lavada com 0,1% v/v de TFA e eluiu-se as amostras com 5 μ L de solução ACN 60% v/v contendo 0,1% v/v de TFA. As etapas foram realizadas sucessivas vezes até que todas as amostras digeridas tivessem passado pela coluna C18. Finalmente, as soluções de peptídeos foram secas (SpeedVac Plus SC110 A, Savant) em temperatura ambiente.

Os espectros de massas obtidos foram então analisados no banco de dados de *Candida albicans* (FungiDB), por meio da ferramenta de busca de íons-fragmento (MS/MS) do software MASCOT versão 2.3 (www.matrixscience.com), disponível no servidor do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPq, Campinas, SP). Como parâmetro de busca, foi usado o máximo de uma perda de sítio de clivagem de tripsina, modificações fixas de carbamidometilação (provenientes da alquilação dos resíduos de cisteína com IAA) e modificações ocasionais como oxidação da metionina e acetilações N-terminais. Também foram adotados como parâmetros de tolerância, 1 Da para a variação de massa na identificação de íons precursoros (MS) e 0,5 Da de variação de massa para os íons fragmentados (MS/MS). Além disso, foram considerados apenas valores de *score* que excedessem a identidade ou homologia, e também adotamos o modo de identificação decoy, que sequencia os peptídeos tanto do N-terminal para o C-terminal, como o contrário, garantindo um resultado mais fidedigno.

- **Extração e caracterização dos lipídeos do biofilme de *C. albicans*.**

- Marcação de componentes lipídicos do biofilme de *C. albicans* com *Nile Red*

Este protocolo foi adaptado de Sitepu; Ignatia; Franz; Wong et al. (2012). Primeiramente, foram obtidos os biofilmes de *C. albicans* de 36 h segundo o protocolo já estabelecido em placas de 6 poços. Para obter a solução estoque de *Nile Red* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: 72485), diluiu-se 1 mL de *Nile Red* (2 mg*mL⁻¹) em acetona PA. Desta solução, foram adicionados 150 μ L em uma solução de DMSO/H₂O (25% v/v) aquecida em volume final de 3 mL. Este volume foi adicionado no biofilme por 10 min na estufa a 37 °C. Finalmente, o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS 1X. A leitura realizou-se em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800 com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue 2.3, utilizando-se o laser em 488nm com detecção de

488 à 530 nm para os lipídeos não polares (neutros) e o laser 561 com detecção de 561 à 700 nm para os lipídeos polares. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

○ Extração da fração lipídica da matriz extracelular do biofilme de *C. albicans*

O protocolo utilizado foi adaptado de Folch; Lees e Sloane Stanley (1957). Após as 36 h de formação, o biofilme foi completamente desprendido da garrafa de 75cm² com auxílio de *cell scraper*, homogeneizado e coletado para posterior filtragem em filtro de baixa ligação proteica SFCA 0,22 µm (Corning, Alemanha, Cód.: 431219). Em seguida, em tubos de ensaio de vidro, cada 1 volume de filtrado foi adicionado em 1 volume de metanol 80% v/v a -20 °C; e então nesta mistura adicionou-se 2 volumes de clorofórmio P.A sob agitação vigorosa, em vórtex por 5 minutos (min). As amostras foram deixadas em repouso por 1 h em temperatura ambiente para separação das fases. A fase superior foi descartada e a fase inferior contendo o clorofórmio foi evaporada a temperatura ambiente em capela de exaustão, para completa evaporação do solvente. Finalmente, o material remanescente nos tubos foi ressuspensionado em etanol P.A e as amostras foram aliquoteadas e guardadas em -20°C.

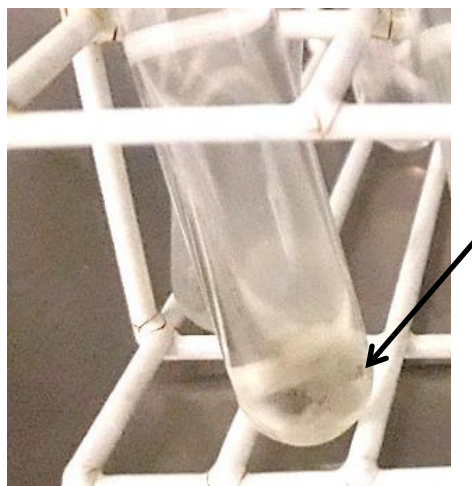


Figura 7. Fase de lipídeos coletada após precipitação. Para a extração dos lipídeos de *C. albicans* foi utilizado o método de metanol:clorofórmio. Na imagem marcada com uma seta são os lipídeos obtidos após a evaporação dos solventes. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Quantificação dos lipídeos extraídos por Sulfo-fosfo-vanilina (SFV)

O método da Sulfo-fosfo-vanilina é muito utilizado devido a sua aplicabilidade e reprodutibilidade na quantificação de lipídeos. O método seguido neste trabalho foi

desenvolvido de acordo com o trabalho de Nunes; Rosa; Vega-Chacón e Mima (2020). Primeiramente, evaporou-se o clorofórmio das amostras na estufa a 70°C e adicionou-se 20 µL de etanol P.A nos tubos das amostras, assim como nos pontos da curva padrão. Os tubos foram esfriados e adicionou-se 200 µL de ácido sulfúrico sob agitação. As amostras foram fervidas a 90 °C por 10 min em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 10 mL de fosfovanilina por tubo. As amostras foram fervidas por mais 10 min. Finalmente, os tubos foram esfriados e realizaram-se as leituras em espectrofotômetro (Espectrofotômetro 4802 de Doble raio UV/Bis; Unico) em 540 nm.

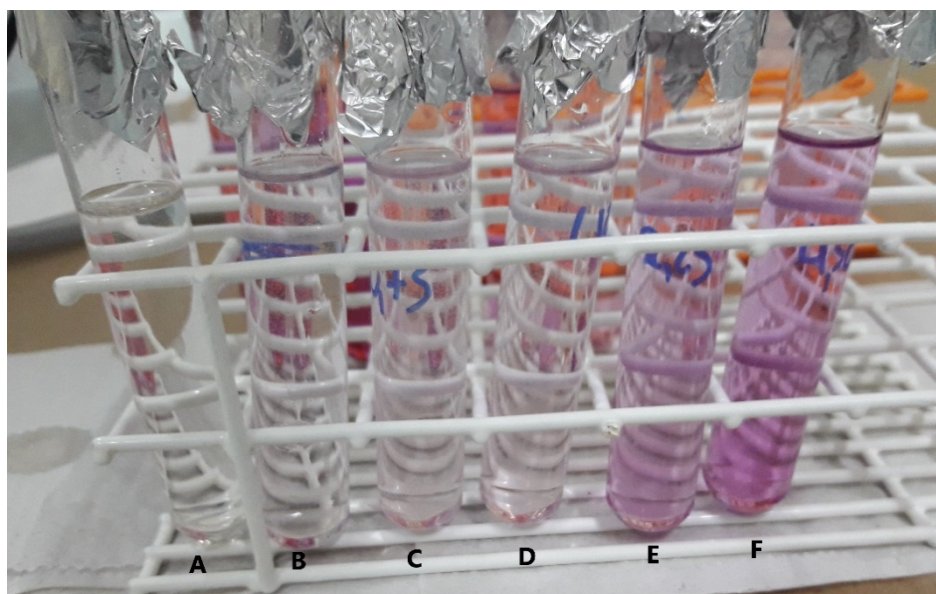


Figura 8. Ensaio de Sulfo-fosfo-vanilina. O ensaio de sulfo-fosfo-vanilina foi realizado para quantificar os lipídeos obtidos após a extração. Foi quantificado 3,5 mg*mL⁻¹ de lipídeos contidos no secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. A: Branco; B-F: Concentrações da curva de lipídeos para quantificação; sendo B: 0,375 mg*mL⁻¹; C: 0,750 mg*mL⁻¹; D: 1,125 mg*mL⁻¹; E: 2,25 mg*mL⁻¹; e F: 4,5 mg*mL⁻¹. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Identificação dos lipídeos extraídos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

As análises de RMN foram realizadas no equipamento Bruker Avance III HD 600 no Laboratório de Ressonância Nuclear II do Instituto de Química da UNESP-AQA. As amostras foram analisadas com ajuda do técnico Nivaldo Boralle, responsável pelo equipamento. Primeiramente, precipitaram-se as amostras segundo o protocolo já descrito. As amostras foram ressuspensas em clorofórmio e liofilizadas durante 24 h. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em DMSO de alta pureza (DMSO deuterizado) para então

execução das análises. Os resultados espectrais foram analisados em colaboração com a Profa. Dra. Eliane Trovatti.

- **Ensaaios celulares in vitro**

- Exposição às proteínas extraídas do biofilme de *C. albicans*
- *Ensaio de viabilidade celular através da metodologia de Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT)*

Primeiramente, as células DOK, SCC-25 e Detroit 562 foram cultivadas, recolhidas e contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 4×10^4 células por poço, em placas de 24 poços (Falcon; Durham; Carolina do Norte; Estados Unidos; Cód.:353072), com o meio correspondente suplementado com 5% v/v de soro fetal bovino. Após 24 h, o meio foi trocado por meio de crescimento basal de queratinócito (KBM de *Keratinocyte Basal Growth Medium*; Lonza; Basileia; Suíça; Cód.: 00192151) suplementado com epinefrina; hidrocortisona; transferrina; insulina; gentamicina (Lonza; Basileia; Suíça; Cód.: 00192152) por 24 h. No caso da linhagem celular THP-1, as células foram cultivadas em RMPI-1640 suplementado com β -mercaptoetanol (0,05 mM), recolhidas e contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço. Finalmente foram adicionadas as proteínas nas células, nas proporções de 10% e 1% e 0,1% v/v seguindo a distribuição apresentada na figura 9.

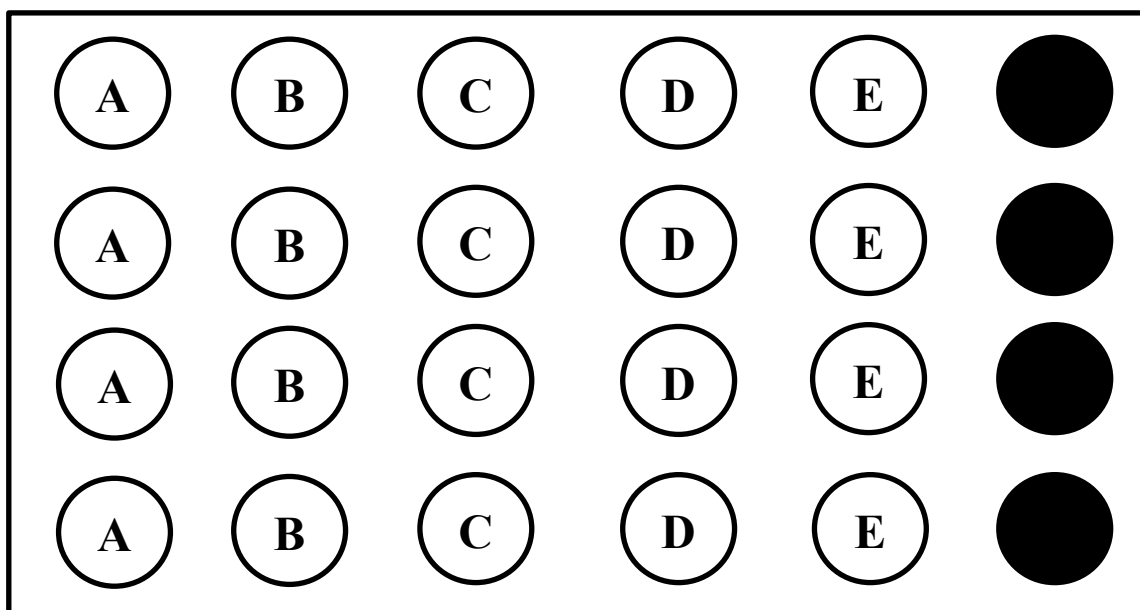


Figura 9. Distribuição dos ensaios de MTT com proteínas do biofilme de 36 h de *C. albicans*. Os ensaios foram realizados nas linhagens THP-1, DOK, SCC-25 e Detroit 562. Foram utilizadas 3 concentrações diferentes de proteínas: 10%, 1% e 0,1% v/v. A: Controle Vivo; B: Controle do veículo; C: Proteínas 10% v/v; D: Proteínas 1% v/v; E: Proteínas 0,1% v/v. **Fonte:** Autoria Própria.

As células foram mantidas em contato com as proteínas por 24 h. Após o tempo indicado, adicionou-se o reagente de MTT ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dissolvido em RPMI 1640 sem fenol por 4 h (DE CARVALHO DIAS; BARBUGLI; DE PATTO; LORDELLO *et al.*, 2017). Os cristais de MTT formados foram solubilizados com 2-propanol P.A sob agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas ELISA (EZ Read 400 Microplate reader, BioChrom e Software Adap 2,0 Biocrom) em 562 nm.

- Exposição aos lipídeos extraídos do biofilme de *C. albicans*
- *Determinação das concentrações de trabalho para os lipídeos de *C. albicans*.*

Os ensaios foram realizados como reagente Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: M2128). Primeiramente, as células foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 até a 3ª passagem. As células foram recolhidas e contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 4×10^4 células por poço em placas de 24 poços (Falcon; Durham; Carolina do Norte; Estados Unidos; Cód.:353072) com o meio correspondente, suplementado com 5% v/v de soro fetal

bovino. As células foram incubadas por 24 h na presença dos lipídeos de *C. albicans* seguindo as concentrações resumidas no quadro 4.

Quadro 4. Concentrações de lipídeos do secretoma de *C. albicans* testados em células.

Concentrações	Porcentagem
C1	2%
C2	1%
C3	0,5%
C4	0,25%
C5	0,125%
C6	0,063%
C7	0,031%
C8	0,016%
C9	0,008%
C10	0,004%

Fonte. Autoria Própria.

- *Ensaio de viabilidade celular através da metodologia de Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio (MTT).*

Os ensaios foram realizados como reagente MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: M2128). Primeiramente, as células foram cultivadas no meio correspondente ao tipo celular em garrafas de 75 cm² até a 3^{ra} passagem. As células foram recolhidas e contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 4 x 10⁴ células por poço em placas de 24 poços (Falcon; Durham; Carolina do Norte; Estados Unidos; Cód.:353072) com o meio correspondente, suplementado com 5% v/v de soro fetal bovino. Após 24 h, o meio foi trocado por meio de crescimento basal de queratinócito (KBM de

Keratinocyte Basal Growth Medium; Lonza; Basileia; Suíça; Cód.: 00192151) sem soro fetal bovino, suplementado com epinefrina; hidrocortisona; transferrina; insulina; gentamicina (Lonza; Basileia; Suíça; Cód.: 00192152) e soro albumina bovina livre de ácido graxo – *BSA fatty acid free* (Sigma-Aldrich; Saint Louis; Missouri; Estados Unidos; Cód.: A8806). As células foram incubadas por 24 h na presença dos lipídeos de *C. albicans* (1% e 2% v/v). O BSA é fundamental para o transporte de lipídeos do meio externo para o interior das células. No caso da linhagem celular THP-1, as células foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado com β -mercaptoetanol (0,05 mM) e 10% v/v de soro fetal bovino em garrafas de 75 cm² até a 3^{ra} passagem. As células foram recolhidas e contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços (Falcon; Durham; Carolina do Norte; Estados Unidos; Cód.:353072). As células foram incubadas por 24 h na presença dos lipídeos de *C. albicans* (1% e 2% v/v). Os lipídeos e os veículos (etanol 1% e 2% v/v) foram adicionados de acordo com a distribuição apresentada na figura 10.

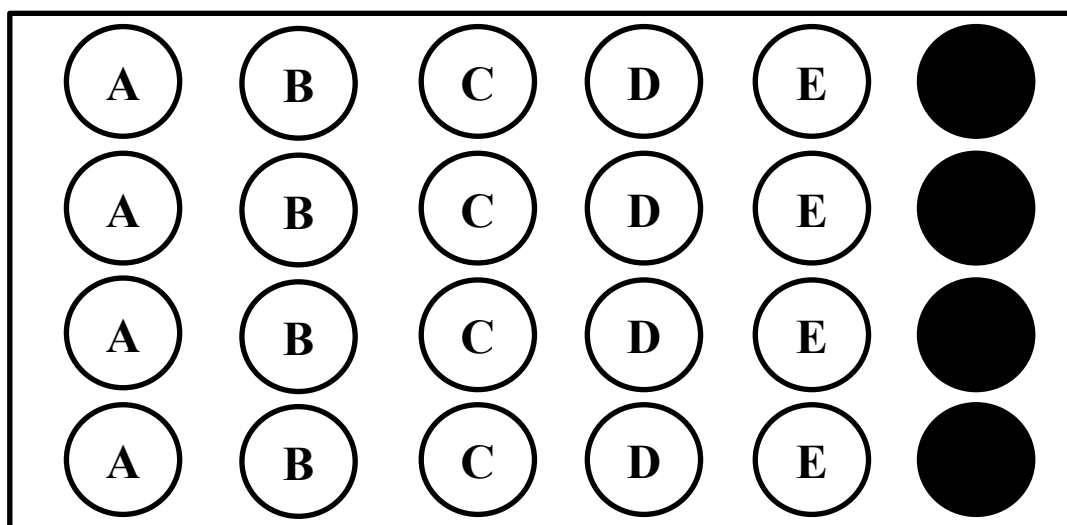


Figura 10. Distribuição dos ensaios de MTT com lipídeos do biofilme de 36 h de *C. albicans*. Os ensaios foram realizados nas linhagens celulares THP-1, DOK, SCC-25 e Detroit 562. As células foram mantidas em meio RPMI ou KBM, suplementados com BSA, foram adicionados os lipídeos em duas concentrações: 2% e 1% v/v. A: Controle Vivo; B: Controle com veículo 2% v/v; C: Lipídeos 2% v/v; D: Controle com veículo 1% v/v; E: Lipídeos 1% v/v; **Fonte:** Autoria Própria.

As células foram mantidas em contato com os lipídeos por 24 h. Após o tempo indicado, o meio de cultivo foi removido, adicionando-se o reagente de MTT ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dissolvido em RPMI 1640 sem fenol por 4 h (DE CARVALHO DIAS; BARBUGLI; DE PATTO;

LORDELLO *et al.*, 2017). Os cristais de MTT formados foram solubilizados com 2-propanol P.A sob agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas ELISA (EZ Read 400 Microplate reader, BioChrom e Software Adap 2,0 Biocrom) em 562 nm.

▪ *Ensaio de metabolismo celular por Alamar Blue em presença de Camptotecina (CPT)*

Esta metodologia foi empregada para verificar as taxas de crescimento celular após 72 h de exposição aos lipídeos extraídos do biofilme de *C. albicans*, assim como analisar um grupo “desafio” na presença de CPT. A CPT é um alcaloide com atividade anti-tumoral robusta que atua como um potente inibidor de Topoisomerase I, além de ser uma molécula fluorescente (405 nm) e muito hidrofóbica (HERTZBERG; CARANFA; HECHT, 1989). Estes experimentos foram realizados apenas para as células displásicas e neoplásicas – DOK, SCC-25 e Detroit 562. Inicialmente foram obtidas as culturas de células segundo o protocolo já estabelecido, semeando 1×10^5 células por poço, seguindo com a exposição aos lipídeos de *C. albicans* (2% v/v) até o tempo de 72 h. Após as 72 h; realizou-se a troca do meio de cultivo por KBM “fresco” e adicionou-se 5 μ L de CPT ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich; Saint Louis; Missouri; Estados Unidos, Cód.: C9911); como controle de veículo, 5 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO de *Dimethyl Sulfoxide*; Sigma-Aldrich; Saint Louis; Missouri; Estados Unidos; Cód.: D5879); a placa foi incubada por 4 h a 37°C e 5% de CO₂ (figura 11).

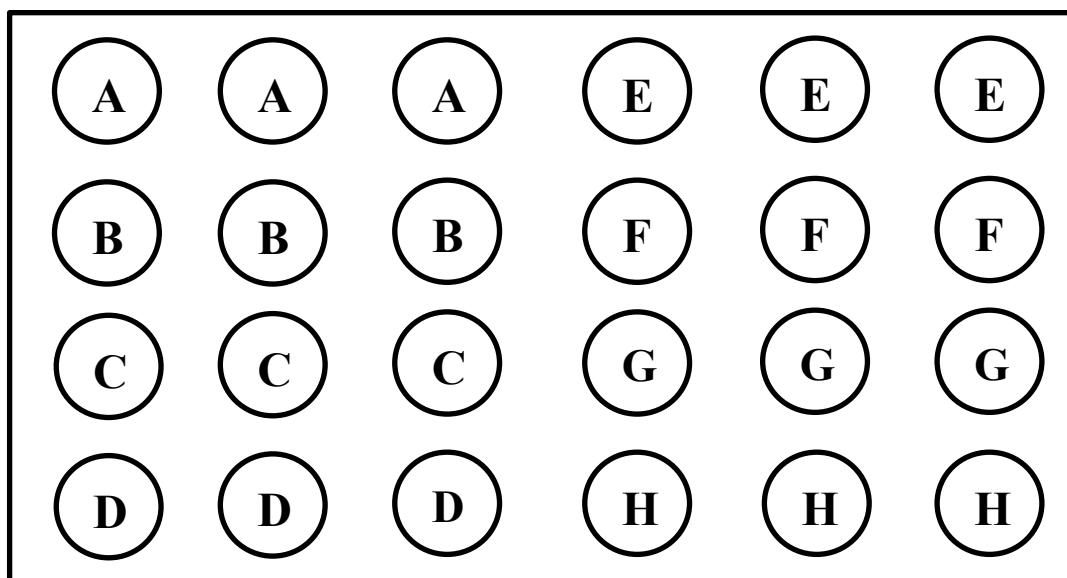


Figura 11. Distribuição dos ensaios de Alamar Blue com lipídeos provenientes do biofilme de 36 h de *C. albicans*; desafio com CPT. As células DOK, SCC-25 e Detroit 562 foram “desafiadas” a CPT ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Previamente as células foram cultivadas com lipídeos extraídos de biofilme de *C. albicans* de 36 h. A: Controle Vivo; B: Controle Morte; C: Lipídeos 2% v/v; D: Etanol 2% v/v; E: Lipídeos 2% v/v + CPT; F: Etanol 2% v/v + DMSO; G: CPT; H: DMSO; **Fonte:** Autoria Própria.

Após o tempo estabelecido foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado o meio específico das células com 10% v/v de soro, suplementado com 100 μL de Alamar Blue (10% v/v; Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos, Cód.: DAL1100) em cada poço. As placas foram incubadas por 4 h. A leitura de fluorescência foi feita no equipamento Fluoroskan Ascent FL (Thermo-Scientific) com filtro de excitação em 545 nm e de emissão em 590 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas e em duas ocasiões distintas.

▪ *Formação de Lipid Droplets através da marcação com Nile Red*

Primeiramente, foram obtidas as culturas de células segundo o protocolo já estabelecido, seguindo a exposição aos lipídeos por 72 h. Estes experimentos foram realizados apenas para as células displásicas e neoplásicas – DOK, SCC-25 e Detroit 562. Para obter a solução estoque de *Nile Red* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, Cód.: 72485) diluiu-se 1 mL de Nile Red ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em acetona PA. As células foram lavadas com PBS 1X. Foi adicionado 1 mL de PBS 1X em cada poço e 1 μL de *Nile Red*. As células foram incubadas por 10 min no escuro; após a incubação as células foram lavadas com PBS 1X. A leitura foi feita em Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 800, com AiryScan, com auxílio do Software Zen Blue 2.3, utilizando-se o laser em 488 nm com detecção de 488 à 530 nm para os lipídeos não polares (neutros) e detecção de 620 à 700 nm para os lipídeos polares. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

▪ *Internalização (uptake) de CPT e ensaios de co-localização com Nile Red*

Seguindo-se o mesmo protocolo descrito nos ensaios de Alamar Blue, após 72 h de cultivo com lipídeos 2% v:v provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h; ou etanol 2% v:v, as células foram tratadas por mais 4 h com CPT. Ao final desta etapa, as células DOK e SCC-25 foram lavadas com PBS 1X e meio novo foi adicionado em cada poço. As microscopias dos ensaios de CPT em presença ou ausência dos lipídeos de *C. albicans* foram realizadas com o microscópio CLSM Carl Zeiss LSM 800. Os parâmetros utilizados foram: detector de campo claro (ESID) e laser de 405 nm com emissão até 450 nm para a detecção da CPT; o laser 488 nm seguindo o protocolo já utilizado para observação da fluorescência de *Nile Red*. Os experimentos foram realizados em duplicata.

- **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk). Considerados normais, os dados foram submetidos à análise estatística através do teste de análise de variância de um fator (ANOVA *one-way*) com pós-teste de Tukey. Os dados não-normais foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Aplicou-se o test *t-Student* para amostras não pareadas em grupos experimentais iguais a dois. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 9 (GRAPHPAD, 2020) com nível de significância de 5%.

III. Resultados

- **Padronização do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* de 36 h.**

- Estabelecimento de curva de crescimento e determinação do tempo de formação do biofilme.

Nestes experimentos foram feitas as curvas de crescimento mediante a técnica de Alamar Blue. Esta curva permitiu estabelecer o tempo de cultura e a dinâmica de formação do biofilme, a fim de se determinar a fase de platô, ou maturação da cultura. Na figura 12 pode-se observar a curva a qual foi realizada em três ocasiões distintas. Foram utilizados biofilmes suplementados com fluconazol (FCZ; $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) como “controle de interferência” de crescimento. Pode-se descrever que a fase logarítmica da cultura começa a partir das 3 h de crescimento e se estende até 8 h. A partir de 8 h começa o platô (fase estacionária) que também define, em hipótese, o amadurecimento do biofilme, no qual, provavelmente começará a produção dos metabólitos secundários alvos do estudo. As 36 h foram determinadas como “limite de cultivo” a fim de evitar a presença de muitas células mortas no biofilme maduro.

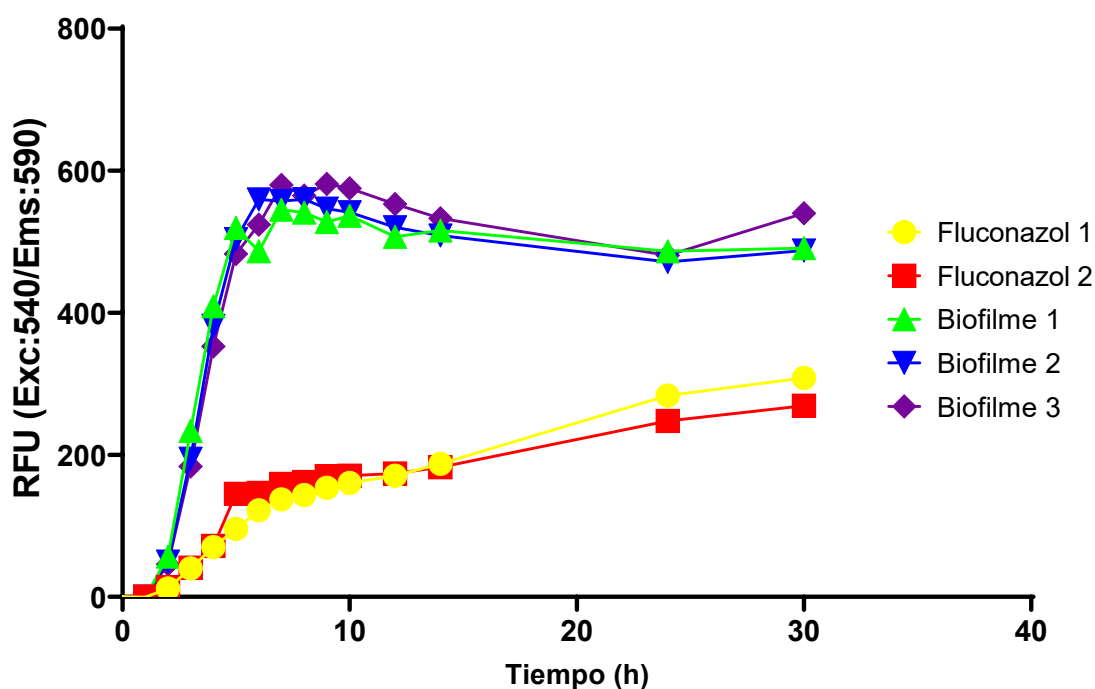


Figura 12. Curva de crescimento do biofilme de *C. albicans* (0/30 h). A curva de crescimento foi realizada mediante quantificação de RFU. A cultura foi realizada em placas de 6 poços e mantida por 30 h. O biofilme foi mantido em meio RPMI 1640, a 37°C e 55 rpm. Para realização da curva foi adicionado Alamar Blue (2,5% v/v). **Fonte:** Autoria Própria.

○ Padronização dos valores de contagens dos biofilmes de *C. albicans*.

As contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas para caracterizar o biofilme formado após 36 h de crescimento. Conforme descrito em métodos, foram usadas as técnicas de contagem em câmara de Neubauer (diluição) e plaqueamento (em placa de Petri) para realizar uma corroboração e validação dos dados; apresentados na figura 13. Os valores de contagens foram padronizados, assumindo-se aceitáveis as faixas de contagens de 10^7 até 10^8 como padrão de qualidade para o crescimento dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

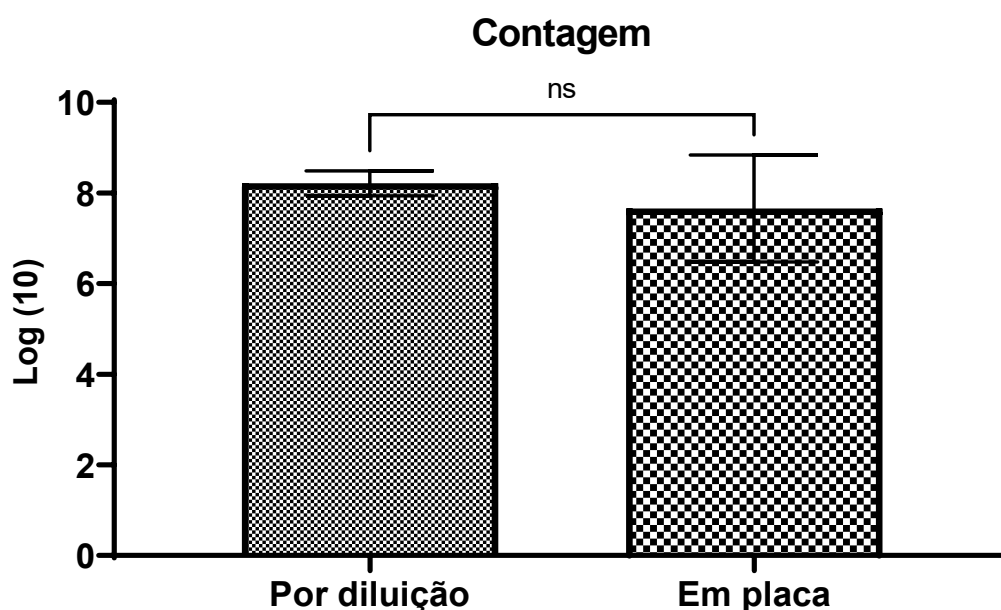


Figura 13. Comparação dos dados de UFC*mL⁻¹ obtidos por duas técnicas de contagem distintas. As contagens das UFC*mL⁻¹ foram realizadas com dois métodos diferentes: contagem por diluição e contagem em placa. Para realização da contagem por diluição, foi tomada uma amostra de 1 mL e foram feitas diluições seriadas. Para realização da contagem em placa, 10 µL de inóculo foi semeado em placa de Petri com SDA, incubada por 24 h. Dados apresentados em forma de logaritmo de base 10; ns = sem diferença estatística. $p \geq 0,5$. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Determinação de biomassa do biofilme de *C. albicans* de 36 h.

Para realizar a quantificação da biomassa, realizou-se o ensaio de Cristal Violeta. Foram utilizados biofilmes suplementados com FCZ (100 µg*mL⁻¹) como “controle de interferência” na formação de biomassa. Neste experimento foi possível determinar que os biofilmes da *C. albicans* de 36 h deveriam apresentar mensurações de biomassa valores de absorbâncias mínimos de 1,09 e máximos de 1,81, com média de $1,31 \pm 0,185$. Na figura 14 é possível observar a diferença de crescimento entre o biofilme em ótimas condições de cultivo e o biofilme que sofreu interferência no desenvolvimento. Este experimento foi realizado em triplicata.

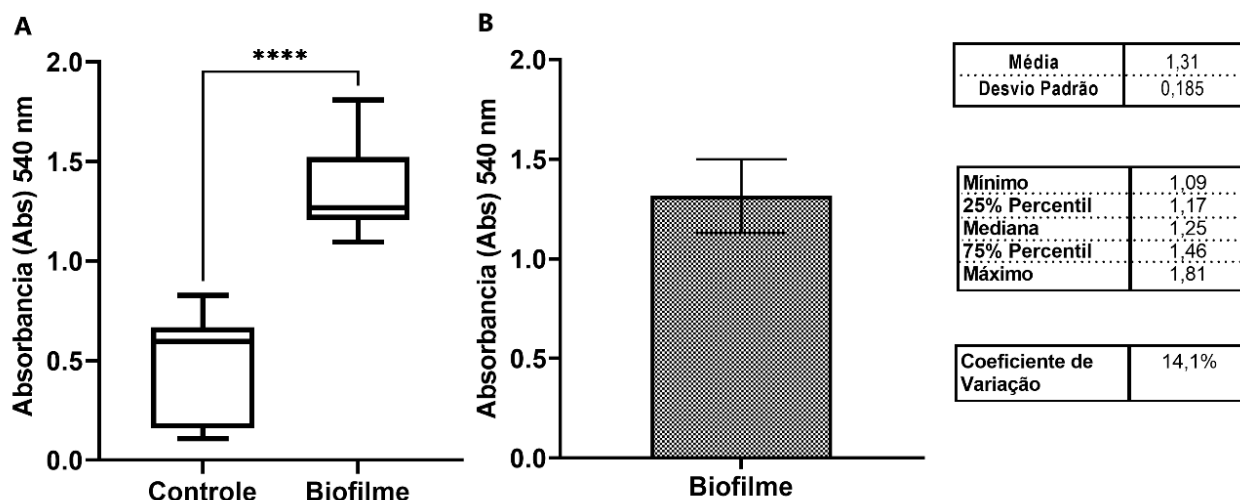


Figura 14. Comparações das médias obtidas no ensaio com Cristal Violeta. O ensaio de cristal violeta foi realizado para quantificação de biomassa. Para a realização do ensaio o biofilme foi crescido durante 36 h a 37°C e 55 rpm. Após o tempo de crescimento, foi adicionado 0,02% v/v de cristal violeta e realizada a mensuração em leitor de placas em 540 nm. A. Comparação de biomassa produzida pelo biofilme após 36 h de cultura em comparação com FCZ (controle de interferência); B. Dados estatísticos. ****p < 0,0001. **Fonte:** Autoria Própria.

○ Marcações de “vivo/morto” e determinação de espessura do biofilme de *C. albicans* de 36 h.

A marcação com Syto9 e Iodeto de propídeo (PI), com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, foi utilizada com os objetivos de: determinar a prevalência de células viáveis (vivas) ou não (mortas) no biofilme desenvolvido, assim como determinar a espessura média das culturas. Foram utilizados biofilmes suplementados com FCZ ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) como “controle de interferência” de viabilidade. Na figura 15 pode-se observar a imagem obtida no microscópio confocal do biofilme marcado. Nesta imagem é apresentado o “controle de interferência”, o qual apresenta cor amarelada, produto da dupla marcação com Syto 9 (verde) e com do PI (vermelho), demonstrando que nestas condições muitas células apresentam-se com danos de integridade das membranas e portanto permeáveis a ambos os macadores (fig. 15.A), conforme esperado. Também podem ser observados espaços sem marcação, demonstrando a ausência de células nesses pontos. A espessura obtida neste biofilme foi de $51.88 \mu\text{m}$. Na figura 15.B está apresentada a marcação de um biofilme padrão de 36 h. Este biofilme formado apresenta padrão “íntegro” em que pode-se observar o predomínio de marcação verde. A quantidade de biomassa medida pela espessura neste biofilme foi de $121.88 \mu\text{m}$. Estas imagens corroboram e ilustram os dados quantitativos de Cristal Violeta.

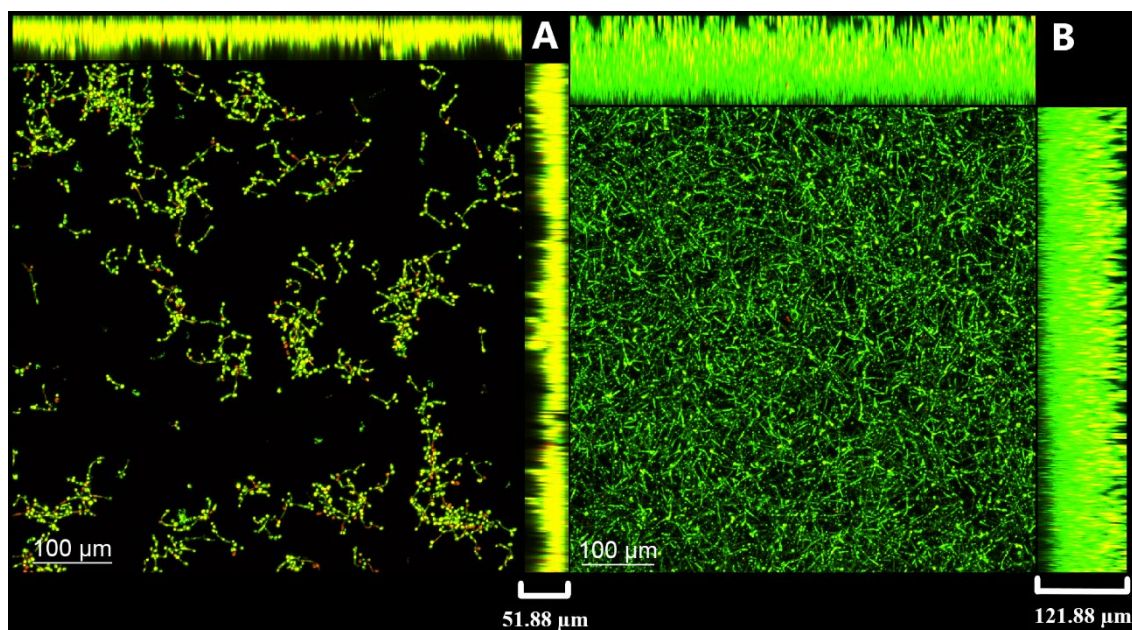


Figura 15. Padrão de marcação com Syto9/PI por microscopia confocal em biofilme de *C. albicans* de 36 h. A marcação com Syto9/PI foi realizada no biofilme após 36 h de formação. Para a marcação foi utilizado o kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability. Foram obtidas espessuras de 51,88 µm no biofilme tratado com FCZ e 121,88 µm no biofilme maduro A. Biofilme com FCZ (controle de interferência); B. Biofilme padrão. **Fonte:** Autoria Própria.

- Determinação de atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h por marcação com FUN1

A última etapa da padronização do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* de 36 h teve como objetivo analisar a atividade metabólica das culturas através da marcação com FUN1, por Microscopia Confocal. Através deste ensaio, pode-se determinar a fase de desenvolvimento do biofilme. A figura 16 ilustra a atividade metabólica do biofilme maduro de 36 h em comparação com o biofilme tratado com FCZ (controle de interferência) [$100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]. Nesta microscopia foi possível verificar um predomínio de coloração verde, indicando células do biofilme com membranas intactas, porém com atividade metabólica baixa. Alguns pontos com vesículas vermelho-alaranjadas demonstram células metabolicamente ativas (figura 16).

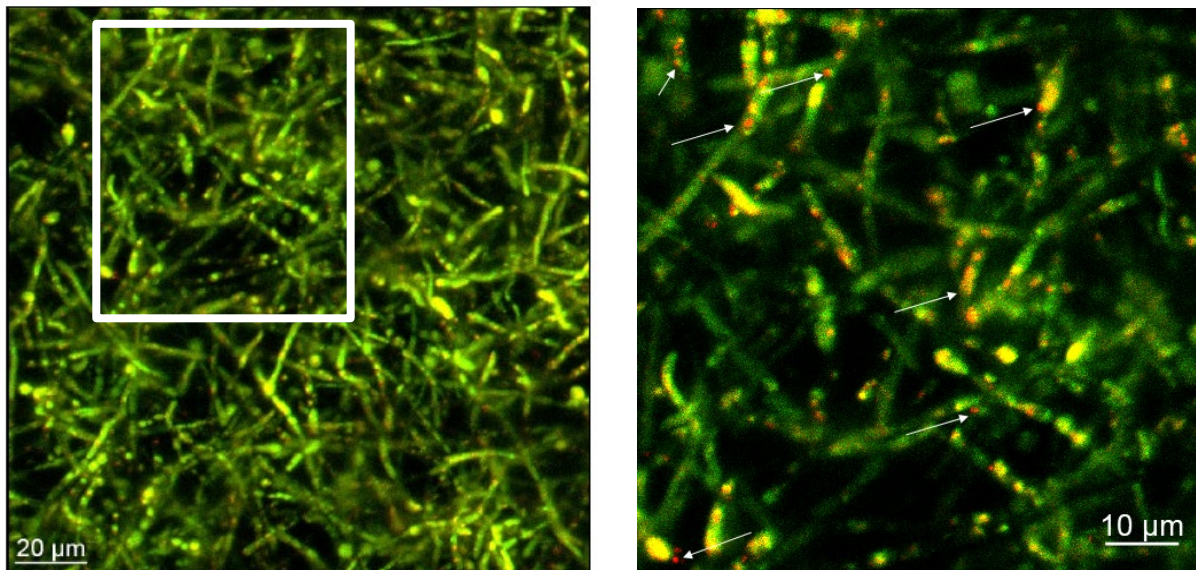


Figura 16. Imagem da microscopia confocal da marcação com FUN1 (atividade metabólica). A marcação com FUN1 foi realizada no biofilme após 36 h de formação. Para a marcação foi utilizado o kit FUN®1 *cell stain*. A marcação foi realizada para ilustrar a atividade metabólica. Observa-se a presença de vesículas vermelhas, evidenciando células metabolicamente ativas no biofilme, além da marcação em verde demonstrando que as membranas intactas, porém com metabolismo mais baixo. Biofilme com 36 h de formação e zoom da área destaque no quadrado branco (setas indicam as vesículas vermelhas). **Fonte:** Autoria Própria.

- **Marcação de moléculas de interesse nos biofilmes de *C. albicans*: PROTEÍNAS**
 - Determinação da presença de proteínas no biofilme de *C. albicans* mediante a marcação com *Sypro Ruby*.

A marcação de proteínas foi realizada com *Sypro Ruby*. Este marcador evidencia qualquer tipo de molécula proteica presente nas amostras; independentemente de estarem ligadas a outros grupamentos químicos ou não. Na figura 17 pode-se observar o resultado da marcação (laranja), ilustrando a presença de proteínas no biofilme.

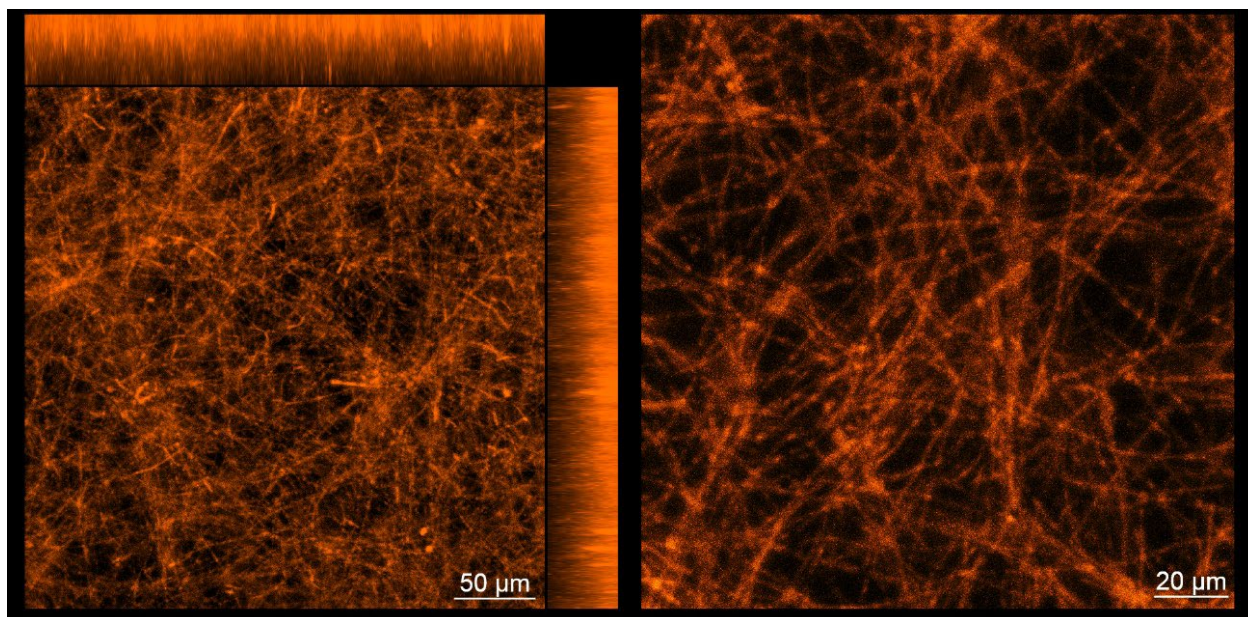


Figura 17. Marcação do biofilme de *C. albicans* de 36 h com *Sypro Ruby*. A marcação com *Sypro Ruby* permite visualizar glicoproteínas; fosfoproteínas e lipoproteínas presentes tanto na parede como nas hifas e na ECM. **Fonte:** Autoria Própria.

- **Quantificação, identificação e atividade das proteínas extraídas do secretoma dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h.**

Segundo metodologia descrita, a precipitação das proteínas foi feita com acetona em baixa temperatura (-20°C). Foram dosadas em média $48,8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteínas extraídas em 3 ocasiões distintas como demonstrado no quadro 4, com valores mínimos de $32,36\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e máximos de $73,14\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; com um desvio padrão de $\pm 15,82$ (quadro 5). As extrações subsequentes seguiram os parâmetros estabelecidos. Adicionalmente às quantificações, realizaram-se ensaios para medir a atividade proteásica do *pool* de proteínas extraídas; para o qual foi usado o kit *EnzChek Protease C assay* (Molecular Probes). Este ensaio foi realizado com o objetivo de se constatar indiretamente, a preservação da atividade proteica do *pool* obtido, validando a metodologia quanto à capacidade de preservar a atividade enzimática da amostra, sendo este um bom indicativo de qualidade do método.

Quadro 5. Quantificações do *pool* de proteínas (proteínas totais em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e quantificação de atividade enzimática do *pool* em função do tempo.

	Proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Atividade Protease (BAEE)	
		1 h	24 h
1ª extração	34,541	443,55	6468,89
	73,14		
2ª extração	43,11	1447	6831,88
	32,36		
3ª extração	61,15	1698	6576,07
	48,51		

Fonte. Autoria Própria.

Quadro 6. Estatística descritiva das quantificações e atividade enzimática do *pool* de proteínas extraídas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

	Proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Atividade Protease (BAEE)	
		1 h	24 h
Média	48,80	1196,18	6625,61
Desvio Padrão	15,82	663,77	186,50
Mínimo	32,36	443,55	6468,89
25% Percentil	36,68	945,28	6522,48
Mediana	45,81	1447	6576,07
75% Percentil	57,99	1572,50	6703,98
Máximo	73,14	1698	6831,88
Coefficiente de Variação	32,41%	55,49%	2,81%

Fonte. Autoria Própria.

○ Identificação das proteínas isoladas do secretoma de biofilmes de *C. albicans*.

Inicialmente as proteínas foram identificadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-Page), segundo o procedimento de Laemmli (1970). A figura 18 permite observar um dos géis depois da marcação com nitrato de prata, onde podem ser identificadas bandas de interesse, especialmente nos pesos de 70; 55 e 40 kDa.

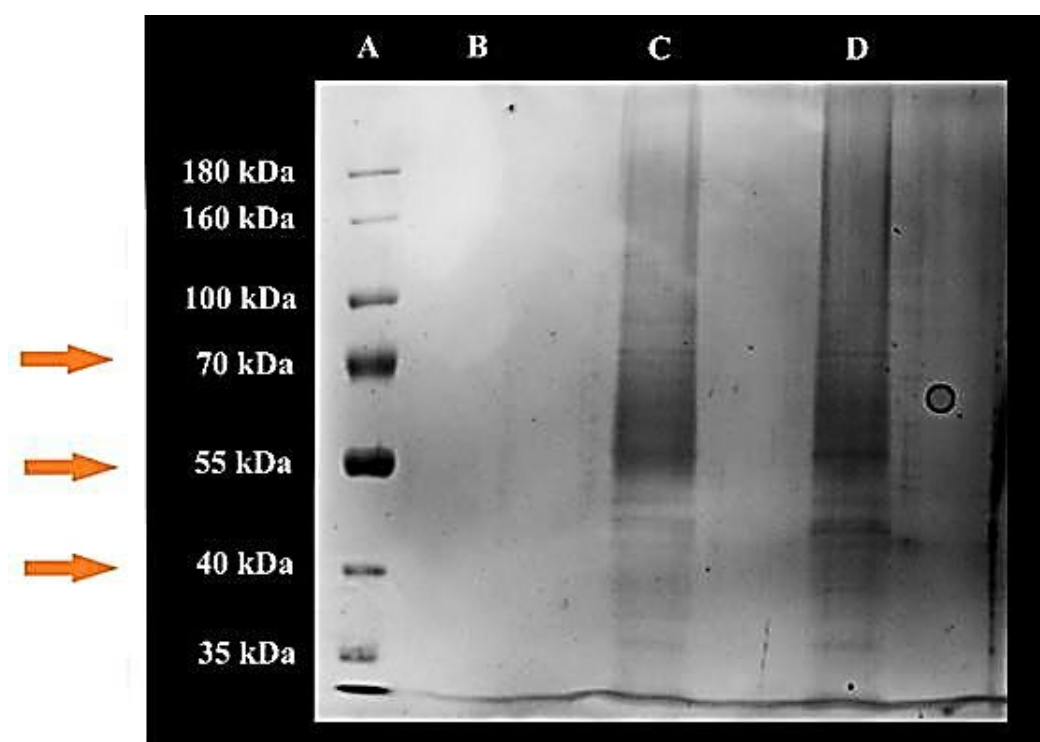


Figura 18. Gel marcado com nitrato de prata após eletroforese em condições denaturantes. SDS-Page para estabelecer um perfil de proteínas extraídas do secretoma de biofilme de *C. albicans* de 36 h. Utilizou-se gel de 12%, com corrida de empacotamento por 15 min a 100 mV, e uma corrida de separação por 30 min a 300 mV. As amostras carregadas (*pool* das proteínas extraídas previamente). Nota-se uma maior quantidade de bandas entre os 40 e 70 kDa. A. Marcador de peso em kDa; B. Controle sem proteína; C e D são duplicatas do *pool*. Destacadas na imagem (setas em laranja) as frações de 70 kDa; 55 kDa e os 45 kDa. **Fonte:** Autoria Própria.

O *pool* de proteínas precipitadas foi enviado para análise por Espectrometria de Massas, na qual foram identificadas 114 proteínas. Os dados foram interpretados no programa MASCOT definido para *Candida albicans* SC5314. As proteínas resultantes das análises de Espectroscopia de Massas, estão listadas no quadro 7.

Quadro 7. Proteínas identificadas mediante Espectrometria de Massas.

	Nome	Gene	Nº Acessão UniProt	Massa (Da)
1	Tos1p	TOS1	A0A1D8PJA8	49770
2	Citrato sintetase	CIT1	A0A1D8PSH3	51969
3	Enolase 1	ENO1	P30575	47071
4	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase	TDH3	Q5ADM7	35925
5	COI1p	COI1	Q5A799	21680
6	Proteína não identificada	orf19.3499	A0A1D8PPT3	18318
7	Cofilin	COF1	A0A1D8PMW6	15899
8	1, 3 β gliconasiltransferase	PHR1	Q9P8J6	60275
9	ATP sintetase (subunidade Beta)	ATP2	A0A1D8PKZ9	53966
10	Mdg1p	MDG1	A0A1D8PFV7	70539
11	Proteína de união de lipídio	PIL1	A0A1D8PDD1	34540
12	Proteína de união de lipídio	LSP1	Q59KV8	35569
13	ATPase de Membrana Plasmática	PMA1	A0A1D8PJ01	98161
14	Malato Desidrogenase	MDH1-1	Q5AMP4	34821
15	Krep9p	KRE9	Q5ANN9	29268
16	Ecm33p	ECM33	A0A1D8PCY4	43798
17	Transaldolase	TAL1	Q5A017	35821
18	Mlc1p	MLC1	A0A1D8PSE1	15986
19	BiP chaperona do retículo endoplasmático (Família das Hsp70)	KAR2	A0A1D8PG96	74573
20	Isomerase disulfeto	PDI1	A0A1D8PR99	63210
21	Endo 1, 3 beta D glucanase	SCW11	A0A1D8PNW1	54692
22	Proteína Ribosomal 40S S21	RPS21B	A0A1D8PCG7	9690
23	Proteína Ribosomal 40S S5	RPS5	Q5AG43	25382
24	Lisina tRNA Ligasse	KRS1	Q5ADU2	68064
25	Proteína não caracterizada	orf19.3475	A0A1D8PPV6	19641
26	6 fosfogluconase Desidrogenase	GND1	A0A1D8PFS4	54625
27	Asm3p	ASM3	Q5ABD3	82959
28	Isocitrato desidrogenase (NADP)	IDP2	A0A1D8PS79	46340
29	Ubiquitina Ligasse	UBI3	Q5A109	22840

30	Msb2p	MSB2	A0A1D8PGF8	141059
31	Lysofosfolipase	PLB3	A0A1D8PU17	70186
32	Aldeído desidrogenase (NAD(P)+)	ALD5	A0A1D8PGT5	54262
33	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	PCK1	A0A1D8PRM7	61567
34	Asr3p	ASR3	A0A1D8PH00	13004
35	Cadeia leve da Clatrina	CLC1	Q5AMQ2	25971
36	Proteinase A	APR1	Q59U59	45647
37	Acetil coenzima A sintetase	ACS1	Q59XW4	75265
38	Op4p	OP4	A0A1D8PFJ9	41480
39	Hsp12p	HSP12	A0A1D8PNC7	13317
40	Nucleosídeo difosfato quinasse	YNK1	Q5AG68	16937
41	Crd2p	CRD2	A0A1D8PL78	8426
42	Transquetolase	TKL1	Q5A750	73840
43	S-Adenosilmetionina sintetase	SAM2	A0A1D8PF68	42448
44	RRM *Domínio	orf19.3932	Q5AK88	30321
45	Piruvato desidrogenase E1	PDB1	Q5A5V6	41553
46	Slk19p	SLK19	Q5ADT0	133948
47	Tioredoxin redutase	TRR1	Q5AG89	34946
48	Hsp90 cochaperona	STI1	A0A1D8PN90	66137
49	Trifuncional aldeído redutase/xilose redutase/glicose 1-dehidrogenase (NADP(+))	GRE3	A0A1D8PNK3	42585
50	Actina	ACT1	A0A1D8PFR4	41940
51	ATPase Hp70	SSB1	Q5A397	66580
52	Transportar de ácido grasso de cadeia longa	ACB1	A0A1D8PQN3	9895
53	Isocitrato liasse	ICL1	Q59RB8	61554
54	Transportador de prótons no ciclo de ATP	VMA4	A0A1D8PS38	25372
55	Adh1p	ADH1	A0A1D8PP43	37285
56	ATPase AAA	CDC48	Q59WG3	91220
57	Transportador de Amônio/acetato	FRP3	A0A1D8PHP8	30986
58	Bifuncional cisteína sintetase/O- acetilhomoserina aminocarboxypropil transferase	MET15	Q59US5	47959

59	Subunidade Ribossomal 60S L12A	RPL12	Q5AJF7	17809
60	Tioredoxina Peroxidasa	AHP1	Q5AF44	19360
61	Dihidrolipoil desidrogenase	LPD1	Q59RQ6	53052
62	Tom20p	TOM20	Q5AIA0	19059
63	SUMO família proteica	SMT3	Q59W54	11199
64	Dismutase Superóxido	SOD3	A0A1D8PQH5	22720
65	Metalochaperona de cobre	COX17	A0A1D8PGA3	7350
66	S-(hidroximetil)glutathione desidrogenase	FDH3	A0A1D8PU61	41473
67	Citocromo C oxidase	orf19.1082.1	A0A1D8PQD5	9929
68	Ornitina Aminotransferase	CAR2	A0A1D8PL14	47719
69	Inibidor de endopeptidase	orf19.2769	Q5AF37	13677
70	Tioredoxina	TRX1	A0A1D8PU69	11594
71	Proteína Ribossomal 60S L6	RPL6	A0A1D8PCX8	19751
72	Regulador Transcricional	SPT3	A0A1D8PU74	38275
73	Proteína não caracterizada	orf19.5201.1	A0A1D8PD97	9591
74	Cip1p	CIP1	A0A1D8PPI6	33017
75	Proteína de clivagem de glicina	GCV3	Q5AKX1	20041
76	Alfa manosidase	AMS1	Q5AF38	132087
77	Pbr1p	PBR1	Q5AAN7	19628
78	Calmodulina	CMD1	A0A1D8PMF8	16468
79	Proteína contadora do domínio SBDS	orf19.1862	Q59U89	13131
80	Factor de Elongação na tradução	EFB1	A0A1D8PM35	23465
81	Sbp1p	SBP1	Q5ANP6	31943
82	Subunidade Ribossomal 60S L11B	RPL11	A0A1D8PHW1	19868
83	Proteína de Biossínteses de Piridoxina	SNZ1	Q5AIA6	32158
84	Slp2p	SLA2	A0A1D8PRF5	121231
85	Tip20p	TIP20	A0A1D8PP62	91272
86	Proteína não caracterizada	orf19.6160	A0A1D8PJ10	89559
87	Glucose 6 fosfato 1 epimerase	orf19.1946	Q5A1Q0	33892
88	5'-3' exoribonuclease 1	KEM1	A0A1D8PFP3	172971
89	Acetyltransferase do complexo de piruvato desidrogenase	LAT1	Q5AGX8	50145

90	2,5-diamino-6-(Ribosilamino) - 4(3H) -pirimidinone 5'-fosfate redutase	orf19.6341	A0A1D8PFH0	34101
91	Proteína não caracterizada	orf19.2296	A0A1D8PF42	264420
92	Endonuclease sem nome	orf19.4835	Q5APD0	59758
93	B30.2 SPRY	orf19.7193	A0A1D8PRG7	75911
94	ERCC4 *Domínio	orf19.3648	A0A1D8PPF7	66416
95	Acetil Coenzima A C-acetyltransferase	ERG10	A0A1D8PH52	42308
96	Subunidade da translocase de importação intracelular TIM10	TIM10	A0A1D8PLH1	10292
97	Proteína carregadora de ADP/ATP	PET9	Q5A516	32905
98	Cfl2p	CFL2	A0A1D8PME3	83884
99	Rdi1p	RDI1	Q5AND4	22948
100	Proteína ligadora de Ubiquitina	CUE5	A0A1D8PDI5	47990
101	Proteína não caracterizada	orf19.4906	A0A1D8PEU9	78912
102	PALP *Domínio	orf19.7152	A0A1D8PRJ1	39482
103	Septina	CDC3	A0A1D8PD83	49030
104	HABP4-PAI-RBP1 *Domínio	orf19.5943.1	A0A1D8PK71	29055
105	Proteína de união ao GTP	GTR1	A0A1D8PI64	41244
106	Proteína não caracterizada	orf19.2125	A0A1D8PQE6	17382
107	Whl1p	WH11	A0A1D8PHF8	6991
108	Glucose 6 Fosfato 1 desidrogenase	ZWF1	A0A1D8PEG2	58424
109	Proteína de Homeostases de esfingolipídeos	ORM1	Q5A8J7	29756
110	Proteína não caracterizada	orf19.1240	A0A1D8PMC0	316006
111	tRNA Ligasse de Fenilalanina	MSF1	Q5AD28	52946
112	BROMO *Domínio	orf19.3949	A0A1D8PP04	148764
113	Cobre - fosfato carreador	orf19.1395	Q59YD1	36556
114	Glutamato desidrogenasa específica de NAD	GDH2	A0A1D8PI00	120113

Fonte. Autoria Própria.

Entre as proteínas obtidas, uma (1) delas está classificada ainda como não identificada (Nº: 6; destacada em vermelho no Quadro 6); e outras sete (7) proteínas ainda não caracterizadas (Nº: 25; 73; 86; 91; 101; 106 e 110; destacadas em azul no Quadro 6), mas com funções supostamente ortólogas, identificadas com base nas informações do UniProt; e comparadas com bases de dados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Quadro 8. Funções das proteínas identificadas no Quadro 7 via *Candida Genome Database* (SKRZYPEK; BINKLEY; BINKLEY; MIYASATO et al., 2004).

Proteínas associadas à parede celular.	
Proteína	Função
ACT1	Remodelação e produção das cadeias de Actina.
ADH1	Álcool desidrogenase.
AHP1	Alquil hidroperóxido redutase.
CDC3	Septina necessária para a formação de hifas e a viabilidade.
ECM33	Proteína ancorada ao GPI; mutantes apresentam redução de adesão.
ENO1	Enolase, relacionada com a glicólise e glicogêneses. Tem atividade transglutaminase envolvida na estruturação dos polissacarídeos da parede celular.
KRE9	Proteína parte da biossíntese do β -1,6-glucanos. Requerido para o crescimento em glicose e utilização da galactose.
MDG1	Relacionada à transmissão do sinal para a conjugação.
MET15	Síntese de metionina e induzida pela aderência e formação de biofilme.
MSB2	Mucina relacionada com a adesão.
PHR1	Glicosidase de superfície celular, está relacionada a ligação entre os β -1,6-glucanos e β -1,3-glucanos.

PIL1	Encontrada na superfície das hifas, e forma parte do eisosomo. É possível que faça parte da endocitose de moléculas do meio exterior.
PLB3	Fosfolipase B ancorada ao GPI. Só se encontra em fungos.
SAM2	S-Adenosilmetionina sintase, relacionada com a síntese de metionina.
SCW11	Proteína de parede celular, função não conhecida.
SOD3	Superóxido dismutase. Protege frente ao estresse oxidativo.
SSB1	Proteína de choque térmico, da família de HSP70. Possivelmente essencial.
TDH3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, relacionado com o transporte de energia.
TKL1	Transquetolase 1, relacionada com a síntese de pentoses.
TOS1	Proteína similar à alfa-aglutinina.
Proteínas parte do processo metabólico de carboidratos	
CIT1	Síntese do citrato.
GRE3	D-xilose redutase.
ICL1	Isocitrato de liase.
MDH1-1	Precursor da malato desidrogenase.
PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.
Proteínas de tradução	
EFB1	Fator de alongação.
KRS1	tRNA-Lys sintase.
RPL11	Proteína ribossomal L11.
RPL12	Proteína ribossomal L12 de citosol.
RPS21B	Proteína ribossomal, subunidade s21.
RPS5	Proteína ribossomal, subunidade s5.
SBP1	Proteína de ligação ao RNA.
UBI3	Ubiquitinação das proteínas ligadas à proteína S34.
Proteínas de resposta aos estímulos	
APR1	Proteinase vacuolar aspártica.

CAR2	Ornitina aminotransferase, parte do metabolismo de arginina.
GND1	6-Fosfogluconato desidrogenase.
HSP12	Proteína de choque térmico, a superexpressão aumenta a resistência ao farnesol e azóis.
KAR2	Similar as chaperonas Hsp70, tem papel na tradução de proteínas no retículo endoplasmático.
RDI1	Inibidor de dissociação de Rho-GDP.
RPL6	Não tem função conhecida. Tem uma proteína ortóloga em <i>S. cerevisiae</i> componente do ribossomo.
SMT3	Proteína similar a ubiquitina.
SNZ1	Síntese de vitamina B, induzida pela transição de levedura a hifa.
TRR1	Tioredoxin redutase.
YNK1	Nucleosídeo difosfato quinase.
ZWF1	Glucose-6-fosfato desidrogenase.
Proteínas relacionadas ao transporte mediado por vesículas	
COF1	Cofilina relacionada a formação de actina.
LSP1	Relacionada com endocitose, é componente de eisossomo.
MLC1	Proteína dependente de formação de microtúbulos.
TRX1	Tioredoxina, relacionadas a transporte de moléculas redox.
Proteínas com função no dobramento de proteínas	
STI1	Proteínas que interagem com Cdc37 e Crk1.
Proteínas de processos de regulação biológica	
LPD1	Dihidrolipoamida desidrogenase, metabolismo de lipídeos.
PDI1	Disulfeto isomerase, metabolismo de enxofre.

RIB7	Atividade redutase e é parte do processo de biossíntese de riboflavina.
Proteínas de processos metabólicos de lipídeos	
ACS1	Acetil-coenzima A sintetase.
ERG10	Acetil-coenzima A acetiltransferase, regulação de ergosterol.
Proteínas de respiração celular	
TIM10	Proteína do espaço intermembrana da mitocôndria, sua função é importar moléculas à membrana interna da mitocôndria.
TOM20	Receptor de importação primária na mitocôndria.
VMA4	Transportador de prótons.
Proteínas de transporte	
ACB1	Proteína de união ao Acetil-coenzima A.
ATP2	Subunidade que forma parte do complexo da ATPase F1F0.
CLC1	Cadeia leve da clatrina, faz parte dos processos de transporte e endocitose.
PET9	Transportador de ADP/ATP mitocondrial.
PMA1	ATPase de prótons de membrana plasmática.
Proteínas relacionados a outros processos	
ALD5	NAD-aldeído desidrogenase.
ASR3	Adenilil-ciclase, responde ao estresse.
CDC48	ATPase microsomal localizado na membrana.
CFL2	Oxidoreductase, relacionada com a utilização de ferro.
CIP1	Oxidoreductase, relacionada com a utilização de metais pesados.
CMD1	Calmodulina, evita os defeitos na formação de hifas.
CRD2	Metalotioneína, ajuda ao crescimento em altas concentrações de cobre.

FDH3	Formaldeído desidrogenase dependente de glutathione.
GDH2	Glutamato desidrogenase.
GVC3	Glicina descarboxilase.
IDP2	Isocitrato desidrogenase.
KEM1	Exoribonuclease, tem função no crescimento filamentoso.
LAT1	Dihidrolipoamida acetiltransferase, componente da piruvato desidrogenase.
OP4	Possivelmente parte da glicosilação
PBR1	Necessária para a coesão e adesão do biofilme, sem função conhecida.
PDB1	Piruvato desidrogenase.
SLA2	Proteína de união à actina.
SLK19	Proteína de membrana plasmática, relacionado à agregação celular.
STP3	Necessária para a virulência, ortóloga da proteína Spt3p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
TAL1	Transaldolase.
TIP20	Possivelmente relacionada com o transporte entre o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático.
WH11	Presente em cepas de alta virulência, necessária para crescimento de biofilme.

Fonte. Autoria Própria, Informação obtida de SKRZYPEK; BINKLEY; BINKLEY; MIYASATO *et al.* (2004)

Foram realizadas comparações de sequências aminoacídicas no sistema BLASTp (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) e na base de dados *Candida Genome Database* (CGD) (SKRZYPEK; BINKLEY; BINKLEY; MIYASATO *et al.*, 2004), para comparação das sequências da proteína não identificada e das proteínas não caracterizadas.

A proteína não identificada na base do UniProt foi verificada em uma busca no CGD (SCHÄFFER; ARAVIND; MADDEN; SHAVIRIN *et al.*, 2001) mediante um BLASTp (ALTSCHUL; WOOTTON; GERTZ; AGARWALA *et al.*, 2005). Os resultados estão apresentados de forma resumida no quadro 9. A proteína com N° de Acesso A0A1D8PPT3 foi identificada como C6_02100W_A. A proteína é secretada na ECM; é expressa durante a formação de um biofilme de tipo “*Spider*”, e é induzida por FCZ e presença de ácidos fracos. A proteína é regulada por Tsa1 e é reprimida por Hap43.

Quadro 9. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PPT3.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C6_02100W_A	342	$8 * e^{-95}$	100%
orf19.3499	342	$8 * e^{-95}$	100%
C6_02100W_B	340	$2 * e^{-94}$	99,4%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

O processo de busca e comparação foi repetido para as proteínas não caracterizadas (N°: 25; 73; 86; 91; 101; 106 e 110). A proteína com N° de Acesso A0A1D8PPV6 foi identificada como C6_02330W_A; os resultados estão resumidos no quadro 10. C6_02330W_A está relacionada com a síntese de glicosaminoglicanos; é mais expressão durante a formação de hifas. Níveis diminuídos de C6_02330W_A estão relacionados com a resistência ao FCZ.

Quadro 10. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PPV6.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C6_02330W_A	863	$4 * e^{-93}$	100%
C6_02330W_B	852	$7 * e^{-92}$	99,5%
orf19.3475	852	$7 * e^{-92}$	99,5%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína com N° de Acesso A0A1D8PD97 foi identificada como orf19.5201.1; sem função definida até o momento; todos os resultados apresentam 100% de identidade como pode ser observado no quadro 11. As outras proteínas (C1_04360C_A e C1_04360C_B) que obtiveram um 100% de identidade estão relacionadas com a regulação negativa da ATPase e estão localizadas na mitocôndria.

Quadro 11. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PD97.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
orf19.5201.1	419	$4 * e^{-42}$	100%
C1_04360C_A	419	$4 * e^{-42}$	100%
C1_04360C_B	419	$4 * e^{-42}$	100%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína com N° de Acesso A0A1D8PJ10 foi identificada como C3_00850C_A; porém a proteína orf19.6160 também apresentou 100% de identidade como pode ser observado no quadro 12. A proteína orf19.6160 não tem função identificada, porém a proteína C3_00850C_A está relacionada com a formação do eisossomos e com a formação de *Lipids Rafts* (Os *Lipids Rafts* são cassetes de lipídeos que formam parte da membrana celular das células eucariotas de membrana).

Quadro 12. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PJ10.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C3_00850C_A	4188	0,0	100%
orf19.6160	4185	0,0	100%
C3_00850C_B	4159	0,0	99,6%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PF42 foi identificada como C1_11200W_A e os resultados estão apresentados de forma resumida no quadro 13. C1_11200W_A é expressa durante a formação de um biofilme do tipo “Spider” podendo ser reprimida por FCZ. É suposto que seja uma mucina relacionada com a morfologia de colônias.

Quadro 13. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PF42.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C1_11200W_A	13244	0,0	100%
orf19.2296	13178	0,0	51,2%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PEU9 foi identificada como C1_10350C_A. Os resultados resumidos do BLASTp estão apresentados no quadro 14. A proteína pode ser uma adesina; regulada por Tbf1. C1_10350C_A é expressa durante a formação de um biofilme do tipo “Spider”.

Quadro 14. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PEU9.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C1_10350C_A	3730	0,0	100%
orf19.4906	3675	0,0	99,1%
C1_10350C_B	3671	0,0	99%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PQE6 foi identificada como C6_04420W_B; mas a proteína C6_04420W_A também apresentou um 100% de identidade como pode ser observado no quadro 15. Não se conhece a função destas proteínas, porém são

induzidas por N-acetilglucosamina e estão envolvidas na formação de biofilme do tipo “Spider”.

Quadro 15. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PQE6.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C6_04420W_B	803	$2 * e^{-86}$	100%
C6_04420W_A	803	$2 * e^{-86}$	100%
orf19.2125	803	$2 * e^{-86}$	74,8%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

A proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PMC0 foi identificada como C4_05590W_A e os resultados estão apresentados de forma resumida no quadro 16. A proteína não tem função identificada ainda; porém existem ortólogos em *Saccharomyces cerevisiae*; e *Candida* não *albicans* como *C. glabrata*; *C. dubliniensis*; *C. parapsilosis* e *C. auris*. Estes ortólogos são proteínas das que se desconhecem as funções.

Quadro 16. Resultados do BLASTp da proteína identificada com o N° de Acesso A0A1D8PMC0.

Descrição	Bit-escore	E-Value	Porcentagem de Identidade
C4_05590W_A	14648	0,0	100%
orf19.8825	14620	0,0	99,8%
orf19.1240	14609	0,0	99,8%

Fonte. Adaptado de NCBI (2016).

- Ensaaios, in vitro, de viabilidade celular em presença de *pool* das proteínas do secretoma de biofilmes de *C. albicans*, mediante o ensaio de MTT.

Estes ensaios foram realizados nas linhagens: THP-1; DOK; SCC-25 e Detroit 562. As células foram expostas a três diferentes proporções (% v/v), em meio de cultivo, do *pool* de proteínas isoladas dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

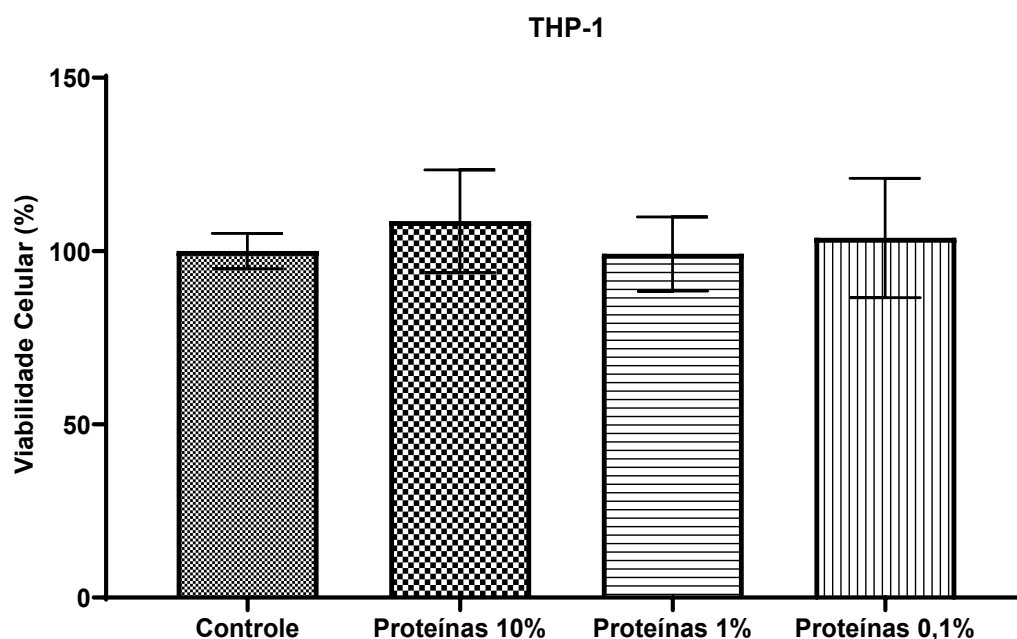


Figura 19. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem THP-1 em presença de *pool* de proteínas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. Para o ensaio as células foram crescidas em placas de 24 poços no meio específico para THP-1. Após o tempo de incubação, foram adicionadas as proteínas e a cultura foi incubada por 24 h. Não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos, demonstrando que as proteínas exercem efeito citotóxico sobre as células THP-1. $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

Nos ensaios, as células THP-1 não apresentaram diferenças estatísticas em comparação com o controle como pode ser observado na figura 19. As médias obtidas da viabilidade celular foram de: 109% para as células expostas à concentração de 10% v/v de proteínas; 99% das células expostas a 1% v/v; e 104% das células expostas a 0,1% v/v de proteínas; em comparação com o controle que apresenta uma viabilidade celular de 100%. Desta maneira, as proteínas não induziram quedas na viabilidade das células THP-1, demonstrando ausência de citotoxicidade nestas condições.

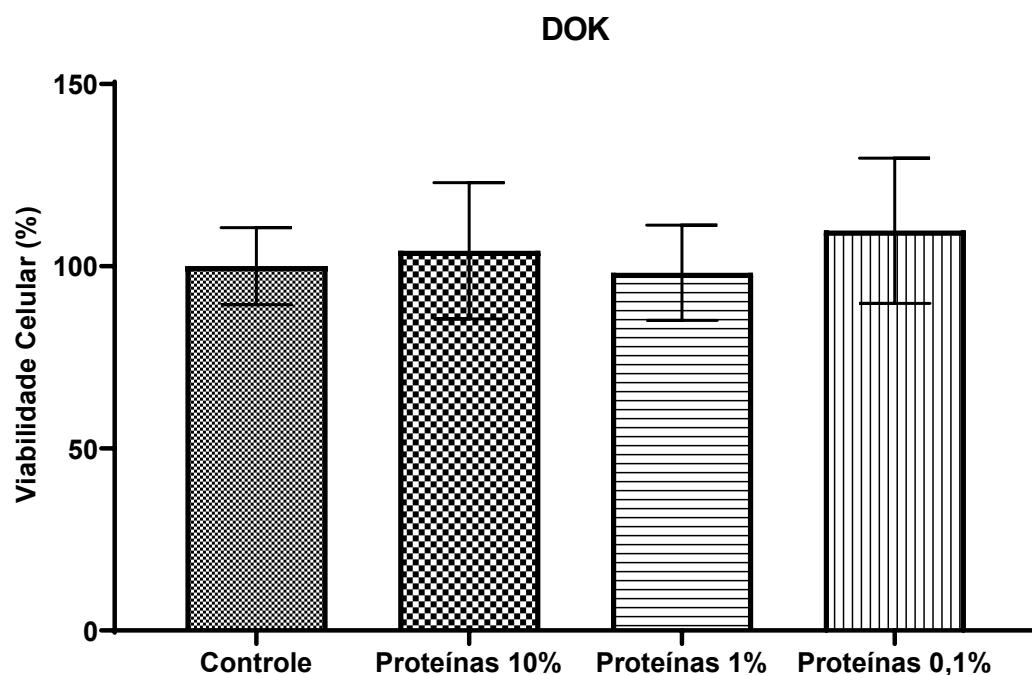


Figura 20. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem DOK em presença de *pool* de proteínas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. Ensaio de MTT realizado nas células DOK após serem expostas a três concentrações de proteínas. As células DOK foram expostas ao *pool* de proteínas extraídas de *C. albicans*. Não foi observado nenhum efeito citotóxico das proteínas nas células DOK. $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

Nos ensaios com as células displásicas DOK não houve diferenças estatísticas em comparação com o controle. As médias obtidas da viabilidade celular foram; 104% para as células expostas a concentração mais alta de proteínas (10% v/v); 98% das células expostas a 1% v/v; e 110% das células expostas à concentração mais baixa de proteínas (0,1% v/v) (figura 20). Desta maneira, as proteínas não induziram quedas na viabilidade das células DOK, demonstrando ausência de citotoxicidade nestas condições.

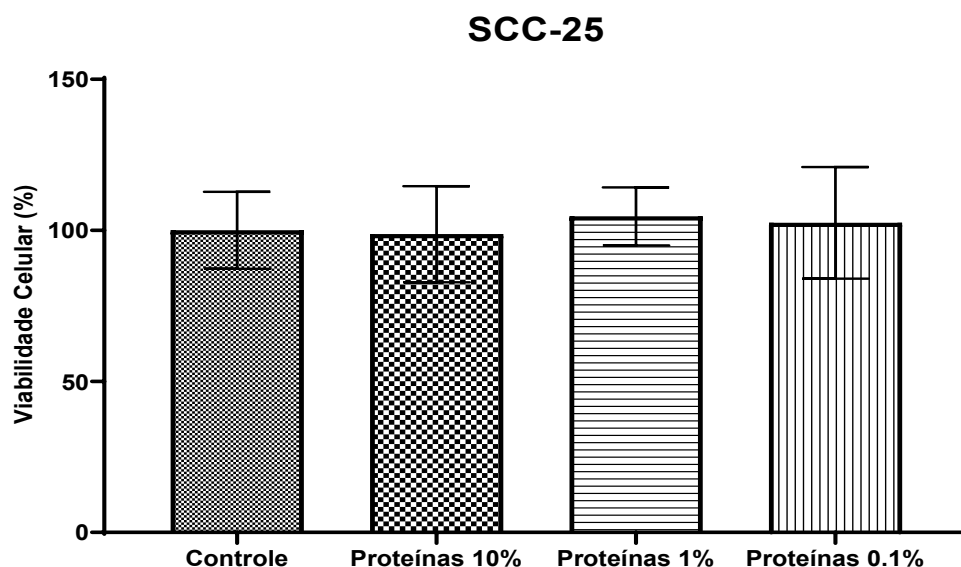


Figura 21. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem SCC-25 em presença de *pool* de proteínas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. Ensaio de MTT realizado nas células SCC-25 após serem expostas a três concentrações de proteínas. As células foram expostas ao *pool* de proteínas extraídas do secretoma de biofilme de *C. albicans*. Não foi observado nenhum efeito citotóxico nas células SCC-25. $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

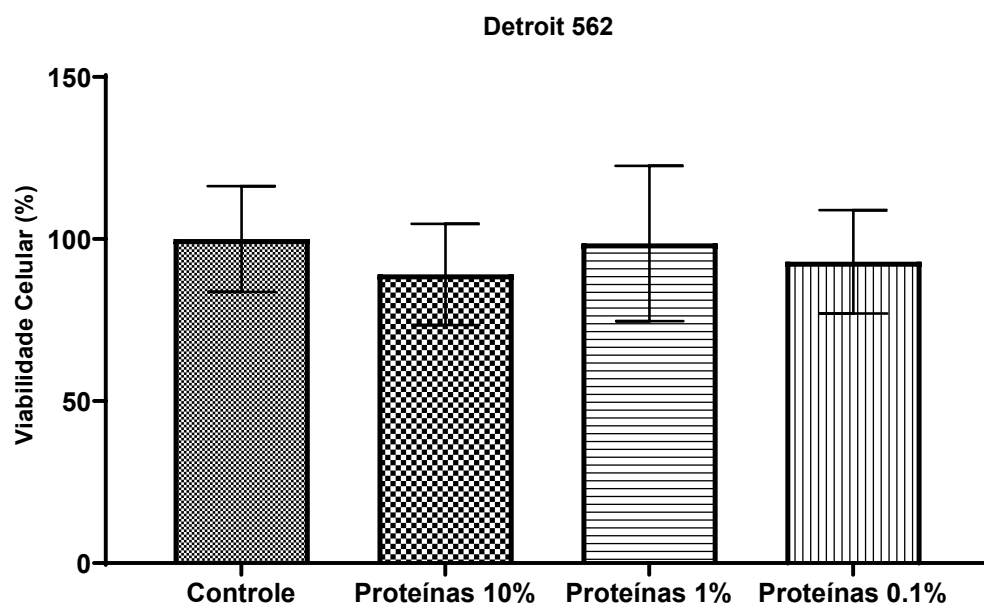


Figura 22. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem Detroit 562 em presença de *pool* de proteínas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. Ensaio de MTT realizado nas células Detroit 562 após serem expostas a três concentrações de proteínas. Os resultados demonstram que as proteínas do secretoma de *C. albicans* não têm efeito citotóxico nas células metastáticas Detroit 562. $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

Nas células neoplásicas não foi observado nenhuma diferença estatística em comparação com o controle, como pode ser observado nas figuras 21 (SCC-25) e 22 (Detroit 562). As médias obtidas da viabilidade celular foram; 99% para as células SCC-25 expostas à concentração mais alta de proteínas (10% v/v); 105% nas células SCC-25 expostas a 1% v/v; e 103% nas células SCC-25 expostas à concentração mais baixa de proteínas (0,1% v/v); em comparação com o controle que apresenta uma viabilidade celular de 100%. Na linhagem celular Detroit 562; as médias obtidas da viabilidade celular foram de: 89% para as células expostas à concentração de 10% v/v de proteínas; 99% nas células expostas a 1% v/v; e 93% nas células expostas a 0,1% v/v de proteínas; em comparação com o controle que apresenta uma viabilidade celular de 100%, demonstrando em ambos os casos há ausência de citotoxicidade. Desta maneira todos os meios de cultivo provenientes das células THP-1, DOK, SCC-25 e Detroit 562, foram recolhidos e serão posteriormente analisados quanto às alterações, ou não, na sinalização de algumas citocinas inflamatórias.

- **Marcação de moléculas de interesse nos biofilmes de *C. albicans*: LIPÍDEOS**

- Determinação da presença de lipídeos mediante a marcação com *Nile Red* nos biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

Após a fase de padronização do biofilme, foram feitas marcações para poder estabelecer a presença dos lipídeos através da marcação com *Nile Red* (NR). O NR é um marcador que permite visualizar os lipídeos presentes no biofilme. Este marcador permite diferenciar lipídeos neutros, lipídeos polares e *lipids storages*; que são organelas ou vesículas ricas em lipídeos que regulam o armazenamento e hidrólise de lipídeos neutros; presentes no biofilme.

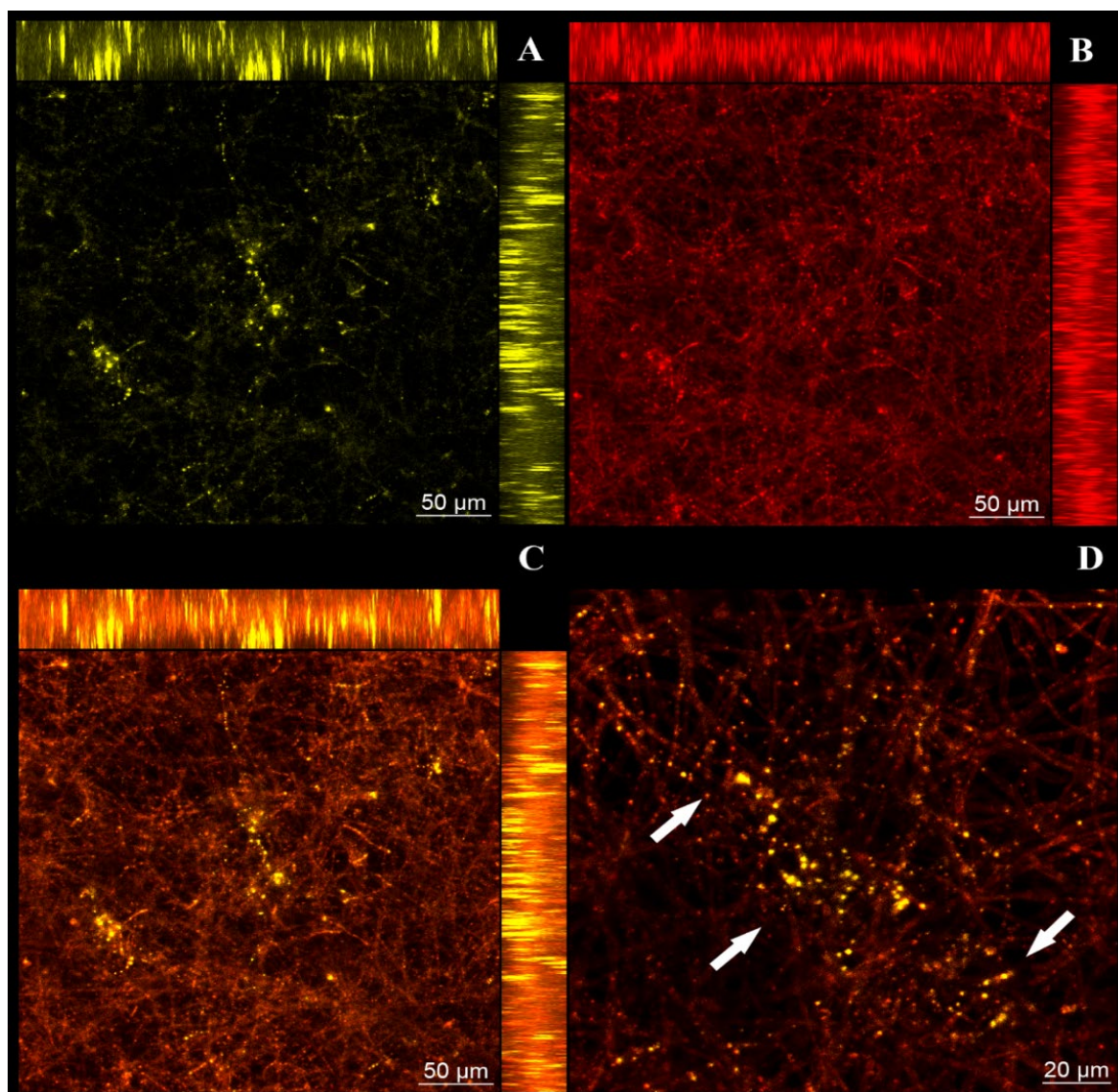


Figura 23. Imagens obtidas por microscopia confocal mediante marcação de lipídeos feita com *Nile Red* (NR). O NR é um marcador específico de lipídeos independente de sua carga. O NR identifica tanto os lipídeos polares, como os lipídeos neutros. A. Marcação na faixa do amarelo dos lipídeos neutros; B. Em vermelho os lipídeos polares; C. É a sobreposição das imagens A e B; D. Estão sinalizadas as vesículas, identificando os estoques de lipídeos (setas brancas). **Fonte:** Autoria Própria.

Na figura 23 observa-se o resultado da marcação do biofilme de 36 h. Na figura 23.A tem-se a imagem dos lipídeos neutros os quais emitem fluorescência na faixa espectral do verde-amarelado. Na figura 23.B pode-se observar a marcação em vermelho dos lipídeos polares muito presentes na estrutura do biofilme, assim como nas paredes do fungo. A figura 23.C é uma sobreposição das imagens, em que se identifica as vesículas de lipídeos, sinalizadas na figura 23D.

- **Quantificação, identificação e atividade dos lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h.**

Os lipídeos foram extraídos conforme a metodologia descrita e as amostras mantidas em -20 °C. Trabalhou-se com um *pool* de amostras quantificadas em média de 3,486 mg*mL⁻¹ de lipídeos, coletados em 3 ocasiões distintas, quantificados mediante o método de sulfo fosfovanilina (quadro 17), com variações médias de 1,1 mg*mL⁻¹ a 4,9 mg*mL⁻¹ (quadro 18).

Quadro 17. Quantificações de lipídeos realizadas em 3 ocasiões distintas

	Lipídeos (mg*mL⁻¹)
1 ^a extração	1,10
	1,35
2 ^a extração	4,03
	4,82
3 ^a extração	4,97
	4,65

Fonte. Autoria Própria.

Quadro 18. Estatística descritiva das quantificações de lipídeos

Média	3,49
Desvio Padrão	1,78
Mínimo	1,10
25% Percentil	2,02
Mediana	4,34
75% Percentil	4,78
Máximo	4,97
Coefficiente de Variação	51,12%

Fonte. Autoria Própria.

- Identificação dos lipídeos isolados do secretoma de biofilmes de *C. albicans*.

Os lipídeos foram extraídos conforme a metodologia descrita e as amostras mantidas em -20 °C. Para identificação das moléculas presentes no *pool*, utilizou-se a técnica de

Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os resultados permitiram identificar 3 classes predominantes de fosfolípidos nas amostras: Fosfatidilinositol (PI), que é um lípido neutro; Fosfatidilcolina (PC) e Fosfatiglicerol (PG), que são lípidos polares. Na figura 24 pode-se observar o espectro de RMN, em que é possível identificar quatro resíduos: resíduos etila (CH_3), identificados pela letra (a); resíduos de metila (CH_2) obtidos após a quebra de cadeias alifáticas, carbonilas ou carbonos com ligações duplas, identificados pela letra (b); resíduos de metila originados das quebras de CH_2CO , identificados pela letra (c) e resíduos de metila carregados por prótons de uma ligação com um nitrogênio ($\text{N}-(\text{CH}_3)^{+3}$), identificados pela letra (d). A identificação destas moléculas, assim como os valores obtidos depois da integralização das áreas abaixo das curvas, permitiu identificar as estruturas químicas apresentadas na figura 25.

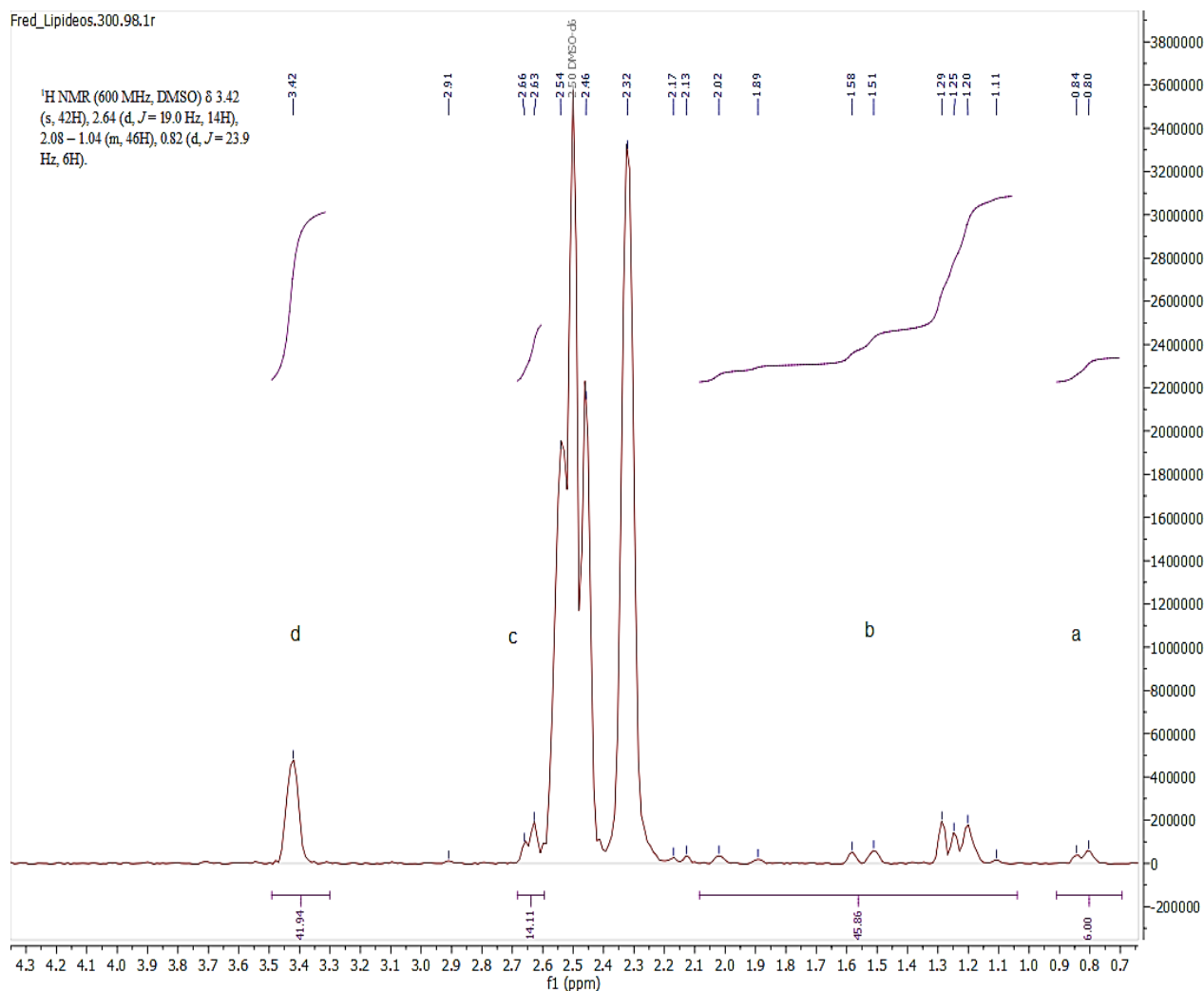


Figura 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das amostras de lipídeos obtidas do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. A RMN foi realizada dissolvendo-se os lipídeos liofilizados de *C. albicans* em DMSO deuterizado. A figura ilustra o espectro de RMN de ¹H. Para a identificação foram descartados os picos do DMSO (2,6 ppm) e os picos próximos ao DMSO para evitar leituras equivocadas. Dentro dos espectros: **a.** Picos formados por resíduos de CH₃; **b.** Picos formados por resíduos de CH₂ obtidos após a quebra de cadeias alifáticas [–(CH₂)_n], carbonilas [–OCO–CH₂–CH₂–] ou carbonos com ligações na posição α das ligações duplas [–CH₂–CH=CH–]; **c.** Picos formados por resíduos de CH₂CO; **d.** Picos formados por resíduos de N-(CH₃)⁺ (grupos metila carregados por prótons de nitrogênio). **Fonte:** Autoria Própria.

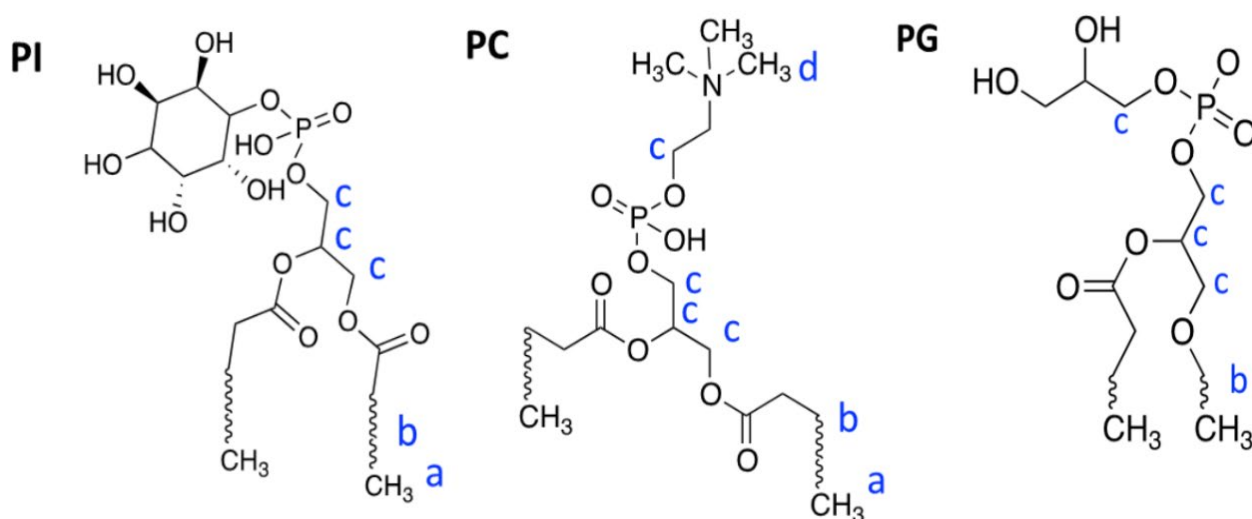


Figura 25. Estruturas químicas dos lipídeos identificados na RMN. As estruturas foram identificadas com ajuda da professora Dra. Eliane Trovatti da Universidade de Araraquara (UNIARA). Os resíduos encontrados foram marcados nas estruturas, assim como no espectrograma. Foram identificadas 3 classes predominantes de lipídeos: Fosfatidilinositol (PI), que é um lipídeo neutro; Fosfatidilcolina (PC) e Fosfatidilglicerol (PG), que são lipídeos polares. a. Resíduos de CH_3 ; b. Resíduos de CH_2 ; c. Resíduos de CH_2CO (grupos de metila rodeados por cadeias alifáticas; carbonilas e ligações duplas); d. Resíduos de $\text{N}-(\text{CH}_3)^{+3}$ (grupos metila carregados por prótons de nitrogênio). **Fonte:** Autoria Própria.

- Determinação das concentrações dos lipídeos de *C. albicans* para testagem em cultura in vitro

Este ensaio foi realizado nas linhagens celulares DOK; SCC-25; e Detroit 562, a fim de se determinar as concentrações ótimas de trabalho dos lipídeos obtidos.

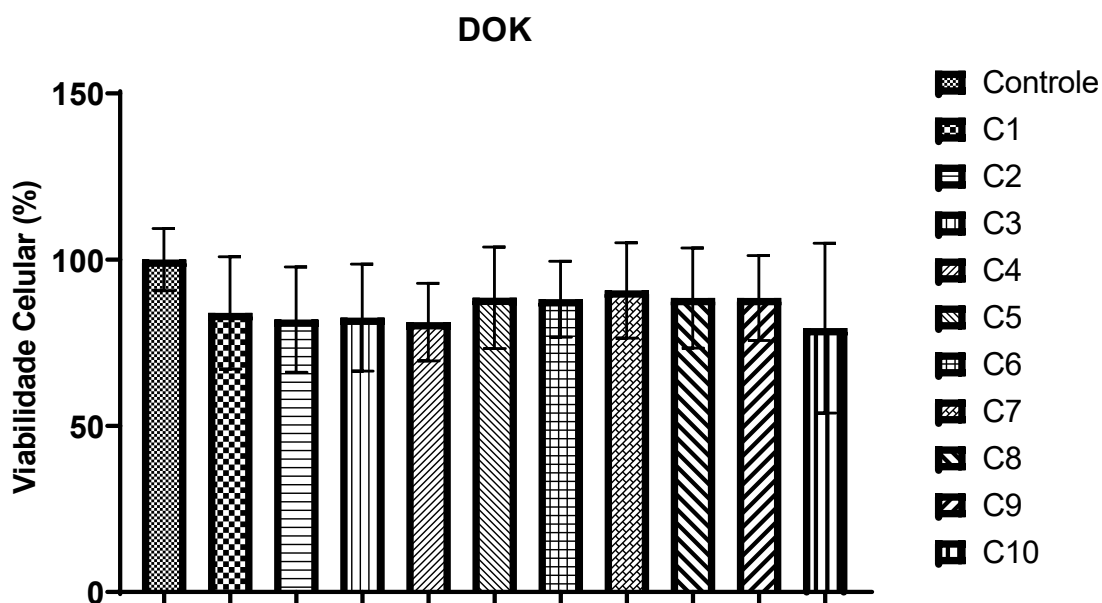


Figura 26. Determinação das concentrações de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h em células DOK. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em quadruplicata e em duas ocasiões distintas. As células foram expostas por 24 h as diferentes concentrações dos lipídeos de *C. albicans*. Não foi observado nenhum efeito citotóxico nas células DOK, por o que se definiu as concentrações C1 e C2 para os seguintes ensaios. As concentrações utilizadas foram: C1(2% v/v), C2(1% v/v), C3(0,5% v/v), C4(0,25% v/v), C5(0,13% v/v), C6(0,06% v/v), C7(0,03% v/v), C8(0,02% v/v), C9(0,01% v/v), C10(0,004% v/v). $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

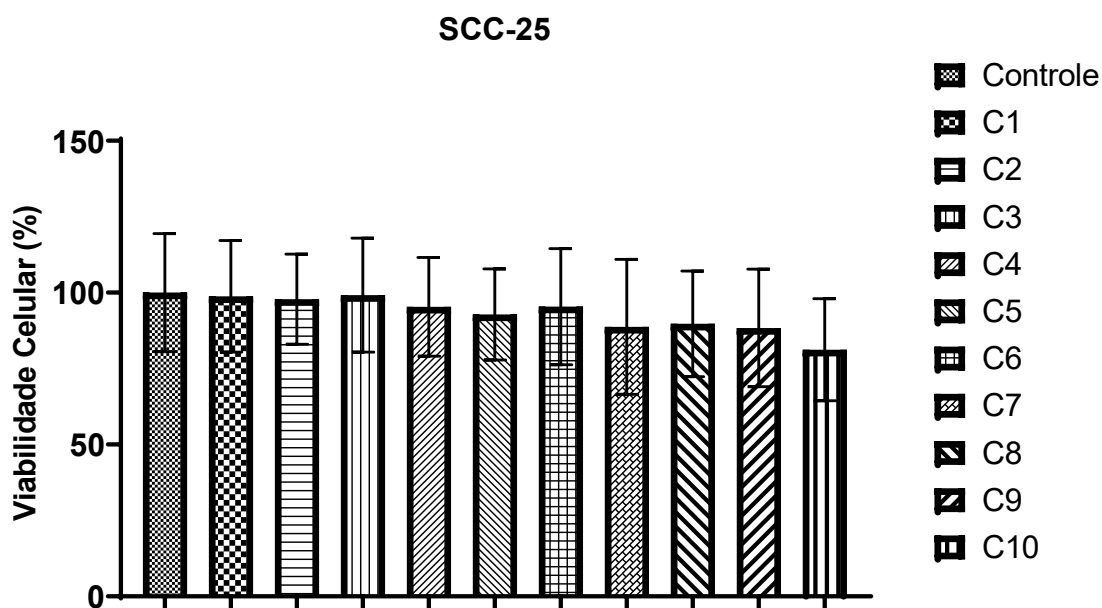


Figura 27. Determinação das concentrações de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h em células SCC-25. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em quadruplicata e em duas ocasiões distintas. As células foram expostas por 24 h as diferentes concentrações dos lipídeos de *C. albicans*. Não foi observado nenhum efeito citotóxico nas células SCC-25, por o que se definiu as concentrações C1 e C2 para os seguintes ensaios. As concentrações utilizadas foram: C1(2% v/v), C2(1% v/v), C3(0,5% v/v), C4(0,25% v/v), C5(0,13% v/v), C6(0,06% v/v), C7(0,03% v/v), C8(0,02% v/v), C9(0,01% v/v), C10(0,004% v/v). $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

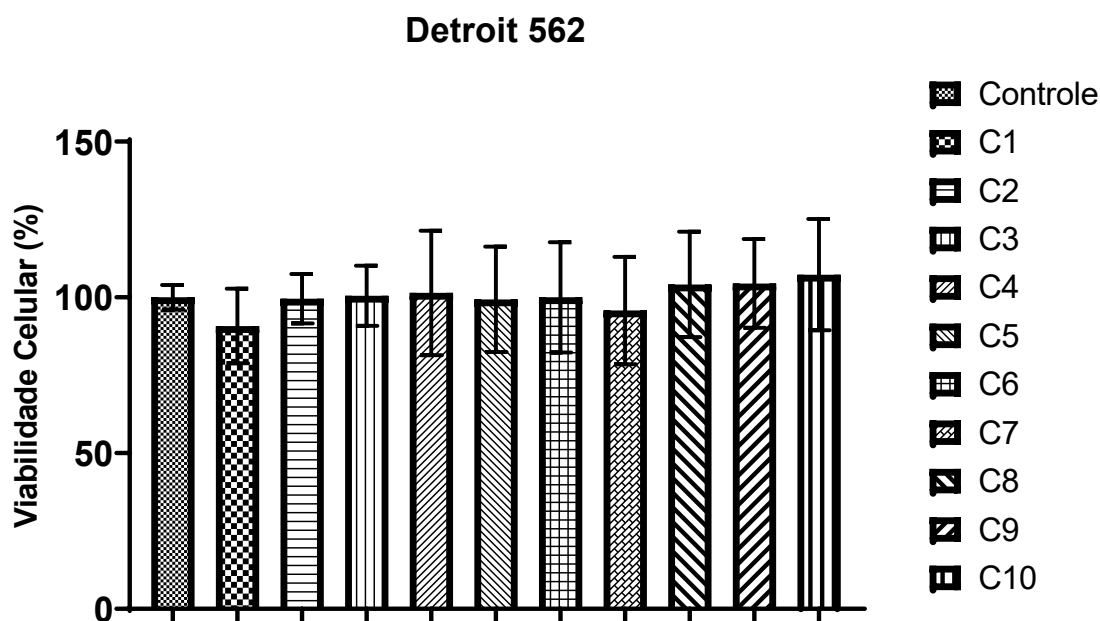


Figura 28. Determinação das concentrações de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h em células Detroit 562. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em quadruplicata e em duas ocasiões distintas. As células foram expostas por 24 h as diferentes concentrações dos lipídeos de *C. albicans*. Não foi observado nenhum efeito citotóxico nas células Detroit 562, por o que se definiu as concentrações C1 e C2 para os seguintes ensaios. As concentrações utilizadas foram: C1(2% v/v), C2(1% v/v), C3(0,5% v/v), C4(0,25% v/v), C5(0,13% v/v), C6(0,06% v/v), C7(0,03% v/v), C8(0,02% v/v), C9(0,01% v/v), C10(0,004% v/v). $p \geq 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

Como pode ser observado nas figuras 26, 27 e 28; nenhuma das células testadas (DOK, SCC-25 e Detroit 562) apresentaram um efeito na viabilidade celular quando foram crescidas em presença das diferentes concentrações de lipídeos de *C. albicans* testadas. Devido a este resultado foi definido as concentrações C1 (2% v/v) e C2 (1% v/v) para ser utilizadas nos seguintes ensaios.

- Ensaio in vitro de viabilidade celular em presença dos lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h, mediante o ensaio de MTT

Este ensaio foi realizado nas linhagens celulares THP-1; DOK; SCC-25; e Detroit 562, a fim de se determinar a indução ou não de citotoxicidade mediada pelos lipídeos obtidos. Os quatro tipos celulares foram expostos às concentrações 2% e 1% v/v de lipídeos.

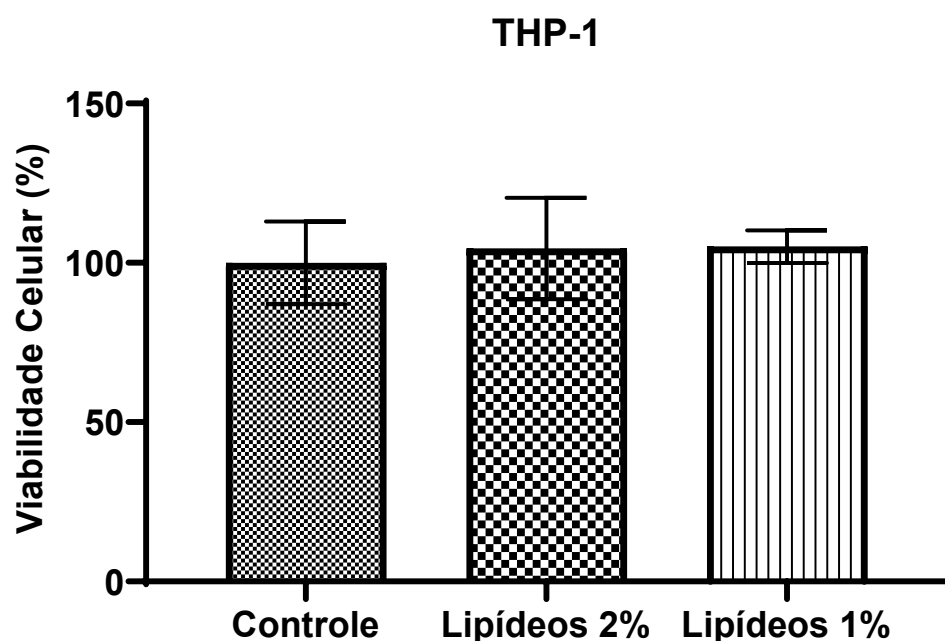


Figura 29. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem THP-1 em presença de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. As células THP-1 foram expostas à duas concentrações de lipídeos de *C. albicans* por 24 h. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em triplicata e em duas ocasiões distintas. Não foi observada diferença estatística entre os grupos, demonstrando ausência de efeito citotóxico nas células THP-1 nestas condições. $p > 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

Nestes ensaios, as células THP-1 não apresentaram diferenças estatísticas em comparação com o controle não exposto aos lipídeos, como pode ser observado na figura 29; demonstrando ausência de efeito citotóxico nas células inflamatórias THP-1. Os valores médios obtidos foram de 104,1% para as células expostas a 2% v/v de lipídeos e 105,1% para as células expostas a 1% v/v.

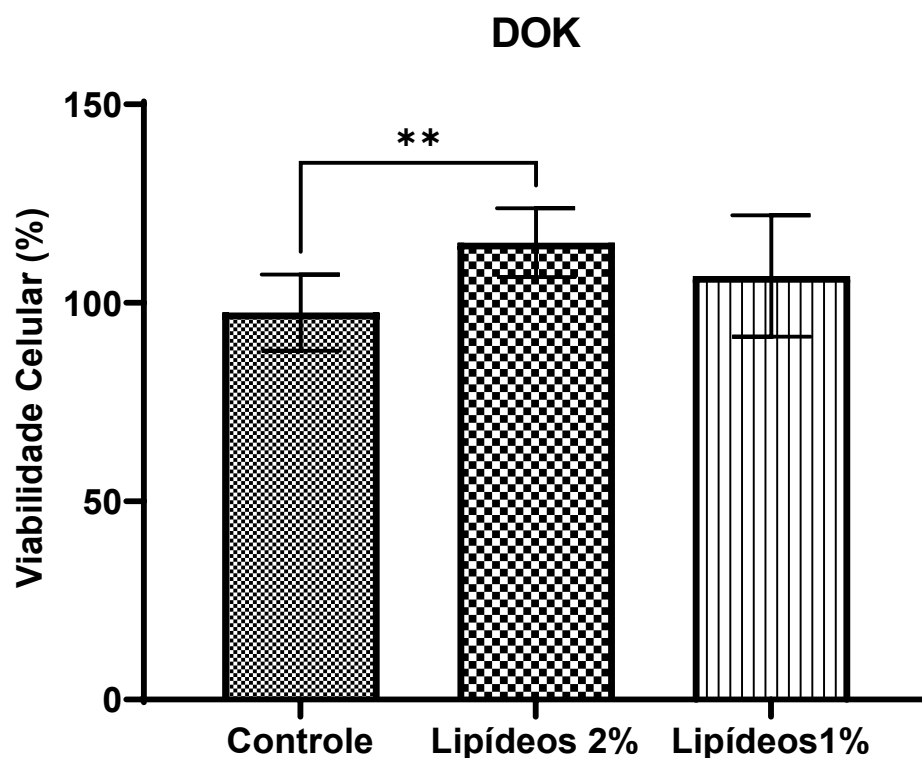


Figura 30. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem DOK em presença de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em triplicata e em duas ocasiões distintas. As células foram expostas por 24 h aos lipídeos de *C. albicans*. As células DOK foram expostas à duas concentrações de lipídeos. Observou-se aumento da viabilidade celular quando as células foram expostas à concentração mais alta de lipídeos (2 % v/v). $p (**) < 0,01$. **Fonte:** Autoria Própria.

Na linhagem celular displásica, DOK, houve estatística diferencial na concentração mais alta de lipídeos (2% v/v) em comparação com o controle não exposto aos lipídeos (figura 30). Nesta concentração, a viabilidade obtida foi de 115,1% em comparação ao controle que apresentou um 100 % de viabilidade. Estes resultados indicam diferenças na viabilidade celular quando adicionados 2% v/v de lipídeos. Isto pode ser um indicativo de uma possível indução de proliferação celular nesta condição. Na concentração de 1% a viabilidade foi de 106,7%, sem diferenças estatísticas.

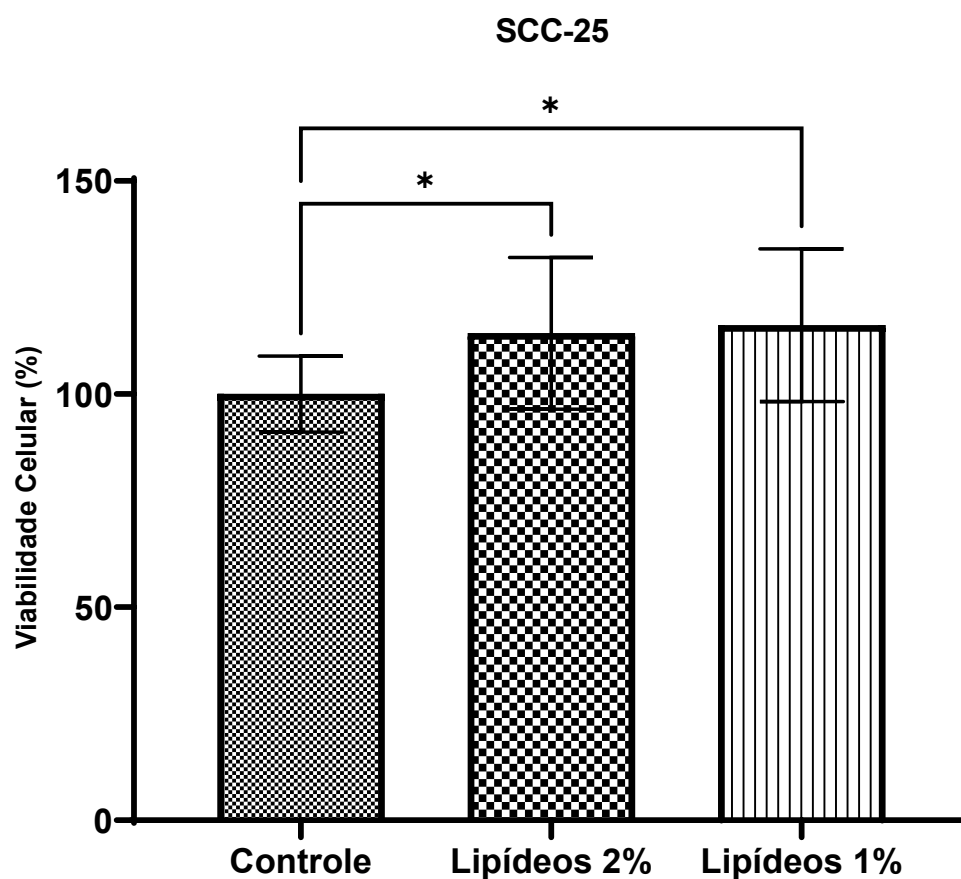


Figura 31. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem SCC-25 em presença de *pool* de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, em triplicata e em duas ocasiões distintas. As células foram expostas por 24 h aos lipídeos de *C. albicans*. As células SCC-25 foram expostas à duas concentrações de lipídeos. Observou-se aumento da viabilidade celular quando as células foram expostas às duas concentrações de lipídeos. p (*) < 0,05. **Fonte:** Autoria Própria.

Nas células SCC-25 foram observadas diferenças estatísticas entre todas as variáveis (figura 31). As diferenças ocorreram tanto para a concentração mais alta (2% v/v) como para a concentração mais baixa (1% v/v) em comparação com o controle. Na concentração mais alta a viabilidade média foi de 114,3% e na concentração mais baixa de 116,2%. As células expostas aos lipídeos do secretoma de *C. albicans* apresentaram uma maior viabilidade em comparação ao controle.

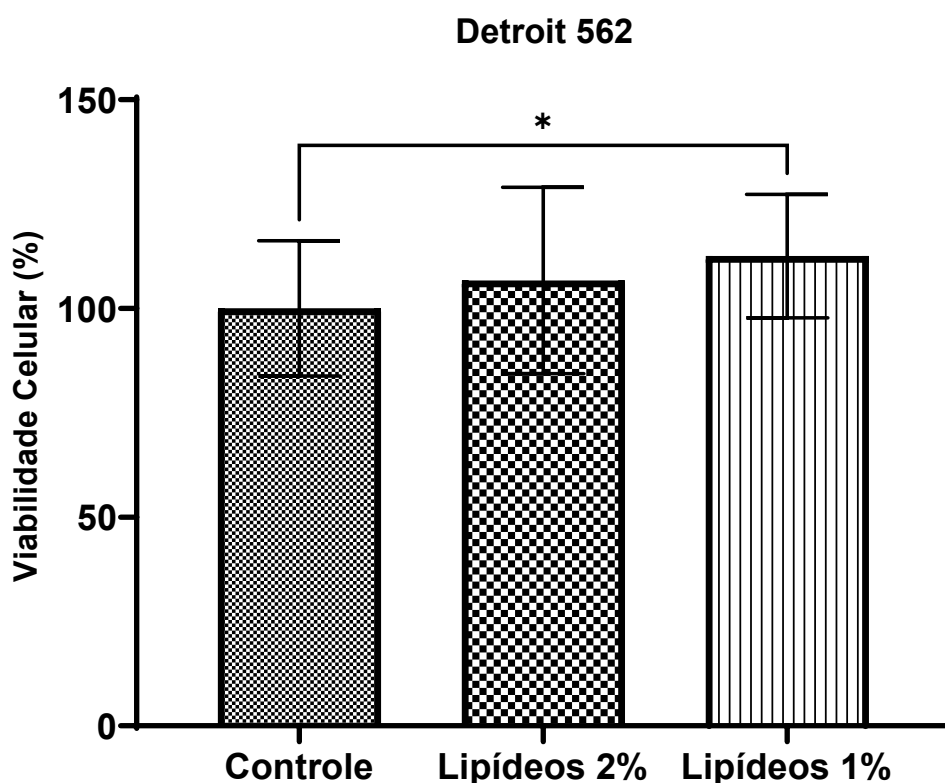


Figura 32. Gráfico da porcentagem de viabilidade celular da linhagem Detroit 562 em presença de *pool* lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans*. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços. As células Detroit 562 foram expostas por 24 h aos lipídeos de *C. albicans*, em triplicata e em duas ocasiões distintas. Houve aumento na viabilidade das células Detroit 562, quando expostas à concentração mais baixa de lipídeos (1% v/v). $p (*) < 0,05$ **Fonte:** Autoria Própria.

Na célula metastática, Detroit 562, pode-se observar diferenças estatísticas na concentração 1% v/v em comparação ao controle (figura 32). A viabilidade celular na concentração de 1% v/v foi de 112,5% em comparação com o controle (100%); e na concentração 2% v/v a média foi de 106,7%.

- Formação de *Lipid Droplets* em células neoplásicas após contato com lipídeos provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

Optou-se por seguir os demais ensaios com a maior concentração testada (2% v/v). A partir deste dado, o tempo de incubação das células DOK, SCC-25 e Detroit 562 em presença de meio suplementado com 2% de lipídeos extraídos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* foi avaliado por 72 h. Primeiramente, iniciou-se a investigação pela formação, ou não, de *Lipid Droplets* (LDs), no interior das células tumorais. A formação de LDs pode influenciar tantos

processos metabólicos relacionados à carcinogênese, como alterações imunológicas nos processos neoplásicos.

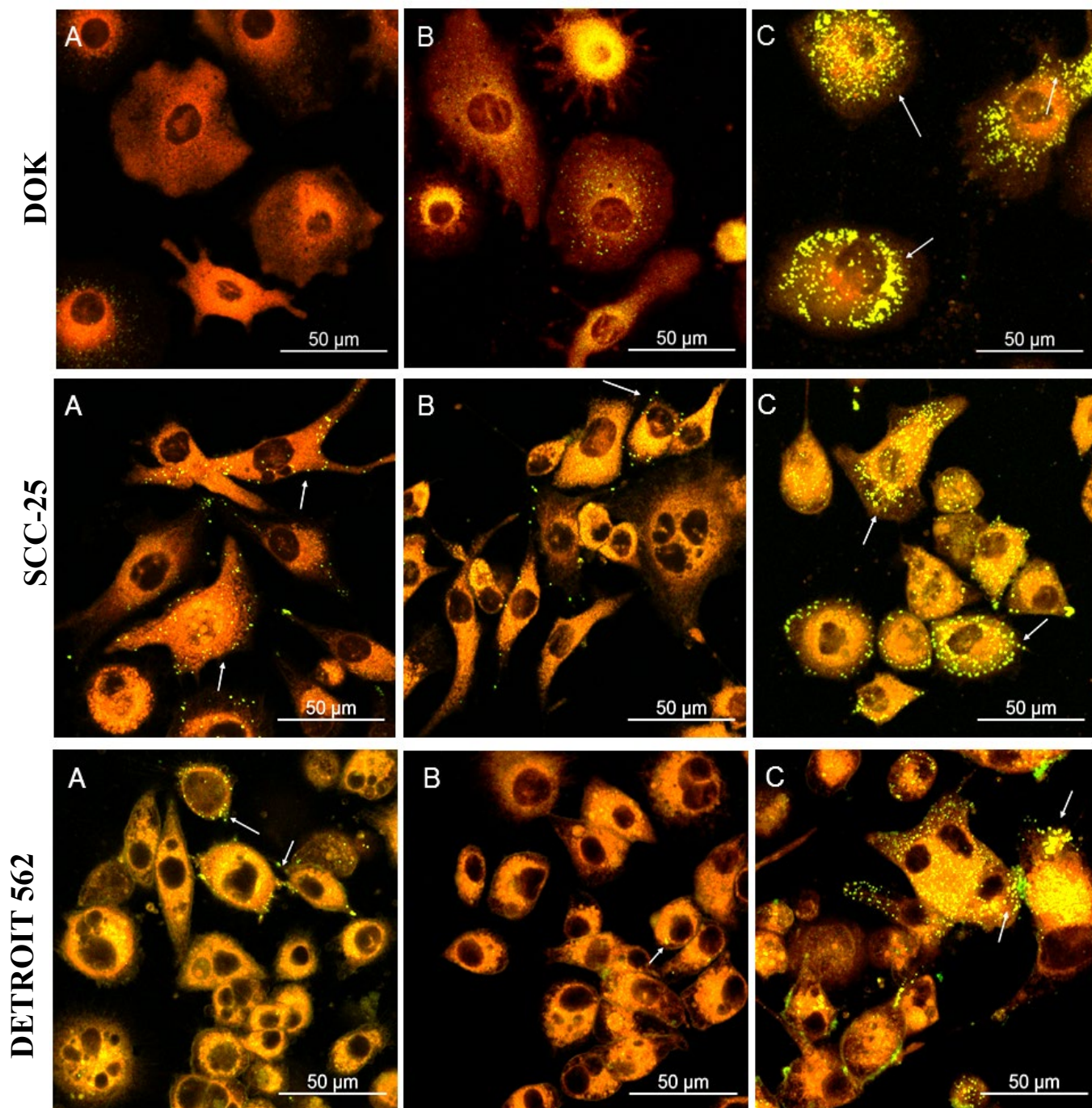


Figura 33. Microscopias das células DOK; SCC-25 e Detroit 562 expostas aos lipídeos extraídos do secretoma dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h. As células foram cultivadas por 72 h com 2% (v:v) do *pool* de lipídeos. Marcação com *Nile Red* (NR). Na presença de lipídeos de *C. albicans* houve aumento importante na formação de *Lipid droplets*. O incremento foi observado em todas as células, porém nas células displásicas (DOK) e de carcinoma primário (SCC-25) estas formações foram mais notórias. As condições de crescimento foram: A. controle (meio de cultivo padrão); B. controle de veículo (meio de cultura com etanol 2% v:v); C. lipídeos (meio de cultura com *pool* de lipídeos 2% v:v). **Fonte:** Autoria Própria.

Como pode ser observado na figura 33; quando as células foram cultivadas (72 h) com os lipídeos isolados do secretoma dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h, houve uma vasta formação de LDs como mecanismo de interação. Nas linhagens testadas pode-se observar grandes quantidades LDs em comparação com os controles; demonstrando que o efeito é uma resposta específica aos lipídeos provenientes do secretoma estudado.

○ Ensaio de metabolismo/crescimento celular por Alamar Blue em presença de Camptotecina (CPT)

Após a constatação de incremento de formação de LDs, após cultivo celular com 2% de lipídeos do secretoma dos biofilmes de *C. albicans*, somados aos relatos da literatura sobre o tema; avaliou-se o comportamento das células DOK, SCC-25 e Detroit 562 mediante a exposição à (CPT), molécula lipofílica e com robusta atividade anti-tumoral. O ensaio de Alamar Blue mensura de maneira indireta a porcentagem de crescimento celular em função das maiores taxas de metabolismo, reveladas por aumento direto nas mensurações de fluorescência (R.F.U) do meio celular na presença do reagente Alamar Blue. Estes resultados estão apresentados nas figuras 34, 35 e 36, em gráficos de porcentagem de crescimento celular.

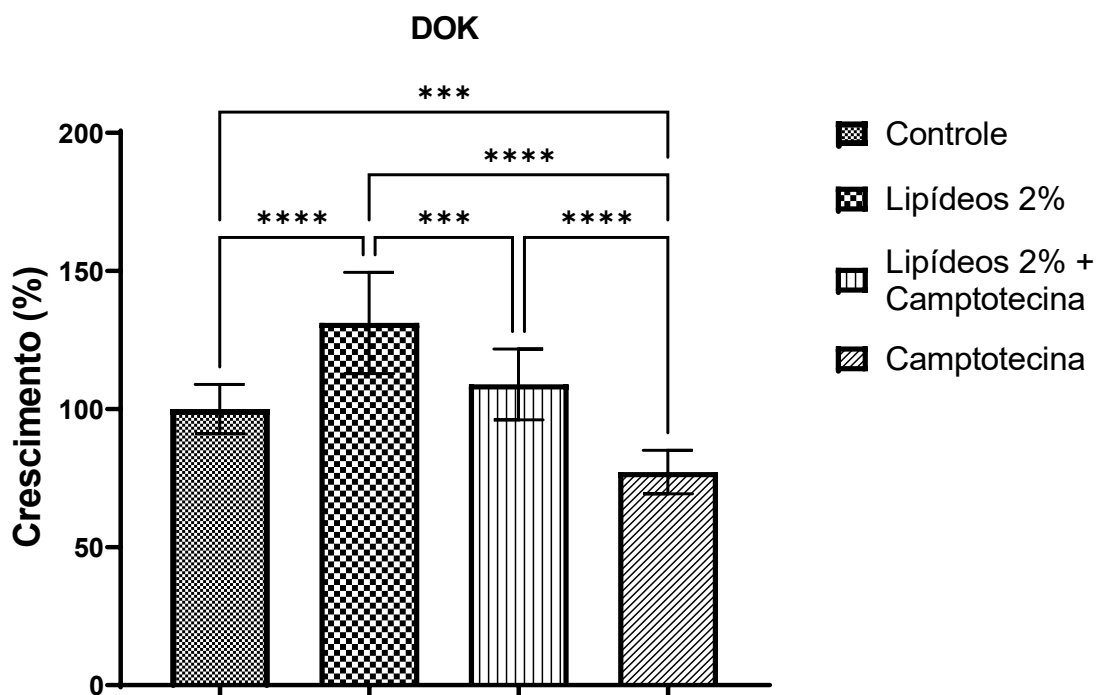


Figura 34. Gráfico da porcentagem de crescimento da linhagem DOK em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* e camptotecina (CPT). Ensaio de Alamar Blue realizado nas células DOK após serem expostas ou não aos lipídeos (2% v/v) por 72 h de cultivo, seguindo-se da exposição à CPT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Houve diferença estatística entre todos os grupos. Nota-se um mascaramento da atividade antitumoral da CPT quando as células foram expostas aos lipídeos de *C. albicans*. p (***) < 0,001; p (****) < 0,0001 **Fonte:** Autoria Própria.

Nas células displásicas, DOK, houve estatística diferencial entre todos os grupos experimentais conforme apresentado na figura 34. Constatou-se um aumento nas taxas de crescimento celular quando na presença de lipídeos 2% v/v; com média de 131% em comparação ao controle de 100%. O resultado mais importante foi a diferença estatística entre as células expostas aos lipídeos e “desafiadas” com CPT, em relação às células somente tratadas com CPT. Comparando-se estas duas variáveis é possível afirmar que os lipídeos provenientes do secretoma de *C. albicans* atuaram de forma a “mascarar” os efeitos de queda do crescimento celular (ou morte celular) causados pela CPT, sendo a taxa de crescimento celular, em torno de 109% no grupo lipídeos + CPT, enquanto que apenas 77% no grupo CPT sem cultivo prévio com lipídeos do secretoma.

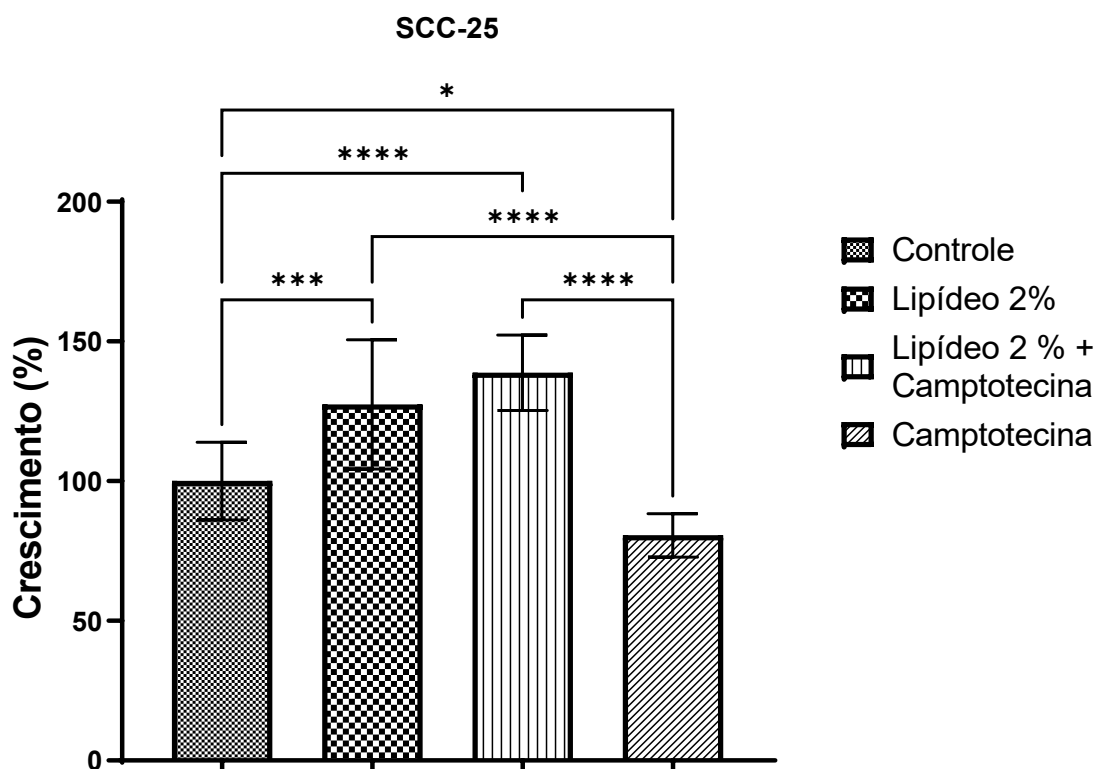


Figura 35. Gráfico da porcentagem de crescimento celular da linhagem SCC-25 em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* e camptotecina (CPT). Ensaio de Alamar Blue realizado nas células SCC-25 após serem expostas ou não aos lipídeos (2% v/v) por 72 h de cultivo, seguindo-se da exposição à CPT ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Houve diferença estatística entre todos os grupos. O ensaio revela que os lipídeos de *C. albicans* mitigaram os efeitos anti-tumorais da CPT, sendo $p (*) < 0,05$; $p (***) < 0,001$; $p (****) < 0,0001$. **Fonte:** Autoria Própria.

Nas células SCC-25 observaram-se diferenças estatísticas entre todos os grupos experimentais. Constatou-se um aumento do crescimento celular na presença de lipídeos 2% v/v (média de 127%); aumento registrado também no grupo lipídeos + CPT. O resultado mais importante foi a diferença estatística entre as células expostas aos lipídeos e “desafiadas” com CPT em relação às células tratadas apenas com CPT. Comparando-se estas duas variáveis é possível afirmar que os lipídeos provenientes do secretoma de *C. albicans* atuaram de forma a mitigar os efeitos anti-tumorais da CPT, sendo a taxa de crescimento celular em torno de 139% no grupo lipídeos + CPT, enquanto que as células expostas somente à CPT tiveram taxas de crescimento próximas de 81% (figura 35).

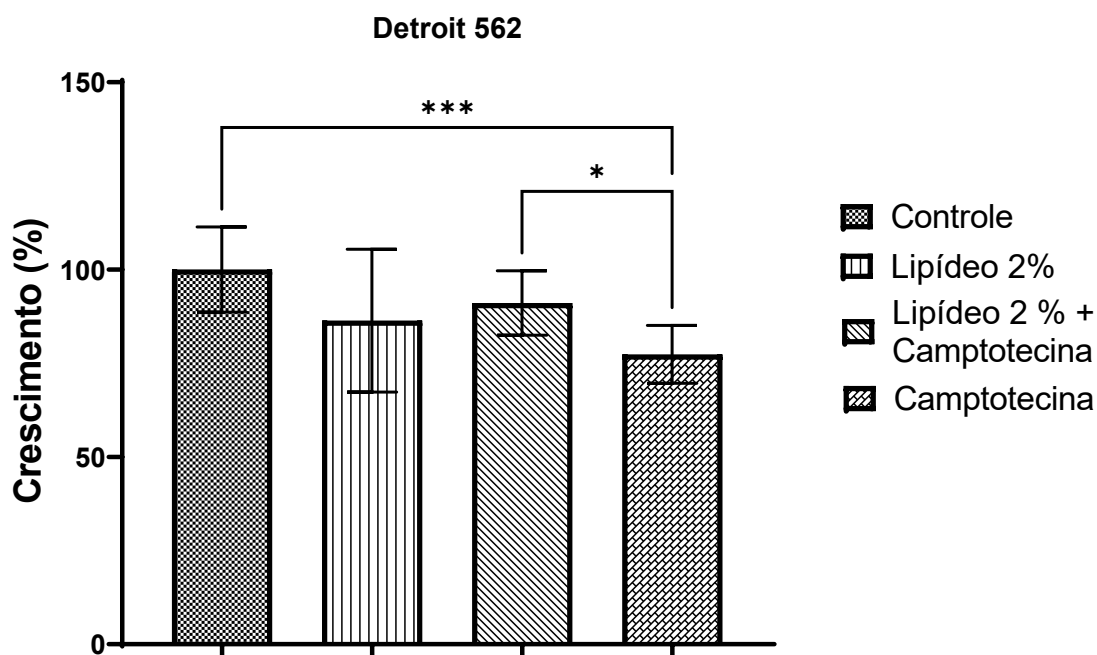


Figura 36. Gráfico da porcentagem de crescimento celular da linhagem Detroit 562 em presença e ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* e camptotecina (CPT). Ensaio de Alamar Blue realizado nas células Detroit 562 após serem expostas ou não aos lipídeos (2% v/v) por 72 h de cultivo, seguindo-se da exposição à CPT ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nas células Detroit 562 foram observadas alterações mais discretas entre as variáveis, sendo $p (*) < 0,05$; $p (***) < 0,0001$. **Fonte:** Autoria.

Nas células metastáticas Detroit 562 as diferenças entre as variáveis foram mais discretas, de acordo com a figura 36. Nota-se redução do crescimento das células tratadas com CPT (77,4%) em relação ao controle (100%), e em relação ao grupo “desafio” lipídeos 2% v/v + CPT (91,07%). Não houve crescimento das células cultivadas com o pool de lipídeos em relação ao controle (células em condições padrão de cultivo), demonstrando que nas células metastáticas a presença de 2% de lipídeos provenientes do secretoma de *C. albicans* parece não induzir processos proliferativos ou de aumento de metabolismo nas condições testadas.

○ Internalização de camptotecina (CPT) e ensaios de co-localização com Nile Red

Para melhor compreender os resultados obtidos até o momento, realizaram-se ensaios de internalização da CPT nas células DOK e SCC-25, escolhidas devido às maiores diferenças entre os grupos experimentais nos ensaios anteriormente realizados. As células foram cultivadas por 72 h na presença ou ausência de lipídeos (2% v/v), isolados do secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h, seguindo-se a incubação com CPT ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 4 h.

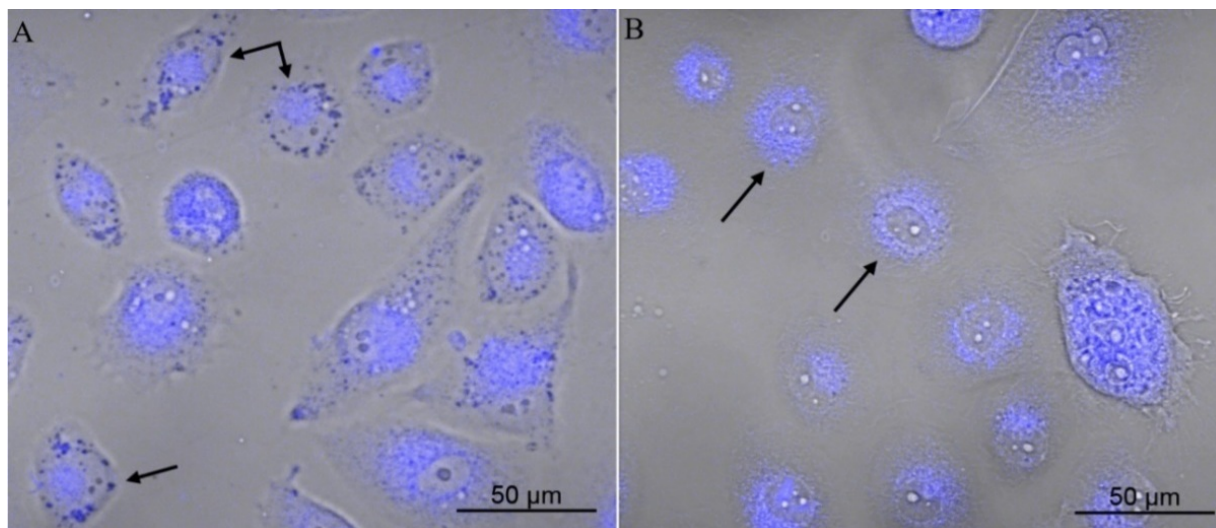


Figura 37. Microscopia de campo claro das células DOK expostas à camptotecina (CPT) em presença ou ausência de lipídeos de *C. albicans*. As células foram crescidas por 72 h em presença ou ausência de lipídeos do secretoma de biofilme de *C. albicans*. As células foram expostas à CPT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 4 h. Os lipídeos não interferiram na capacidade internalização da CPT. Setas pretas indicam o padrão de internalização da CPT nas células DOK. A. Lipídeos de *C. albicans* + CPT. B. Somente CPT. **Fonte.** Autoria própria.

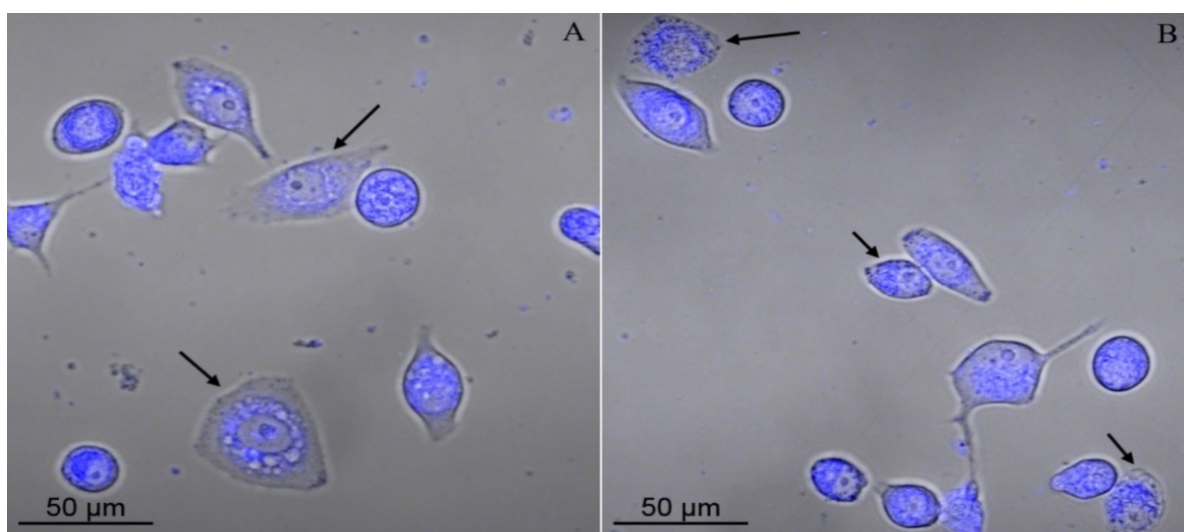


Figura 38. Microscopia de campo claro das células SCC-25 expostas à camptotecina (CPT) em presença ou ausência de lipídeos de *C. albicans*. As células foram crescidas por 72 h em presença ou ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans*. As células foram expostas à CPT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 4 h. Os lipídeos não interferiram na capacidade de internalização da CPT. Setas pretas indicam o padrão de internalização da CPT nas células SCC-25. A. Lipídeos de *C. albicans* + CPT. B. Somente CPT. **Fonte.** Autoria própria.

As microscopias de campo claro (figura 37 e 38) permitiram observar que os lipídeos não modificaram a capacidade de internalização de CPT nas células DOK (figura 37) e SCC-25 (figura 38). Este resultado motivou a realização de dupla marcação com CPT e NR para tentar identificar ou não padrões de distribuições de CPT alterados pela presença dos lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* (figura 36 e 37).

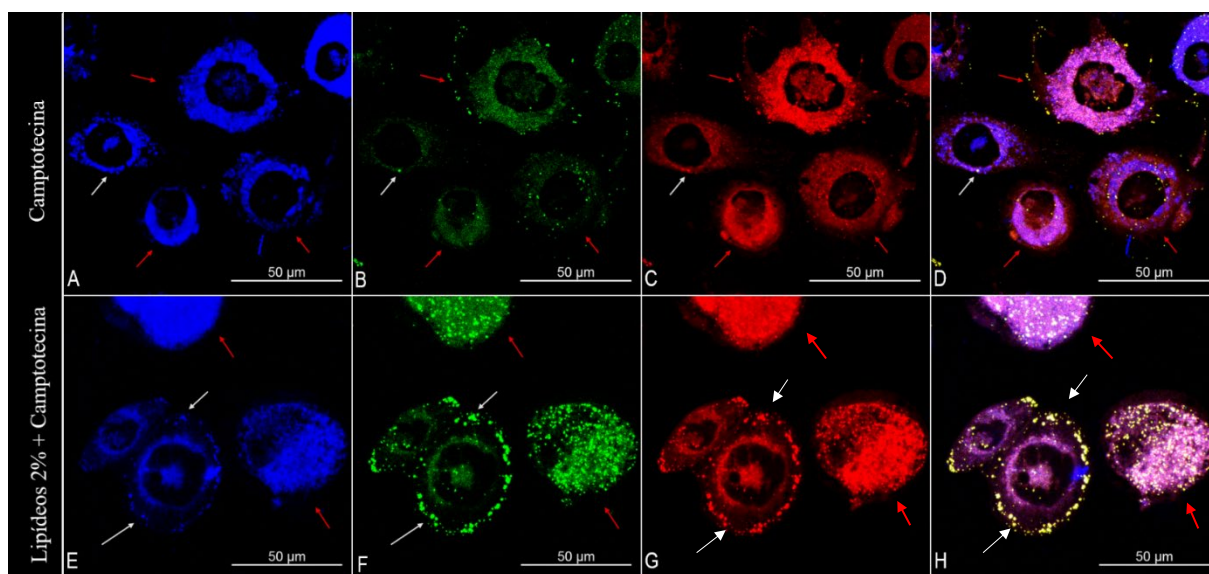


Figura 39. Internalização da camptotecina (CPT) em células DOK em presença ou ausência de lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans*. As células foram cultivadas ou não com lipídeos (2% v/v) provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans*, por 72 h, e posteriormente incubadas com CPT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 4 h. Foi observado um padrão diferente de distribuição intracelular da CPT nas condições experimentais estudadas. Na ausência dos lipídeos de *C. albicans*, nota-se as células DOK apresentam maior retenção de CPT (fluorescência azul em A) em comparação com as células previamente cultivadas com lipídeos e posteriormente tratadas com CPT (fluorescência azul em E). Além disto, nas células cultivadas com lipídeos, a CPT encontra-se colocalizada nos *Lipid Droplets*, imagens (E, F, G, H). As setas brancas indicam co-localização específica de CPT em LD, setas vermelhas indicam marcações de CPT inespecíficas. **Fonte:** Autoria própria.

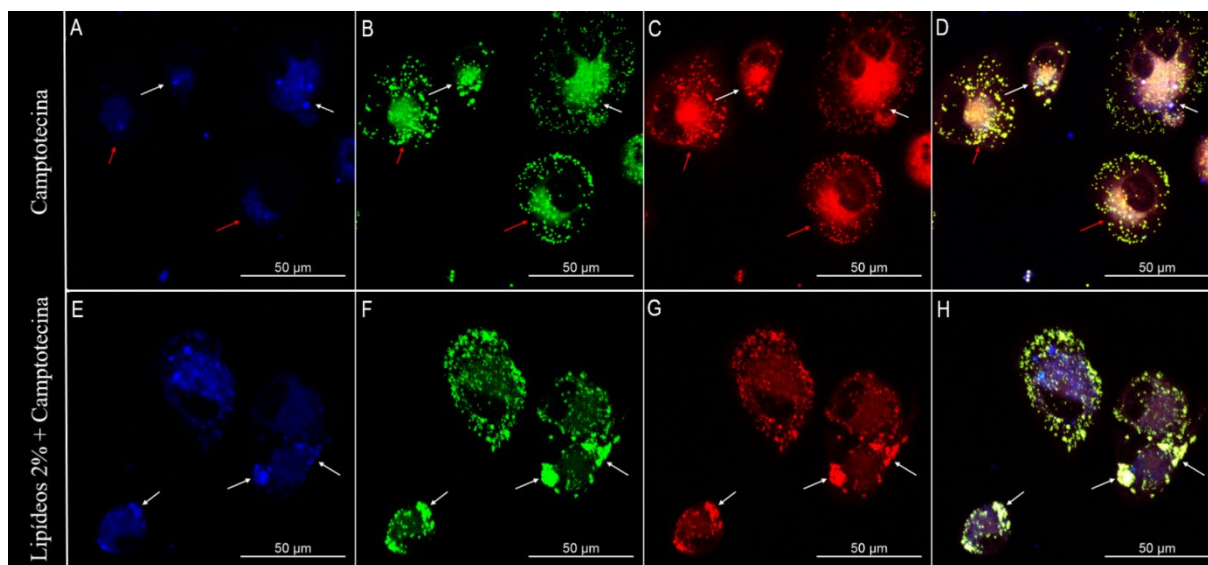


Figura 40. Internalização da camptotecina (CPT) em células SCC-25 em presença ou ausência de lipídeos dos secretomas de biofilmes de *C. albicans*. As células foram cultivadas ou não com lipídeos (2% v/v) provenientes do secretoma de biofilmes de *C. albicans* por 72 h e posteriormente incubadas com CPT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 4 h. Foi observado um padrão diferente de distribuição intracelular da CPT nas condições experimentais estudadas. A CPT encontra-se colocalizada com os *Lipid Droplets* quando as células foram previamente cultivadas com os lipídeos do secretoma de biofilmes de *C. albicans* observado nas imagens (E, F, G, H). As setas brancas indicam co-localização específica de CPT em LD, setas vermelhas indicam marcações de CPT inespecíficas. **Fonte:** Autoria própria.

Em ambas células, DOK e SCC-25 foi observado um padrão diferencial de distribuição intracelular da CPT. Nas células DOK (figura 39), foi observado que na ausência dos lipídeos do secretoma de *C. albicans*, as células apresentavam maior retenção de CPT em comparação com as células cultivadas com lipídeos, assim como a co-localização de CPT em LDs. As células SCC-25 apresentaram repostas semelhantes às células DOK (figura 40), porém sem evidências de retenção de CPT como foi observado para as células DOK. Em ambas células foi observado que a distribuição da CPT estava co-localizada com os LDs.

IV. Discussão

No estudo do desenvolvimento de biofilmes, é fundamental conhecer os padrões de crescimento dos micro-organismos e as diferentes etapas do ciclo de formação, crescimento e maturação. Neste contexto, diversos são os fatores que poderiam impactar em discrepâncias nos padrões dos biofilmes, dentre eles: disponibilidade de nutrientes, ou seja, a escolha de meios de cultivo apropriados, volume, condições e concentrações dos inóculos, tipo de material (superfície) em que o biofilme será desenvolvido, assim como temperatura de crescimento e a presença de contaminantes (MAGANA; SERETI; IOANNIDIS; MITCHELL et al., 2018; ROBERTS; KRAGH; BJARNSHOLT; DIGGLE, 2015). Na tentativa de cercar todas as possíveis variações no crescimento dos biofilmes, iniciou-se o trabalho por técnicas de validação e padronização do desenvolvimento do biofilme e de seu subproduto – filtrado ou secretoma, que foi o alvo do estudo em questão. Inicialmente validamos as etapas de descongelamento e crescimento de *C. albicans*. Para a formação do biofilme padronizamos a concentração do inóculo sempre na ordem de 1×10^7 UFC*mL⁻¹, em meio de cultivo e temperatura segundo experiência prévia do grupo (DIAS; BARBUGLI; VERGANI, 2016).

As técnicas de estabelecimento de uma curva de crescimento e contagens de UFC*mL⁻¹ permitiram obter dados importantes para validação das condições de crescimento dos biofilmes. Com estes experimentos, foi possível determinar o tempo de cultivo do biofilme em 36 h e também o número de UFC*mL⁻¹ neste tempo. No trabalho de Azeredo; Azevedo; Briandet; Cerca *et al.* (2017) foi questionado o uso das UFC's para quantificar o número de colônias em biofilmes. Estes questionamentos são pertinentes, já que se trata de um microambiente heterogêneo com frações não cultiváveis, o que poderia dar lugar às quantificações discrepantes. Os resultados da curva de crescimento mediante o Alamar Blue e o seguimento mediante uma correlação com a intensidade de fluorescência da cultura, permitiu ter um entendimento inicial da dinâmica de crescimento e formação do biofilme de *C. albicans* alvo do trabalho.

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de cultura ainda mais padronizado, foram feitos testes adicionais para estabelecer limites mensuráveis para obtenção de uma alta

reprodutibilidade. Para estabelecer um padrão de biomassa, após as 36 h foram feitas quantificações com cristal violeta, baseadas no protocolo descrito por Peeters; Nelis e Coenye (2008). O ensaio de cristal violeta permitiu estabelecer mínimos e máximos de absorbâncias, as quais foram utilizadas durante as subseqüentes formações dos biofilmes. Adicionalmente, foram feitas marcações com o kit de *Live and Dead* para estabelecer a prevalência de células vivas e mortas, assim como estabelecer a espessura do biofilme, parâmetros importantes para constatar a maturação das culturas Gonçalves; Silva; Felício; De Medeiros *et al.* (2017). Por fim, a marcação com FUN1 elucidou que, o biofilme desenvolvido durante as 36 h, atingiu o estado de maturação, devido à presença de vasta marcação verde – típica de células maduras, com alguns pontos em vermelho/laranja, indicando atividade metabólica ativa, mas em menor proporção.

Uma vez estabelecidas as condições de cultivo, devidamente padronizadas e validadas, iniciou-se a identificação das biomoléculas de interesse do trabalho em questão. Uma maneira rápida e direta (biofilmes a fresco) para obtenção de tais respostas foi através do emprego de marcadores específicos para Microscopia de Fluorescência Confocal. O uso do *Nile Red* permitiu identificar em vermelho os lipídeos polares e em amarelo os lipídeos neutros presentes no biofilme. Corroborando esta observação, na identificação por RMN, foram detectados lipídeos polares e neutros. O principal resultado desta marcação foi a observação dos estoques de lipídeos neutros (vesículas) nas células do biofilme de *C. albicans* de 36 h, conforme já descrito na literatura (RADULOVIC; KNITTELFELDER; CRISTOBAL-SARRAMIAN; KOLB *et al.*, 2013). Além da função de armazenamento, estas vesículas também apresentam funções diversas como sinalização; estocagem temporal de proteínas e degradação das mesmas, transporte de RNA e DNA e sinalização de resistência ao estresse. Outra função importante é o estoque de lipotoxinas (RADULOVIC; KNITTELFELDER; CRISTOBAL-SARRAMIAN; KOLB *et al.*, 2013). No estudo de Lattif; Mukherjee; Chandra; Roth *et al.* (2011) foi descrito que biofilmes apresentam maiores quantidades destas vesículas, sobretudo nas hifas.

As proteínas existentes no biofilme de *C. albicans* de 36 h também foram reveladas, por marcação direta (a fresco), mediante a utilização do *Sypro Ruby*. Os relatos da literatura reportam que 57% das proteínas secretadas por *C. albicans* são proteínas da parede celular (SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010). A porcentagem restante ainda tem-se pouco conhecimento sobre os mecanismos de transporte e quantidades secretadas para a ECM. A plasticidade dos biofilmes de *C. albicans* é um dos principais fatores de virulência deste fungo e está relacionada com a expressão de proteínas dependente de fatores ambientais como

pH; nutrientes, presença de CO₂ e temperatura (GOW; VAN DE VEERDONK; BROWN; NETEA, 2012; WILLGER; LIU; OLARTE; ADAMO et al., 2015).

As proteínas extraídas dos biofilmes de *C. albicans* foram dosadas por Bradford e em seguida caracterizadas por eletroforeses em géis de poliacrilamida em condições denaturantes. Os géis resultantes permitiram observar padrões de bandas similares aos reportados por VEDIYAPPAN e CHAFFIN (2006) e YAZDANPARAST; NEZARATI; HESHMATI e HAMZEHLOU (2012). Nos géis, foi possível encontrar as bandas entre 40 kDa e 70 kDa, onde normalmente estão contidas as proteases e adesinas (fatores de virulência). Estes resultados foram confirmados pelas análises de Espectroscopia de Massas e também pela determinação de atividade proteásica nas amostras de proteínas isoladas dos biofilmes, através do kit *EnzChek Protease C Assay*. Esta atividade de protease, presente nas amostras, foi mantida em altos níveis, e de maneira temporal ascendente, por até 24 horas.

As análises de Espectrometria de Massas (EM) da fração proteica do secretoma de *C. albicans* identificaram 114 proteínas contidas no *pool* isolado do secretoma, mediante a técnica de precipitação com acetona. Dentre as classes de proteínas identificadas, obtiveram-se tanto proteínas sem glicosilfosfatidilinositol (non-GPI) como proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (KLIS; BRUL, 2015). As proteínas non-GPI encontradas foram: Tos1, proteína muito presente, independentemente das condições de cultivo e cuja função é modificar os β -1,3-glucanos (KLIS; BRUL, 2015; SORGO; HEILMANN; BRUL; DE KOSTER *et al.*, 2013; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010); Scw11, é uma enzima que modifica os β -1,3-glucanos e está relacionada com o processo de separação celular (KLIS; BRUL, 2015; SORGO; HEILMANN; BRUL; DE KOSTER *et al.*, 2013; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010); Plb3, uma fosfolipase importante na degradação de lipídeos e com possível efeito sobre a penetração de *C. albicans* nas células (KLIS; BRUL, 2015); Coi1, uma proteína pequena, encontrada em várias condições de cultivo, mas sem função identificada (KLIS; BRUL, 2015; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010); Msb2, uma mucina de sinalização que detecta dano celular e ativa a Cek1 da via da MAP quinase (KLIS; BRUL, 2015; ROMÁN; COTTIER; ERNST; PLA, 2009; SORGO; HEILMANN; BRUL; DE KOSTER *et al.*, 2013). As proteínas GPI foram identificadas em menor proporção e isto já era esperado, uma vez que são proteínas ancoradas na parede celular e que teoricamente estariam pouco presentes no secretoma (KLIS; BRUL, 2015). Nesta classe foram identificadas Phr1; uma β -1,3-gluconasiltransferase que permite separar as moléculas de β -1,3 e β 1,6-glucanos e

transferir novas cadeias de glucanos, sendo muito importante, pois é uma proteína relacionada a estrutura da parede celular, além da resistência ao fluconazol (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; RUIZ-HERRERA; VICTORIA ELORZA; VALENTÍN; SENTANDREU, 2006; SORGO; HEILMANN; BRUL; DE KOSTER *et al.*, 2013; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010; TAFF; NETT; ZARNOWSKI; ROSS *et al.*, 2012). Kar2, uma chaperona presente especialmente em hifas e no biofilme (CHAFFIN, 2008; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010). Ubi3, uma proteína ribossomal a qual apresenta sinal em N-terminal, podendo estar relacionada ao retículo endoplasmático rugoso (SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010). Met15, uma proteína que participa da assimilação de enxofre. É muito expressa em presença de farnesol e no biofilme, sendo o metabolismo de enxofre diretamente relacionado com a comunicação célula e célula e o *quorum sensing* do biofilme (GARCÍA-SÁNCHEZ; AUBERT; IRAQUI; JANBON *et al.*, 2004; SORGO; HEILMANN; DEKKER; BRUL *et al.*, 2010; THOMAS; BACHMANN; LOPEZ-RIBOT, 2006). Adicionalmente, algumas proteínas Met tem um papel na resposta antigénica durante as infecções com *C. albicans* (THOMAS; BACHMANN; LOPEZ-RIBOT, 2006). Gil-Bona; Monteoliva e Gil (2015) descrevem em seu trabalho as proteínas Act1, Adh1, Ahp1, Car2, Cit1, Eno1, Gnh1, Mdh1-1, Sam2, Snz1, Tal1, Tdh3 e Tkl1 como proteínas relacionadas ao metabolismo de *C. albicans*. As proteínas Atp2, Pet9 e Pma1 são descritas como transportadoras transmembrana e as proteínas Apr1, Rpl12 e Rpl16 como proteínas que participam da síntese e ubiquitinação de outras proteínas (GIL-BONA; MONTEOLIVA; GIL, 2015).

Das proteínas encontradas nas análises de EM como Adh1p; Atp2p; Eno1p; Sam2p; Slk19p; Ssb1p; Tal1p; Tdh3p; Tkl1p e Tos1p foram identificadas como imunogénicas (MARÍN; PARRA-GIRALDO; HERNÁNDEZ-HARO; HERNÁEZ *et al.*, 2015). Estas proteínas também foram identificadas no meio de *C. albicans* cultivada em presença de soro humano (MARÍN; PARRA-GIRALDO; HERNÁNDEZ-HARO; HERNÁEZ *et al.*, 2015). A presença de anticorpos reativos às proteínas Adh1p; Atp2p; Eno1p; Pdi1p; Ssb1p e Tkl1p foram encontradas por (MOCHON; JIN; KAYALA; WINGARD *et al.*, 2010; PITARCH; ABIAN; CARRASCAL; SÁNCHEZ *et al.*, 2004; PITARCH; JIMÉNEZ; NOMBELA; GIL, 2006; 2008; PITARCH; NOMBELA; GIL, 2011) em pessoas com candidemia em várias etapas da doença, sendo que tais pacientes possuem IgG positivo. Eno1p foi encontrada em diversos ensaios clínicos e é recomendada como um alvo para realização de testes diagnósticos de candidemia (PITARCH; ABIAN; CARRASCAL; SÁNCHEZ *et al.*, 2004; PITARCH; JIMÉNEZ;

NOMBELA; GIL, 2006; 2008; PITARCH; NOMBELA; GIL, 2011). Um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro frente às infecções por *C. albicans* é a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP); entre eles histatina 5 e LL-37, que provocam danos na membrana citoplasmática do fungo. A proteína Msb2p secretada por *C. albicans* (e encontrada neste estudo) confere resistência aos AMP's; especialmente LL-37 (SZAFRANSKI-SCHNEIDER; SWIDERGALL; COTTIER; TIELKER *et al.*, 2012). Nos estudos de Swidergall; Ernst e Ernst (2013) Msb2p inibiu outros AMP's como as α - e β -defensinas e AMP's de outros micro-organismos; como a daptomicina. A daptomicina é um antibiótico ativo contra Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* que acaba sendo pouco efetivo contra tais patógenos quando *C. albicans* está presente (SWIDERGALL; ERNST; ERNST, 2013).

A patogenicidade de *C. albicans* está relacionada ao seu polimorfismo. *C. albicans* pode utilizar duas rotas para invadir as células do hospedeiro através da endocitose e da penetração ativa (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Na endocitose, *C. albicans* secreta proteínas especializadas, denominadas invasinas, como Als3 e Ssa1; que se unem aos ligantes no hospedeiro como E-caderina em células epiteliais e N-caderina em células endoteliais (MAYER; WILSON; HUBE, 2013) (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; NAGLIK; KÖNIG; HUBE; GAFFEN, 2017). Já a penetração ativa ocorre por ação das hifas de *C. albicans*. As proteases (Sap); fosfolipases e lipases são as proteínas envolvidas neste processo de invasão (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). O reconhecimento de *C. albicans* no hospedeiro é mediado por Receptores de Padrões de Reconhecimento (PRR de *Pattern Recognition Receptors*), entre eles os receptores do tipo Toll (TLR de *Toll-like Receptors*); os receptores do tipo c de lectina (CLR de *C-type Lectin Receptors*) e os receptores do tipo NOD (NLR de *NOD-like Receptors*) (GOW; VAN DE VEERDONK; BROWN; NETEA, 2012; NAGLIK; KÖNIG; HUBE; GAFFEN, 2017). Todos estes receptores permitem identificações específicas dos patógenos via diversos mecanismos, como por exemplo via carboidratos presentes nas paredes de *C. albicans* (mananas, fosfolipomananas e β -glucanos) (GOW; VAN DE VEERDONK; BROWN; NETEA, 2012; NAGLIK; KÖNIG; HUBE; GAFFEN, 2017). No estudo de Luo; Krüger; Knüpfer; Kasper *et al.* (2016) foi observado que várias proteínas secretadas tinham uma ou mais cadeias glicosiladas, sendo a glicosilação fundamental para a imunorreatividade dos anticorpos frente às proteínas produzidas durante a invasão (LUO; KRÜGER; KNÜPFER; KASPER *et al.*, 2016). A cascata inflamatória no processo infeccioso por *C. albicans* ocorre via

produção de citocinas como IL-10; IL-1 β ; IL-1 α ; IL-18 e adicionalmente via células T auxiliares como TH1 e TH17. A presença de *C. albicans* tem sido reportada em pacientes com carcinomas de células escamosas orais; que apresentam altos níveis de IL-1 β e IL-8 (PERERA; AL-HEBSHI; PERERA; IPE *et al.*, 2017; SHAY; SANGWAN; PADMANABHAN; LUNDY *et al.*, 2020; VESTY; GEAR; BISWAS; RADCLIFF *et al.*, 2018). A IL-1 β é uma citocina inflamatória que é secretada a partir da ativação do inflamassoma (IDRIS; GHAZALI; KOH, 2015; LEE; CHANG; SYU; WONG *et al.*, 2015). A ativação do inflamassoma é mediada pela resposta imune inata ao reconhecimento de PRR; relacionados às repostas frente aos patógenos ou sinais de dano celular (IDRIS; GHAZALI; KOH, 2015; LEE; CHANG; SYU; WONG *et al.*, 2015). O estudo de Lee; Chang; Syu; Wong *et al.* (2015) permitiu estabelecer o papel de IL-1 β no carcinoma oral de células escamosas (OSCC). IL-1 β tem uma relação direta na progressão de OSCC e possíveis efeitos promotores de metástase. Neste estudo foi observado que células DOK quando cultivadas em presença de IL-1 β , aumentavam suas taxas de proliferação seguida de desregulação na sinalização celular (LEE; CHANG; SYU; WONG *et al.*, 2015). O estudo também estabeleceu uma correlação direta entre os níveis de IL-1 β e a presença de alterações patológicas malignas em tecidos orais (LEE; CHANG; SYU; WONG *et al.*, 2015). Além desta relação direta de IL-1 β com o OSCC; IL-1 β juntamente com IL-6 é capaz de induzir a diferenciação de células TH17 em seres humanos (KESSELRING; THIEL; PRIES; TRENKLE *et al.*, 2010). No estudo Kesselring; Thiel; Pries; Trenkle *et al.* (2010) demonstrou-se uma maior presença de células TH17 no sangue periférico de pacientes com carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC).

Os ensaios realizados com as células inflamatórias THP-1 e com as células displásicas DOK, e tumorais SCC-25 e Detroit 562, expostas às proteínas extraídas dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h, não revelaram atividade citotóxica destas moléculas. Ainda quando os ensaios demonstraram que estatisticamente as proteínas não apresentam um efeito citotóxico, é possível que a resposta esteja relacionada com a hormesis. A hormesis é uma resposta coordenada das células e os organismos frente aos desafios impostos ou gerados intrinsecamente, os quais envolvem vários processos de tradução de sinal de resposta (CALABRESE; MATTSON, 2017); normalmente ligada a baixos níveis do toxico, permitindo as células ou organismos a se preparar para uma resposta a uma concentração maior.

A patofisiologia de *C. albicans* também está relacionada à produção de lipídeos, sobretudo em biofilmes (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018). Neste trabalho foi possível isolar e quantificar um *pool* de lipídeos oriundos do secretoma dos biofilmes de *C. albicans* de 36 h.

Após a obtenção de concentrações satisfatórias de lipídeos, em média $3,48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, estas amostras foram analisadas por RMN, permitindo identificar 3 grupos principais de lipídeos nas amostras: o fosfatidilinositol (PI), que é um lipídeo neutro; a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidilglicerol (PG), que são lipídeos polares. O grupo de Lattif; Mukherjee; Chandra; Roth et al. (2011) descreveram o PI como principal fosfolipídeo presente em biofilmes de *C. albicans*. O PI está relacionado com funções de adesão; sendo também um precursor dos esfingolipídeos necessários na formação de vesículas lipídicas. No entanto, nas análises de RMN não foram encontrados esfingolipídeos, o que pode ser devido à pequena porcentagem de 0,5% de tais moléculas nos biofilmes de *C. albicans* segundo reporta a literatura. (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018). A extração dos lipídeos, realizada neste trabalho, baseou-se apenas no produto do secretoma dos biofilmes e não em partes de quebra de membranas celulares como relatado por Singh; Khyati Kapoor; Mandal; Roth et al. (2010), em que a precipitação foi realizada também com a técnica de Clorofórmio:Metanol, porém com degradação da parede celular fúngica por *glass beads*. No caso de Zarnowski; Westler; Lacmbouh; Marita et al. (2014) foram utilizadas duas técnicas complementares; a metilação de ácidos graxos e a extração direta mediante espectrometria de gases acoplada a cromatografia. A técnica de análise usada por Lattif; Mukherjee; Chandra; Roth et al. (2011) foi uma cromatografia de gases; usando padrões específicos para a detecção de esfingolipídeos.

Conforme já mencionado, outro lipídeo detectado no *pool* do secretoma neste trabalho foi o PG. No estudo realizado por Singh; Yadav e Prasad (2012) demonstrou-se que PG está muito relacionado com a resistência aos azóis; principalmente pela importância de PG na formação da parede celular e em funções mitocondriais de *C. albicans*. À cerca do lipídeo PC, também encontrado no *pool* do secretoma, deve-se pontuar a importância deste lipídeo na regulação do metabolismo de *C. albicans*; Khandelwal; Kaemmer; Förster; Singh et al. (2016) demonstraram que quando os transportadores de PC são silenciados há uma desregulação da homeostase dos lipídeos com acúmulo em vesículas, aumento da susceptibilidade aos antifúngicos e diminuição da virulência (KHANDELWAL; KAEMMER; FÖRSTER; SINGH et al., 2016; SINGH; YADAV; PRASAD, 2012).

Os lipídeos são moléculas de armazenamento de alta energia, sendo importantes para o balanço energético celular. O papel dos lipídeos na tumorigenese está em discussão, porém sua importância já é reconhecida (CRUZ; BARRETO; FAZOLINI; VIOLA et al., 2020). Sobre este propósito, os lipídeos extraídos do secretoma dos biofilmes de *C. albicans*, foram

utilizados para estudar o comportamento de células displásicas e neoplásicas da CCP, primeiramente via ensaios de viabilidade/citotoxicidade por MTT. Os experimentos demonstraram ausência de efeito citotóxico após exposição aos lipídeos do *pool*. Após estes ensaios foram selecionadas as concentrações 2% v/v. Nos ensaios de Alamar Blue, observou-se um aumento das taxas de crescimento celular nas células DOK, SCC-25 e Detroit 562. No estudo de Pascual; Avgustinova; Mejetta; Martín et al. (2017) observou-se que células de carcinoma oral (entre elas SCC-25 e Detroit 562) apresentavam maiores taxas de proliferação quando cultivadas na presença de lipídeos e isto estaria relacionado a presença do receptor CD36 de ácidos graxos nestas células. Estes resultados foram reportados com o ácido palmítico, proveniente de dietas ricas em gorduras. A revisão realizada por Buechler e Aslanidis (2020) trata do conhecimento atual do papel dos lipídeos no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (HCC). Nesta revisão foi descrito que PC; especialmente as variantes poli-insaturadas, eram menos presentes nos tecidos de HCC; enquanto que as variantes monoinsaturadas eram mais abundantes nas lesões neoplásicas (BUECHLER; ASLANIDIS, 2020). Com relação ao PI, já foram descritas induções de alteração no gene *TP53* em células tumorais (BUECHLER; ASLANIDIS, 2020). No estudo realizado pelo grupo de Schmidt; Kajtár; Juhász; Péter et al. (2020), observou-se que a marcação de lipídeos em biópsias de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (HNSCC de *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) estava depletada em relação à lisofosfatidilcolina (LPC). Por outro lado, foi observado um acúmulo de glicerolipídeos como o PE e PC nas áreas neoplásicas. Sendo assim, os autores concluem que lipídeos poderiam funcionar como marcadores de diagnóstico e de prognóstico, além de contribuírem para um melhor entendimento do comportamento de HNSCC (SCHMIDT; KAJTÁR; JUHÁSZ; PÉTER et al., 2020).

Para melhor entender os processos celulares ocorridos durante a exposição aos lipídeos isolados do secretoma dos biofilmes de *C. albicans*, estudou-se a formação de *Lipids Droplets* (LDs) nas células tumorais, DOK, SCC-25 e Detroit 562. A formação de LDs em tumores é particularmente importante. A reprogramação metabólica via LDs é um *Hallmark* do câncer; nesta reprogramação mediada por mutações não específicas é normal que as células tenham um desbalanço no metabolismo (LUO; ZHAO; CHENG; LI et al., 2018). Este desbalanço pode ser devido a um mau funcionamento de rotas metabólicas de lipídeos, ou por criação de novas rotas de síntese “de novo” (CRUZ; BARRETO; FAZOLINI; VIOLA et al., 2020; CURRIE; SCHULZE; ZECHNER; WALTHER et al., 2013; LUO; ZHAO; CHENG; LI et al., 2018). As células neoplásicas requerem maior quantidade de energia e fontes de carbono, devido às altas

taxas de multiplicação. Muitos fosfolipídeos são parte essencial das membranas celulares e são derivados de ácidos graxos, que são fontes importantes de energia (CURRIE; SCHULZE; ZECHNER; WALTHER et al., 2013). As células neoplásicas tendem a formar LDs para melhorar a captação de lipídeos; aumentar a síntese “de novo” e regular a lipólise, permitindo uma maior disponibilidade de energia (CRUZ; BARRETO; FAZOLINI; VIOLA et al., 2020).

Neste trabalho detectou-se um considerável aumento na formação de LDs, nas células DOK, SCC-25 e Detroit 562, cultivadas por 72 h na presença do *pool* de lipídeos do secretoma de *C. albicans*, evento mais evidente nas células DOK e SCC-25. Esta formação de LDs foi acompanhada de aumento das taxas de crescimento e nenhuma queda na viabilidade celular. Dessa forma, podemos afirmar que os lipídeos isolados modularam vias de metabolismo lipídico nas células neoplásicas estudadas. Com o intuito de investigar e corroborar se o efeito causado era realmente devido aos lipídeos de *C. albicans*, trabalhou-se na investigação de possíveis alterações de resistência a fármacos anti-tumorais. Vários estudos têm demonstrado que a presença de LDs é maior em células resistentes aos quimioterápicos; como no carcinoma de ovário humano resistente a cisplatina (MONTOPOLI; BELLANDA; LONARDONI; RAGAZZI et al., 2011); no carcinoma mamário humano e no adenocarcinoma de cólon humano, ambos resistentes a doxorrubicina (SANTINI; NAPOLITANO; FERRANTE; RAINALDI et al., 2003; SANTINI; ROMANO; RAINALDI; FILIPPINI et al., 2001). Nos estudos de Schlaepfer; Hitz; Gijón; Bergman et al. (2012) e Rak; De Zan; Stefulj; Kosović et al. (2014) células tumorais T47D e 7T apresentaram uma resistência à morte celular mediada pela formação de LDs.

Nesta proposição, mediante os ensaios de internalização de CPT, foi observado que efetivamente os LDs modificaram a distribuição da CPT nas células estudadas, assim como a resposta a este anti-tumoral. Este comportamento poderia contextualizar a mitigação da ação de CPT nas células previamente expostas aos lipídeos de *C. albicans*. Adicionalmente, observou-se que a CPT estaria co-localizada e estocada nos LDs, possivelmente devido a sua hidrofobicidade, assim como descrito por Santini; Romano; Rainaldi; Filippini *et al.* (2001).

Por fim, as células cultivadas por 72 h com lipídeos do secretoma de *C. albicans*, apresentaram resistência à ação de CPT. No entanto, o comportamento das células metastáticas, Detroit 562, foi mais discreto. Desta maneira, pode-se inferir que o efeito

causado pela presença de lipídeos de *C. albicans* estaria relacionado também ao fenótipo de progressão tumoral; assim como foi mencionado nos estudos das alterações de expressão de proto-oncogenes mediados pelo secretoma de *C. albicans* por Amaya Arbeláez; De Paula e Silva; Navegante; Valente *et al.* (2021). Os autores relatam um incremento na expressão dos genes *Bcl-2* e *PI3KCA* nas células SCC-25 e; *hRas* e *BRAF* nas células Detroit 562 expostas ao secretoma de biofilmes jovens (16 h de formação). A superexpressão destes genes está relacionada com o crescimento, evasão e metástases (AMAYA ARBELÁEZ; DE PAULA E SILVA; NAVEGANTE; VALENTE *et al.*, 2021). Adicionalmente, foi observado que o secretoma de biofilmes de *C. albicans* de 36 h reduziu a expressão do gene *CDKN1B* nas células SCC-25. O gene *CDKN1B* codifica a proteína p27, que é um supressor de tumor. A redução da expressão de *CDKN1B* tem sido observado em displasias e lesões de OSCC com prognóstico reservado (CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Baixos níveis de p27 estão relacionados com um aumento na taxa de proliferação celular (CHU; HENGST; SLINGERLAND, 2008). Novos estudos sobre a interação das proteínas e lipídeos específicos ainda precisam ser entendidos, os resultados obtidos neste trabalho permitem abrir a discussão sobre a influência destas moléculas nos fenótipos celulares relacionados ao câncer de cabeça e pescoço.

V. Conclusões

O biofilme de *C. albicans* formado em 36 horas permitiu extrair, em média, $48,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteínas e $3,49 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de lipídeos. Identificou-se 114 proteínas provenientes do secretoma deste biofilme, as quais não apresentaram perfil de citotoxicidade nas células estudadas. Foram identificadas 3 classes de lipídeos: fosfatidilinositol, que é um lipídeo neutro; fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol, que são lipídeos polares. Os lipídeos aumentaram as taxas de viabilidade e crescimento celular, assim como induziram robusta produção de *Lipid Droplets* nas células DOK, SCC-25 e Detroit 562. A presença dos *Lipid Droplets* modificou a distribuição intracelular da camptotecina. Esta interação mitigou o efeito anti-tumoral da molécula, especialmente nas células DOK e SCC-25, as quais tornaram-se resistentes à ação da camptotecina. Sendo assim, as proteínas e mais notadamente neste trabalho, os lipídeos, provenientes do secretoma de biofilmes maduros de *C. albicans*, são capazes de interagir e modular respostas em células displásicas e tumorais de carcinoma de cabeça e pescoço.

VI. Referências Bibliográficas

ALFAROUK, K. O.; BASHIR, A. H. H.; ALJARBOU, A. N.; RAMADAN, A. M. *et al.* The Possible Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer and Its Management. **Frontiers in Oncology**, v. 9, article 75, 2019-February-22 2019. Review <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00075>

ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. **Journal of Fungi**, v.4, n.4, p. 140, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jof4040140>

ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. L. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v.4, n. 4, p. 140, 2018. <https://doi.org/10.3390/jof4040140>

ALLAM, M.; BERTRAND, R.; ZHANG-SUN, G.; PAPPAS, J. *et al.* Cholera Toxin Triggers Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v.57, n. 13, p. 2615-2618, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS journal**, 272, n. 20, p. 5101-5109, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>

AMAYA ARBELÁEZ, M. I.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; NAVEGANTE, G.; VALENTE, V. *et al.* Proto-Oncogenes and Cell Cycle Gene Expression in Normal and Neoplastic Oral Epithelial Cells Stimulated With Soluble Factors From Single and Dual Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 11, n. 51, 2021-February-25 2021. Original Research <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.627043>

ARNHEIM DAHLSTRÖM, L.; ANDERSSON, K.; LUOSTARINEN, T.; THORESEN, S. *et al.* Prospective Seroepidemiologic Study of Human Papillomavirus and Other Risk Factors in Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 20, n. 12, p. 2541-2550, 2011. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0761> %J Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention

ATCC. **Detroit 562 (ATCC® CCL-138™)** 2020a. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-138.aspx>. Acesso em: 23 de Fevereiro de 2020.

ATCC. **SCC-25 (ATCC® CRL-1628™)** 2020b. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1628.aspx#>. Acesso em: 24 de Fevereiro de 2020.

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

ATCC. **Candida albicans (Robin) Berkhout MYA-2876™** 2021. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/mya-2876>. Acesso em: 15/06.

AYKUT, B.; PUSHALKAR, S.; CHEN, R.; LI, Q. *et al.* The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. **Nature**, 574, n. 7777, p. 264-267, 2019/10/01 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1608-2>

AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N. *et al.* Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, 43, n. 3, p. 313-351, 2017/05/04 2017. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

BACHMANN, M.; MÖRÖY, T. The serine/threonine kinase Pim-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 37, n. 4, p. 726-730, 2005/04/01/ 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.11.005>

BÁNYAI, L.; TREXLER, M.; KERÉKES, K.; CSUKA, O. *et al.* Use of signals of positive and negative selection to distinguish cancer genes and passenger genes. **eLife**, 10, p. e59629, 2021/01/11 2021. <https://doi.org/10.7554/eLife.59629>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 59, n. 2, p. 73-76, Apr 2006.

BUECHLER, C.; ASLANIDIS, C. Role of lipids in pathophysiology, diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1865, n. 5, p. 158658, 2020/05/01/ 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158658>

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, 3, n. 1, p. 13, 2017/09/15 2017. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, 72, n. 3, p. 495-544, 2008. <https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.00032-07>

CHANG, C.; MARSZLOWICZ, G.; WALDMAN, Z.; LI, P. *et al.* Guanylyl cyclase C as a biomarker for targeted imaging and therapy of metastatic colorectal cancer. **Biomarkers in Medicine**, 3, n. 1, p. 33-45, 2009. <https://doi.org/10.2217/17520363.3.1.33>

CHANG, L.; TSAI, J.-S.; HUANG, S.-J.; SHIH, C.-C. Evaluation of infectious complications of the implantable venous access system in a general oncologic population. **American Journal of Infection Control**, 31, n. 1, p. 34-39, 2003/02/01 2003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1067/mic.2003.29>

CHATURVEDI, A. K.; GAYDOS, C. A.; AGREDA, P.; HOLDEN, J. P. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* Infection and Risk for Lung Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 19, n. 6, p. 1498-1505, 2010. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-1261> %J Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention

CHENG, C.; GENG, F.; CHENG, X.; GUO, D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. **Cancer Communications**, 38, n. 1, p. 27, 2018/05/21 2018. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0301-4>

CHILDERS, B. M.; VAN LAAR, T. A.; YOU, T.; CLEGG, S. *et al.* MrkD1P from *Klebsiella pneumoniae* strain IA565 allows for coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* and protection from protease-mediated biofilm detachment. **Infection and immunity**, 81, n. 11, p. 4112-4120, 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.00521-13>

CHOW, L. Q. M. Head and Neck Cancer. **The New England Journal of Medicine**, 382, n. 1, p. 60-72, 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1715715>

CHU, I. M.; HENGST, L.; SLINGERLAND, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 8, n. 4, p. 253-267, 2008/04/01 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2347>

CRUZ, A. L. S.; BARRETO, E. d. A.; FAZOLINI, N. P. B.; VIOLA, J. P. B. *et al.* Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. **Cell Death & Disease**, 11, n. 2, p. 105, 2020/02/06 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2297-3>

CULLEN, P. J.; SPRAGUE, G. F., Jr. The regulation of filamentous growth in yeast. **Genetics**, 190, n. 1, p. 23-49, 2012. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>

CURRIE, E.; SCHULZE, A.; ZECHNER, R.; WALTHER, Tobias C. *et al.* Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell Metabolism**, 18, n. 2, p. 153-161, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>

DE CARVALHO DIAS, K.; BARBUGLI, P. A.; DE PATTO, F.; LORDELLO, V. B. *et al.* Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. **BMC microbiology**, 17, n. 1, p. 146-146, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1031-5>

DE CARVALHO DIAS, K.; DE SOUSA, D. L.; BARBUGLI, P. A.; CERRI, P. S. *et al.* Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. **Journal of Microbiological Methods**, 152, p. 52-60, 2018/09/01/ 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.004>

DIAS, K. d. C.; BARBUGLI, P. A.; VERGANI, C. E. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. **Journal of Microbiological Methods**, 125, p. 40-42, 2016/06/01/ 2016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.018>

DUVIC, M.; KUZEL, T. M.; OLSEN, E. A.; MARTIN, A. G. *et al.* Quality-of-Life Improvements in Cutaneous T-Cell Lymphoma Patients Treated with Denileukin Diftitox (ONTAK®). **Clinical Lymphoma**, 2, n. 4, p. 222-228, 2002/03/01/ 2002. <https://doi.org/https://doi.org/10.3816/CLM.2002.n.003>

DZUTSEV, A.; BADGER, J. H.; PEREZ-CHANONA, E.; ROY, S. *et al.* Microbes and Cancer. **Annual Review of Immunology**, 35, n. 1, p. 199-228, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133>

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

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FOURIE, R.; ELLS, R.; SWART, C. W.; SEBOLAI, O. M. *et al.* *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids. **Frontiers in Physiology**, 7, n. 64, 2016-February-26 2016. Review <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00064>

FRANKEL, A.; POWELL, B.; LILLY, M. J. C. c.; MODIFIERS, b. r. Diphtheria toxin conjugate therapy of cancer. **Cancer Chemotherapy and Biological Responses Modifiers**, 20, p. 301-313, 2002.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, 3, n. 5, p. 362-374, 2003/05/01 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G. *et al.* *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. **Eukaryotic Cell**, 3, n. 2, p. 536-545, 2004. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.536-545.2004>

GARIÉPY, J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 39, n. 1, p. 99-106, 2001/08/01/ 2001. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00126-3)

GARRETT, W. S. Cancer and the microbiota. **Science (New York, N.Y.)**, 348, n. 6230, p. 80-86, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>

GEĐAS, A.; OLSZEWSKA, M. A. Chapter 1 - Biofilm formation and resistance. *In*: SIMOES, M.; BORGES, A., *et al* (Ed.). **Recent Trends in Biofilm Science and Technology**: Academic Press, 2020. p. 1-21.

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

GIL-BONA, A.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C. Global Proteomic Profiling of the Secretome of *Candida albicans* ecm33 Cell Wall Mutant Reveals the Involvement of Ecm33 in Sap2 Secretion. **Journal of Proteome Research**, 14, n. 10, p. 4270-4281, 2015/10/02 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00411>

GILELES-HILLEL, A.; SHOSEYOV, D.; POLACHEK, I.; KOREM, M. *et al.* Association of chronic *Candida albicans* respiratory infection with a more severe lung disease in patients with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, 50, n. 11, p. 1082-1089, 2015/11/01 2015. <https://doi.org/10.1002/ppul.23302> <https://doi.org/10.1002/ppul.23302>

GONÇALVES, S.; SILVA, P. M.; FELÍCIO, M. R.; DE MEDEIROS, L. N. *et al.* Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 7, p. 249-249, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00249>

GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, 10, n. 2, p. 112-122, 2012/02/01 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>

GRAINHA, T.; JORGE, P.; ALVES, D.; LOPES, S. P. *et al.* Unraveling *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* Communication in Coinfection Scenarios: Insights Through

Network Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, n. 676, 2020-November-11 2020. Original Research <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.550505>

GRAPHPAD. **GraphPad Prism**. Versão 9.0.0. GraphPad Software, 2020.

HAIKO, J.; SAEEDI, B.; BAGGER, G.; KARPATI, F. *et al.* Coexistence of *Candida* species and bacteria in patients with cystic fibrosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 38, n. 6, p. 1071-1077, 2019/06/01 2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03493-3>

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in microbiology**, 19, n. 11, p. 557-563, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.004>

HATAKEYAMA, M.; HIGASHI, H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. **Cancer Science**, 96, n. 12, p. 835-843, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00130.x>

HENNEBERRY, A. L.; WRIGHT, M. M.; MCMASTER, C. R. The Major Sites of Cellular Phospholipid Synthesis and Molecular Determinants of Fatty Acid and Lipid Head Group Specificity. **Molecular Biology of the Cell**, 13, n. 9, p. 3148-3161, 2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0540>

HERTZBERG, R. P.; CARANFA, M. J.; HECHT, S. M. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. **Biochemistry**, 28, n. 11, p. 4629-4638, 1989/05/30 1989. <https://doi.org/10.1021/bi00437a018>

HOFFMAN, L. R.; DÉZIEL, E.; D'ARGENIO, D. A.; LÉPINE, F. *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 52, p. 19890-19895, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606756104> %J Proceedings of the National Academy of Sciences

IDRIS, A.; GHAZALI, N. B.; KOH, D. Interleukin 1 β —A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? **Biomarkers in Cancer**, 7, p. BIC.S25375, 2015. <https://doi.org/10.4137/bic.S25375>

INABA, H.; SUGITA, H.; KUBONIWA, M.; IWAI, S. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. **Cellular Microbiology**, 16, n. 1, p. 131-145, 2014/01/01 2014. <https://doi.org/10.1111/cmi.12211> <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cmi.12211>

INCA. **Atlas On-line de Mortalidade**. Instituto Nacional de Cancer, 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo02/consultar.xhtml?sessionId=F64B26D675CD52DB8B7EEA13C3EF85C4#panelResultado>. Acesso em: 19 de Junho de 2021.

INCA. **Estatísticas de câncer**. Instituto Nacional de Cancer, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 19 de Junho de 2021.

INCA. **Neoplasia maligna da cavidade oral (taxas ajustadas)**. Instituto Nacional de Cancer, 2021c. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-da-cavidade-oral>. Acesso em: 19 de Junho de 2021.

INGHAM, C. J.; BOONSTRA, S.; LEVELS, S.; DE LANGE, M. *et al.* Rapid Susceptibility Testing and Microcolony Analysis of *Candida* spp. Cultured and Imaged on Porous Aluminum Oxide. **PLOS ONE**, 7, n. 3, p. e33818, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033818>

JOHANSSON, D.; BERGSTRÖM, P.; HENRIKSSON, R.; GRANKVIST, K. *et al.* Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* enhances cisplatin-induced apoptosis to lung cancer cells in vitro. **Oncology research**, 15, n. 9, p. 423-430, 2006 2006. <https://doi.org/10.3727/096504005776568273>

JOHANSSON, D.; JOHANSSON, A.; BEHNAM-MOTLAGH, P. α -Toxin of *Staphylococcus aureus* overcomes acquired cisplatin-resistance in malignant mesothelioma cells. **Cancer Letters**, 265, n. 1, p. 67-75, 2008/06/28/ 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.007>

KACHLANY, S. C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin:from Threat to Therapy. **Journal of Dental Research**, 89, n. 6, p. 561-570, 2010. <https://doi.org/10.1177/0022034510363682>

KESSELRING, R.; THIEL, A.; PRIES, R.; TRENKLE, T. *et al.* Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. **British Journal of Cancer**, 103, n. 8, p. 1245-1254, 2010/10/01 2010. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605891>

KHANDELWAL, Nitesh K.; KAEMMER, P.; FÖRSTER, Toni M.; SINGH, A. *et al.* Pleiotropic effects of the vacuolar ABC transporter MLT1 of *Candida albicans* on cell function and virulence. **Biochemical Journal**, 473, n. 11, p. 1537-1552, 2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160024> %J Biochemical Journal

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**, 49, n. 2, p. 171, 2011/05/03 2011. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>

KLIS, F. M.; BRUL, S. Adaptations of the Secretome of *Candida albicans* in Response to Host-Related Environmental Conditions. **Eukaryotic cell**, 14, n. 12, p. 1165-1172, 2015. <https://doi.org/10.1128/EC.00142-15> %J Eukaryotic Cell

KLOTZ, S. A.; GAUR, N. K.; DE ARMOND, R.; SHEPPARD, D. *et al.* *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. **Medical Mycology**, 45, n. 4, p. 363-370, 2007. <https://doi.org/10.1080/13693780701299333> %J Medical Mycology

KOBLINSKI, J. E.; AHAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clinica Chimica Acta**, 291, n. 2, p. 113-135, 2000/02/15/ 2000. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00224-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00224-7)

KOSTIC, Aleksandar D.; CHUN, E.; ROBERTSON, L.; GLICKMAN, Jonathan N. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. **Cell Host & Microbe**, 14, n. 2, p. 207-215, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>

KUO, S. C.; HU, Y. W.; LIU, C. J.; LEE, Y. T. *et al.* Association between tuberculosis infections and non-pulmonary malignancies: a nationwide population-based study. **British Journal of Cancer**, 109, n. 1, p. 229-234, 2013/07/01 2013. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.220>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, 1970/08/01 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LAI, C.-C.; WANG, C.-Y.; LIU, W.-L.; HUANG, Y.-T. *et al.* Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. **Journal of Medical Microbiology**, 61, n. 5, p. 701-704, 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.038166-0>

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

LAX, A. J.; GRIGORIADIS, A. E. *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. **International Journal of Medical Microbiology**, 291, n. 4, p. 261-268, 2001/01/01/ 2001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/1438-4221-00129>

LEE, C.-H.; CHANG, J. S.-M.; SYU, S.-H.; WONG, T.-S. *et al.* IL-1 β Promotes Malignant Transformation and Tumor Aggressiveness in Oral Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, 230, n. 4, p. 875-884, 2015/04/01 2015. <https://doi.org/10.1002/jcp.24816> <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.24816>

LEE, S. A.; WORMSLEY, S.; KAMOUN, S.; LEE, A. F. S. *et al.* An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. **Yeast**, 20, n. 7, p. 595-610, 2003. <https://doi.org/10.1002/yea.988>

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, 149, n. 2, p. 353-362, 2003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.25932-0>

LIM, C. S. Y.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 31, n. 1, p. 21-31, 2012/01/01 2012. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1273-3>

LIMON, J. J.; TANG, J.; LI, D.; WOLF, A. J. *et al.* *Malassezia* Is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. **Cell host & microbe**, 25, n. 3, p. 377-388.e376, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.007>

LUO, T.; KRÜGER, T.; KNÜPFER, U.; KASPER, L. *et al.* Immunoproteomic Analysis of Antibody Responses to Extracellular Proteins of *Candida albicans* Revealing the Importance of Glycosylation for Antigen Recognition. **Journal of Proteome Research**, 15, n. 8, p. 2394-2406, 2016/08/05 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01065>

LUO, X.; ZHAO, X.; CHENG, C.; LI, N. *et al.* The implications of signaling lipids in cancer metastasis. **Experimental & Molecular Medicine**, 50, n. 9, p. 127, 2018/09/21 2018. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0150-x>

MAGANA, M.; SERETI, C.; IOANNIDIS, A.; MITCHELL, C. A. *et al.* Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical microbiology reviews**, 31, n. 3, p. e00084-00016, 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>

MAO, S.; PARK, Y.; HASEGAWA, Y.; TRIBBLE, G. D. *et al.* Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Cellular Microbiology**, 9, n. 8, p. 1997-2007, 2007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00931.x>

MARÍN, E.; PARRA-GIRALDO, C. M.; HERNÁNDEZ-HARO, C.; HERNÁEZ, M. L. *et al.* *Candida albicans* Shaving to Profile Human Serum Proteins on Hyphal Surface. **Frontiers in Microbiology**, 6, n. 1343, 2015-December-08 2015. Original Research <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01343>

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, 83, n. 4, p. 489-501, 2008. <https://doi.org/10.4065/83.4.489>

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, 91, n. 3, p. 386-396, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, 4, n. 2, p. 119-128, 2013/02/15 2013. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>

MCCULLOUGH, M.; JABER, M.; BARRETT, A. W.; BAIN, L. *et al.* Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. **Oral Oncology**, 38, n. 4, p. 391-393, 2002/06/01/ 2002. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(01\)00079-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1368-8375(01)00079-3)

MICHL, P.; BUCHHOLZ, M.; ROLKE, M.; KUNSCH, S. *et al.* Claudin-4: A new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Gastroenterology**, 121, n. 3, p. 678-684, 2001. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.27124>

MOCHON, A. B.; JIN, Y.; KAYALA, M. A.; WINGARD, J. R. *et al.* Serological Profiling of a *Candida albicans* Protein Microarray Reveals Permanent Host-Pathogen Interplay and Stage-Specific Responses during Candidemia. **PLOS Pathogens**, 6, n. 3, p. e1000827, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000827>

MONTOPOLI, M.; BELLANDA, M.; LONARDONI, F.; RAGAZZI, E. *et al.* "Metabolic Reprogramming"; in Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin. **Current Cancer Drug Targets**, 11, n. 2, p. 226-235, 2011. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156800911794328501>

MOYES, D. L.; WILSON, D.; RICHARDSON, J. P.; MOGAVERO, S. *et al.* Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, 532, n. 7597, p. 64-68, 2016/04/01 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17625>

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 67, n. 3, p. 400-428, 2003. <https://doi.org/10.1128/mmb.67.3.400-428.2003>

NAGLIK, J. R.; KÖNIG, A.; HUBE, B.; GAFFEN, S. L. *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current Opinion in Microbiology**, 40, p. 104-112, 2017/12/01/ 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.030>

NAKHJIRI, S. F.; PARK, Y.; YILMAZ, O.; CHUNG, W. O. *et al.* Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiology Letters**, 200, n. 2, p. 145-149, 2001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10706.x>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, N. **BLAST**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 13 de Agosto de 2020.

NCBI, R. C. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, 44, n. Database issue, p. D7-D19, 11/28. 11/05/accepted. 11/04/revised 09/16/received 2016. <https://doi.org/http://10.1093/nar/gkv1290>

NØRGAARD, M.; THOMSEN, R. W.; FARKAS, D. K.; MOGENSEN, M. F. *et al.* *Candida* infection and cancer risk: A Danish nationwide cohort study. **European Journal of Internal Medicine**, 24, n. 5, p. 451-455, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.02.017>

NUNES, T. S. B. S.; ROSA, L. M.; VEGA-CHACÓN, Y.; MIMA, E. G. d. O. Fungistatic Action of N-Acetylcysteine on *Candida albicans* Biofilms and Its Interaction with Antifungal Agents **Microorganisms**, 8, p. 980, 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms8070980>

OLIVARES-YAÑEZ, C.; EMERSON, J.; KETTENBACH, A.; LOROS, J. J. *et al.* Modulation of Circadian Gene Expression and Metabolic Compensation by the RCO-1 Corepressor of *Neurospora crassa*. **Genetics**, 204, n. 1, p. 163-176, 2016. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.191064> %J Genetics

ORTH, J. H. C.; LANG, S.; TANIGUCHI, M.; AKTORIES, K. *Pasteurella multocida* Toxin-induced Activation of RhoA Is Mediated via Two Families of Gα Proteins, Gαq and Gα12/13. **Journal of Biological Chemistry**, 280, n. 44, p. 36701-36707, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507203200>

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, 4, n. 1, p. 18026, 2018/05/11 2018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>

PARK, J. B.; LEE, C. S.; JANG, J.-H.; GHIM, J. *et al.* Phospholipase signalling networks in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 12, n. 11, p. 782-792, 2012/11/01 2012. <https://doi.org/10.1038/nrc3379>

PASCUAL, G.; AVGUSTINOVA, A.; MEJETTA, S.; MARTÍN, M. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, 541, n. 7635, p. 41-45, 2017/01/01 2017. <https://doi.org/10.1038/nature20791>

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, 72, n. 2, p. 157-165, 2008/02/01/ 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>

PERERA, M.; AL-HEBSHI, N. N.; PERERA, I.; IPE, D. *et al.* A dysbiotic mycobiome dominated by *Candida albicans* is identified within oral squamous-cell carcinomas. **Journal of Oral Microbiology**, 9, n. 1, p. 1385369, 2017/01/01 2017. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1385369>

PITARCH, A.; ABIAN, J.; CARRASCAL, M.; SÁNCHEZ, M. *et al.* Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. **Proteomics**, 4, n. 10, p. 3084-3106, 2004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pmic.200400903>

PITARCH, A.; JIMÉNEZ, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Decoding Serological Response to *Candida* Cell Wall Immunome into Novel Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Candidates for Systemic Candidiasis by Proteomic and Bioinformatic Analyses *. **Molecular & Cellular Proteomics**, 5, n. 1, p. 79-96, 2006. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500243-MCP200>

PITARCH, A.; JIMÉNEZ, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, 2, n. 4, p. 596-618, 2008/04/01 2008. <https://doi.org/10.1002/prca.200780039>
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prca.200780039>

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-*Candida* antibodies in serum. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, 10, n. 1, p. M110.004010-M004110.004010, 2011. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004010>

PREUß, I.; HILDEBRAND, D.; ORTH, J. H. C.; AKTORIES, K. *et al.* *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. **Cellular Microbiology**, 12, n. 8, p. 1174-1185, 2010. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01462.x>

RADULOVIC, M.; KNITTELFELDER, O.; CRISTOBAL-SARRAMIAN, A.; KOLB, D. *et al.* The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. **Current Genetics**, 59, n. 4, p. 231-242, 2013/11/01 2013. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0407-9>

RAK, S.; DE ZAN, T.; STEFULJ, J.; KOSOVIĆ, M. *et al.* FTIR spectroscopy reveals lipid droplets in drug resistant laryngeal carcinoma cells through detection of increased ester vibrational bands intensity. **Analyst**, 139, n. 13, p. 3407-3415, 2014. 10.1039/C4AN00412D <https://doi.org/10.1039/C4AN00412D>

RAMIREZ-GARCIA, A.; GALLOT, N.; ABAD, A.; MENDOZA, L. *et al.* Molecular fractionation and characterization of a *Candida albicans* fraction that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 92, n. 1, p. 133-145, 2011/10/01 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3540-8>

RAMIREZ-GARCIA, A.; REMENTERIA, A.; AGUIRRE-URIZAR, J. M.; MORAGUES, M. D. *et al.* *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or

progression? **Critical Reviews in Microbiology**, 42, n. 2, p. 181-193, 2016/03/03 2016. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.913004>

RAMÍREZ-LABRADA, A. G.; ISLA, D.; ARTAL, A.; ARIAS, M. *et al.* The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy. **Trends in Cancer**, 6, n. 2, p. 86-97, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.007>

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

ROBERTS, A. E. L.; KRAGH, K. N.; BJARNSHOLT, T.; DIGGLE, S. P. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection. **Journal of Molecular Biology**, 427, n. 23, p. 3646-3661, 2015/11/20/ 2015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.002>

RODRÍGUEZ-CUESTA, J.; HERNANDO, F. L.; MENDOZA, L.; GALLOT, N. *et al.* *Candida albicans* enhances experimental hepatic melanoma metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, 27, n. 1, p. 35-42, 2010/01/01 2010. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9300-9>

ROMÁN, E.; COTTIER, F.; ERNST, J. F.; PLA, J. Msb2 Signaling Mucin Controls Activation of Cek1 Mitogen-Activated Protein Kinase in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, 8, n. 8, p. 1235-1249, 2009. <https://doi.org/doi:10.1128/EC.00081-09>

RUBINSTEIN, Mara R.; WANG, X.; LIU, W.; HAO, Y. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. **Cell Host & Microbe**, 14, n. 2, p. 195-206, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>.

RUIZ-HERRERA, J.; VICTORIA ELORZA, M.; VALENTÍN, E.; SENTANDREU, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, 6, n. 1, p. 14-29, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x> %J FEMS Yeast Research.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; CHEUNG, B. P. K.; JAYATILAKE, J. A. M. S. *et al.* Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, 114, n. 12, p. 857-866, 2006. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_479.x

SANTINI, M. T.; NAPOLITANO, M.; FERRANTE, A.; RAINALDI, G. *et al.* Differential control of cholesterol and fatty acid biosynthesis in sensitive and multidrug-resistant LoVo tumor cells. **Anticancer research**, 23, n. 6C, p. 4737-4746, Nov-Dec, 2003.

SANTINI, M. T.; ROMANO, R.; RAINALDI, G.; FILIPPINI, P. *et al.* The relationship between ¹H-NMR mobile lipid intensity and cholesterol in two human tumor multidrug resistant cell lines (MCF-7 and LoVo). **Biochimica et biophysica acta**, 1531, n. 1-2, p. 111-131, 2001/03// 2001. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(01\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(01)00093-2)

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, 62, n. 1, p. 10-24, 2013. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

SCANU, T.; SPAAPEN, Robbert M.; BAKKER, Jeroen M.; PRATAP, Chandra B. *et al.* *Salmonella* Manipulation of Host Signaling Pathways Provokes Cellular Transformation Associated with Gallbladder Carcinoma. **Cell Host & Microbe**, 17, n. 6, p. 763-774, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.002>

SCHÄFFER, A. A.; ARAVIND, L.; MADDEN, T. L.; SHAVIRIN, S. *et al.* Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. **Nucleic acids research**, 29, n. 14, p. 2994-3005, 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2994>

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, 48, n. 6, p. 365-377, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>

SCHLAEPFER, I. R.; HITZ, C. A.; GIJÓN, M. A.; BERGMAN, B. C. *et al.* Progesterone modulates the lipid profile and sensitivity of breast cancer cells to docetaxel. **Molecular and cellular endocrinology**, 363, n. 1-2, p. 111-121, 2012/11// 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.005>

SCHMIDT, J.; KAJTÁR, B.; JUHÁSZ, K.; PÉTER, M. *et al.* Lipid and protein tumor markers for head and neck squamous cell carcinoma identified by imaging mass spectrometry. **Oncotarget**, 11, n. 28, 2020. Imaging mass spectrometry; tumor marker; lipid tumor marker; S100A8; S100A9 <https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.27649>

SCIENTIFIC, T. Acetone precipitation of proteins. Thermo Scientific. SCIENTIFIC, T. Thermo Scientific: Thermo Scientific 2009.

SHANMUGHAPRIYA, S.; SENTHILKUMAR, G.; VINODHINI, K.; DAS, B. C. *et al.* Viral and bacterial aetiologies of epithelial ovarian cancer. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 31, n. 9, p. 2311-2317, 2012/09/01 2012. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1570-5>

SHAY, E.; SANGWAN, N.; PADMANABHAN, R.; LUNDY, S. *et al.* Bacteriome and mycobiome and bacteriome-mycobiome interactions in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, 11, n. 25, 2020. microbiome; bacteriome; mycobiome; head and neck squamous cell carcinoma; cancer

SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, 299, n. 1, p. 1-8, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x> %J FEMS Microbiology Letters

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

SINGH, A.; KHYATI KAPOOR, T.; MANDAL, A.; ROTH, M. *et al.* Phospholipidome of *Candida*: Each Species of *Candida* Has Distinctive Phospholipid Molecular Species. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, 14, n. 6, p. 665-677, 2010. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0041>

SINGH, A.; YADAV, V.; PRASAD, R. Comparative Lipidomics in Clinical Isolates of *Candida albicans* Reveal Crosstalk between Mitochondria, Cell Wall Integrity and Azole Resistance. **PLOS ONE**, 7, n. 6, p. e39812, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039812>

SITEPU, I. R.; IGNATIA, L.; FRANZ, A. K.; WONG, D. M. *et al.* An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. **Journal of Microbiological Methods**, 91, n. 2, p. 321-328, 2012/11/01/ 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.001>

SKRZYPEK, M.; BINKLEY, J.; BINKLEY, G.; MIYASATO, S. *et al.* ***Candida* Genome Database**. 2004. Disponível em: <http://www.candidagenome.org/>. Acesso em: 13 de Agosto de 2020.

SOLL, D. R. *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? **Current Biology**, 18, n. 16, p. R717-R720, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.014>

SORGO, A. G.; HEILMANN, C. J.; BRUL, S.; DE KOSTER, C. G. *et al.* Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. **FEMS Microbiology Letters**, 338, n. 1, p. 10-17, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12049> %J FEMS Microbiology Letters.

SORGO, A. G.; HEILMANN, C. J.; DEKKER, H. L.; BRUL, S. *et al.* Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. **Yeast**, 27, n. 8, p. 661-672, 2010. <https://doi.org/10.1002/yea.1775>

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, 17, p. 463-516, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>

SWIDERGALL, M.; ERNST, A. M.; ERNST, J. F. *Candida albicans* Mucin Msb2 Is a Broad-Range Protectant against Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 57, n. 8, p. 3917-3922, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.00862-13> %J Antimicrobial Agents and Chemotherapy

SZAFRANSKI-SCHNEIDER, E.; SWIDERGALL, M.; COTTIER, F.; TIELKER, D. *et al.* Msb2 Shedding Protects *Candida albicans* against Antimicrobial Peptides. **PLOS Pathogens**, 8, n. 2, p. e1002501, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002501>

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ZARNOWSKI, R.; ROSS, K. M. *et al.* A *Candida* Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. **PLOS Pathogens**, 8, n. 8, p. e1002848, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002848>

TAMGADGE, S.; TAMGADGE, A.; PILLAI, A.; CHANDE, M. *et al.* Association of *Candida* sp. with the Degrees of Dysplasia and Oral Cancer: A Study by Calcofluor White under Fluorescent Microscopy. **Iranian journal of pathology**, 12, n. 4, p. 348-355, Fall 2017.

THOMAS, D. P.; BACHMANN, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, 6, n. 21, p. 5795-5804, 2006. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600332>

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 65, n. 2, p. 87-108, 2015. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21262>

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, 74, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>

TZENG, H.-T.; WANG, Y.-C. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. **Journal of Biomedical Science**, 23, n. 1, p. 70, 2016/10/06 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0287-7>

VEDIYAPPAN, G.; CHAFFIN, W. L. Non-glucan attached proteins of *Candida albicans* biofilm formed on various surfaces. **Mycopathologia**, 161, n. 1, p. 3-10, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0167-2>

VESTY, A.; GEAR, K.; BISWAS, K.; RADCLIFF, F. J. *et al.* Microbial and inflammatory-based salivary biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical and**

Experimental Dental Research, 4, n. 6, p. 255-262, 2018/12/01 2018.
<https://doi.org/10.1002/cre2.139> <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cre2.139>

VIDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45, p. 55-64, 2009.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000100009>

WANG, Z.; BHATTACHARYA, N.; WEAVER, M.; PETERSEN, K. *et al.* Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. **Journal of veterinary science**, 2, n. 3, p. 167-179, 2001/12// 2001.

WATANABE, T.; TADA, M.; NAGAI, H.; SASAKI, S. *et al.* *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. **Gastroenterology**, 115, n. 3, p. 642-648, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70143-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70143-X)

WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Oral bacteria and cancer. **PLoS pathogens**, 10, n. 3, p. e1003933-e1003933, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>

WILLGER, S. D.; LIU, Z.; OLARTE, R. A.; ADAMO, M. E. *et al.* Analysis of the *Candida albicans* Phosphoproteome. **Eukaryotic cell**, 14, n. 5, p. 474-485, 2015.
<https://doi.org/10.1128/EC.00011-15> %J Eukaryotic Cell

WILSON, M. Bacterial Biofilms and Human Disease. **Science Progress**, 84, n. 3, p. 235-254, 2001. <https://doi.org/10.3184/003685001783238998>

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 320, n. 3, p. 1163-1170, 2007. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111666> %J Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

WOLF, A. J.; LIMON, J. J.; NGUYEN, C.; PRINCE, A. *et al.* *Malassezia* spp. induce inflammatory cytokines and activate NLRP3 inflammasomes in phagocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, 109, n. 1, p. 161-172, 2021.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/JLB.2MA0820-259R>

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

WOTHERSPOON, A. C.; ORTIZ-HIDALGO, C.; FALZON, M. R.; ISAACSON, P. G. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **The Lancet**, 338, n. 8776, p. 1175-1176, 1991. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92035-Z](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92035-Z)

XIE, G.-H.; FANG, X.-M.; FANG, Q.; WU, X.-M. *et al.* Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. **Critical care (London, England)**, 12, n. 1, p. R5-R5, 2008. <https://doi.org/10.1186/cc6766>

XU, W.-H.; LIU, Z.-B.; HOU, Y.-F.; HONG, Q. *et al.* Inhibition of autophagy enhances the cytotoxic effect of PA-MSHA in breast cancer. **BMC Cancer**, 14, n. 1, p. 273, 2014/04/21 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-273>

YAZDANPARAST, S. A.; NEZARATI, S. S. M.; HESHMATI, F.; HAMZEHLLOU, S. Comparison of cell wall proteins in putative *Candida albicans* & *Candida dubliniensis* by using modified staining method & SDS-PAGE. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, 26, n. 2, p. 45-49, 2012.

YILMAZ, O.; JUNGAS, T.; VERBEKE, P.; OJCIUS, D. M. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and immunity**, 72, n. 7, p. 3743-3751, 2004. <https://doi.org/10.1128/iai.72.7.3743-3751.2004>

YILMAZ, O.; YAO, L.; MAEDA, K.; ROSE, T. M. *et al.* ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. **Cellular microbiology**, 10, n. 4, p. 863-875, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01089.x>

ZAGO, C. E.; SILVA, S.; SANITÁ, P. V.; BARBUGLI, P. A. *et al.* Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PLOS ONE**, 10, n. 4, p. e0123206, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123206>

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W. M.; LACMBOUH, G. A.; MARITA, J. M. *et al.* Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **mBio**, 5, n. 4, p. e01333-01314, 2014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14> %J mBio.

ZHAN, P.; SUO, L.-j.; QIAN, Q.; SHEN, X.-k. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer risk: A meta-analysis. **European Journal of Cancer**, 47, n. 5, p. 742-747, 2011/03/01/ 2011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.003>.