

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER**

**ANÁLISES METABOLÔMICAS E INFLUÊNCIAS DE ANTIFÚNGICOS E DA  
INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
ADESINAS E PROTEASES EM *Candida albicans***

**Alfenas/MG**

**2020**

**JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER**

**ANÁLISES METABOLÔMICAS E INFLUÊNCIAS DE ANTIFÚNGICOS E DA  
INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
ADESINAS E PROTEASES EM *Candida albicans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Federal de Alfenas como requisito para obtenção de  
título de Doutorado.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.  
Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

- O48a Oliver, Josidel Conceição.  
Análises metabolômicas e influências de antifúngicos e da interação patógeno-hospedeiro na expressão gênica de adesinas e proteases em *Candida albicans* / Josidel Conceição Oliver. – Alfenas/MG, 2020.  
100f. : il. --
- Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.  
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.
1. Anfotericina B. 2. Caspofungina. 3. Fluconazol. 4. Fagócitos. 5. Metabolismo. 6. Fatores de Virulência. I. Dias, Amanda Latercia Tranches.  
II. Título.

CDD-616.9041

**JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER**

Análises metabômicas e influências de antifúngicos e da interação patógeno-hospedeiro na expressão gênica de adesinas e proteases em *Candida albicans*

Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias  
Instituição: UNIFAL-MG

Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem  
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan  
Instituição: UNIFAL-MG

Prof. Dr. Dr. Marcos Vinicios Salles Dias  
Instituição : UNIFAL-MG

Prof. Dr. Fábio Antonio Colombo  
Instituição: UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Barbosa Padovan, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinicios Salles Dias, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2020, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Antonio Colombo, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0270223** e o código CRC **3DF406D7**.

Dedico esse trabalho aos pesquisadores e cientistas do Brasil, em especial aos pós-graduandos, os quais trabalham incansavelmente na pesquisa, muitas vezes, sacrificando mais de 10 horas de trabalho diário, além dos finais de semana, gerando inúmeros benefícios a humanidade desde o entendimento de uma patogênese, a métodos de prevenção e cura de doenças, e infelizmente, ainda não são devidamente reconhecidos como pesquisadores. Pelo esforço nosso de cada dia e pela paixão ao saber que nos motiva a continuar nessa jornada, enfrentando as inúmeras adversidades que é produzir Ciência nesse país.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, saúde e uma infinidade de bênçãos que me concedeu. Agradeço pelas pessoas e desafios que colocou no meu caminho, pois me fizeram crescer em sabedoria, chegar onde estou e poder alcançar mais essa vitória.

Aos meus pais João e Lucia e toda minha família, que muito me ensinaram e sempre apoiaram minhas escolhas, principalmente nos estudos, incentivando e deixando-me livre para decidir meu próprio futuro.

Ao meu amado marido Matheus que esteve ao meu lado durante toda a graduação e pós-graduação, ajudando e incentivando meus projetos, e principalmente, distribuindo carinho, atenção e leveza nas horas mais difíceis.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Amanda Latercia Tranches Dias, pela orientação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada em mim e na realização deste trabalho.

As amigas e integrantes do Núcleo de Estudos em Micologia (NEMIC), em especial, Carla Benedini R. J. Ferreira, Naiara C. Silva, Camila M. Pernambuco e Michele Coimbra, que comigo dividiram experiências e colaboraram na minha formação.

A todos os professores, pós-graduandos, funcionários e alunos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), em especial aos professores doutores Fábio A. Colombo, Marcos José Marques, Luiz Felipe L. Coelho, Ana Carolina B. Padovan e Marisa Ionta pela colaboração e suporte com materiais e/ou conhecimentos compartilhados.

A todos os professores e colaboradores e da Università de Bologna (UNIBO), Itália, Beatrice Vitali, Carola Parolin, Luca Laghi, Claudio Foschi, Monica Cricca e Antonella Marangoni, pelos conhecimentos transmitidos e auxílio no aprimoramento deste trabalho.

As agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.

(SAGAN, 2017)

## RESUMO

As infecções fúngicas são um problema de saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares, nos quais *Candida* spp. são as principais causadoras de infecções fúngicas invasivas. Dentre os fatores associados à virulência desse gênero destacam-se a produção de adesinas e aspartato proteases, que contribuem para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro. Acredita-se que a exposição de *Candida* spp. a fagócitos e/ou a concentrações subinibitórias de antifúngicos pode alterar a expressão dessas proteínas e aumentar a virulência do fungo. Esse trabalho objetivou avaliar fatores associados a virulência tais como metabólica e expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *HWP1* e *ALS3*, em isolados clínicos de *C. albicans* em interação com macrófagos e após exposição a concentrações inibitórias e subinibitórias (1/4 ou 1/8) de antifúngicos. Oito linhagens de *C. albicans* foram testadas quanto à sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina e fluconazol e mostraram-se sensíveis, com exceção da 221-V que foi considerada resistente a caspofungina. A identificação dos isolados foi confirmada por MALDI-TOF, e o perfil metabólico das linhagens foi analisado por RMN-<sup>1</sup>H. 66 moléculas foram encontradas no metaboloma, as quais estão envolvidas principalmente no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), na glicólise e gliconeogênese, no metabolismo dos aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos. Ademais, foram encontradas algumas moléculas associadas a virulência fúngica. A linhagem 221-V destacou-se por apresentar altas concentrações de trealose, glicose, fumarato, arabitol e glicerol, essas moléculas estão associadas a resposta ao estresse oxidativo e osmótico. A partir dos resultados de metabólica e sensibilidade foram selecionadas três linhagens para ensaios de fagocitose e expressão gênica. Após ensaios de interação *Candida*-macrófagos, foi observado que os macrófagos eliminaram 34,18±5,43%; 35,30±7,12% e 34,81±4,73% das células de leveduras, nas linhagens 121, 221-V e SC5314. Em relação a expressão gênica analisada por qPCR, a interação *Candida*-macrófago regulou positivamente a expressão dos genes *SAP2* (13,85±1,95), *ALS3* (5,81±0,91) e *HWP1* (15,66±3,29) em comparação com o controle. Em geral, o tratamento com concentrações subinibitórias de anfotericina B, fluconazol e caspofungina aumentou os níveis de expressão dos genes analisados. A linhagem 221-V destacou-se por aumentar os níveis de expressão dos seis genes avaliados após exposição a caspofungina *SAP2* (75,85±10,69), *SAP4* (32,19±15,93), *SAP9* (6,91±0,85), *SAP10* (55,38±25,19), *ALS3* (11,81±4,60) e *HWP1* (41,38±8,69) em comparação com o controle. Esses resultados mostram que a interação com células hospedeiras e, principalmente, a exposição a concentrações subinibitórias de antifúngicos podem correlacionar-se com o aumento da virulência de *C. albicans*. Concentrações subinibitórias podem ser utilizadas como tratamento sistêmico empírico ou profilático para pacientes com fatores de risco para candidíase invasiva, bem como, pode incorrer em falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, a não adesão ao tratamento e erros de dosagem ou ao tempo entre as doses. Além disso, compreender a patogênese fúngica pode auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, tais como novos fármacos para candidíase, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada a infecções fúngicas.

Palavras-chave: Anfotericina B. Caspofungina. Fluconazol. Fagócitos. Metabolismo. Fatores de virulência.

## ABSTRACT

Fungal infections are a public health problem especially in hospital settings where *Candida* spp. are the main causes of invasive fungal infections. Among the virulence factors of this fungus, we highlight the production of adhesins and aspartate proteases, which contribute to the adhesion and invasion of host tissues. *Candida* spp. exposed to phagocytes and/or subinhibitory antifungal concentrations may alter the expression of these proteins and increase the fungal virulence. This study aimed to evaluate virulence factors such as metabolomics, antifungal susceptibility and gene expression *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *HWPI* and *ALS3*, from *C. albicans* clinical isolates interacting with macrophages after exposition by inhibitory and subinhibitory antifungal concentrations. Eight *C. albicans* strains were tested for susceptibility to the amphotericin B, caspofungin and fluconazole and all strains were susceptible, except the 221-V which was considered resistant to caspofungin. The identification of the isolates was confirmed by MALDI-TOF, and the metabolomic profile was analysed by <sup>1</sup>H-NMR. 66 molecules were found in the metabolome, which are mainly involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, in glycolysis and gluconeogenesis, in the metabolism of amino acids, lipids and nucleic acids. In addition, some molecules associated with fungal virulence have been found. The strain 221-V stood out showing high concentrations of trehalose, glucose, fumarate, arabitol and glycerol, which are associated with oxidative and osmotic stress response. Three strains were selected for phagocytosis and gene expression assays from the results of metabolomics and susceptibility. After *Candida*-macrophage interaction assays, macrophages killed  $34.18 \pm 5.43\%$ ;  $35.30 \pm 7.12\%$  and  $34.81 \pm 4.73\%$  of yeast cells in strains 121, 221-V and SC5314, respectively. Regarding gene expression analysed by qPCR, the *Candida*-macrophage interaction upregulated the expression of the *SAP2* ( $13.85 \pm 1.95$ ), *ALS3* ( $5.81 \pm 0.91$ ) and *HWPI* ( $15.66 \pm 3.29$ ) genes when compared to the control. In general, treatment with subinhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and caspofungin increased the expression levels of the analysed genes. The 221-V strain stood out because it increased the expression levels of the six genes evaluated after exposure to this antifungal *SAP2* ( $75,85 \pm 10,69$ ), *SAP4* ( $32,19 \pm 15,93$ ), *SAP9* ( $6,91 \pm 0,85$ ), *SAP10* ( $55,38 \pm 25,19$ ), *ALS3* ( $11,81 \pm 4,60$ ) and *HWPI* ( $41,38 \pm 8,69$ ) when it was compared to control. These results show that interaction with host cells and especially exposure to subinhibitory antifungal concentrations can increase *C. albicans* virulence. Subinhibitory concentrations may be used as empirical or prophylactic systemic treatment for patients with risk factors for invasive candidiasis, and may occur in therapeutic failure due to pharmacokinetic and/or pharmacodynamic parameters and dosing errors or time between the doses. In addition, understanding fungal pathogenesis may assist in the research and development of new therapeutics, such as candidiasis drugs, thus contributing to a reduction in the incidence of morbidity and mortality associated with fungal infections.

Keywords: Amphotericin B. Caspofungin. Fluconazole. Phagocytes. Metabolism. Virulence Factors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectro de massa por MALDI-TOF (m/z 3.000 a 10.000) revelando diferenças entre espécies diferentes de leveduras.....	25
Figura 2 – Fluxograma simplificado da metodologia utilizada nessa pesquisa.....	29
Figura 3 – Fotografia de microscopia óptica (40x) para contagem de células fagocíticas com azul de tripan. Os monócitos viáveis não se coram, enquanto as células mortas, coradas em azuis, são excluídas da contagem...34	
Figura 4 – Espectro de massa MALDI-TOF (m/z 2.000 a 20.000) de <i>C. albicans</i> SC5314.....	45
Figura 5 – Espectros de RMN- <sup>1</sup> H do metaboloma extracelular das linhagens de <i>C. albicans</i> .....	45
Figura 6 – Número de moléculas encontradas no metaboloma das oito linhagens de <i>C. albicans</i> .....	46
Figura 7 – Esquema simplificado do metabolismo central de microrganismo com as moléculas quantificadas nesse estudo.....	50
Figura 8 – Moléculas envolvidas na produção de energia apresentaram alterações em suas concentrações no metaboloma extracelular de 8 linhagens de <i>C. albicans</i> indicando glicólise.....	54
Figura 9 – Atividade fungicida de macrófagos sobre <i>C. albicans</i> .....	65
Figura 10 – Microscopia de força atômica após interação patógeno-hospedeiro.....	66
Figura 11 – Microscopia de fluorescência mostrando a interação <i>Candida</i> -macrófago. A quitina da parede celular dos fungos foi marcada por branco de calcofluor e a actina das células foi corada por rodamina-faloidina.....	67
Figura 12 – Corte transversal de microscopia confocal mostrando a interação <i>Candida</i> -macrófago hospedeiro. A quitina da parede celular dos fungos foi marcada por branco de calcofluor e a actina das células foi corada por rodamina-faloidina.....	68

Figura 13 – Expressão gênica de <i>SAP2</i> , <i>SAP4</i> , <i>SAP9</i> , <i>SAP10</i> , <i>ALS3</i> e <i>HWPI</i> em <i>C. albicans</i> 121 após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos.....	70
Figura 14 – Expressão gênica de <i>SAP2</i> , <i>SAP4</i> , <i>SAP9</i> , <i>SAP10</i> , <i>ALS3</i> e <i>HWPI</i> em <i>C. albicans</i> 221-V após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos.....	71
Figura 15 – Expressão gênica de <i>SAP2</i> , <i>SAP4</i> , <i>SAP9</i> , <i>SAP10</i> , <i>ALS3</i> e <i>HWPI</i> em <i>C. albicans</i> SC5314 após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos.....	72
Figura 16 – Expressão gênica de <i>SAP2</i> , <i>SAP4</i> , <i>SAP9</i> , <i>SAP10</i> , <i>ALS3</i> e <i>HWPI</i> em <i>C. albicans</i> após exposição a antifúngicos e contato com macrófagos, utilizando a amostra <i>Candida</i> em contato com macrófagos (CM) como o controle na análise por CT comparativo.....	78

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Isolados hospitalares de *Candida albicans* provenientes do repositório de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.....30
- Quadro 2 – Concentrações inibitórias mínimas (MIC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade de *C. albicans* frente aos antifúngicos segundo AFST-EUCAST.....31
- Quadro 3 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados e testados, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e referências.....40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (MIC) e classificação dos isolados de <i>C. albicans</i> quanto à sensibilidade aos antifúngicos, determinada por microdiluição em caldo.....	43
Tabela 2 – Metaboloma extracelular de <i>C. albicans</i> .....	48
Tabela 3 – Metaboloma intracelular de <i>C. albicans</i> .....	49
Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de <i>C. albicans</i> por RMN- <sup>1</sup> H com a literatura.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT1	– gene da actina.
ALS	– gene <i>Agglutinin-like protein</i>
ATCC	– <i>American tissue culture collection</i> .
ATP	– adenosina trifosfato.
AFST	– <i>Antifungal Susceptibility Testing</i> .
cDNA	– ácido desoxirribonucleico complementar.
dNTP's	– desoxirribonucleotídeos fosfatados.
DEPC	– dietilpirocarbonato.
DMSO	– dimetilsulfóxido.
DTT	– ditioneitol.
EUCAST	– <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> .
EDTA	– ácido etilenodiamino tetra-acético
GPI	– glicosilfosfatidilinositol.
g	– constante de gravitação universal.
HWP	– gene <i>Hyphal wall protein</i> .
L	– litro.
MALDI-TOF MS	– ionização e dessorção a <i>laser</i> assistida por matriz acoplado a um analisador de massas por tempo de voo.
MIC	– concentração inibitória mínima.
µg	– micrograma.
µL	– microlitro.
mL	– mililitro.
MOI	– multiplicidade de infecção.
MOPS	– ácido 3-(N-morfolino) propanossulfónico.
M-MLV RT	– <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i> .
Mφ	– macrófagos.
nm	– nanômetro.
OD	– densidade óptica.
PBS	– tampão fosfato-salino.
PMA	– forbol-12-miristato-13-acetato.
qPCR	– reação em cadeia da polimerase quantitativa.

RMN- <sup>1</sup> H	– ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
RNA	– ácido ribonucleico.
SAB	– Sabouraud Dextrose.
SAP	– gene aspartato protease secretada.
Sapp	– aspartato proteases secretadas.
SFB	– soro fetal bovino.
SLC	– sobrenadante livre de células.
SubMICs	– concentrações subinibitórias.
TCA	– ciclo do ácido tricarboxílico
UFC	– unidades formadoras de colônia.
YCB-BSA	– <i>Yeast carbon base-bovine serum albumin.</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1	Candida spp. E INFECÇÕES OPORTUNISTAS .....	18
2.2	EXPRESSÃO GÊNICA DE ADESINAS EM C. albicans E PATOGÊNESE .....	20
2.3	EXPRESSÃO GÊNICA DE ASPARTATO PROTEASES SECRETADAS (SAP) EM Candida spp. E PATOGÊNESE .....	21
2.4	A IMPORTÂNCIA DE PESQUISAR EXPRESSÃO GÊNICA DE ADESINAS E PROTEASES EM C. albicans .....	23
2.5	O USO DAS TECNOLOGIAS “ÔMICAS” NO ESTUDO DE VIRULÊNCIA E INTERAÇÃO Candida-HOSPEDEIRO.....	24
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1	AMOSTRAS E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS ..	30
4.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	30
4.3	ANÁLISE PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS.....	31
4.4	ANÁLISE METABOLÔMICA POR RMN- <sup>1</sup> H .....	32
4.5	SELEÇÃO DE TRÊS LINHAGENS DE C. albicans PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E GENÔMICA. ....	33
4.6	EXPOSIÇÃO DOS ISOLADOS DE C. albicans AOS ANTIFÚNGICOS .....	33
4.7	CULTIVO DE CÉLULAS THP-1.....	34
4.8	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 .....	35
4.9	INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO .....	35
<b>4.9.1</b>	<b>Avaliação da interação patógeno-hospedeiro por microscopia de força atômica (AFM).....</b>	<b>36</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Avaliação da interação patógeno-hospedeiro por microscopia de fluorescência e confocal. ....</b>	<b>36</b>
4.10	LISE DE MACRÓFAGOS APÓS ENSAIO DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO. ....	37
4.11	ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS.....	37
4.12	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM C. albicans .....	38
<b>4.12.1</b>	<b>Extração de RNA .....</b>	<b>38</b>

4.12.2	Purificação de RNA .....	38
4.12.3	Transcriptase Reversa (Síntese de cDNA).....	39
4.12.4	Confecção dos <i>primers</i> .....	40
4.12.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	41
4.12.6	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	41
4.12.7	Análise e interpretação dos resultados da qPCR.....	42
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1	PERFIL DE SENSIBILIDADE DE LINHAGENS DE <i>C. albicans</i> AOS ANTIFÚNGICOS.....	43
5.2	ANÁLISES PROTEÔMICAS E METABOLÔMICAS .....	44
5.3	SELEÇÃO DE TRÊS LINHAGENS DE <i>C. albicans</i> PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E GENÔMICA. ....	63
5.4	ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS.....	64
5.5	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) .....	66
5.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>C. albicans</i> .....	69
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas são um importante problema de saúde pública, cuja incidência tem aumentado especialmente em indivíduos imunocomprometidos em ambiente hospitalar (BRAGA *et al.*, 2018; CORNISTEIN *et al.*, 2013; PROCOP; ROBERTS, 2004; SARDI *et al.*, 2013). As espécies do gênero *Candida* são as mais frequentes em infecções fúngicas invasivas correspondendo a cerca de 80% a 92% dos casos (CANELA *et al.*, 2018; COLOMBO *et al.*, 2013b; MARRA *et al.*, 2011). *Candida albicans* é a espécie mais comumente isolada em hemoculturas de pacientes com infecções hospitalares no Brasil, com incidência de 34,3% à 66,6% (ALMEIDA *et al.*, 2013; BRAGA *et al.*, 2018; COLOMBO *et al.*, 2006, 2013a; DOI *et al.*, 2016; MARRA *et al.*, 2011).

Algumas espécies de *Candida* spp. podem ser comensais, vivendo em equilíbrio com a microbiota do hospedeiro sem causar-lhe nenhum dano, ou patogênicas. Ambos os estados comensais e patogênicos envolvem regulação e adaptação ao microambiente hospedeiro (DA SILVA DANTAS *et al.*, 2016). Alterações na imunidade do hospedeiro, lesões de pele ou variações da microbiota causadas por antibióticos podem mudar o estado de comensalismo para patogenicidade (HA *et al.*, 2011; PIROFSKI; CASADEVALL, 2009). O potencial patogênico pode ser regulado para manter o comensalismo ou para danificar os tecidos do hospedeiro e evitar resposta imunológica. Em ambos os casos parece que a biologia celular deste fungo evoluiu para permitir o estabelecimento de diferentes tipos de relações com o hospedeiro humano (DA SILVA DANTAS *et al.*, 2016).

*Candida albicans* pode provocar infecções mucocutâneas ou invasivas principalmente em pacientes imunocomprometidos (XU; CHEN; LI, 2008). A imunidade protetora contra fungos patogênicos envolve diversas moléculas e células das quais destacam-se as células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos que são importantes fatores na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. (HA *et al.*, 2011; KAUR; MA; CORMACK, 2007). Entretanto, quando o sistema imune não é capaz de impedir a infecção faz-se necessário a utilização de antifúngicos para inibir o crescimento de *C. albicans* (VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

Anfotericina B, fluconazol e equinocandinas, como a caspofungina, são os antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas (COLOMBO *et al.*, 2013b; KLEPSEK, 2011). Entretanto, algumas linhagens de *Candida* spp. têm se mostrado

resistentes a alguns antifúngicos, e essa resistência pode estar naturalmente presente ou ser adquirida com as influências ambientais, tais como contato de linhagens com concentrações subinibitórias de antifúngicos (PFALLER, 2012; SILVA *et al.*, 2012). Tratamentos profiláticos com antifúngicos, recomendados a pacientes transplantados ou internados em unidades de terapia intensiva que são considerados de alto risco para candidíase invasiva, podem expor linhagens de *Candida* spp. a baixas concentrações de antifúngicos por longos períodos de tempo e este é um dos fatores que pode estimular *Candida* spp. a produzir e secretar fatores de virulência e ainda, selecionar linhagens resistentes (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PFALLER, 2012; SILVA; NERY; DIAS, 2014).

Algumas espécies de *Candida* spp. possuem importantes fatores associados à virulência, os quais incluem a capacidade de adesão às células hospedeiras, alterações fenotípicas e morfológicas, formação de biofilmes, produção e secreção de enzimas hidrolíticas e de uma toxina peptídica citolítica, chamada candidalisina (MOYES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2012). Dentre esses fatores associados à virulência, destacam-se as adesinas que participam da adesão da levedura ao hospedeiro e as proteases aspárticas secretadas (Sapp) que degradam proteínas do hospedeiro, inclusive do sistema imune (NAGLIK *et al.*, 2004; ORSI *et al.*, 2014). Isolados de *Candida* spp. expostos a antifúngico podem alterar seus perfis de expressão de adesinas e Sapp (SILVA *et al.*, 2015; HOSSEINI *et al.*, 2019). Sendo assim, faz-se importante o estudo e comparação entre a sensibilidade de isolados e a expressão gênica de adesinas e proteases para melhor entendimento da relação entre expressão gênica e patogenicidade de *Candida* spp.

O sucesso de *C. albicans* como patógeno depende da rápida adaptação aos microambientes do hospedeiro, através do remodelamento metabólico, resistência ao estresse e expressão de determinantes de virulência. Além de apoiar as funções celulares básicas, a utilização de muitos aminoácidos tem um efeito direto sobre a patogenicidade dos fungos, desencadeando as principais características de virulência, incluindo a morfogênese das hifas e o crescimento do biofilme em *C. albicans* (GARBE; VYLKOVA, 2019). Como pode fornecer informações importantes sobre a resposta de um organismo, a integração da metabolômica em um estudo de interação fungo-hospedeiro seria uma adição altamente valiosa junto a outros estudos “ômicos” (CULIBRK; CROFT; TEBBUTT, 2016).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir está descrita uma revisão de literatura sobre os principais temas dessa tese, os quais são: *Candida* spp. e infecções oportunistas; Expressão gênica de adesinas em *C. albicans* e patogênese; Expressão gênica de aspartato proteases secretadas (SAP) em *Candida* spp. e patogênese; A importância de pesquisar expressão gênica de adesinas e proteases em *C. albicans*; O uso das tecnologias “ômicas” no estudo de virulência e interação *Candida*-hospedeiro.

### 2.1 *Candida* spp. E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

*Candida* spp. podem estar presente em equilíbrio na microbiota de indivíduos saudáveis. Entretanto, esse fungo é capaz de causar infecções oportunistas quando existem distúrbios na microbiota do homem, como no crescimento fúngico por uso de antimicrobianos de amplo espectro, no comprometimento do sistema imune e em lesões de pele e mucosas (HA *et al.*, 2011).

Algumas espécies de *Candida* spp. podem ser classificadas como fungos polimórficos por apresentarem-se sob a forma leveduriforme ou filamentosa (hifas ou pseudo-hifas). A forma de levedura possibilita o rápido deslocamento através de superfícies mucosas, fluidos corporais e corrente sanguínea. Em contraste, as hifas permitem maior adesão, formação de biofilmes, evasão e lise de macrófagos e neutrófilos, invasão das camadas de células epiteliais e outros tecidos do hospedeiro (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011).

As infecções por *Candida* spp. predominam dentre as infecções fúngicas oportunistas em todo o mundo, e *C. albicans* é o principal agente de candidíase invasiva seguida por outras espécies não-*albicans* de *Candida* spp. (BRAGA *et al.*, 2018; CORNISTEIN *et al.*, 2013; PFALLER; DIEKEMA, 2007). A candidemia ou candidíase invasiva disseminada é uma infecção resultante da presença do patógeno na corrente sanguínea (PAPPAS *et al.*, 2004). Essa doença está associada a altos índices de mortalidade, aproximadamente 54%, e ao aumento dos custos com cuidados e duração da hospitalização (COLOMBO *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2002).

Anfotericina B, fluconazol e equinocandinas, como a caspofungina, são os antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas, entretanto, as

equinocandinas são recomendadas para tratamento de candidíase invasiva (COLOMBO *et al.*, 2013b; JACK *et al.*, 2016; KLEPSEK, 2011). As equinocandinas são conhecidas por inibir a síntese da parede celular fúngica através da inibição não competitiva das subunidades Fks da (1,3)- $\beta$ -D-glucana sintase, ademais, um estudo recente mostrou que estas podem promover também necrose e apoptose (ARYAMLOO *et al.*, 2019). Algumas linhagens de *Candida* spp. tem apresentado resistência a caspofungina, resultantes de mutações pontuais no gene FKS1 no cromossomo 1, que codifica uma subunidade catalítica do alvo 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase (PERLIN, 2015).

A anfotericina B atua ligando-se ao ergosterol na membrana celular dos fungos, aumentando a permeabilidade desta e causando a fuga de componentes intracelulares como íons de sódio, potássio, magnésio e cloreto (LOO; MUHSIN; WALSH, 2013). Casos de *Candida* spp. resistência à anfotericina B são raros e geralmente estão ligados a mutações nos genes ERG2, ERG3 e ERG1) que sintetizam enzimas necessárias para síntese do ergosterol (MEADOWS, 2013).

O fluconazol inibe a enzima lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase, bloqueando a incorporação de ergosterol na membrana plasmática e levando ao acúmulo de esteróis intermediários. Esses esteróis intermediários não possuem a mesma configuração e propriedades físicas do ergosterol; portanto, fazem com que a membrana plasmática se forme com propriedades alteradas, alterando a fluidez, a permeabilidade e prejudicando a captação de nutrientes, o que acaba levando à toxicidade celular (TAVEIRA *et al.*, 2016). Linhagens resistentes ao fluconazol normalmente apresentam alterações da enzima-alvo, o citocromo P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (Erg11p), ou mutações pontuais do gene (ERG11) que codifica a enzima (PEREA *et al.*, 2001).

De modo geral, o desenvolvimento e a evolução de processos infecciosos estão relacionados à virulência do microrganismo e à capacidade do hospedeiro em prevenir ou combater a invasão ou colonização microbiana (HUBE; NAGLIK, 2001). Algumas espécies de *Candida* spp. podem apresentar importantes fatores associados à virulência, os quais incluem a capacidade de adesão às células hospedeiras, alterações fenotípicas e morfológicas, formação de biofilmes, capacidade de resistir ao peróxido de hidrogênio e derivados e a capacidade de produzir e secretar enzimas. Algumas proteínas importantes são as adesinas, que auxiliam no processo de adesão e instalação de infecções, e as proteases que auxiliam nos processos de adesão e invasão, danificando tecidos do hospedeiro (DE GROOT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012).

## 2.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE ADESINAS EM *C. albicans* E PATOGÊNESE

As adesinas fúngicas modulam a adesão, agregação, formação de biofilme e respostas imune do hospedeiro (DE GROOT *et al.*, 2013). Dois genes muito importantes responsáveis pelo processo de adesão em *C. albicans* são os genes *HWPI* e *HWP2* que codificam as proteínas Hwp1p e Hwp2p, manoproteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) na membrana e parede celular e específicas para formas filamentosas (DE GROOT *et al.*, 2013; MARTIN *et al.*, 2011; STAAB *et al.*, 1999). Esses genes são importantes para o desenvolvimento de hifas, na adesão de levedura em células epiteliais do hospedeiro e no crescimento de biofilmes (NAILIS *et al.*, 2010; ORSI *et al.*, 2014).

Como o gene *HWPI* é detectado tanto em hospedeiros assintomáticos de *C. albicans* quanto em pacientes com candidíase oral ou vaginal, as formas filamentosas fúngicas podem estar presentes em ambos os casos, no entanto, a expressão desse gene é maior entre isolados de pacientes com candidíase (NAGLIK *et al.*, 2006). Após serem expostos às células da micróglia, células imunitárias neuronais, espécies de *Candida* spp. aumentam significativamente os níveis de mRNA de *HWPI*, apoiando ainda mais a ideia de que a expressão de *HWPI* deve ser considerada como um fator de virulência (ORSI *et al.*, 2014).

Outra importante família de genes responsáveis pela produção de adesinas são os genes de sequência tipo aglutinina (*ALS*), que codificam glicoproteínas da superfície celular fúngica que podem se ligar a peptídicos de células humanas, inclusive imunoglobulinas, ou formar agregados com outros microrganismos potencialmente patogênicos para o homem, levando a infecções mistas (DE GROOT *et al.*, 2013; HOYER *et al.*, 2008; SILVERMAN *et al.*, 2010). Esta família de genes é composta por nove membros *ALS1-9*. Os genes *ALS1-4* codificam adesinas específicas para formar tubos germinativos e hifas, enquanto *ALS5* e *ALS9* estão associados com blastosporos (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2015). Os genes *ALS1-4* possuem importância na adesão de *Candida* spp. em células epiteliais e endoteliais do hospedeiro, inclusive os genes *ALS2* e *ALS4* já foram descritos no processo de adesão fúngica em epitélio vascular (DE GROOT *et al.*, 2013; MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2015; ZHAO *et al.*, 2005). A expressão desses genes varia não só em função da morfologia, mas também na fase de crescimento de fungos e meio que se encontra (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2015).

As adesinas Als1p, Als3p e Hwp1p desempenham funções complementares durante a formação de biofilmes sugerindo que estas possam interagir para promover a adesão entre superfícies celulares adjacentes (NOBILE *et al.*, 2008). Além disso, a Als3p pode induzir a endocitose de *C. albicans* por ligação a N-caderina nas células endoteliais e E-caderina nas células epiteliais bucais (PHAN *et al.*, 2007).

Em relação à exposição de *Candida* spp. a antifúngicos, a expressão de *ALS1* pode ser regulada positivamente por caspofungina, enquanto a exposição ao fluconazol pode diminuir os níveis de Als3p e Hwp1p (GREGORI *et al.*, 2011; SORGO *et al.*, 2011). Estas pesquisas sustentam a importância no estudo da expressão diferencial desses genes em leveduras expostas a antifúngicos.

### 2.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE ASPARTATO PROTEASES SECRETADAS (SAP) EM *Candida* spp. E PATOGÊNESE

Existe uma família de 10 diferentes genes que codificam aspartato proteases secretadas (*SAP1-10*) em *C. albicans*, os quais são responsáveis pela produção das enzimas: Sap1p, Sap2p, Sap3p, Sap4p, Sap5p, Sap6p, Sap7p, Sap8p, Sap9p e Sap10p, que podem estar ancoradas à parede celular do fungo ou livres no meio extracelular. Estudos apontam que as Sap1-8p são secretadas extracelularmente, enquanto que, a Sap9p e a Sap10p estão ligadas à membrana celular fúngica pelo glicosilfosfatidilinositol (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; STANISZEWSKA *et al.*, 2012). Linhagens de *Candida* spp. não patogênicas, em geral, expressam menos genes *SAP* (PARRA-ORTEGA *et al.*, 2009).

As enzimas Sapp possuem ampla especificidade de substrato e podem degradar uma variedade de proteínas humanas, como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, laminina, fibronectina, mucina e quase todas as imunoglobulinas, inclusive a Imunoglobulina A, à qual é resistente à maioria das proteases bacterianas. Basicamente, a função dessas enzimas é digerir proteínas disponíveis para fornecer nitrogênio e promover a sobrevivência das células fúngicas. Entretanto, também estão relacionadas à virulência, pois elas acabam por degradar proteínas estruturais e do sistema imunológico do hospedeiro (HUBE; NAGLIK, 2001).

A expressão de genes *SAP* pode ser diferencialmente regulada. A expressão de *SAP1-3* está ligada a alterações fenotípicas nas linhagens, aderência e infecções de mucosa. As

Sap1-6p são conhecidas por hidrolisar proteínas do hospedeiro e causar danos teciduais (NAGLIK *et al.*, 2004).

O gene *SAP2* é o mais expresso *in vivo* e Sap2p são as principais enzimas secretadas *in vitro* (NAGLIK *et al.*, 2004). Sap2p hidrolisa várias proteínas dos hospedeiro como colágeno, lactoferrina salivar, e também proteínas do sistema imune como IgA e enzimas envolvidas no *burst* oxidativo em macrófagos (SCHALLER *et al.*, 2005). Além disso, Sap2p pode induzir modulação imune, visto que foi utilizada com sucesso como um imunógeno na redução de candidíase de mucosas em modelos animais (VILANOVA *et al.*, 2004).

Sabe-se que os genes *SAP4*, *SAP5* e *SAP6* são predominantemente expressos em hifas, sendo estimulados durante a mudança de *C. albicans* de levedura para hifas, contribuindo na adesão e invasão de tecidos do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). Outro fator de virulência relacionado às isoenzimas Sap4-6p é que estas podem contribuir para a destruição dos macrófagos e escape de células de *Candida* spp. em processos infecciosos (BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 1998). Um estudo recente mostrou que Sap4-6p possuem um aminoácido capaz de se ligar à proteína integrina da superfície de células epiteliais, incluindo queratinócitos, e, desta forma, podem ser internalizadas por lisossomos, alterando parcialmente a permeabilidade das membranas lisossomais desencadeando a apoptose através da ativação de caspases (WU *et al.*, 2013).

Estudos anteriores mostram que *SAP9* é fortemente expressa em *C. albicans* durante infecções (NAGLIK *et al.*, 2008; RIPEAU *et al.*, 2002). A interação da levedura com modelos epiteliais de mucosas mostrou altas expressão de *SAP9*, acompanhada de expressão constitutiva em níveis menores de *SAP2* e *SAP10*. Além disso, isolados mutantes com deficiência na formação de hifas expressaram menos *SAP2*, *SAP4*, *SAP6*, *SAP9* enquanto a expressão de *SAP10* manteve-se praticamente inalterada (NAGLIK *et al.*, 2008).

A prevalência aumentada de infecções causadas por *Candida* spp. e a seleção de microrganismos resistentes aos fármacos existentes cria a necessidade de compreender seus mecanismos patogênicos e, paralelamente, desenvolver novos agentes antifúngicos (BORATE *et al.*, 2011; YANG, 2003). Assim, concentrações subinibitórias de antifúngicos podem promover aumento do potencial patogênico por estímulo dos fatores de virulência, como a produção e secreção de Sapp (WU *et al.*, 2000). Costa *et al.* (2010) analisaram a influência de fluconazol sobre a atividade de Sapp de *C. albicans* e encontraram aumento de atividade em isolados resistentes aos azóis. Copping *et al.* (2005) avaliaram a influência de

azóis, anfotericina B, caspofungina e 5-flucitosina sobre a atividade de Sapp em isolados de *C. albicans* e encontraram um aumento de expressão de *SAP2* na maioria dos isolados.

#### 2.4 A IMPORTÂNCIA DE PESQUISAR EXPRESSÃO GÊNICA DE ADESINAS E PROTEASES EM *C. albicans*

Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a detecção e identificação de proteínas codificadas por famílias multigênicas, como a família de *SAP1-10*, *HWPI-2* e *ALSI-4*, e entre esses métodos a qPCR vem sendo descrita em vários estudos (GREEN *et al.*, 2005; MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2015; NAGLIK *et al.*, 2008). Esses estudos têm sido vitais em demonstrar a expressão gênica de *C. albicans* em infecções, pois além de serem capazes de detectá-los, possibilitam analisar os níveis relativos dos genes expressos.

Faz-se de extrema necessidade o estudo das condições nas quais as adesinas e proteases são estimuladas ou inibidas *in vivo* e seus possíveis mecanismos de atuação e inibição nessas condições para que, finalmente, possa ser fornecido auxílio favorável à pesquisa e desenvolvimento de agentes antifúngicos que interfiram nesse potencial de virulência, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada às infecções (JAIN *et al.*, 2007; MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2015; RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

Interação com tecido epitelial e penetração são condições importantes para entender os efeitos patogênicos de agentes infecciosos como *Candida* spp. Entretanto, os protocolos de ensaio tradicionais têm envolvido animais ou culturas de células animais como um modelo de infecção *in vivo*. A relevância destas abordagens é muitas vezes limitada em relação ao ser humano e pontos finais relacionados com processos patológicos humanos são comumente negligenciados. Linhagens de células humanas que se assemelhem muito às situações *in vivo* e permitam estudos de funções fisiológicas relevantes e respostas microbianas são, portanto, altamente desejáveis (SCHALLER *et al.*, 2006).

Ainda hoje existem poucos estudos sobre o potencial de virulência de *Candida* spp. que junto aos índices crescentes de infecções fúngicas e quadros de resistência aos antifúngicos disponíveis, tornam-se problema de saúde pública mundial (CORNISTEIN *et al.*, 2013; MORGAN *et al.*, 2005; SARDI *et al.*, 2013; WILSON *et al.*, 2002). Desde a descoberta dos antifúngicos nistatina e anfotericina B na década de 1950, poucos antifúngicos sistêmicos foram descobertos e liberados para uso, possivelmente pelo fato de

*C. albicans* ser eucariótica como as células do hospedeiro humano, o que pode gerar toxicidade e é um fator limitante no desenvolvimento de novos fármacos (LEWIS, 2011; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2010).

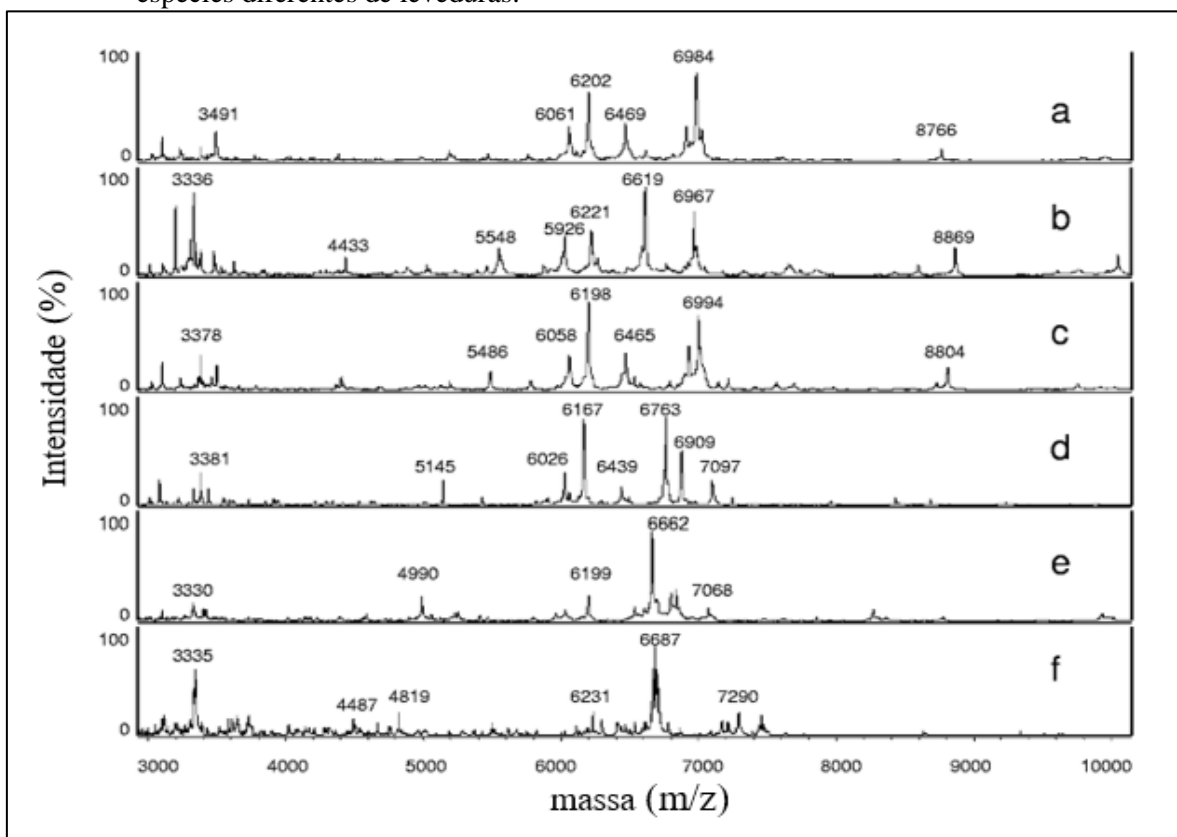
As adesinas Hwp1p e Als3p, bem como as proteases Sap9p e Sap10p, estão similarmente ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) na membrana ou parede celular de *C. albicans* e podem ser possíveis alvos para o desenvolvimento de novos antifúngicos, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associadas às infecções fúngicas (RÖRIG *et al.*, 2009).

## 2.5 O USO DAS TECNOLOGIAS “ÔMICAS” NO ESTUDO DE VIRULÊNCIA E INTERAÇÃO *Candida*-HOSPEDEIRO.

As tecnologias “ômicas” fornecem dados de transcriptomas, proteomas e metabolomas que podem ser utilizados em conjunto para auxiliar na pesquisa de virulência e patogenicidade de microrganismos, além de perfis de resistência antifúngica (CHIN *et al.*, 2016; ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2019). Em uma abordagem “multi-ômica” usando dois isolados clínicos de *C. auris* e uma linhagem padrão de *C. albicans* que apresentaram diferentes níveis de resistência antifúngica, foi possível observar semelhanças e diferenças metabólicas, lipidômicas e proteômicas entre os isolados de *C. auris*, bem como em comparação com *C. albicans*. Esses achados fornecem informações interessantes sobre características metabólicas, algumas relacionadas à resistência antifúngica, que sugere um mecanismo multifatorial de resistência a fármacos, incluindo grandes diferenças na utilização de carbono, esfingolipídeos, glicerolipídeos, esteróis, parede celular e bombas de efluxo (ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2019).

Martínez-Solano *et al.* (2006) observaram a produção diferencial de proteínas de macrófagos após interação com *C. albicans*, utilizando análise proteômica por espectrometria de massa por ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz acoplada a um analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS). Nesse equipamento, cada microrganismo produz um espectro de massas distinto dos demais, como se cada espécie tivesse uma “impressão digital” que a difere (MARKLEIN *et al.*, 2009). A Figura 1 ilustra as diferenças no espectro de massas das proteínas entre diferentes espécies.

Figura 1 – Espectro de massa por MALDI-TOF ( $m/z$  3.000 a 10.000) revelando diferenças entre espécies diferentes de leveduras.



Legenda: *Candida albicans* (a), *Candida glabrata* (b), *Candida tropicalis* (c), *Candida krusei* (d), *Candida parapsilosis* (e) e *Cryptococcus neoformans* (f).

Fonte: Adaptado de Marklein *et al.*, (2009).

Um estudo de proteômica, utilizando nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (NanoLC-MS/MS), analisou o comportamento de escape de *C. albicans* de macrófagos usando análise de proteoma mista e quantitativa em isolamento (KITAHARA *et al.*, 2015). Os autores identificaram cinco proteínas de macrófagos e 237 proteínas de *C. albicans* como moléculas candidatas à interação específica. Os autores relataram que as proteínas de *C. albicans* induzidas por macrófagos estavam ligadas à resposta ao estresse, síntese de membrana, geração de glicose, degradação de aminoácidos e outras funções desconhecidas. Enquanto, as proteínas de macrófagos induzidas por *C. albicans* foram ligadas a uma chaperona e à apoptose. Os autores postularam que *C. albicans* pode suportar o ambiente hostil dentro de macrófagos através da regulação positiva de proteínas relacionadas ao estresse, tais como Cat1p (resposta ao estresse oxidativo), Als3p (adesão), Ece1p (desenvolvimento de hifas) e Ape2p (protease); enquanto a fuga de *C. albicans* dos macrófagos poderia estar associada à produção de glicose por uma via de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e regulação negativa de chaperona e da proteína Noa1p

associada à apoptose, em macrófagos (KITAHARA *et al.*, 2015). Em resumo, a pesquisa proteômica na interação *Candida*-hospedeiro é um campo emergente. Pesquisas mais abrangentes e que se complementem são necessárias para desvendar os mecanismos de patogenicidade e virulência de *Candida* spp. (CHIN *et al.*, 2016).

Outra importante ferramenta no estudo de virulência é a metabolômica. Os metabólitos são considerados moléculas efetoras finais do transcriptoma e proteoma. Portanto, a análise do metaboloma é valiosa para o estudo de como os fungos interagem com o hospedeiro e vice-versa. Muito parecido com o genoma, o conhecimento do metaboloma de um organismo fornece uma vantagem notável para a pesquisa metabólica (CULIBRK; CROFT; TEBBUTT, 2016). Existem técnicas de alto rendimento capazes de analisar os metabólitos, tais como a espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN), e, ambas foram aplicadas à metabolômica fúngica (AZERANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018). Como pode fornecer informações importantes sobre a resposta de um organismo, a integração da metabolômica em um estudo de interação fungo-hospedeiro seria uma adição altamente valiosa junto a outros estudos “ômicos” (CULIBRK; CROFT; TEBBUTT, 2016).

As análises metabolômicas fornecem dados principalmente de metabólitos envolvidos no metabolismo de aminoácidos e de glicose, como no ciclo do ácido tricarboxílico (LI *et al.*, 2018). O sucesso de *C. albicans* como patógeno depende da rápida adaptação aos microambientes do hospedeiro, através do remodelamento metabólico, resistência ao estresse e expressão de determinantes de virulência. Além de apoiar as funções celulares básicas, a utilização de muitos aminoácidos tem um efeito direto sobre a patogenicidade dos fungos, desencadeando as principais características de virulência, incluindo a morfogênese das hifas e o crescimento do biofilme em *C. albicans* (GARBE; VYLKOVA, 2019). Um exemplo de aminoácido envolvido na virulência de *C. albicans* é a metionina, tanto o transporte quanto o metabolismo da metionina são importantes para a virulência, incluindo filamentação, formação de biofilme, sobrevivência dentro de macrófagos e virulência durante uma infecção sistêmica (SCHREVEENS *et al.*, 2018).

Enquanto dentro macrófagos, *C. albicans* deve confiar em recursos endógenos para a sobrevivência porque os macrófagos são frequentemente descritos como deficientes em glicose. A resposta transcricional inicial ao meio interno do macrófago é uma mudança da glicólise para a gliconeogênese (LORENZ; BENDER; FINK, 2004). A capacidade de utilizar fontes de carbono que não a glicose poderia ajudar na sobrevivência de *C. albicans* fagocitadas. Na ausência de glicose, fontes alternativas de carbono, tais como etanol e

acetato, são convertidas no metabólito central acetil-CoA para alimentar o ciclo de glioxilato e a gliconeogênese para produção de glicose e energia (CHEW; CHEE; THAN, 2019; MOTA *et al.*, 2015). Além disso, alguns estudos sugerem a importância de genes envolvidos no ciclo do glioxilato na virulência fúngica, como por exemplo, o aumento nos níveis de expressão dos genes acetato permease *ADY2*, isocitrato liase *ICLI* e malato sintase *MLS1* em espécies de *Candida* após fagocitose por macrófagos (KAUR; MA; CORMACK, 2007; LORENZ; FINK, 2001). Além disso, o gene *ICLI* é necessário para a completa virulência deste patógeno fúngico. *C. albicans* mutante sem o gene *ICLI* mostrou-se avirulenta em um modelo *in vivo* de camundongo com candidíase invasiva, enquanto a reintrodução de *ICLI* restaurou a virulência deste patógeno (LORENZ; FINK, 2001).

Análises de metaboloma também podem ser exploradas a partir de materiais biológicos de pacientes, e, estudos em indivíduos com infecções por *Candida* spp. são muito escassos. Um estudo do perfil metabólico da urina de um recém-nascido com infecção por *C. parapsilosis* comparado a recém-nascidos sem infecção mostrou maiores índices de glicina, serina, treonina, glicose e maltose na urina durante a infecção por *C. parapsilosis*, enquanto o ácido cítrico, o ácido hexadecanóico e o ácido octadecanóico estavam diminuídos (DESSÌ *et al.*, 2014). Pesquisar os diferentes padrões de metabólitos envolvidos na patogenicidade fúngica pode auxiliar nos estudos de virulência, interação patógeno-hospedeiro e em possibilidades de intervenções terapêuticas.

### 3 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas na revisão de literatura, este trabalho teve os seguintes objetivos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar perfis metabolômicos, sensibilidade antifúngica e expressão gênica de isolados de *C. albicans*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Confirmar a identificação bioquímica de isolados de *C. albicans* por análise proteômica.

Avaliar a sensibilidade de linhagens de *C. albicans* frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina e fluconazol.

Analisar perfis metabolômicos das linhagens de *C. albicans*, e selecionar linhagens para os testes de interação patógeno-hospedeiro e expressão gênica.

Avaliar a interação de *C. albicans* mantidas na presença diferentes concentrações de antifúngicos e macrófagos.

Comparar a expressão dos genes *HWPI*, *ALS3*, *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10* entre isolados de *C. albicans* mantidos na presença de concentrações subinibitórias e inibitórias de antifúngicos.

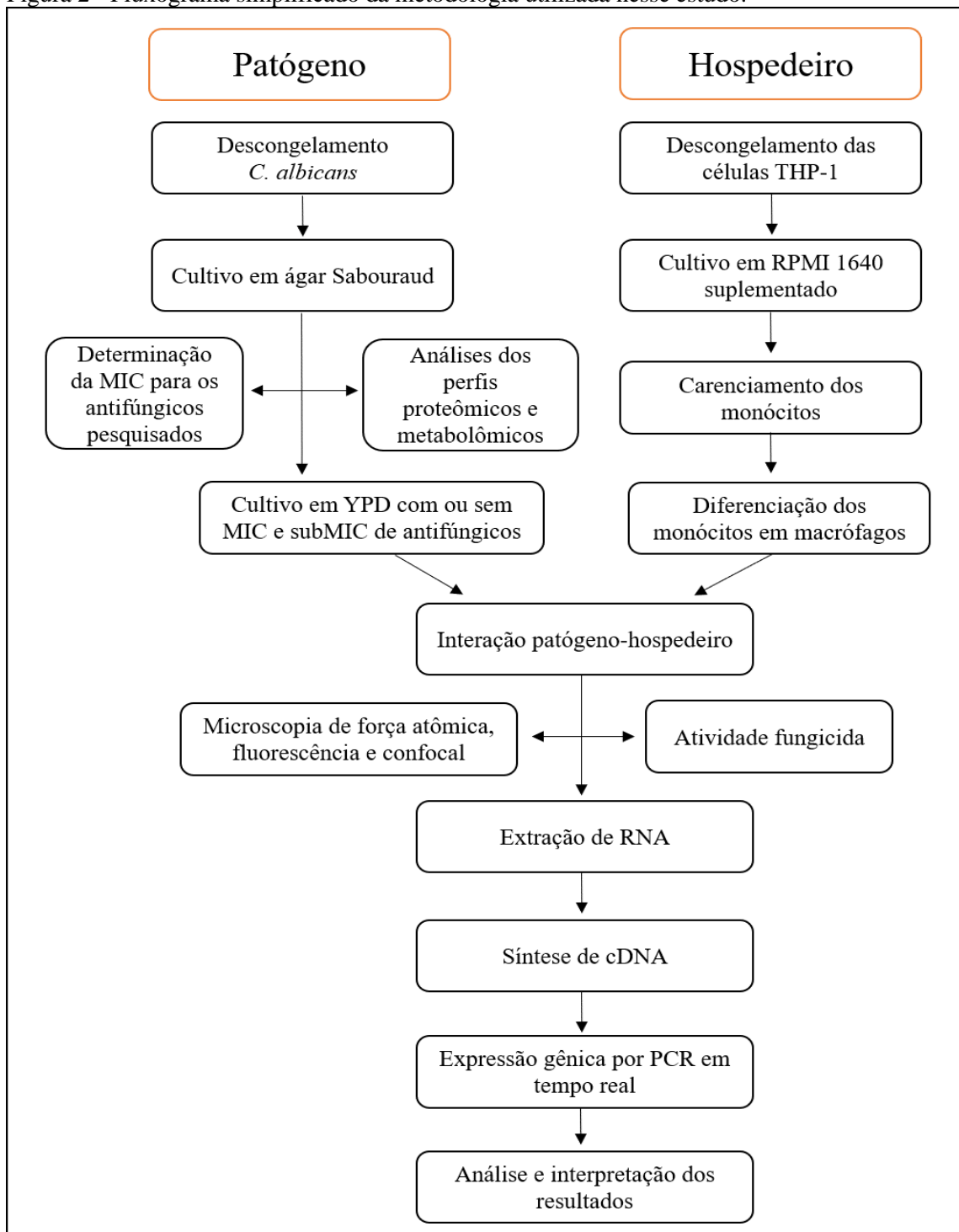
Avaliar a expressão gênica diferencial de *HWPI*, *ALS3*, *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10* de *C. albicans* em interação com macrófagos e antifúngicos,

Comparar as respostas obtidas para *C. albicans* tratadas com concentrações subinibitórias e inibitórias de antifúngicos com as respostas obtidas em ausência de tratamento.

#### 4 METODOLOGIA

A Figura 2 mostra um fluxograma simplificado da metodologia usada neste trabalho.

Figura 2 - Fluxograma simplificado da metodologia utilizada nesse estudo.



Fonte: Da autora.

#### 4.1 AMOSTRAS E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Ao todo, foram pré-selecionadas 8 amostras de *C. albicans* provenientes do repositório de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, as quais têm sido mantidas à -80°C e foram avaliadas quanto a seus perfis de sensibilidade antifúngica e metabolômica (QUADRO 1). Para os ensaios de interação patógeno-hospedeiro foi utilizada a linhagem de células monocíticas humanas de origem leucêmica THP-1 (ATCC® TIB-202™).

Quadro 1 – Isolados hospitalares de *Candida albicans* provenientes do repositório de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Isolados	Origem
SC5314	Sangue
ATCC 10231	Escarro
31	Ponta de cateter
120	Hemocultura
121	Ponta de cateter
221-V	Ponta de cateter
257	Ponta de cateter
289	Ponta de cateter

Fonte: Ferreira (2011).

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

A linhagem *C. albicans* SC5314 e outros 7 isolados clínicos de origem hospitalar foram avaliados quanto ao seu perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina e fluconazol, determinados através do método de microdiluição em caldo para determinação das concentrações inibitórias mínimas de agentes antifúngicos para leveduras, de acordo com as diretrizes do AFST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST *et al.*, 2017). As soluções-estoque dos antifúngicos foram preparadas nas concentrações de 5120 µg/mL para fluconazol e 1600 µg/mL para anfotericina B e caspofungina em dimetilsulfóxido (DMSO). A diluição seriada dos antifúngicos bem como o próprio teste foi feito em meio RPMI-1640 (com L-glutamina e vermelho de fenol, mas sem bicarbonato) suplementado com 2% de glicose e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) a uma concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0. O teste foi

realizado em microplacas estéreis de 96 poços e fundo chato. As concentrações foram analisadas em dez diferentes concentrações de 0,063 a 64 µg/mL para fluconazol, e de 0,008 a 4 µg/mL para anfotericina B e caspofungina, com razão 2 entre cada diluição. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 530 nm.

Os perfis de sensibilidade ou resistência aos antifúngicos foram interpretados conforme proposto no documento *Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs Version 8.1* (EUCAST, 2018), o Quadro 2 exemplifica os pontos de corte para a interpretação dos resultados de sensibilidade dos isolados de *C. albicans*, os quais foram classificadas como sensível (S) ou resistente (R).

Quadro 2 - Concentrações inibitórias mínimas (MIC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade de *C. albicans* frente aos antifúngicos segundo AFST- EUCAST.

Antifúngicos	MIC (µg/mL)	
	≤ S	R >
Anfotericina B	1	1
Fluconazol	2	4
Caspofungina	Nota <sup>1</sup>	Nota <sup>1</sup>
Anidulafungina	0,032	0,032
Micafungina	0,016	0,016

Legenda: S: sensível; R: resistente; Nota<sup>1</sup>: de acordo com EUCAST (2018), os isolados sensíveis à anidulafungina e à micafungina devem ser considerados sensíveis à caspofungina, até que os pontos de corte da caspofungina tenham sido estabelecidos. Da mesma forma, isolados com perfil intermediário para anidulafungina e micafungina podem ser considerados intermediários para caspofungina, pois os pontos de corte do EUCAST ainda não foram estabelecidos para caspofungina.

Fonte: EUCAST (2018).

As atividades descritas nos itens 4.3 e 4.4 “Análises proteômica e metabolômica” foram realizadas durante um estágio de intercâmbio, sob a supervisão da professora Dra. Beatrice Vitali no Departamento de Farmácia da Università di Bologna, Itália.

#### 4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

Todas as oito linhagens de *Candida* spp. foram analisadas quanto ao seus perfis proteômicos por espectrometria de massa por ionização e desorção a “laser” assistida por matriz acoplada a um analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS), como descrito anteriormente (FOSCHI *et al.*, 2017). Aproximadamente, 10<sup>8</sup> células de *Candida* spp. foram lavadas com 300 µL de água estéril e 900 µL de etanol absoluto, posteriormente

foram suspensas em 25  $\mu$ L de ácido fórmico a 70% e 25  $\mu$ L de acetonitrila. As soluções foram cuidadosamente submetidas a vórtex e centrifugadas a 18000 $\times$ g durante 10 minutos. Posteriormente, 1  $\mu$ L dos sobrenadantes foram transferidos para uma placa de MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em dez repetições, após secagem à temperatura ambiente e adição de 1  $\mu$ L de solução de matriz de MALDI HCCA (10 mg/mL de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético; Bruker Daltonics). A medição de MALDI-TOF MS foi realizada no instrumento Bruker Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) operando em modo iônico linear e positivo e usando o software Flex Control 3.3 com os seguintes parâmetros: frequência laser, 20%; tempo de atraso da extração de íons, 30 ns; tensão da primeira fonte de íons, 19 kV; tensão da segunda fonte de íons, 15,8 kV; e tensão da lente fonte de íons, 7,75 kV. Um total de 240 disparos a laser foi realizado automaticamente para cada amostra. Para a identificação de espécies, os espectros coletados foram analisados com o software Bruker Biotyper 3.1 e comparados com os da base de dados de referência.

#### 4.4 ANÁLISE METABOLÔMICA POR RMN-<sup>1</sup>H

As oito linhagens de *C. albicans* foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose a 37°C por 24 h, e posteriormente, foram preparadas suspensões de *C. albicans* em água destilada estéril com densidade óptica (OD) a 600 nm igual a 0,1, aproximadamente 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. 500  $\mu$ L de suspensão de *C. albicans* foram adicionadas sobre 5 mL de caldo Sabouraud Dextrose e os tubos foram incubados a 37°C e 180 rpm por 24 horas. A turbidez das culturas de *C. albicans* foram padronizadas a OD 600 nm igual a 0,8, aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. As suspensões celulares foram centrifugadas a 5000  $\times$  g por 5 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22  $\mu$ m para obtenção de sobrenadante livre de células (SLC) e analisados por RMN-<sup>1</sup>H para avaliar o metaboloma extracelular. O meio de cultura foi utilizado como controle para o metaboloma extracelular. O precipitado celular foi lavado com água destilada estéril, foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão (20 mM Tris HCl pH 8, 2mM sódio EDTA, 1.2% Triton X-100) e 0,2 g de pérolas de vidro, e então, vortexado por 20 minutos para lise celular. As pérolas de vidros foram precipitadas por centrifugação (4700  $\times$  g por 5 minutos) e os sobrenadantes, contendo os metabólitos, foram coletados e analisados por RMN-<sup>1</sup>H para análise do metaboloma intracelular. Para cada SLC (700  $\mu$ L) e lisado de células (500  $\mu$ L) obtidos a partir das culturas

de *Candida* foi adicionado 100 µL de uma solução de D<sub>2</sub>O de ácido sal sódio 3-trimetilsilil-propiónico-2,2,3,3-d<sub>4</sub> a 6,25 mM e pH 7,0 em meio de um tampão 100 mM de fosfato. Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram registrados a 298 K com um espectrômetro AVANCE III (Bruker, Milão, Itália) com uma frequência de 600,13 MHz. Sinais amplos de moléculas de rotação lenta foram reduzidos com um filtro T<sub>2</sub> de 400 ecos, separados por um tempo de eco de 400 µs. A atribuição de sinais foi realizada por Chenomx (Chenomx Inc., Canada, ver 8.02). O processamento de espectros e quantificação de moléculas foi realizado de acordo com o proposto por Foschi *et al.* (2018).

#### 4.5 SELEÇÃO DE TRÊS LINHAGENS DE *C. albicans* PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E GENÔMICA.

Analisando os resultados de sensibilidade antifúngica e metabolômica foram selecionadas as linhagens SC5314, 121 e 221-V para os ensaios de interação patógeno-hospedeiro. A linhagem *C. albicans* SC5314, também conhecida como ATCC MYA-2876, foi selecionada pois é uma das linhagens de *C. albicans* mais estudadas, com genoma descrito e que possui aproximadamente 30% de seus genes caracterizados, segundo o *Candida* Genome Database ([http://www.candidagenome.org/cache/C\\_albicans\\_SC5314\\_genomeSnapshot.html](http://www.candidagenome.org/cache/C_albicans_SC5314_genomeSnapshot.html)). As linhagens 121 e 221-V foram escolhidas por seus resultados de sensibilidade e metabolômica, considerados intermediários ou altos, os quais serão detalhados nos resultados (item 5.3).

#### 4.6 EXPOSIÇÃO DOS ISOLADOS DE *C. albicans* AOS ANTIFÚNGICOS

As três linhagens de *C. albicans* selecionadas para os testes de interação patógeno-hospedeiro e expressão gênica foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas a 37°C, e posteriormente, foram preparadas suspensões com 10<sup>5</sup> células/mL em 20,0 mL de caldo *Yeast extract – Peptone – Dextrose* (YPD). O YPD é utilizado para crescimento de *Candida* spp. e análises de expressão gênica (GREEN *et al.*, 2005; KRANEVELD *et al.*, 2011; SAMARANAYAKE *et al.*, 2006). Adicionalmente, os isolados foram cultivados em YPD na presença da MIC e ¼ da MIC de anfotericina B, MIC e ¼ da MIC de fluconazol e 1/8 da MIC de caspofungina. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 180 rpm. Após o cultivo, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis, centrifugadas

a 1500 x g e por 4 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com água estéril, e utilizadas no ensaio de interação patógeno-hospedeiro (subtítulo 4.9).

#### 4.7 CULTIVO DE CÉLULAS THP-1

A linhagem de células monocíticas humanas de origem leucêmica THP-1 (ATCC® TIB-202™) foram cultivadas em garrafas de cultivo celular com meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL) sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (COLLETTE; ZHOU; LORENZ, 2014; PEREIRA, 2010). A cada 48 horas o meio de cultivo foi renovado por centrifugação da suspensão celular a 400 x g por 5 minutos, descarte de sobrenadante, e adição do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 % SFB, estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL) (PEREIRA, 2010) para uma concentração final de  $4 \times 10^5$  células/mL. O cultivo das células foi realizado durante 10 dias, ou até que as células se multiplicassem em quantidade suficiente para os testes de interação/fagocitose. O acompanhamento a cada dois dias do cultivo foi realizado através de observação em microscópio óptico invertido para visualizar a morfologia e crescimento celular e por contagem das células viáveis. A viabilidade celular foi avaliada em hemocitômetro por adição de azul de tripan 0,2%, em que as células mortas se coram de azul (FIGURA 3).

Figura 3 - Fotografia de microscopia óptica (40x) para contagem de células fagocíticas com azul de tripan. Os monócitos viáveis não se coram, enquanto as células mortas, coradas em azuis, são excluídas da contagem.



Fonte: Da autora.

#### 4.8 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1

Após as células THP-1 serem cultivadas por cerca de 10 dias, multiplicarem-se e apresentarem quantidade suficiente para os testes, as células suspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos contidas na garrafa de cultivo foram transferidas para um tubo de centrifuga. O cultivo foi centrifugado à 400 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Sobre as células foi adicionado meio RPMI 1640 com antibióticos e sem SFB, a privação de SFB diminui a velocidade de proliferação celular.  $10^6$  células/mL foram transferidas para uma garrafa de cultivo celular e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas (PEREIRA, 2010). Posteriormente, as células THP-1 foram transferidas para um tubo de centrifuga, o tubo foi centrifugado à 400 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Sobre as células foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL), e foi retirada uma alíquota de 100 µL para contagem das células em hemocítmetro excluindo as células mortas pela inclusão do corante azul de tripan (PEREIRA, 2010). Após contagem das células, foi preparada uma suspensão contendo  $5 \times 10^5$  células/mL em RPMI suplementado com 10% de SFB, estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL). Sobre essa suspensão celular foi adicionado um solução de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para concentração final de 100 nM, semelhante a Tavanti *et al.* (2006) com modificações. As garrafas de cultivo foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. De acordo com Daigneault *et al.* (2010) as células THP-1 ao serem estimuladas pelo PMA diferenciam-se de monócitos para macrófagos.

#### 4.9 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

Os ensaios de interação *Candida*-macrófagos foram realizados utilizando a multiplicidade de infecção (MOI) 10. Foram cultivadas  $10^6$  células/mL e  $10^7$  leveduras/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibacterianos (FROHNER *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2017). O ensaio foi realizado a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Uma vez que é de interesse avaliar a expressão diferencial gênica de adesinas e proteases não apenas nas condições ideais de interação/infecção, foi feita também a avaliação da mesma após exposição da levedura às concentrações inibitórias e subinibitórias (1/4 e 1/8 da MIC) dos antifúngicos. A adição dos ativos é proposta para avaliar sua influência sobre a

expressão gênica de adesinas e proteases durante interação/infecção uma vez que estes são muito utilizados em ambiente hospitalar como profilaxia (PFALLER, 2012). Testes controle foram conduzidos em todos os níveis para possibilitar a avaliação comparativa da expressão de gênica nas condições de interação propostas, ou seja, controles das culturas celulares e dos isolados de *C. albicans* estudados na interação/infecção foram apresentados com e sem interação.

#### **4.9.1 Avaliação da interação patógeno-hospedeiro por microscopia de força atômica (AFM)**

Para visualizar a interação patógeno-hospedeiro e avaliar a topografia celular, foi utilizado o microscópio de força atômica (NX10 – Park; Software SmartScan™) do LabAFM, que faz parte do Centro de Microscopia (CEMIC) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), com a colaboração do prof. Dr. Ihosvany Camps (FINEP: Proc. 0179/12). O ensaio de interação patógeno-hospedeiro foi feito sobre lamínulas de vidro de 13 mm em placa de 24 poços. Após 1 hora de incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as lamínulas foram lavadas com PBS gelado e secaram a temperatura ambiente. As imagens possuem 50µm x 50µm e foram lidas por AFM em modo Não-Contato, com Cantilever NSC15 (µMasch; 125µm, 40N/m, 125khz). As imagens foram analisadas pelo programa XEI™ para a obtenção destas em terceira dimensão (3D).

#### **4.9.2 Avaliação da interação patógeno-hospedeiro por microscopia de fluorescência e confocal.**

O ensaio de interação patógeno-hospedeiro MOI 10 foi realizado sobre lamínulas de vidro de 13 mm em placa de 24 poços. Após 1 hora de incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as lamínulas foram lavadas com PBS. As células foram fixadas em paraformaldeído a 2% por 10 min, permeabilizadas em Triton X-100 a 0,2% em PBS por 5 min e depois lavadas com PBS. A coloração da quitina da parede celular dos fungos foi realizada com 10µL de branco de calcofluor (CFW) 50 µg/mL por 10 min e lavagem com PBS. A actina das células foi corada com rodamina-faloidina (Invitrogen) a 5 µg/mL por 20 minutos e lavagem com PBS. As lamínulas foram fixadas em uma lâmina de vidro com glicerol 70%. Para visualizar a interação patógeno-hospedeiro, foram utilizados os

microscópios de fluorescência (Microscópio de Fluorescência Zeiss Axio Scope A1, NY, USA) e confocal (Microscópio Confocal Nikon Eclipse Ti, USA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) (BAIN *et al.*, 2014).

#### 4.10 LISE DE MACRÓFAGOS APÓS ENSAIO DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO.

Após o término do ensaio de interação patógeno-hospedeiro, as garrafas de cultivo foram colocadas sobre banho de gelo por 1 minuto para facilitar o desprendimento das células, cada uma foi raspada com o auxílio de raspadores de células estéreis e descartáveis, as células de leveduras e macrófagos foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 1500 x g e 4 minutos, condição na qual as células precipitaram e o sobrenadante foi descartado. Sobre o precipitado foram adicionados 2 mL de solução NaOH em água deionizada pH 11, os tubos foram homogeneizados e incubados por 8 minutos em temperatura ambiente para lizar as células fagocíticas e liberar as células de *C. albicans* que foram internalizadas. As amostras contidas em cada tubo foram lavadas 2x com água destilada estéril e a partir destas foram feitas a atividade fungicida (item 4.10) e a extração de ácido ribonucleico (RNA) (item 4.12.1).

#### 4.11 ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

A atividade fungicida dos macrófagos foi avaliada por plaqueamento de diluições seriadas das suspensões celulares ao final do ensaio de interação patógeno-hospedeiro em ágar Sabouraud, semelhante a Tavanti *et al.* (2006) com adaptações. Após o término do ensaio de interação patógeno-hospedeiro, as células foram raspadas com auxílio de raspadores celulares e transferidas para tubos de centrífuga. Alíquotas de cada condição foram coletadas e diluições seriadas (1:10) foram preparadas e plaqueadas em meio agar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A porcentagem de redução de unidades formadoras de colônia (UFC) com média e desvio padrão foi determinada como se segue: porcentagem de redução =  $100 - (\text{UFC do grupo experimental} / \text{UFC grupo controle}) \times 100$ . As culturas do grupo controle consistiam em células de *C. albicans* incubadas na ausência de macrófagos.

## 4.12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *C. albicans*

A expressão gênica de *C. albicans* foi avaliada por meio da extração de RNA, conversão em cDNA e quantificação por reação em cadeia de polimerase (qPCR).

### 4.12.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita a partir do precipitado de células obtido por coleta após a realização de ensaios de interação patógeno-hospedeiro e lise dos fagócitos. Inicialmente, sobre o precipitado de células foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Tris HCL 200mM e pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25mM; SDS 0,5%) e 100 µL de pérolas de vidro (450-600 µm, Sigma) e as amostras foram agitadas por 12 minutos em vórtex, alternando-se 30 segundos de agitação e 30 segundos em gelo. Esse tampão de lise é utilizado há décadas para romper as barreiras celulares de fungos e expor o material genético (RAEDER; BRODA, 1985). Posteriormente, o lisado foi transferido, sem as pérolas, para outro tubo contendo 1 mL de Trizol<sup>®</sup> Reagente (Ambion<sup>TM</sup>). Após agitação em vórtex por 10 minutos, alternando-se 30 segundos de agitação e 30 segundos em gelo, adicionaram-se 400 µL de clorofórmio e os tubos foram novamente agitados em vórtex por 3 minutos, com repouso de 3 minutos em gelo seguidos por centrifugação a 20000 x g e 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi recolhida e a esse conteúdo foi adicionado igual volume de isopropanol. Após 1 hora de incubação a -20°C, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g e 4°C por 30 minutos. O RNA foi lavado duas vezes por adição de 1 mL de etanol 75%, centrifugação por 10 minutos e remoção do álcool. Posteriormente, adicionou-se 30 µL de água DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato) a cada amostra de RNA e estas foram quantificadas e qualificadas através da relação entre as densidades ópticas a 230, 260 e 280 nm no espectrofotômetro Genova Nano (Jenway). E posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C.

### 4.12.2 Purificação de RNA

As amostras de RNA foram purificadas utilizando DNase I (Desoxirribonuclease I, Promega), conforme realizado em outros estudos similares (DUNKEL *et al.*, 2014; FREIRE *et al.*, 2015; NAGLIK *et al.*, 2008). Em tubos para PCR contendo 1 µL de DNase I (1 unidade/mL em 50% de glicerol, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM),

1  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, KCl 500 mM) e 4 mg de cada amostra de RNA diluídas em 8  $\mu\text{L}$  de água DEPC. A reação de degradação de DNA contaminante foi feita à 25°C por 15 minutos. Para prevenir a catálise do RNA por íons metálicos (Mg/Ca) durante o aquecimento, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de solução de parada (50 mM EDTA) e os tubos de reação foram mantidos por 10 minutos a 70°C para desnaturar a DNase I. Ao final do processo, obteve-se 11  $\mu\text{L}$  de RNA purificado por amostra.

#### 4.12.3 Transcriptase Reversa (Síntese de cDNA)

O RNA purificado foi reversamente transcrito para cDNA em um termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystem). Sobre 1000 ng de RNA purificado suspensos em 11  $\mu\text{L}$  de água DEPC foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  de Oligo(dT)18 Primer na concentração de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Integrated DNA Technologies – IDT) e 1  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados “dNTP’s” (dATP - desoxiAdenosina Trifosfatada, dCTP -desoxiCitidina Trifosfatada, dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada, dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada) na concentração de 10 mM (Invitrogen). As amostras foram levadas ao termociclador por 4 minutos e 30 segundos a 65°C para promover a dissociação das estruturas secundárias, posteriormente os tubos contendo a mistura de reação foram colocados no banho de gelo por 20 segundos para evitar anelamentos inadequados. Em seguida, 2  $\mu\text{L}$  de DTT (Invitrogen) e 4  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM;  $\text{MgCl}_2$  15 mM) (Invitrogen) foram adicionados aos demais componentes como cofatores da reação e os tubos colocados novamente no termociclador. Após 20 segundos a 37°C, temperatura necessária para promover o anelamento dos *primers*, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Invitrogen), que é a responsável pela transcrição reversa e consequente síntese do cDNA, a partir do RNA inicial. Após 50 minutos a 37°C, um ciclo de 95°C por 5 minutos promoveu a inativação da enzima e a remoção dos *primers*. Ao final da reação, os tubos contendo as amostras foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C para posterior utilização na Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

#### 4.12.4 Confeccção dos *primers*

Os *primers* para os genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3*, e *HWPI* foram desenhados utilizando o genoma de *C. albicans* disponível na plataforma Gene do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a ferramenta *IDT Primer Quest* (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Os *primers* foram desenhados para anelarem-se idealmente à temperatura de 63°C e confeccionados pela Thermo Fisher Scientific®. O gene da actina (*ACT1*) foi utilizado como normalizador nas análises de expressão e sua sequência foi a mesma utilizada no estudo de Spiering *et al.*, (2010). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados e testados, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e referências.

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Fonte
<i>ACT1</i>	F 5' -AGCTCCAGAAGCTTTGTTTCAGACC- 3' R 5' -TGCATACGTTTCAGCAATAACCTGGG- 3'	174	(SPIERING <i>et al.</i> , 2010)
<i>SAP2</i>	F 5' -ATGAAGCCGGTGGTAGTTATG- 3' R 5' -GTGGCAGCATCTGGAGAATTA- 3'	106	Da autora
<i>SAP4</i>	F 5' -CTGACTTGTGGGTTCCAGATT- 3' R 5' -GCTAGAAGCAGCTGGAGAATAG- 3'	107	Da autora
<i>SAP9</i>	F 5' -CATCTTCATCTGGCACCTCTAC- 3' R 5' -GCGAAAGCAACAACCCATAC- 3'	90	Da autora
<i>SAP10</i>	F 5' -CCCAACCCAGTTCAACCATTA- 3' R 5' -CACTCAATATGGCGATCCATGA- 3'	102	Da autora
<i>ALS3</i>	F 5' -CCACCAGGTGAAACTGATACTG- 3' R 5' -ACGGTAGTAGCAGTGGTATAGG- 3'	101	Da autora
<i>HWPI</i>	F 5' -CCACAACAGCCACAAGAA- 3' R 5' -CATCAGGTTGAGGTGGATTG- 3'	100	Da autora

Legenda: F = *primer forward*; R = *primer reverse*; pb: pares de bases.

#### 4.12.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR convencional foi realizada afim de determinar a qualidade e funcionalidade dos *primers* e análise qualitativa do tamanho dos fragmentos amplificados. A PCR foi realizada em Termociclador Amplitherm TX96, onde foram adicionados a tubos de PCR 12,5  $\mu\text{L}$  do GoTaq Green Master Mix (Promega®), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$  e tampão de reação na concentração ótima para PCR, 2  $\mu\text{L}$  de c-DNA (40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  *primer forward* (Thermo Fischer®) (10 pmol), 1  $\mu\text{L}$  *primer reverse* (Thermo Fischer®) (10 pmol) e água ultrapura para PCR, quantidade suficiente para 25  $\mu\text{L}$ . As condições da PCR foram:

- 94°C por 4 minutos, para desnaturação inicial;
  - 94°C por 1 minuto para desnaturação;
  - 63°C por 45 segundos para anelamento dos *primers*;
  - 72°C por 2 minutos, para extensão;
  - 72°C por 10 minutos.
- } 40 ciclos

Com a finalidade de visualizar os produtos da amplificação da PCR, foi feito eletroforese em gel de agarose (1%) com 3  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo (10  $\text{mg}/\text{mL}$ ). Foi utilizado um marcador de peso molecular (Ludwig Biotec®) para 100 pb. A corrida foi realizada aplicando-se tensão de 80 Volts e corrente de 400 mA por 50 minutos para realização da eletroforese e as imagens capturadas a partir de transiluminador sob luz UV.

#### 4.12.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para análise da expressão relativa dos genes alvos, *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3*, e *HWP1*, foram feitas qPCR com o *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* (BioRad) no equipamento de PCR em tempo real *ABI StepOne™ (Applied Biosystems)*. Para as reações de amplificação, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de Sybr Green PCR Master Mix®, 1  $\mu\text{L}$  de cada *primer F* e *R* a 10 pmol, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA com concentração ajustada para 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e 3  $\mu\text{L}$  de água ultrapura para PCR. A reação foi conduzida nos seguintes ciclos: 1 ciclo a 95° C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos mais 63° C por 1 minuto. Ao final foram feitas curvas de *Melting* de 60°C a 95°C.

#### 4.12.7 Análise e interpretação dos resultados da qPCR

A qPCR fornece valores de *Cycle Threshold* ( $C_T$ ), ciclo em que cada reação atinge o limiar da fase exponencial de fluorescência, estes são registrados e analisados. A determinação de valores de  $C_T$  para os genes pesquisados em até 40 ciclos, permite detectar a presença de genes nas amostras e validar a amplificação. Amostras com  $C_T$  indeterminado para os genes pesquisados, e determinado para *ACT1* foram consideradas válidas e relatadas como negativas para expressão do gene na amostra. Quanto maior o valor do  $C_T$ , menor o número de cópias do gene amplificado. Os resultados foram analisados pelo método do  $C_T$  comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) utilizado para analisar as alterações relativas na expressão do gene a partir de experimento quantitativo de qPCR (NAGLIK *et al.*, 2008; STANISZEWSKA *et al.*, 2014). Os valores de  $C_T$  fornecidos pela qPCR foram analisados conforme o exemplo a seguir: calcula-se a média dos  $C_T$  para *SAP* e para *ACT1* entre as duplicatas de cada amostra e esta média será chamada de  $C_T$  médio;  $\Delta C_T = C_T$  médio da *SAP* -  $C_T$  médio da *ACT1*;  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  amostra tratada -  $\Delta C_T$  amostra não tratada, e finalmente a quantidade relativa pode ser expressa por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  das amostras tratadas em relação a amostra não tratada, também chamada de controle (que deve ser igual a 1), as amostras tratadas que exibem  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  menor que 1 expressam, por exemplo, menos *SAP* que o controle e as amostras tratadas que exibem  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  maior que 1 expressam, por exemplo, mais *SAP* que o controle. A análise da expressão de *HPWI* e *ALSI-4* foi realizada de forma semelhante à descrita anteriormente. Os dados que apresentaram normalidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de múltipla comparação de *Tukey*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de sensibilidade, proteômica, metabolômica e expressão gênica obtidos nesse estudo estão descritos a seguir.

### 5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DE LINHAGENS DE *C. albicans* AOS ANTIFÚNGICOS.

Inicialmente foi confirmado o perfil de resposta antifúngica de oito isolados de *C. albicans*, destes, dois eram padrões ATCC e seis provenientes de casos de infecções hospitalares. Todos os isolados fazem parte da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia e estavam mantidos a -80°C. O perfil de sensibilidade dos isolados foi determinado como descrito anteriormente na metodologia, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC) e classificação dos isolados de *C. albicans* quanto à sensibilidade aos antifúngicos, determinada por microdiluição em caldo.

Amostra	Origem	Anfotericina B		Caspofungina		Fluconazol	
		MIC (µg/mL)	C	MIC (µg/mL)	C	MIC (µg/mL)	C
SC5314	Sangue	0,125	S	0,063	S	0,125	S
ATCC 10231	Escarro	0,063	S	0,125	S	0,500	S
31	Ponta de cateter	0,031	S	0,063	S	0,125	S
120	Hemocultura	0,063	S	0,063	S	0,125	S
121	Ponta de cateter	0,031	S	0,125	S	0,125	S
221-V	Ponta de cateter	0,125	S	1,000	R	0,500	S
257	Ponta de cateter	0,063	S	0,031	S	0,125	S
289	Ponta de cateter	0,063	S	0,031	S	0,125	S

Legenda: MIC: Concentração Inibitória Mínima; C: Classificação quanto à sensibilidade; S: sensível; R: resistente.

Fonte: Da autora.

Todos as linhagens apresentaram-se sensíveis aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, apresentando valores de MIC dos antifúngicos menores que os pontos de corte indicados no documento *Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs Version 9* (EUCAST, 2018). O EUCAST ainda não estabeleceu pontos de corte para

classificação de espécies sensíveis ou resistentes à caspofungina, devido à significativa variação interlaboratorial nas faixas de MIC para esse antifúngico (EUCAST, 2018). Entretanto, o isolado 221-V apresentou um MIC para caspofungina relativamente alto se comparado aos pontos de corte dos antifúngicos anidulafungina e micafungina, os quais pertencem à mesma classe antifúngica das chamadas equinocandinas. A MIC do isolado 221-V foi 32,25 e 61,5 vezes maior para caspofungina se comparado aos pontos de corte para anidulafungina (0,032 µg/mL) e micafungina (0,016 µg/mL), respectivamente. De acordo com *Clinical & Laboratory Standards Institute*, isolados de *C. albicans* devem ser considerados sensíveis quando a MIC  $\leq 0,25$  µg/mL, e resistentes quando MIC  $\geq 1$  µg/mL (CLSI, 2017). Portanto, a linhagem 221-V foi considerada resistente à caspofungina.

Estudos anteriores quanto à sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol encontraram MIC igual a 1 µg/mL, concentração próxima a encontrada neste trabalho (FERNANDES *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014). Outra pesquisa de sensibilidade de *C. albicans* ATCC 10231 a antifúngicos verificou MIC igual a 1,0 µg/mL para anfotericina B e 0,25 µg/mL para fluconazol (COELHO *et al.*, 2012). Todos os isolados provenientes de fontes de infecção hospitalar também se mostraram sensíveis e tal comportamento em isolados de *C. albicans* também já foi observado em outros estudos (PEMÁN *et al.*, 2012; SAVASTANO *et al.*, 2016).

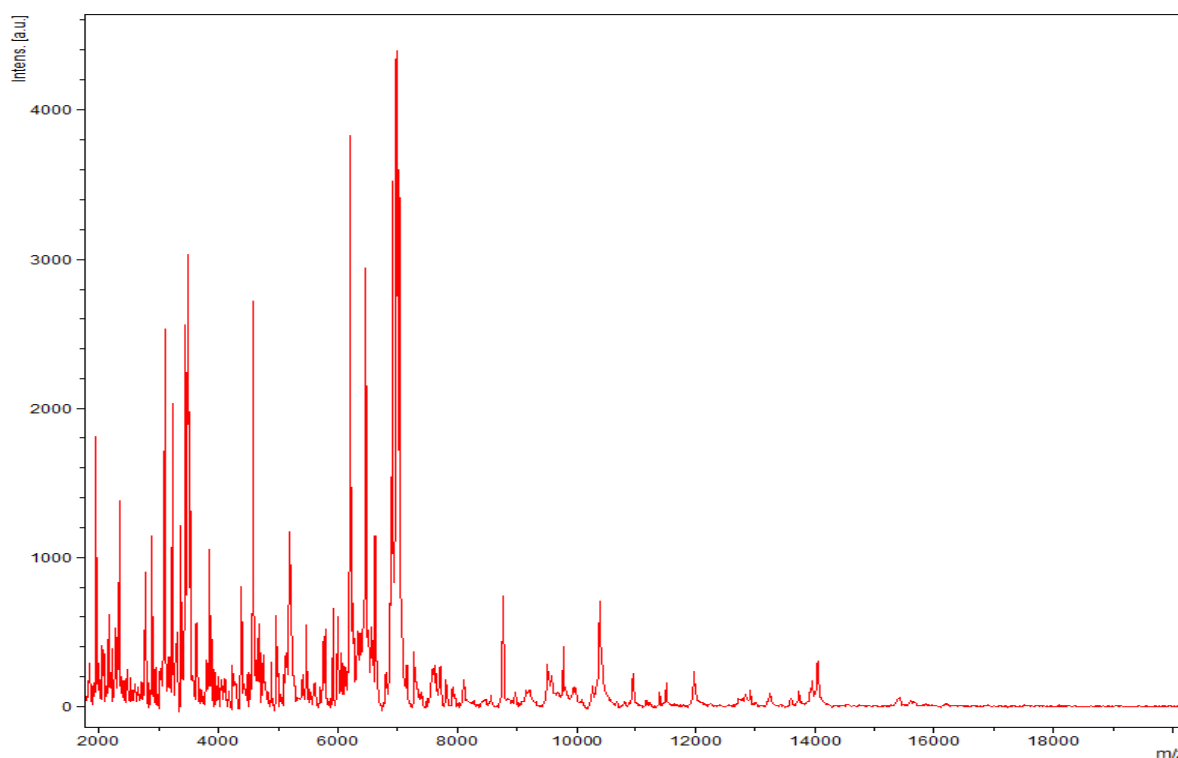
A partir dos valores da MIC de anfotericina B, caspofungina e fluconazol para os isolados de *C. albicans* determinou-se o uso das concentrações de MIC e  $\frac{1}{4}$  da MIC para estudo de concentrações subinibitórias. Para caspofungina, utilizou-se  $\frac{1}{8}$  da MIC, pois na MIC e  $\frac{1}{4}$  MIC para este antifúngico, o número de células viáveis após 24 h de cultivo era menor que  $10^3$  células/mL, quantidade a qual era insuficiente para as metodologias utilizadas de interação patógeno-hospedeiro e de extração de RNA, tornando inviável o cultivo nessas concentrações.

## 5.2 ANÁLISES PROTEÔMICAS E METABOLÔMICAS

A análise proteômica e metabolômica das linhagens de *Candida*, estas foram realizadas durante um estágio de intercâmbio na Università di Bologna, Itália, sob a supervisão da professora Beatrice Vitali. Os dados foram coletados em espectros de massa ou ressonância magnética nuclear e foram analisados para comparar as linhagens, e fornecer dados para seleção das amostras utilizados nos ensaios de expressão gênica.

A identificação bioquímica dos isolados foram confirmadas por proteoma em MALDI-TOF MS com  $scores \geq 2,000$ , confirmando que as 8 amostras pré-selecionadas eram da espécie *C. albicans*. Nesse equipamento, cada microrganismo produz um espectro de massas distinto dos demais, como se cada espécie tivesse uma “impressão digital” que a difere (MARKLEIN *et al.*, 2009). A Figura 4 mostra o espectro de massas (m/z) da linhagem SC5314 que é representativo para as 8 linhagens de *C. albicans*.

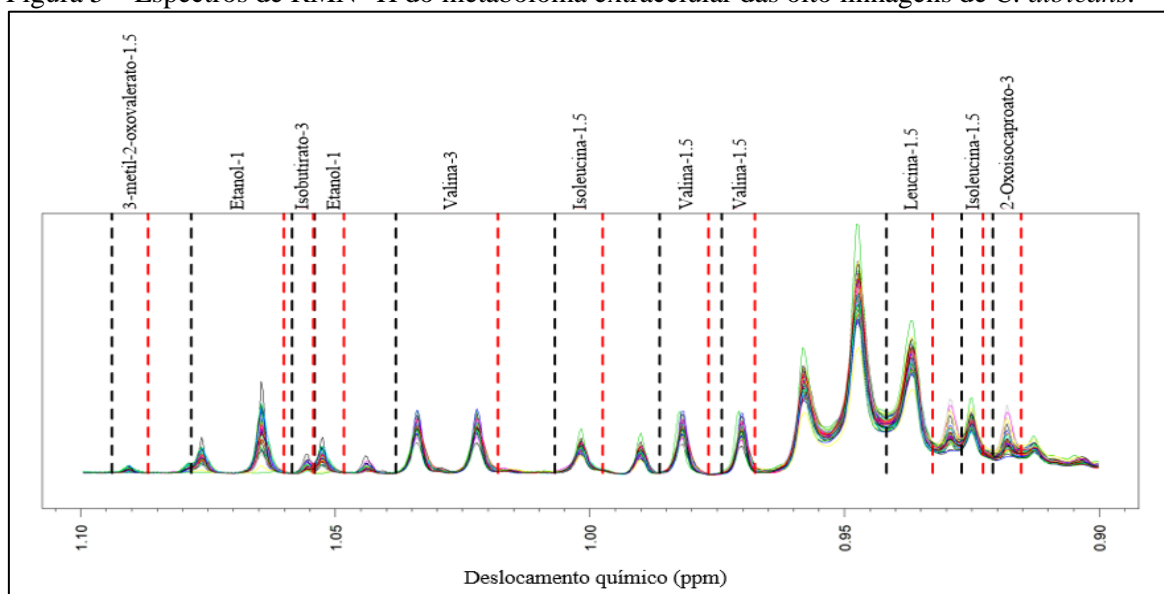
Figura 4 – Espectro de massa MALDI-TOF (m/z 2.000 a 20.000) de *C. albicans* SC5314.



Fonte: Da autora.

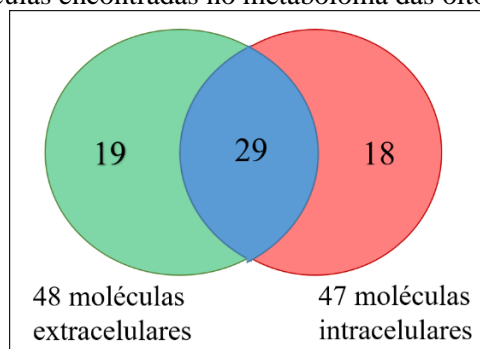
A análise do metaboloma de *C. albicans* a partir dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H (FIGURA 5) foi feita utilizando o “software” Chenomx, o qual possibilitou a identificação e quantificação de um total de 66 metabólitos comuns as 8 linhagens, com 48 moléculas no metaboloma extracelular e 47 moléculas no metaboloma intracelular, das quais 29 moléculas foram encontradas em ambos os metabolomas (FIGURA 6). Todas as moléculas encontradas e suas concentrações por linhagem estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

Figura 5 – Espectros de RMN-<sup>1</sup>H do metaboloma extracelular das oito linhagens de *C. albicans*.



Fonte: Da autora.

Figura 6 – Número de moléculas encontradas no metaboloma das oito linhagens de *C. albicans*.



Fonte: Da autora.

Nos últimos anos, tem sido estudados e desenvolvidos novos métodos para identificação rápida e caracterização de microrganismos, os quais possibilitaram a identificação de novas espécies e caracterização de componentes e/ou metabólitos destas. Métodos como perfis proteicos utilizando ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz acoplada a um analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF) e perfis metabolômicos empregando ressonância magnética nuclear (RMN) (CAROLIS *et al.*, 2014; EDDOUZI *et al.*, 2013; FOSCHI *et al.*, 2017; LAGHI *et al.*, 2014; REZAEI-MATEHKOLAEI; SHAFIEI; ZAREI-MAHMOUDABADI, 2016). Muitos estudos relatam uma alta precisão para a identificação de fungos pelo MALDI-TOF MS. A sua relação custo-eficácia, tempo de análise curto, baixa taxa de erro e o fato de que ele também pode discriminar entre espécies estreitamente relacionadas e críticas o tornam apropriado para a

implementação na rotina clínica (FOSCHI *et al.*, 2017; HENDRICKX, 2017; LACROIX *et al.*, 2014). Além disso, a identificação proteica por MALDI-TOF pode fornecer dados para comparação de fatores associados à virulência de *Candida* spp. (MEILLER *et al.*, 2009). Um exemplo é o estudo de Cabezón *et al.* (2009), que após comparar seus achados com bancos de dados, identificou 214 proteínas de membrana, incluindo proteínas ancoradas ao GPI, algumas associada à síntese e manutenção de  $\beta$ -glucanas na parede celular, outras são fatores de virulência, como fosfolipases ou proteases aspárticas.

A espectroscopia de RMN gera dados complexos com base em perfis de metabólitos e composição química, o que pode ser usado não somente para a avaliação de metabólitos, mas também para identificação precisa de leveduras até o nível de subespécie. A identificação de isolados de leveduras por RMN é rápida e altamente robusta, ou seja, com boa repetibilidade (HIMMELREICH; SORRELL; DANIEL, 2017). Devido às características acima citadas, esperava-se avaliar a produção e secreção de adesinas e proteases nos isolados de *C. albicans* para seleção destas para o teste de interação patógeno-hospedeiro. Entretanto, não foi possível detectar essas proteínas durante os ensaios de proteômica por falta de moléculas padrões (Sapps purificadas), foi feita apenas a identificação ou confirmação dos isolados por comparação como banco de dados.

Na análise metabolômica por RMN  $^1\text{H}$  não é possível detectar adesinas e proteases, entretanto, o aminoácido aspartato foi quantificado no metaboloma intracelular de *C. albicans* nas concentrações de 26,4; 20,6; 27,1; 39,7; 49,6; 60,4; 67,3 e 68,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente, nas linhagens SC5314, 289, 257, ATCC10231, 121, 120, 31 e 221-V (TABELA 3). O aspartato é um aminoácido associado ao estresse por antifúngicos e pode estar relacionado à virulência fúngica, pois *C. albicans* aumenta os níveis de aspartato intracelular após exposição ao cetoconazol (LI *et al.*, 2018). Além disso, Sapp são proteínas globulares que apresentam dois sítios catalíticos de aspartato (BORELLI *et al.*, 2007). Portanto, em uma correlação direta de biodisponibilidade, linhagens que produzem mais aspartato poderiam produzir mais Sapp.

Tabela 2 – Metaboloma extracelular de *C. albicans*.

Moléculas	Concentração em mM								
	Linhagens de <i>Candida albicans</i>								
	SC5314	ATCC10231	31	120	121	221-V	257	289	SAB
Acetato	6,10E-01	9,13E-01	9,22E-01	3,62E-01	1,15E+00	3,80E-01	2,68E+00	2,92E+00	4,58E-01
Acetoina	1,75E-01	2,52E-01	4,51E-01	4,62E-01	2,93E-01	2,84E-02	1,92E-01	2,02E-01	-8,17E-04
Acetona	1,72E-02	1,58E-02	1,88E-02	1,47E-02	1,13E-02	1,73E-02	2,04E-02	2,06E-02	1,64E-02
Alanina	3,96E-01	3,64E-01	5,94E-01	3,28E-01	4,75E-01	5,85E-01	3,01E-01	3,74E-01	4,58E-01
Aloisoleucina	9,31E-01	7,29E-01	1,02E+00	1,35E+00	1,15E+00	9,54E-01	9,82E-01	9,62E-01	3,67E-01
Arabitol	1,73E+00	4,67E+00	6,52E-01	2,06E-01	3,89E+00	5,31E-01	1,26E+00	1,10E+00	1,97E-01
Asparagina	8,72E-02	4,86E-02	1,56E-02	1,55E-02	2,73E-02	1,03E-01	6,60E-02	5,67E-02	1,91E-01
Citidina	6,86E-03	8,03E-03	7,60E-03	6,54E-03	7,72E-03	6,49E-03	6,54E-03	6,78E-03	8,17E-03
Citrato	1,29E+00	1,35E+00	1,24E+00	1,32E+00	1,36E+00	1,34E+00	1,37E+00	1,26E+00	1,02E+00
Colina	1,78E-02	1,68E-02	2,45E-02	3,85E-02	1,18E-02	3,49E-02	1,61E-02	1,61E-02	3,55E-02
Etanol	7,16E+01	8,38E+01	1,09E+02	1,11E+02	1,07E+02	7,86E+01	8,05E+01	8,03E+01	2,79E-01
Fenilalanina	6,87E-01	7,25E-01	6,51E-01	6,46E-01	5,44E-01	6,43E-01	7,02E-01	6,95E-01	6,31E-01
Formato	5,46E-02	5,48E-02	8,78E-02	1,89E-02	4,14E-02	5,18E-02	4,62E-02	6,05E-02	6,76E-02
Fumarato	3,02E-02	2,10E-02	4,12E-02	1,32E-02	2,21E-02	7,56E-02	1,59E-02	1,64E-02	2,89E-03
Glicerol	2,03E+00	1,92E+00	5,03E+00	6,75E+00	3,07E+00	3,31E+00	2,82E+00	2,84E+00	1,11E-01
Glicose	1,84E+01	1,36E+01	7,16E-01	7,27E-01	1,33E+00	1,69E+01	1,35E+01	1,35E+01	4,63E+01
Guanosina	5,74E-03	5,30E-03	7,77E-03	6,55E-03	6,53E-03	8,18E-03	7,18E-03	6,23E-03	8,46E-03
Hidroxiacetona	2,83E-02	2,54E-02	3,03E-02	3,46E-02	2,64E-02	1,86E-02	2,57E-02	2,76E-02	1,90E-02
Inosina	7,10E-03	6,19E-03	8,24E-03	8,01E-03	8,54E-03	3,95E-03	6,21E-03	5,75E-03	7,00E-03
Isobutirato	1,28E-02	2,09E-02	2,95E-02	3,93E-02	2,96E-02	1,30E-02	2,64E-02	2,98E-02	7,54E-03
Isoleucina	3,33E-01	3,34E-01	3,04E-01	2,85E-01	2,90E-01	3,38E-01	3,27E-01	3,41E-01	3,59E-01
Lactato	2,00E-01	1,64E-01	2,84E-01	3,19E-01	2,20E-01	1,90E-01	2,75E-01	2,82E-01	1,61E-01
Leucina	2,16E+00	2,31E+00	1,92E+00	1,92E+00	2,00E+00	2,24E+00	2,16E+00	2,15E+00	2,26E+00
Lisina	1,18E+00	1,21E+00	1,15E+00	1,15E+00	1,17E+00	1,12E+00	1,19E+00	1,14E+00	1,05E+00
Malato	1,05E-01	7,78E-02	1,00E-01	5,77E-02	6,48E-02	2,33E-01	8,39E-02	8,67E-02	1,07E-01
Manose	5,86E-02	4,15E-02	2,61E-02	1,62E-02	3,36E-02	6,69E-02	5,55E-02	6,64E-02	3,22E-02
Metanol	4,00E-03	5,01E-03	1,34E-02	1,17E-02	1,33E-02	1,95E-03	2,15E-03	3,10E-03	1,19E-02
Metionina	1,79E-01	1,89E-01	1,42E-01	1,08E-01	1,78E-01	1,93E-01	1,50E-01	1,63E-01	2,49E-01
N6-acetil-lisina	2,20E-01	2,40E-01	1,86E-01	1,93E-01	2,04E-01	1,71E-01	2,01E-01	2,02E-01	2,46E-01
Orotato	2,59E-03	2,66E-03	3,68E-03	4,54E-03	3,13E-03	3,34E-03	3,17E-03	3,96E-03	2,06E-03
p-cresol	1,22E-02	1,27E-02	1,38E-02	1,12E-02	1,46E-02	1,06E-02	1,25E-02	1,23E-02	1,07E-02
Piroglutamato	4,35E-01	4,59E-01	4,49E-01	4,49E-01	4,48E-01	4,49E-01	4,62E-01	4,64E-01	4,24E-01
Piruvato	6,41E+00	3,15E+00	1,13E+01	1,23E+01	6,55E+00	5,03E+00	7,37E+00	7,19E+00	3,13E-02
Putrescine	2,00E-02	3,70E-02	3,03E-02	2,60E-02	2,30E-02	2,54E-02	2,19E-02	2,92E-02	3,10E-02
Ribose	4,79E-02	3,65E-02	8,84E-03	7,87E-03	1,28E-02	4,52E-02	3,46E-02	3,87E-02	1,03E-01
Sacarose	6,69E-02	6,51E-02	6,45E-02	7,16E-02	6,65E-02	7,35E-02	6,56E-02	6,70E-02	5,47E-02
Sarcosina	6,12E-02	6,49E-02	6,69E-02	6,25E-02	6,35E-02	6,30E-02	6,33E-02	6,23E-02	6,03E-02
Succinato	3,60E-01	4,68E-01	5,09E-01	3,92E-01	4,31E-01	6,73E-01	2,73E-01	2,50E-01	5,28E-02
Tirosina	1,82E-01	1,80E-01	1,90E-01	1,93E-01	1,80E-01	1,72E-01	1,85E-01	1,83E-01	1,46E-01
Treonina	1,29E-01	8,20E-02	1,66E-02	5,67E-03	2,05E-02	1,24E-01	7,25E-02	8,29E-02	4,80E-01
Triptofano	1,65E-01	1,81E-01	1,18E-01	1,19E-01	1,35E-01	1,30E-01	1,62E-01	1,56E-01	1,72E-01
Uracila	1,65E-02	1,76E-02	2,11E-02	2,19E-02	2,69E-02	8,25E-03	1,79E-02	1,56E-02	1,22E-02
Valina	3,79E-01	3,92E-01	3,61E-01	3,16E-01	3,77E-01	4,40E-01	3,82E-01	3,95E-01	4,14E-01
1,3-Dihidroxiacetona	1,42E-03	1,81E-03	2,82E-03	3,72E-03	2,02E-03	1,08E-03	1,76E-03	1,82E-03	2,09E-04
2,3-Butanediol	2,28E-01	3,26E-01	3,43E-01	4,44E-01	3,63E-01	1,46E-01	2,20E-01	2,37E-01	2,34E-02
2-Oxoglutarato	1,47E-01	1,42E-01	1,84E-01	1,14E-01	1,61E-01	5,72E-02	1,13E-01	1,22E-01	1,51E-02
2-Oxoisocaproato	2,07E-01	2,02E-01	1,95E-01	1,59E-01	2,28E-01	2,03E-01	1,98E-01	1,90E-01	1,86E-01
3-Metil-2-oxovalerato	3,13E-02	2,76E-02	5,05E-02	2,16E-02	6,13E-02	2,44E-02	2,68E-02	2,57E-02	1,44E-03

Legenda: SAB: caldo Sabouraud Dextrose analisado como controle. As moléculas em azul foram detectadas em ambos os metaboloma intra e extracelular.

Fonte: Da autora.

Tabela 3 – Metaboloma intracelular de *C. albicans*.

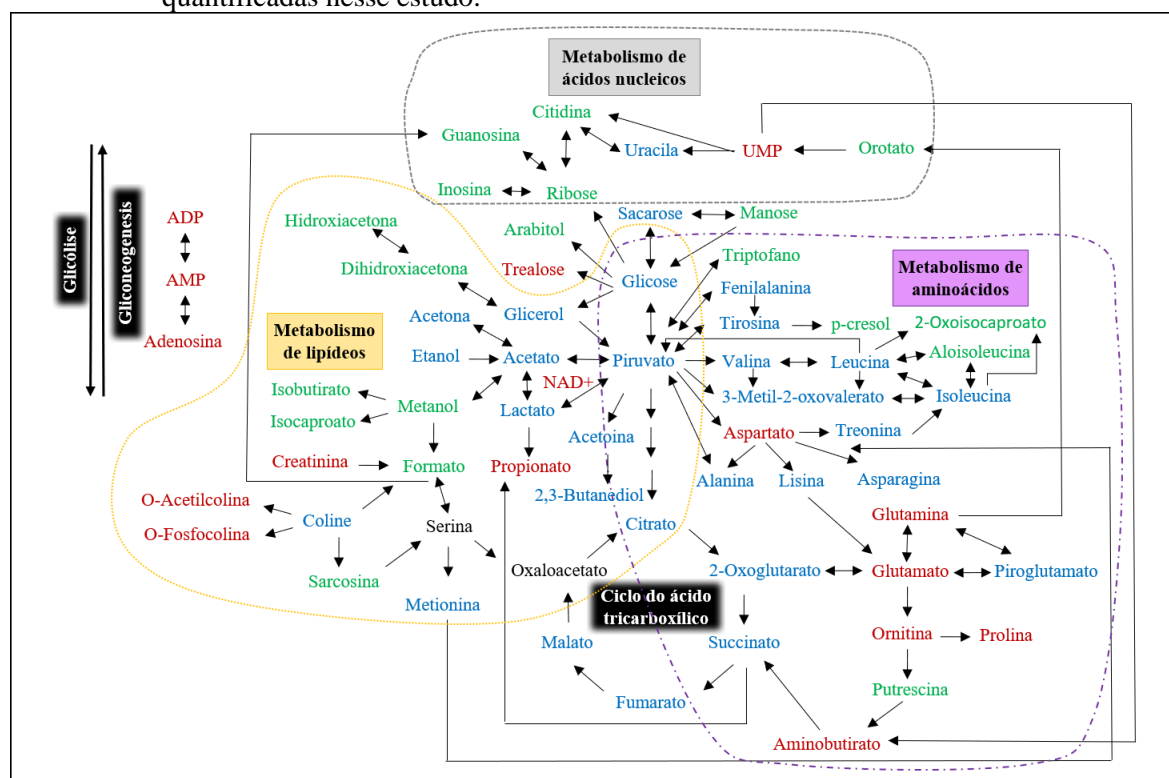
Moléculas	Concentração em mM							
	Linhagens de <i>Candida albicans</i>							
	SC5314	ATCC10231	31	120	121	221-V	257	289
Acetato	7,04E-01	9,88E-01	3,79E-01	5,49E-01	2,68E-01	3,79E-01	1,14E+00	1,44E+00
Acetoína	1,14E-02	5,45E-03	1,37E-02	1,24E-02	5,95E-03	4,40E-03	1,62E-02	7,33E-03
Acetona	1,59E-02	1,05E-02	1,50E-02	1,60E-02	6,51E-03	2,87E-03	1,55E-02	1,30E-02
Adenosina	6,53E-03	5,86E-03	7,74E-03	1,01E-02	7,52E-03	1,48E-02	8,83E-03	1,01E-02
Adenosina difosfato (ADP)	2,09E-03	1,84E-03	2,35E-03	3,36E-03	1,73E-03	2,88E-03	2,76E-03	2,43E-03
Adenosina monofosfato (AMP)	1,28E-02	7,64E-03	1,83E-02	1,64E-02	1,36E-02	2,97E-02	1,08E-02	1,11E-02
Alanina	1,63E-01	5,88E-02	1,84E-01	1,02E-01	9,81E-02	1,87E-01	1,21E-01	1,81E-01
Asparagina	2,61E-02	2,65E-02	2,78E-02	3,93E-02	2,37E-02	3,28E-02	2,85E-02	2,08E-02
Aspartato	2,64E-02	3,97E-02	6,73E-02	6,04E-02	4,96E-02	6,88E-02	2,71E-02	2,06E-02
Citrato	4,19E-02	3,84E-02	3,79E-02	3,26E-02	4,17E-02	3,01E-02	4,82E-02	3,45E-02
Colina	5,91E-04	9,04E-04	1,65E-03	1,02E-03	1,21E-03	1,94E-03	9,63E-04	1,35E-03
Creatinina	4,11E-03	4,94E-03	2,28E-03	3,98E-03	6,02E-03	8,54E-03	3,62E-03	2,45E-03
Etilanol	2,57E+00	7,16E-01	1,86E+00	1,46E+00	3,53E+00	2,40E+00	2,94E+00	1,49E+00
Fenilalanina	2,26E-02	2,14E-02	2,26E-02	2,11E-02	2,35E-02	2,02E-02	2,98E-02	2,23E-02
Fumarato	3,51E-03	3,54E-03	5,93E-03	4,21E-03	5,00E-03	5,47E-03	3,55E-03	3,43E-03
Glicerol	1,25E+00	1,32E+00	1,26E+00	1,58E+00	5,12E-01	3,70E-01	1,42E+00	1,07E+00
Glicose	9,73E-02	8,55E-02	5,75E-03	5,62E-03	3,35E-01	2,75E-01	6,90E-02	2,45E-02
Glicose-1-fosfato	2,01E-02	9,22E-03	1,27E-02	1,98E-02	4,15E-02	7,38E-02	3,34E-02	5,17E-02
Glutamato	7,75E-02	4,79E-02	9,58E-02	1,01E-01	9,32E-02	2,10E-01	5,37E-02	7,24E-02
Glutamina	3,82E-02	3,73E-02	3,88E-02	7,35E-02	4,15E-02	1,49E-01	2,97E-02	4,31E-02
Isoleucina	1,36E-02	1,27E-02	1,92E-02	1,45E-02	1,33E-02	1,24E-02	1,59E-02	1,04E-02
Lactato	1,12E-02	1,74E-02	1,87E-02	2,52E-02	2,38E-02	2,05E-02	3,18E-02	1,69E-02
Leucina	8,62E-02	8,06E-02	9,48E-02	7,27E-02	9,20E-02	6,67E-02	1,12E-01	6,99E-02
Lisina	6,13E-02	3,38E-02	6,10E-02	4,12E-02	5,10E-02	5,05E-02	5,83E-02	3,19E-02
Malato	3,53E-02	4,26E-02	7,63E-02	5,02E-02	5,85E-02	5,53E-02	4,29E-02	4,38E-02
Metionina	8,30E-03	1,27E-02	1,33E-02	1,37E-02	1,35E-02	1,04E-02	1,01E-02	1,06E-02
Monofosfato de uridina (UMP)	1,17E-02	6,33E-03	1,31E-02	9,89E-03	9,47E-03	1,19E-02	7,41E-03	1,07E-02
NAD+	7,20E-03	7,68E-03	6,76E-03	5,71E-03	6,08E-03	6,23E-03	6,73E-03	7,05E-03
O-acetilcolina	3,15E-03	2,48E-03	6,66E-03	4,29E-03	2,92E-03	4,38E-03	2,50E-03	3,45E-03
O-fosfocolina	2,01E-03	2,35E-03	2,63E-03	2,12E-03	3,31E-03	8,55E-03	2,26E-03	2,65E-03
Ornitina	3,33E-03	3,24E-03	3,67E-03	3,20E-03	3,26E-03	3,66E-03	1,51E-03	4,12E-03
Piroglutamato	1,12E-02	9,80E-03	8,04E-03	6,82E-03	8,98E-03	6,11E-03	1,42E-02	9,25E-03
Piruvato	5,67E-02	2,48E-02	5,47E-02	5,81E-02	9,05E-03	1,24E-02	7,98E-02	4,50E-02
Prolina	2,63E-02	4,63E-03	4,06E-02	3,88E-02	5,34E-02	5,62E-02	4,66E-02	2,28E-02
Propionato	1,39E-01	1,57E-01	1,42E-01	1,63E-01	4,75E-02	5,27E-02	1,40E-01	1,59E-01
Sacarose	6,80E-03	6,02E-03	8,14E-03	7,99E-03	1,10E-02	4,50E-02	1,81E-02	1,22E-02
Succinato	1,83E-02	2,10E-02	1,58E-02	1,15E-02	1,87E-02	2,31E-02	1,79E-02	1,03E-02
Tirosina	1,27E-02	9,55E-03	1,23E-02	1,16E-02	1,02E-02	1,07E-02	1,15E-02	1,09E-02
Trealose	4,92E-02	2,39E-03	2,87E-02	2,53E-02	1,66E-01	1,07E+00	3,17E-02	2,31E-02
Treonina	8,74E-03	4,39E-03	1,86E-02	2,10E-02	1,84E-02	2,65E-02	1,77E-02	1,58E-02
Uracila	5,88E-03	4,64E-03	7,12E-03	8,39E-03	5,74E-03	9,65E-03	6,97E-03	5,67E-03
Valina	2,72E-02	2,16E-02	3,27E-02	2,67E-02	2,64E-02	3,01E-02	3,14E-02	2,31E-02
2,3-Butanediol	9,31E-03	8,63E-03	1,17E-02	1,23E-02	6,08E-03	4,00E-03	1,39E-02	8,48E-03
2-Aminobutirato	6,62E-03	5,42E-03	6,50E-03	4,98E-03	4,42E-03	3,70E-03	7,54E-03	5,57E-03
2-Oxoglutarato	5,47E-03	6,01E-03	5,35E-03	5,76E-03	2,98E-03	7,07E-03	5,86E-03	5,23E-03
3-Metil-2-oxovalerato	6,97E-02	6,43E-02	7,08E-02	5,93E-02	7,56E-02	6,46E-02	8,65E-02	5,71E-02
4-Aminobutirato (GABA)	2,06E-02	8,77E-03	1,93E-02	5,41E-03	6,06E-03	6,74E-03	1,31E-02	9,10E-03

Legenda: As moléculas em azul foram detectadas em ambos os metaboloma intra e extracelular.

Fonte: Da autora.

Os metabólitos encontrados estão envolvidos principalmente no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), na glicólise ou na gliconeogênese, na síntese lipídica, no metabolismo dos aminoácidos e ácidos nucleicos, ou seja, nas vias metabólicas principais dos fungos, as quais estão envolvidas inicialmente com a produção de energia e posteriormente com mecanismos de virulência que serão discutidos a seguir. Uma representação das moléculas envolvidas no metabolismo de microrganismos e que foram quantificadas nesse trabalho pode ser visualizada na Figura 7. As rotas metabólicas foram desenhadas com informações de estudos anteriores (ASLAN; NOOR; BAR-EVEN, 2017; CHEN *et al.*, 2016; CHEW; CHEE; THAN, 2019; DUDLEY *et al.*, 2010; FLINT *et al.*, 2015; HUERGO; DIXON, 2015; KITAHARA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018; NATTER; KOHLWEIN, 2013; PIETZKE; MEISER; VAZQUEZ, 2019; PUIG-CASTELLVÍ *et al.*, 2016; ROHDE *et al.*, 2017; SRINIVASAN *et al.*, 2015; TANG; LEE; CHEN, 2015; WARGO, 2013; ZHU *et al.*, 2015).

Figura 7 – Esquema simplificado do metabolismo central de microrganismo com as moléculas quantificadas nesse estudo.



Legenda: As moléculas destacadas em vermelho foram quantificadas no metaboloma intracelular, as moléculas em verde correspondem ao metaboloma extracelular e as moléculas em azul estavam presentes em ambos metabolomas. Duas moléculas (serina e oxaloacetato) foram adicionadas ao mapa metabólico como intermediários para ilustrar a ligação entre outras metabólitos.

Fonte: Da autora.

Entre os aminoácidos quantificados no metaboloma foi observado uma variação nas concentrações de treonina entre as linhagens. No metaboloma extracelular pode-se notar a diminuição desse aminoácido na ordem de 3,72; 3,87; 5,79; 5,85; 6,62; 23,41; 28,92 e 84,66 vezes menor que a concentração inicial no meio de cultura, respectivamente, para as linhagens SC5314, 221-V, 289, ATCC10231, 257, 121, 31 e 120. No metaboloma intracelular as menores concentrações estavam nas linhagens padrões SC5314 (8,74  $\mu\text{M}$ ) e ATCC10231 (4,39  $\mu\text{M}$ ) e as maiores concentrações nas linhagens clínicas 289 (15,8  $\mu\text{M}$ ), 257 (17,7  $\mu\text{M}$ ), 121 (18,4  $\mu\text{M}$ ), 31 (18,6  $\mu\text{M}$ ), 120 (21,0  $\mu\text{M}$ ) e 221-V (26,5  $\mu\text{M}$ ).

O rompimento das vias biossintéticas de treonina e aminoácidos de cadeia ramificada como isoleucina e valina resulta em virulência atenuada no modelo de infecção intravenosa em camundongos (KINGSBURY; MCCUSKER, 2010a, 2010b). A via biossintética da treonina é particularmente interessante como alvo em antifúngicos por não estar presente em humanos. A treonina é produzida a partir do aspartato que é convertido em homoserina, que por sua vez é convertida em treonina pela ação da homoserina quinase (Thr1p). *C. albicans* mutantes *THR1A* foram significativamente atenuados na virulência e extremamente sensíveis ao soro. Entretanto, a sensibilidade sérica foi suprimida pela adição de treonina. A sobrevivência do soro é crítica para a disseminação, um importante determinante da virulência (KINGSBURY; MCCUSKER, 2010b). Ademais, as adesinas Hwp1p e Als3p possuem domínios C e N-terminais ricos em resíduos de treonina, os quais são importantes para adesão fúngica (PADOVAN *et al.*, 2009; RAUCEO *et al.*, 2006). Assim, pode-se inferir que a linhagem 221-V seria a mais virulenta pois, provavelmente, foi a linhagem que mais produz treonina (maior concentração intracelular) e poderiam produzir mais adesinas, enquanto foi um dos isolados que utilizou menos treonina disponível no meio de cultura. Isto condiz com os resultados apresentados nos ensaios de interação com macrófago em que essa amostra apresentou maiores níveis de expressão gênica de adesinas e proteases (item 5.6). Comparando as concentrações de treonina entre as linhagens, pode-se inferir, similarmente, que a linhagem 121 apresenta virulência intermediária e SC5314, menor virulência em relação aos outros isolados.

Ademais, o metabolismo de aminoácidos pode favorecer a sobrevivência, o crescimento e induzir à formação de hifas em *C. albicans*. Essa espécie pode sobreviver em ambientes extremamente ácidos ( $\text{pH} < 2$ ) e extremamente alcalinos ( $\text{pH} > 10$ ), adaptando-se a estes pela capacidade de regular o pH citosólico, o qual é geralmente neutro a alcalino variando entre pH 5,8 e pH 9 (VYLKOVA *et al.*, 2011). Os aminoácidos são absorvidos e

metabolizados, criando grandes quantidades de amônio citotóxico, que são então expulsos por transportadores de amônio como CaAto5 e levam à alcalinização do pH no meio e, embora os mecanismos subjacentes não sejam completamente compreendidos, esse processo favorece o crescimento fúngico e resulta na morfogênese da hifas (DANHOF; LORENZ, 2015; GARBE; VYLKOVA, 2019).

Um estudo de proteômica mostrou que a interação *Candida*-macrófago regulou positivamente a síntese de enzimas envolvidas na produção de citrato, isocitrato, malato, tais como a citrato desidrogenase, isocitrato liase e malato sintase (KITAHARA *et al.*, 2015). Sugerindo que a produção de glicose pela ativação da gliconeogênese e do ciclo de ácido tricarboxílico e/ou ciclo do glioxilato está relacionada à capacidade de *C. albicans* escapar de dentro dos macrófagos (KITAHARA *et al.*, 2015). O ciclo de ácido tricarboxílico é uma via central para o metabolismo de fontes de carbono, lipídios e aminoácidos, e fornece uma importante fonte de energia para a célula (TAO *et al.*, 2017). Analisando a glicose no metaboloma extracelular, as menores concentrações foram observadas nos isolados 31 (0,716 mM) e 120 (0,727 mM), valor intermediário no isolado 121 (1,33 mM), e as maiores concentrações nos isolados 221-V (16,9 mM) e SC5314 (18,4 mM) (TABELA 2). Analisando a glicose no metaboloma intracelular, novamente as menores concentrações foram observadas nos isolados 31 (5,75 µM) e 120 (5,62 µM), valor intermediário na amostra SC5314 (97,3 µM), e as maiores concentrações nos isolados 221-V (275 µM) e 121 (335 µM) (TABELA 3). A glicose aumenta a resistência de *C. albicans* a antifúngicos azoicos e ao estresse oxidativo, e assim, a ação de células fagocíticas (RODAKI *et al.*, 2009). Os níveis de glicose podem alterar significativamente a expressão de genes associados a virulência fúngica, tais como *CAP1*, ligado a resposta ao estresse oxidativo (RODAKI *et al.*, 2009). Assim, a maior disponibilidade de glicose intracelular pela linhagem 221-V destacaria esta como a amostra mais virulenta. Curiosamente, essa linhagem apresentou os maiores níveis de expressão dos genes *SAP*, *ALS3* e *HWPI* (item 5.6).

Analisando o metaboloma extracelular, pode-se notar que todos os isolados aumentaram os níveis de etanol em comparação com a concentração inicial do meio de cultura, principalmente os isolados clínicos 31 (10,9 µM), 120 (11,1 µM) e 121 (10,7 µM). Entretanto, no metaboloma intracelular os isolados SC5314 (2,57 mM), 120 (3,53 mM) e 259 (2,94 mM) mostraram as maiores concentrações de etanol. Na ausência de glicose, fontes alternativas de carbono, tais como etanol e acetato, são convertidas no metabólito central acetil-CoA para alimentar o ciclo de glioxilato e a gliconeogênese para produção de

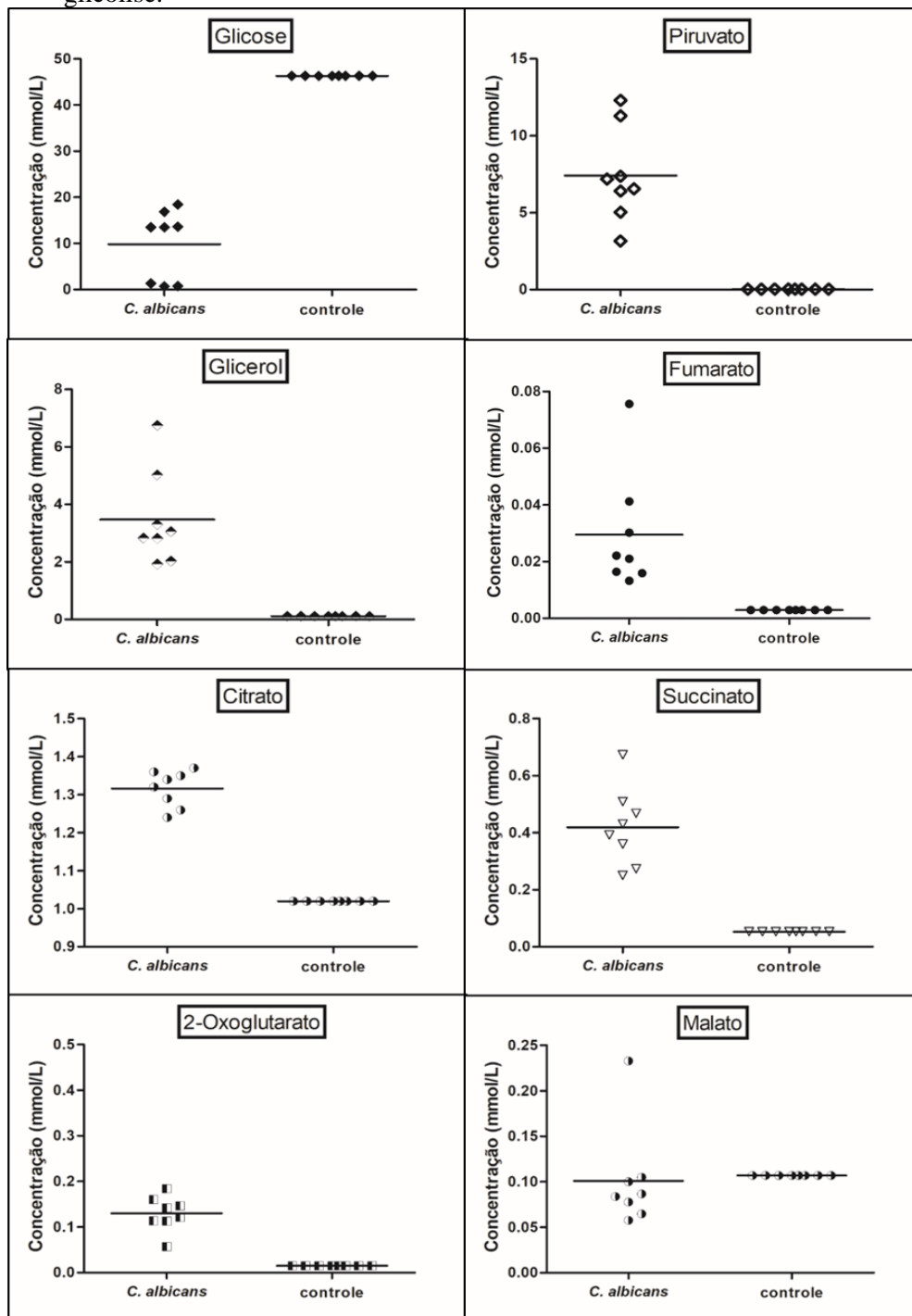
glicose e energia (CHEW; CHEE; THAN, 2019; MOTA *et al.*, 2015). As linhagens 121 e 221-V mostraram as menores concentrações intracelular de acetato em comparação com as demais linhagens, esses dois isolados também apresentaram os maiores níveis de glicose intracelular (TABELA 3). Esses resultados sugerem que as linhagens 121 e 221-V podem ter usado o acetato no processo de gliconeogênese.

Analisando o metaboloma extracelular pode-se observar um aumento na produção de fumarato igual a 4,56; 5,52; 5,69; 7,26; 7,64; 10,45; 14,28 e 26,18 vezes maior que o controle (meio de cultura), respectivamente nas linhagens 120; 257; 289; ATCC10231; 121; SC5314; 31 e 221-V. A análise do metaboloma intracelular mostrou maiores concentrações de fumarato nas linhagens 31 (5,93  $\mu\text{M}$ ), 221-V (5,47  $\mu\text{M}$ ) e 121 (5,00  $\mu\text{M}$ ). Um recente estudo mostrou que o gene *SDH2* codifica uma subunidade da succinato desidrogenase que catalisa a oxidação do succinato em fumarato no ciclo TCA. Essa enzima desempenha um papel importante na filamentação e virulência de *C. albicans* provavelmente por afetar espécies reativas de oxigênio intracelular (BI *et al.*, 2018). Assim, infere-se que o fumarato, provavelmente, seja importante na virulência de *C. albicans*, e novamente a linhagem 221-V destaca-se com maior disponibilidade desse metabólito.

Na etapa de glicólise há a produção de adenosina trifosfato (ATP) e duas moléculas de piruvato, o segundo estágio da respiração aeróbica é o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarbóxico que envolve moléculas de citrato, fumarato, succinato, malato e oxoglutarato (TAO *et al.*, 2017). Essas moléculas foram encontradas no metaboloma extracelular de *C. albicans*, e, em geral, apresentaram suas concentrações aumentadas em relação a concentração inicial do meio, com exceção do malato que não foi alterado significativamente (FIGURA 8).

A glicólise pode também estimular *C. albicans* a produzir e armazenar glicerol e um intermediário metabólico chamado dihidroxiacetona (KLEIN *et al.*, 2017), o qual foi encontrado em concentrações 5,18; 6,80; 9,70; 13,50 e 17,82 vezes maior do que a concentração inicial nas linhagens 221-V, SC5314, 121, 31 e 120, respectivamente. A conversão de glicerol-3-fosfato em fosfato de dihidroxiacetona pela ação da glicerol-3-fosfato oxidase permite o uso de glicerol como fonte de carbono mas esse processo produz peróxido de hidrogênio que altamente tóxico ao microrganismo (FERRARINI *et al.*, 2016). Dessa maneira, as menores concentrações de dihidroxiacetona observadas nas linhagens 221-V, SC5314 e 121 indicam que estas teriam menor produção de peróxido de hidrogênio e sofreriam menos danos que as demais linhagens.

Figura 8 – Moléculas envolvidas na produção de energia apresentaram alterações em suas concentrações no metaboloma extracelular de 8 linhagens de *C. albicans* indicando glicólise.



Legenda: Os dados mostram a diminuição de glicose e aumento nas concentrações de moléculas utilizadas no ciclo do ácido tricarboxílico, evidenciando a glicólise. O controle utilizado foi o meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose. Com exceção do malato que não apresentou diferença significativa  $P > 0.05$ , os outros sete metabólitos apresentaram diferença significativa do controle (meio de cultura)  $P < 0,01$ .

Fonte: Da autora.

Analisando o metaboloma intracelular, as maiores concentrações de glicose foram observadas nos isolados 121 e 221-V, interessante, essas linhagens apresentaram

menores concentrações de acetona, acetato e piruvato (TABELA 3) quando comparadas as demais amostras. Altas concentrações de glicose favorecem a síntese de lipídeos, ademais, moléculas de acetato, acetona, formato e piruvato são precursoras na biossíntese de lipídeos tais como esfingolipídeos, glicerofosfolipídeos, glicerolipídeos e esteróis (KANESHIRO, 2002; WANG *et al.*, 2011). Desse modo, esses metabólitos poderiam estar relacionados à sensibilidade ou resistência aos antifúngicos, por favorecerem a formação de esteróis como o ergosterol. A menor disponibilidade de acetona, acetato e piruvato nas linhagens 121 e 221-V, possivelmente, causariam menor produção de esteróis como ergosterol, destacando estas com menos sensíveis a antifúngicos que agem sobre o ergosterol. De fato, a linhagem 221-V apresentou menor sensibilidade a anfotericina B se comparada as demais linhagens. Entretanto, o mesmo não foi observado na linhagem 121, uma justificativa seria a maior concentração de piruvato no metaboloma extracelular desta que poderia estar sendo reabsorvido e utilizado na lipogênese.

Um estudo recente encontrou diferenças proteômicas e metabólicas como maiores concentrações de citrato em uma linhagem de *C. auris* resistente ao fluconazol e caspofungina quando comparada a uma linhagem de *C. albicans* sensível a esses antifúngicos (ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2019). Esses achados fornecem informações interessantes sobre características metabólicas, algumas relacionadas à resistência antifúngica, que sugere um mecanismo multifatorial de resistência a fármacos, incluindo grandes diferenças na utilização de carbono, esfingolipídeos, glicerolipídeos, esteróis, parede celular e bombas de efluxo (ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2019). Na Figura 8 pode-se observar o aumento de citrato no metaboloma extracelular quando comparado ao controle, no qual a maior concentração foi na amostra 221-V (1,37 mM). Entretanto, analisando as concentrações de citrato no metaboloma intracelular, a linhagem 221-V apresentou a menor concentração (30,1  $\mu$ M) entre as linhagens.

É conhecido que *C. albicans* pode aumentar a síntese de glicerol, arabitol e trealose em resposta ao estresse oxidativo e osmótico (SÁNCHEZ-FRESNEDA *et al.*, 2013). Na Tabela 2 é possível notar que as linhagens de *C. albicans* produziram também arabitol, o qual foi encontrado em concentrações 1,04; 2,69; 3,30; 5,58; 6,39; 8,76; 19,69 e 23,66 vezes maior do que no controle, respectivamente, nas linhagens 120, 221-V, 31, 289, 257, SC5314, 121 e ATCC10231. Observando a Tabela 3 foi possível notar as maiores concentrações de trealose nas linhagens 221-V (1070  $\mu$ M) e 121 (166  $\mu$ M), valor intermediário para SC5314 (49,2  $\mu$ M) e a menor concentração na linhagem ATCC10231 (2,39  $\mu$ M).

As moléculas encontradas nesse trabalho foram comparadas com dois trabalhos recentes de metaboloma de *Candida* spp. (TABELA 4) (LI *et al.*, 2018; SEMREEN *et al.*, 2019). Comparando os metabólitos encontrados com os de Semreen *et al.* (2019), foram encontradas 15 moléculas iguais ou relacionadas como um metabólito destas, tais como, dois álcoois provenientes de metabolização de aminoácidos, 4-(2-hidroxietil)fenol e 2-(1H-indol-3-il)etan-1-ol, que são metabólitos secundários de tirosina e triptofano, respectivamente. Quando comparados ao estudo de Li *et al.* (2018), foram encontrados 22 metabólitos iguais ou relacionados. Oito moléculas (alanina, fenilalanina, glicerol, glicose, lactato, metionina, tirosina e 2-Oxoglutarato) foram encontradas nesse trabalho em ambos os metabolomas intracelular e extracelular, enquanto que no estudo de Li *et al.* (2018) elas foram detectadas em apenas um dos metabolomas. Os metabólitos encontrados nesses três estudos diferem, assim como as metodologias utilizadas em cada um. Nesse trabalho utilizou-se o RMN-<sup>1</sup>H e foram quantificados 66 metabólitos; Li *et al.* (2018) utilizaram uma combinação de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS), cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a MS de tempo-*off* de quadrupolo (UHPLC-Q-TOF/MS) e cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada ao método quadrupolo triplo MS (HILIC-QQQ / MS) para quantificar 65 metabólitos; e, Semreen *et al.* (2019) utilizaram CG-MS e quantificaram 22 metabólitos em *C. albicans* e 63 metabólitos em *C. auris*. Ambas as técnicas de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear são utilizadas em estudos de metabolômica fúngica (AZERANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018). A diferença entre os resultados pode estar relacionada à sensibilidade de cada método e os bancos de dados utilizados para interpretação dos mesmos. A espectrometria de massa é capaz de analisar quantidades extremamente baixas de metabólitos dentro de uma amostra, entretanto, não é tão precisa na quantificação dos metabólitos, a menos que métodos de marcação com isótopos estáveis sejam usados (CREEK *et al.*, 2012; VEENSTRA, 2012). Em contraste, a tecnologia de RMN é capaz de determinar a quantificação relativa de metabólitos com facilidade, embora sua sensibilidade possua várias ordens de grandeza inferior à da espectrometria de massa (CULIBRK; CROFT; TEBBUTT, 2016; VEENSTRA, 2012). Portanto, pesquisas que combinem essas técnicas seriam altamente valiosas em estudos de metaboloma fúngico.

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continua)

Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 Acetato <sup>I/E</sup>		
 Acetoina <sup>I/E</sup>		
 Acetona <sup>I/E</sup>		
 Adenosina <sup>I</sup>		 Adenosina <sup>I</sup>
 Adenosina difosfato (ADP) <sup>I</sup>		
 Adenosina monofosfato (AMP) <sup>I</sup>		
 Alanina <sup>I/E</sup>		 Alanina <sup>I</sup>
 Aloisoleucina <sup>E</sup>		
 Arabitol <sup>E</sup>		 Arabitol <sup>I</sup>

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

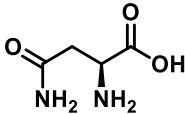
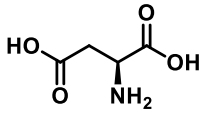
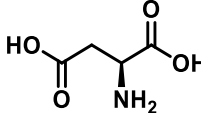
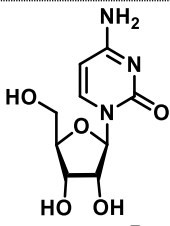
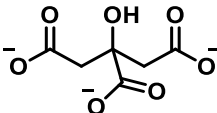
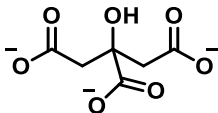
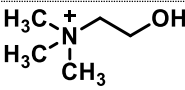
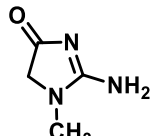
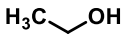
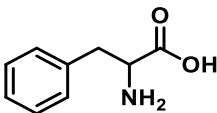
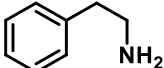
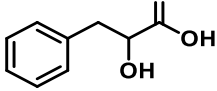
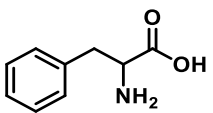

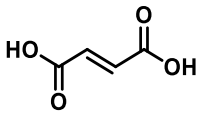
Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 <p>Asparagina <sup>I/E</sup></p>		
 <p>Aspartato <sup>I</sup></p>		 <p>Aspartato <sup>I</sup></p>
 <p>Citidina <sup>E</sup></p>		
 <p>Citrato <sup>I/E</sup></p>		 <p>Citrato <sup>I/E</sup></p>
 <p>Colina <sup>I/E</sup></p>		
 <p>Creatinina <sup>I</sup></p>		
 <p>Etanol <sup>I/E</sup></p>		
 <p>Fenilalanina <sup>I/E</sup></p>	 <p>2-feniletano-1-amina <sup>E</sup></p>  <p>Ácido 2-hidroxi-3-fenilpropanoico <sup>E</sup></p>	 <p>Fenilalanina <sup>E</sup></p>
 <p>Formato <sup>E</sup></p>		
 <p>Fumarato <sup>I/E</sup></p>		

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

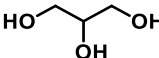
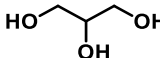
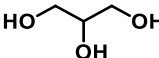
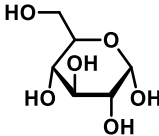
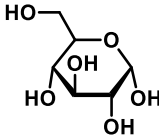
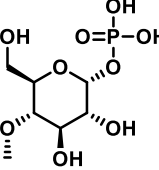
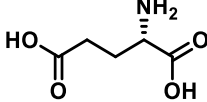
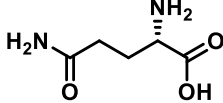
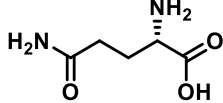
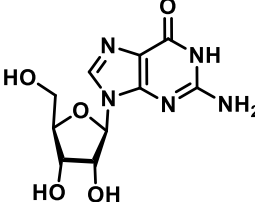
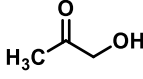
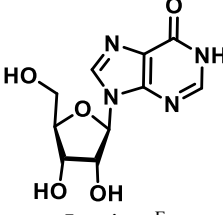
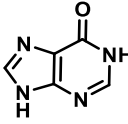
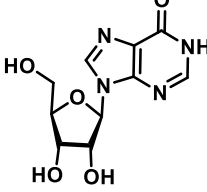
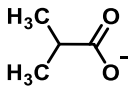
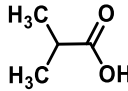
Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 Glicerol <sup>I/E</sup>	 Glicerol <sup>E</sup>	 Glicerol <sup>I</sup>
 Glucose <sup>I/E</sup>		 Glucose <sup>E</sup>
 Glucose-1-fosfato <sup>I</sup>		
 Glutamato <sup>I</sup>		
 Glutamina <sup>I</sup>		 Glutamina <sup>I</sup>
 Guanosina <sup>E</sup>		
 Hidroxiacetona <sup>E</sup>		
 Inosina <sup>E</sup>		 1,9-diidro-6H-purin-6-ona <sup>I</sup>
		 Inosina <sup>E</sup>
 Isobutirato <sup>E</sup>	 Ácido isobutérico <sup>E</sup>	

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

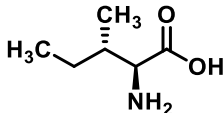
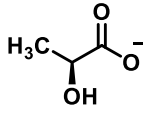
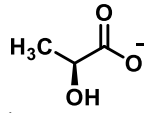
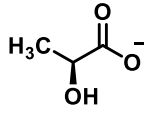
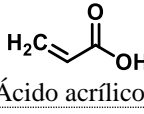
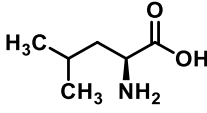
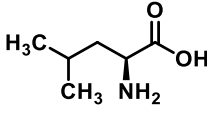
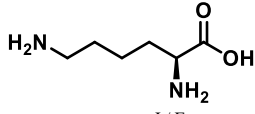
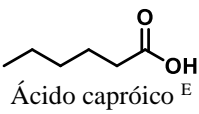
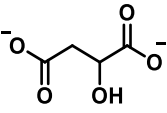
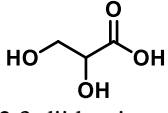
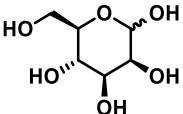
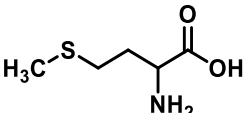
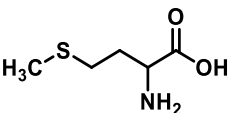
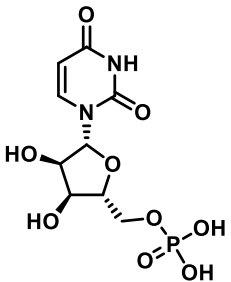
Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 <p>Isoleucina <sup>I/E</sup></p>		
 <p>Lactato <sup>I/E</sup></p>	 <p>Ácido láctico <sup>E</sup></p>	 <p>Lactato <sup>I</sup></p>
	 <p>Ácido acrílico <sup>E</sup></p>	
 <p>Leucina <sup>I/E</sup></p>		 <p>Leucina <sup>I/E</sup></p>
 <p>Lisina <sup>I/E</sup></p>	 <p>Ácido caprónico <sup>E</sup></p>	
 <p>Malato <sup>I/E</sup></p>	 <p>Ácido 2,3-diidroxiopropanoico <sup>E</sup></p>	
 <p>Manose <sup>E</sup></p>		
<p>HO-CH<sub>3</sub></p> <p>Metanol <sup>E</sup></p>		
 <p>Metionina <sup>I/E</sup></p>		 <p>Metionina <sup>I</sup></p>
 <p>Monofosfato de uridina (UMP) <sup>I</sup></p>		

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

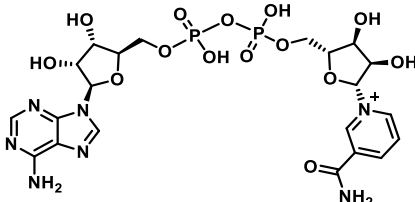
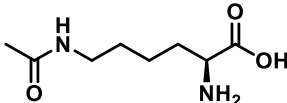
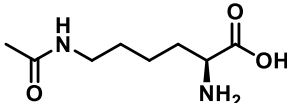
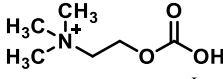
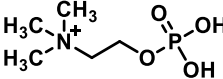
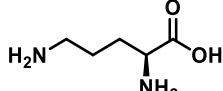
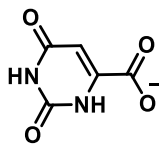
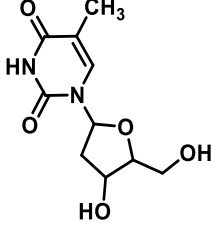
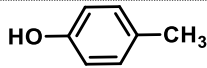
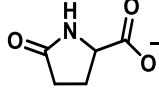
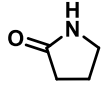
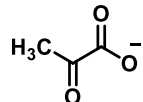
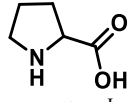
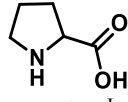
Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 <p>NAD<sup>+</sup> <sup>I</sup></p>		
 <p>N-Acetil-lisina <sup>E</sup></p>	 <p>N-Acetil-lisina <sup>I</sup></p>	
 <p>O-acetilcolina <sup>I</sup></p>		
 <p>O-fosfocolina <sup>I</sup></p>		
 <p>Ornitina <sup>I</sup></p>		
 <p>Orotato <sup>E</sup></p>	 <p>1-(4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetraidrofurano-2-il)-5-metilpirimidina-2,4(1<i>H</i>,3<i>H</i>)-diona <sup>E</sup></p>	
 <p>p-cresol <sup>E</sup></p>		
 <p>Piroglutamato <sup>I/E</sup></p>	 <p>pirrolidin-2-ona <sup>E</sup></p>	
 <p>Piruvato <sup>I/E</sup></p>		
 <p>Prolina <sup>I</sup></p>	 <p>Prolina <sup>I</sup></p>	

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

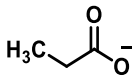
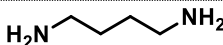
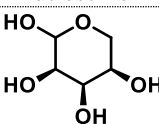
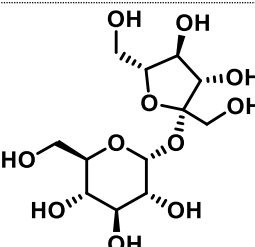
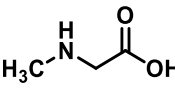
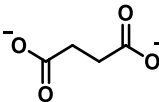
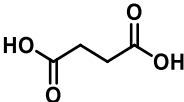
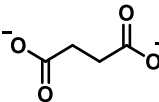
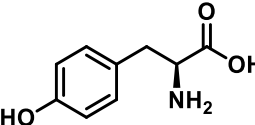
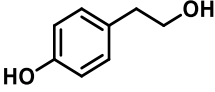
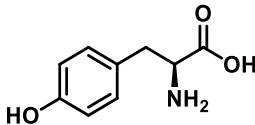
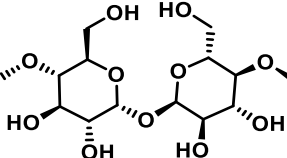
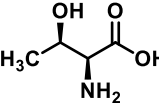
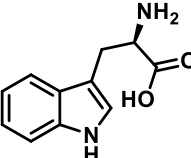
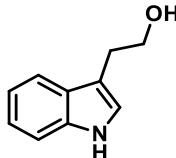
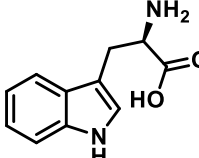
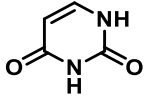
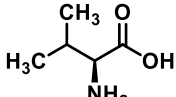
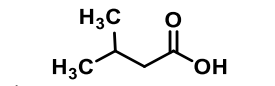
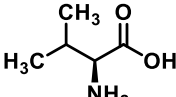
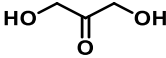
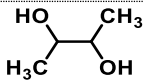
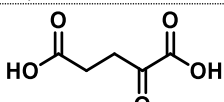
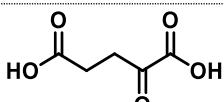
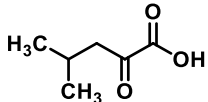
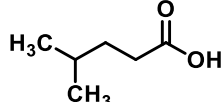
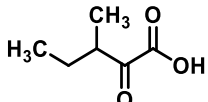
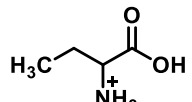
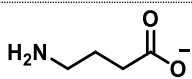
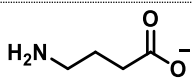
Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 Propionato <sup>I</sup>		
 Putrescine <sup>E</sup>		
 Ribose <sup>E</sup>		
 Sacarose <sup>I/E</sup>		
 Sarcosina <sup>E</sup>		
 Succinato <sup>I/E</sup>	 Ácido succínico <sup>E</sup>	 Succinato <sup>I/E</sup>
 Tirosina <sup>I/E</sup>	 4-(2-hidroxietyl)fenol <sup>E</sup>	 Tirosina <sup>E</sup>
 Trealose <sup>I</sup>		
 Treonina <sup>I/E</sup>		
 Triptofano <sup>E</sup>	 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)etan-1-ol <sup>E</sup>	 Triptofano <sup>E</sup>

Tabela 4 – Análise comparativa do metaboloma de *C. albicans* por RMN-<sup>1</sup>H com a literatura.  
(continuação)

Metaboloma (RMN- <sup>1</sup> H)	Semreen <i>et al</i> 2019	Li <i>et al.</i> 2018
 Uracila <sup>I/E</sup>		
 Valina <sup>I/E</sup>	 Ácido 3-metilbutanóico <sup>E</sup>	 Valina <sup>I/E</sup>
 1,3-Dihidroxi-acetona <sup>E</sup>		
 2,3-Butanodiol <sup>I/E</sup>		
 2-Oxoglutarato <sup>I/E</sup>		 2-Oxoglutarato <sup>I</sup>
 2-Oxoisocaproato <sup>E</sup>	 Ácido 4-metilpentanóico <sup>E</sup>	
 3-Metil-2-oxovalerato <sup>I/E</sup>		
 2-Aminobutirato <sup>I</sup>		
 4-Aminobutirato (GABA) <sup>I</sup>		 4-Aminobutirato (GABA) <sup>I</sup>

Legenda: <sup>I</sup> - Intracelular; <sup>E</sup> – Extracelular

### 5.3 SELEÇÃO DE TRÊS LINHAGENS DE *C. albicans* PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E GENÔMICA.

Observando os resultados de sensibilidade antifúngica e metabolômica foram escolhidas as linhagens SC5314, 121 e 221-V para os ensaios de interação patógeno-hospedeiro conforme detalhado a seguir.

O principal critério de seleção foi a sensibilidade aos antifúngicos, notou-se que as linhagens mostraram diferentes MICs para caspofungina, com perfis de alta sensibilidade para a linhagens SC5314 (0,063 µg/mL), um valor intermediário em relação as outras linhagens para a amostra 121 (0,125 µg/mL) e o valor maior para a linhagem 221-V (1,0 µg/mL). Semelhantemente, o aminoácido aspartato, relacionado à produção de Sapp, apresentou concentrações baixa, intermediária e alta no metaboloma intracelular de *C. albicans* SC5314 (26,4 µM), 121 (49,6 µM) e 221-V (68,8µM).

As linhagens 121 e 221-V apresentaram altos níveis de metabólitos envolvidos na produção energia, como por exemplo o fumarato, além dos maiores níveis de glicose intracelular. Interessantemente, essas linhagens mostraram as menores concentrações de acetona, acetato e piruvato, as quais são moléculas precursoras na biossíntese de lipídeos tais como esteróis (KANESHIRO, 2002; WANG *et al.*, 2011). Desse modo, esses metabólitos poderiam estar relacionados ao perfil de sensibilidade aos antifúngicos, por favorecerem a formação de esteróis como o ergosterol. Estas duas linhagens também apresentaram as altas concentrações de glicerol, arabitol e trealose os quais estão associados a resposta ao estresse oxidativo e osmótico (SÁNCHEZ-FRESNEDA *et al.*, 2013). Ademais, essas linhagens mostraram as maiores concentrações intracelulares de treonina, a qual é importante para produção das adesinas Hwp1p e Als3p que possuem domínios C e N-terminais ricos em resíduos desse aminoácido (PADOVAN *et al.*, 2009; RAUCEO *et al.*, 2006). Assim, pode-se inferir que a linhagem 221-V seria a mais virulenta pois, provavelmente, foi a linhagem que mais produzir treonina (maior concentração intracelular) Portanto, as linhagens 121 e 211-V destacaram-se entre as demais linhagens de origem clínicas, apresentando-se como possíveis linhagens metabolicamente mais virulentas.

Entre as linhagens padrões, a SC5314, também conhecida como ATCC MYA-2876, foi selecionada por ser uma das linhagens de *C. albicans* mais estudadas em biologia molecular e que possui aproximadamente 30% de seus genes caracterizados, segundo o *Candida* Genome Database ([http://www.candidagenome.org/cache/C\\_albicans\\_SC5314\\_genomeSnapshot.html](http://www.candidagenome.org/cache/C_albicans_SC5314_genomeSnapshot.html)).

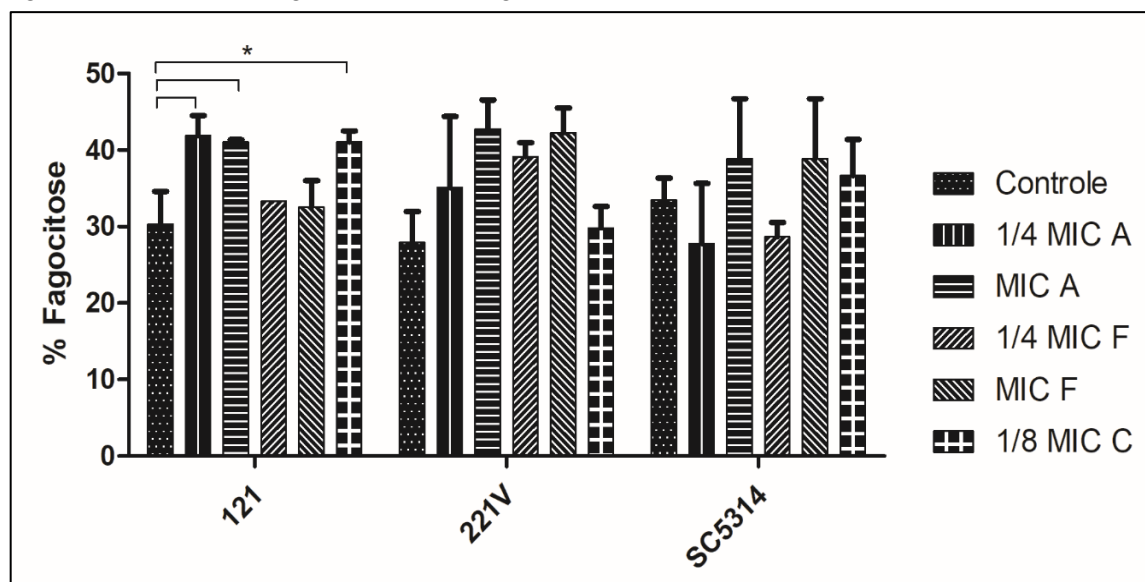
#### 5.4 ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

A atividade fungicida dos macrófagos foi avaliada após 1h de contato com as leveduras. Os macrófagos mataram  $34,18 \pm 5,43\%$ ;  $35,30 \pm 7,12\%$  e  $34,81 \pm 4,73\%$  das

células de leveduras, nas linhagens 121, 221-V e SC5314, respectivamente (FIGURA 9). Esses resultados são semelhantes a estudos anteriores que também avaliaram a atividade fungicida após 1 hora de contato entre as leveduras e células fagocíticas, como o trabalho de Tavanti *et al.* (2006) em que os macrófagos mataram 37,4% de *C. albicans*, e de Newman *et al.* (2005) no qual monócitos e macrófagos mataram 48% a 57% do inóculo inicial de *C. albicans*.

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não com antifúngicos, para as linhagens 221-V e SC5314. Entretanto, observou-se um aumento significativo na taxa de fagocitose ( $P < 0,05$ ) na linhagem 121 após tratamentos com 1/8 da MIC de caspofungina, a MIC de anfotericina B e 1/4 da MIC de anfotericina B, as quais mostraram taxas de fagocitose com médias respectivamente iguais a  $41,05 \pm 1,05\%$ ;  $41,01 \pm 0,24\%$  e  $41,88 \pm 1,88\%$ . Essa diferença em relação ao grupo não tratado pode ter ocorrido pelo estresse causado pelos antifúngicos. Entre as três linhagens estudadas, a 121 era a que apresentava menores valores de MIC à anfotericina B, ou seja, a amostra com maior sensibilidade. Estudos anteriores também mostraram que tratamentos com MIC e subMIC podem aumentar as taxas de fagocitose de *C. albicans* por células polimorfonucleares (HOPE *et al.*, 2007; TULLIO *et al.*, 2012).

Figura 9 – Atividade fungicida de macrófagos sobre *C. albicans*.



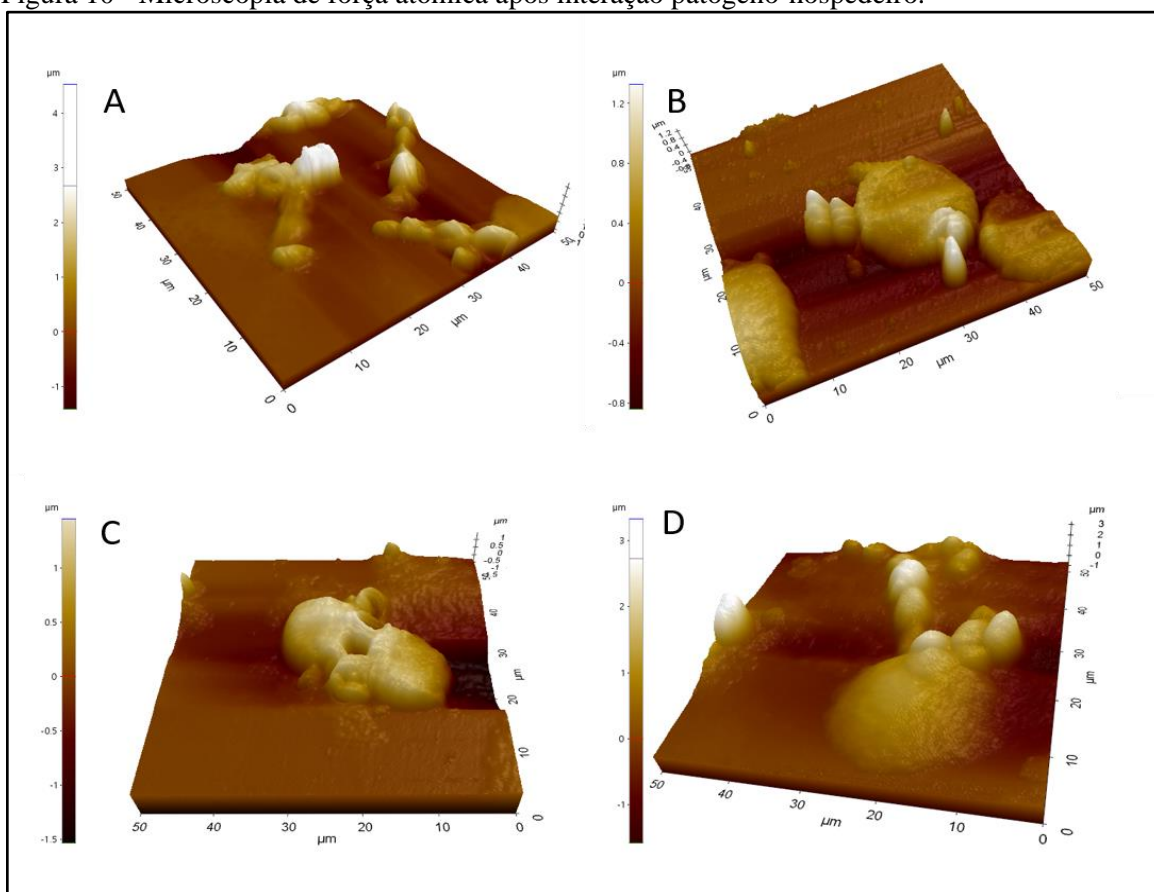
Legenda. Controle: *Candida albicans* cultivada na ausência de antifúngicos; 1/4 MIC A: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de anfotericina; MIC A: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de anfotericina; 1/4 MIC F: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de fluconazol; MIC F: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de fluconazol; 1/8 MIC C: *C. albicans* cultivada na presença de 1/8 da MIC de caspofungina; \*:  $P < 0,05$ .

Fonte: Da autora.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

Para visualizar topograficamente a interação patógeno-hospedeiro e avaliar se os antifúngicos poderiam alterar a topografia das células fúngicas, as amostras foram analisadas microscopicamente por força atômica (FIGURA 10). Nesse ensaio pode-se observar que, os macrófagos aderiram na superfície das lamínulas de forma planar apresentando  $19,91 \pm 3,26 \mu\text{m}$  de diâmetro e  $0,88 \pm 0,27 \mu\text{m}$  de altura. Os isolados de *C. albicans* apresentaram em média  $4,28 \pm 1,85 \mu\text{m}$  de diâmetro e  $2,53 \pm 0,21 \mu\text{m}$  de altura. Embora o diâmetro das células de *C. albicans* tenha variado de 2,5 a 6,4  $\mu\text{m}$ , não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as amostras tratadas com antifúngico e controle. Ou seja, nenhum dos três tratamentos antifúngicos alteram o tamanho de *C. albicans*.

Figura 10 - Microscopia de força atômica após interação patógeno-hospedeiro.

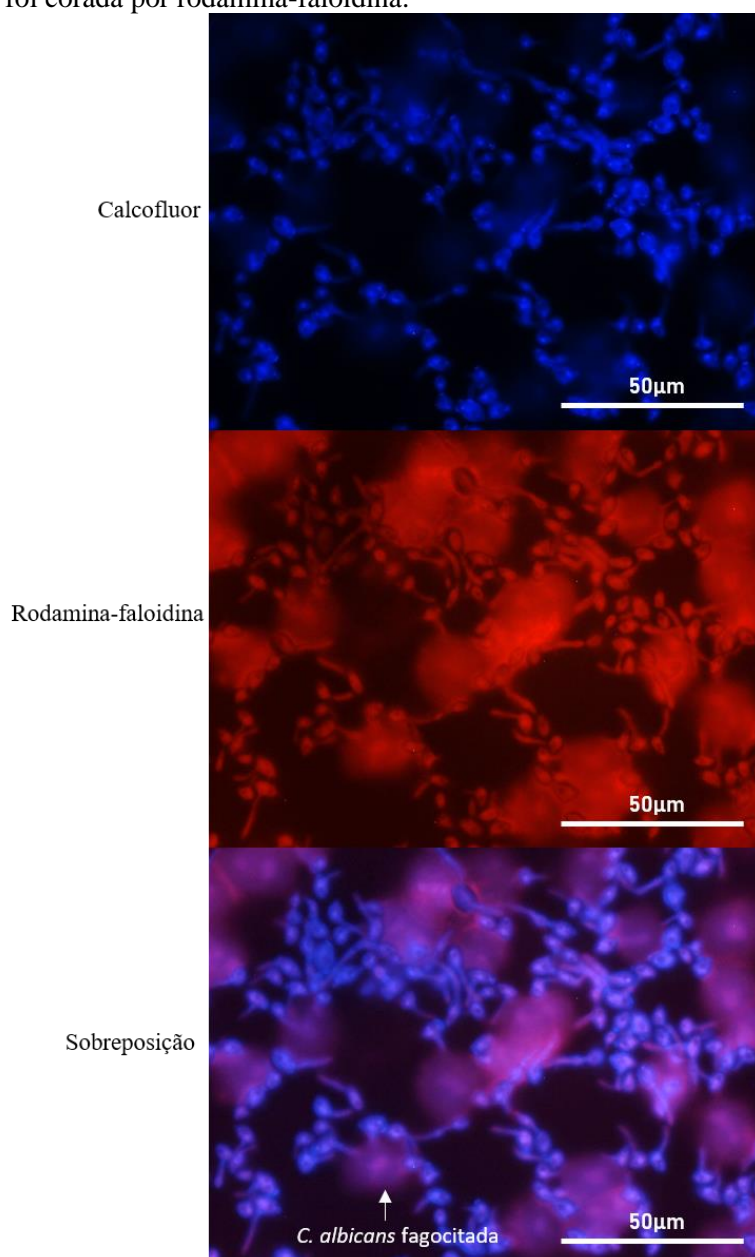


Legenda: (A) *Candida albicans* cultivada na presença de macrófagos; (B) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (MIC) de anfotericina B; (C) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,008  $\mu\text{g/mL}$  (1/8 da MIC) de caspofungina; (D) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (MIC) de fluconazol. As células maiores correspondem aos macrófagos, e as menores, à *C. albicans* SC5314.

Fonte: Da autora.

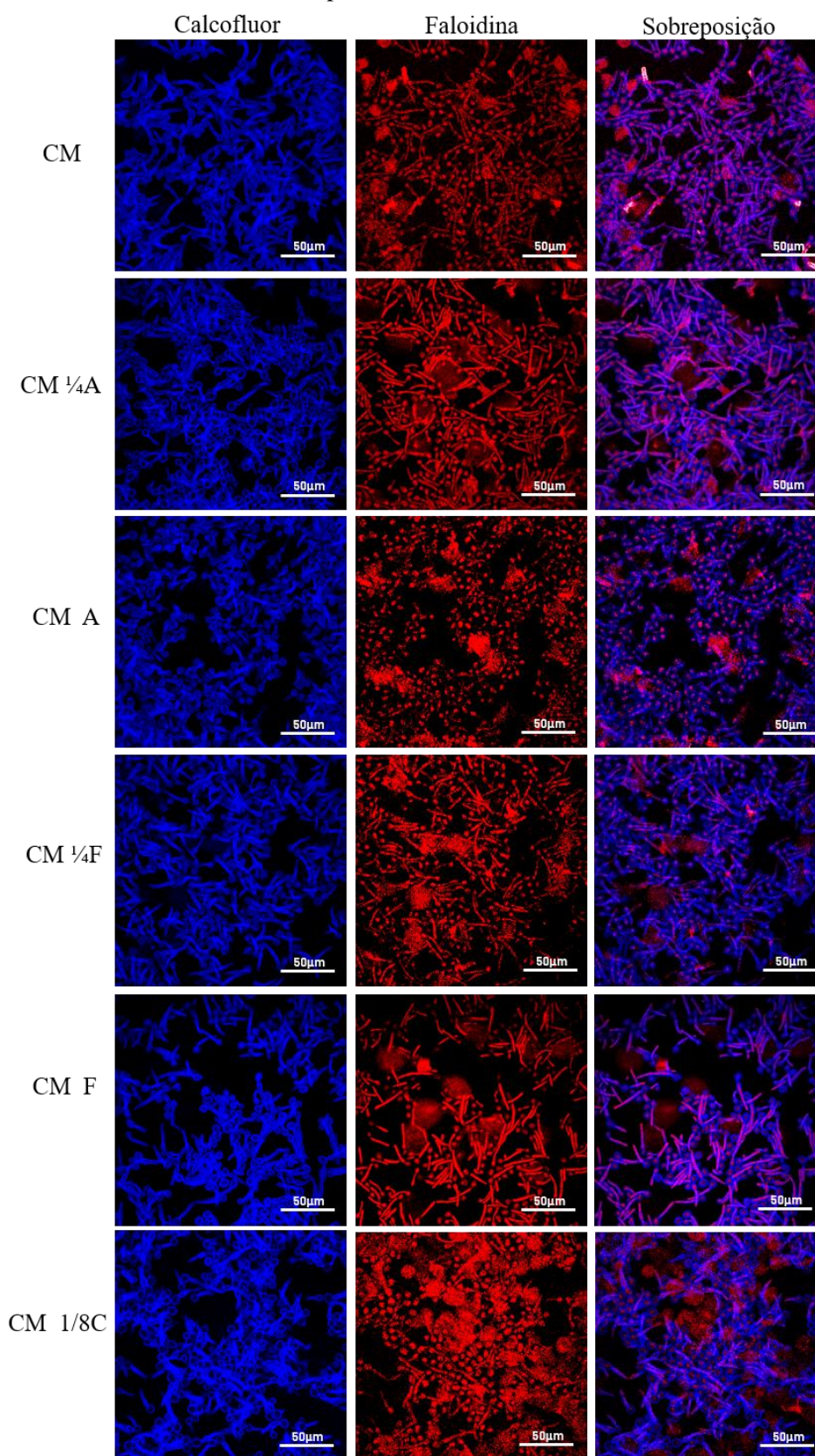
A interação patógeno-hospedeiro também foi avaliada por microscopia de fluorescência (FIGURA 11) e confocal (FIGURA 12). A coloração da quitina da parede celular dos fungos foi realizada com branco de calcofluor (CFW) e a actina das células foi corada por rodamina-faloidina (Invitrogen). Analisando as imagens foi possível visualizar os macrófagos, a *C. albicans*, sua filimentação e o número de células por fagócito, o qual apresentou uma média 4, similar aos resultados encontrados na contagem em meio agar Sabouraud Dextrose (FIGURA 9).

Figura 11 – Microscopia de fluorescência mostrando a interação *Candida*-macrófago. A quitina da parede celular dos fungos foi marcada por branco de calcofluor e a actina das células foi corada por rodamina-faloidina.



Fonte: Da autora.

Figura 12 – Corte transversal de microscopia confocal mostrando a interação *Candida*-macrófago. A quitina da parede celular dos fungos foi marcada por branco de calcofluor e a actina das células foi corada por rodamina-faloidina.



Legenda: CM: *C. albicans* SC5314 cultivada na presença de macrófagos; CM ¼A: *C. albicans* cultivada na

presença de macrófagos e ¼ da MIC de anfotericina B; CM MIC A: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de anfotericina B; CM ¼ F: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e ¼ da MIC de fluconazol; CM F: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de fluconazol. CM 1/8C: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/8 da MIC de caspofungina.

Fonte: Da autora.

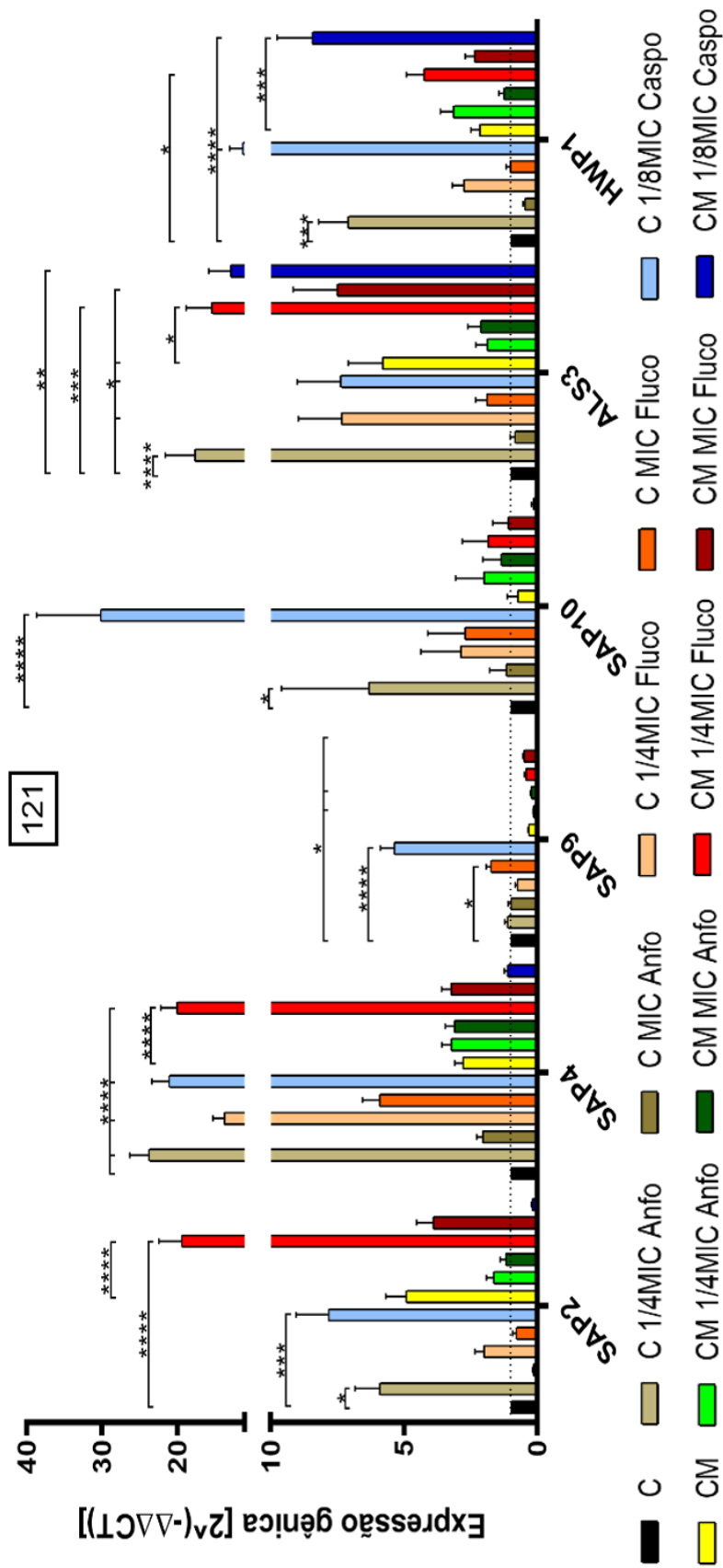
## 5.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE *C. albicans*

Foi avaliado se o contato de linhagens de *C. albicans* com os antifúngicos e/ou as células fagocíticas alterava a expressão dos genes *SAP*, *ALS3* e *HWPI*. Em geral, pode-se observar que as linhagens de *C. albicans* expostas às concentrações subinibitórias dos antifúngicos apresentaram maiores níveis de expressão dos genes analisados (FIGURAS 13, 14 e 15).

As linhagens 121 e 221-V expostas a concentrações subinibitórias de caspofungina mostraram aumento significativo na expressão de todos os seis genes pesquisados quando comparadas ao controle sem exposição. Os maiores níveis de expressão gênica foram observados na linhagem 221-V, a qual foi classificada como resistente a esse antifúngico (1 µg/mL), com aumento médio de 75,8 (*SAP2*); 32,2 (*SAP4*); 6,9 (*SAP9*); 50,4 (*SAP10*); 11,8 (*ALS3*) e 41,4 (*HWPI*) vezes maior quando comparados ao controle (FIGURA 14). A linhagem 121 apresentou níveis intermediários, bem como sua sensibilidade à caspofungina foi intermediária (0,125 µg/mL), com aumento médio de 7,8 (*SAP2*); 21,1 (*SAP4*); 5,4 (*SAP9*); 30,2 (*SAP10*); 7,4 (*ALS3*) e 11,3 (*HWPI*) quando comparados ao controle (FIGURA 13). A linhagem SC5314, a mais sensível à caspofungina (0,63 µg/mL), não apresentou alterações significativas ( $P > 0,05$ ) na expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*, entretanto, a amostra exposta a 1/8 do MIC do antifúngico e macrófagos mostrou aumento dos níveis de *ALS3* ( $P < 0,01$ ) e *HWPI* ( $P < 0,0001$ ) (FIGURA 15).

*Candida albicans* cultivada na presença de concentrações subinibitórias de fluconazol aumentou os níveis de expressão de alguns genes quando comparadas ao controle: *SAP4* (13,78) e *ALS3* (7,34) na linhagem 121; *SAP2* (3,86), *SAP4* (1,98), *SAP9* (8,54) e *SAP10* (16,74) na linhagem SC5314. Além disso, amostras expostas ao antifúngico e macrófagos mostraram níveis aumentados dos seguintes genes: *SAP2* (19,41), *SAP4* (20,01) e *ALS3* (15,42) para linhagem 121; *SAP4* (2,07) para linhagem SC5314 (FIGURA 15).

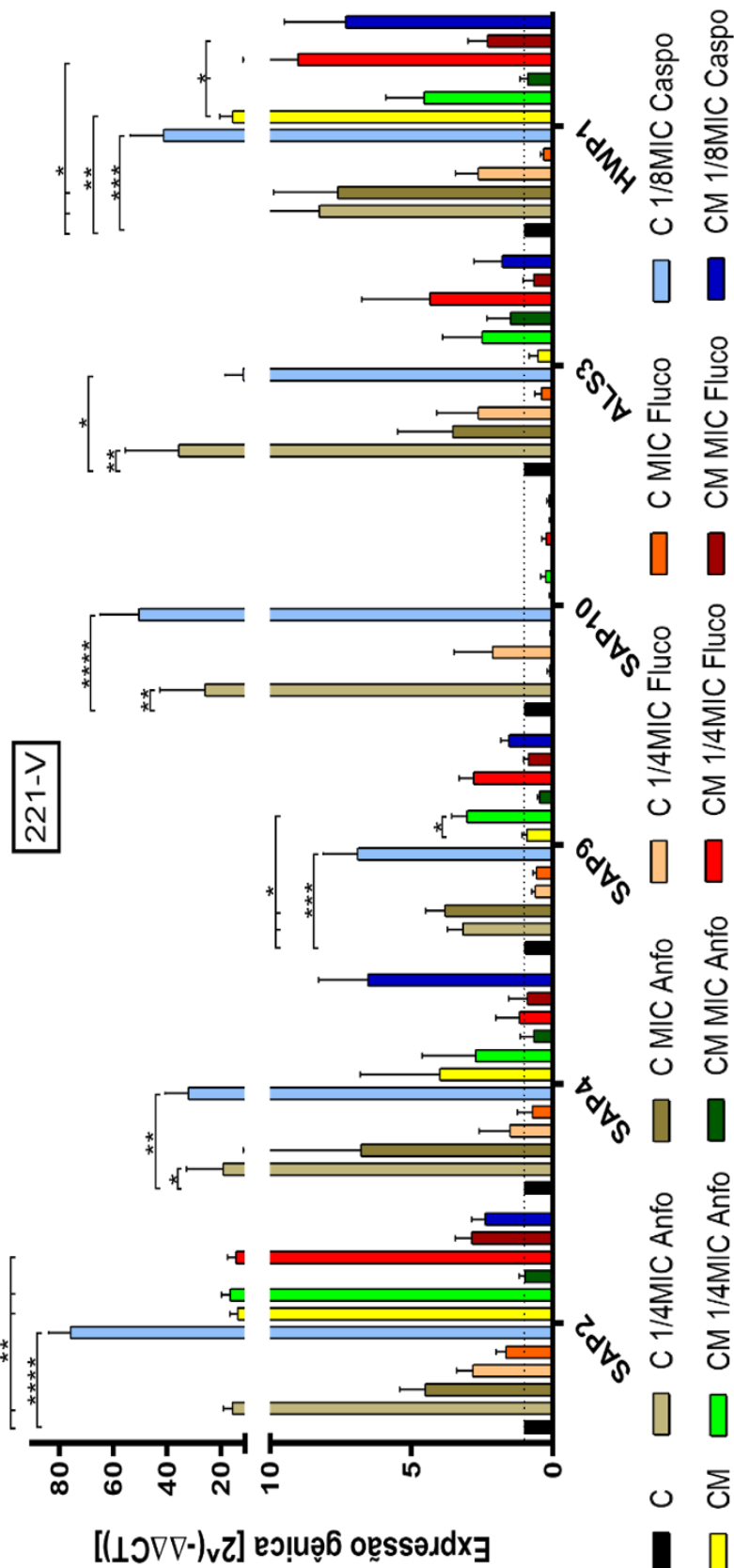
Figura 13 – Expressão gênica de *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3* e *HWP1* em *C. albicans* 121 após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos



Legenda. C: *Candida albicans*; C 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de anfotericina B; C MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de anfotericina B; C 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de fluconazol; C MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de fluconazol; C 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/8 da MIC de caspofungina; CM: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; CM 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de anfotericina B; CM MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de anfotericina B; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de fluconazol; CM MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de fluconazol; CM 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/8 da MIC de caspofungina. \* < 0,05; \*\* < 0,01; \*\*\* < 0,001; \*\*\*\* < 0,0001.

Fonte: Da autora.

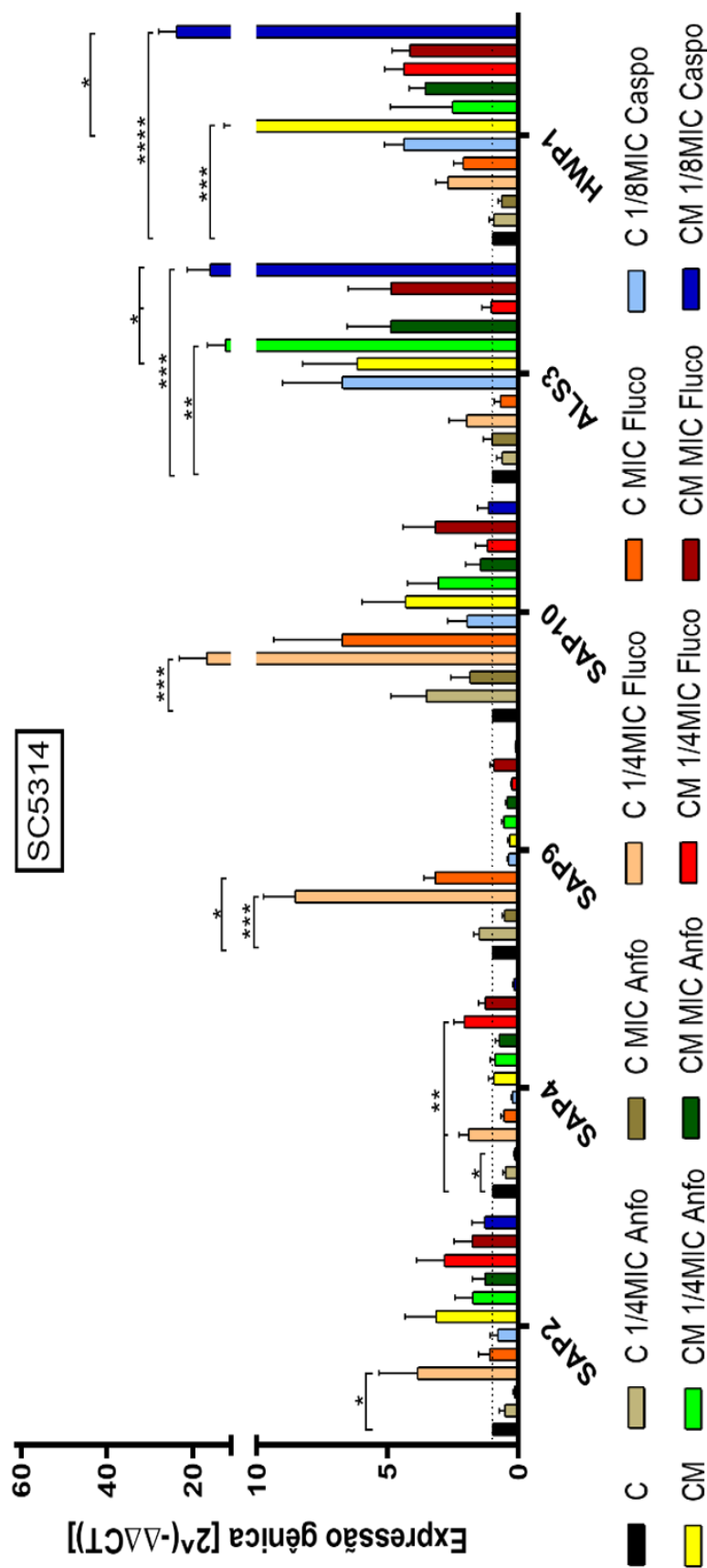
Figura 14 – Expressão gênica de *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3* e *HWP1* em *C. albicans* 221-V após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos



Legenda. C: *Candida albicans*; C 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de anfotericina B; C 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de fluconazol; C 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/8 da MIC de caspofungina; CM: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; CM 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de anfotericina B; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de fluconazol; CM 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/8 da MIC de caspofungina. \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ; \*\*\*\* $<0,0001$ .

Fonte: Da autora.

Figura 15 – Expressão gênica de *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3* e *HWP1* em *C. albicans* SC5314 após exposição a antifúngicos e/ou interação com macrófagos.



Legenda. C: *Candida albicans*; C 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de anfotericina B; C 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de anfotericina B; C 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de 1/4 da MIC de fluconazol; C 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença da MIC de fluconazol; C 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de 1/8 da MIC de caspofungina; CM: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; CM 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de anfotericina B; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de anfotericina B; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de fluconazol; CM MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de fluconazol; CM 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/8 da MIC de caspofungina. \* < 0,05; \*\* < 0,01; \*\*\* < 0,001; \*\*\*\* < 0,0001.

Fonte: Da autora.

Concentrações subinibitórias de anfotericina também influenciaram no aumento dos níveis de expressão de alguns genes pesquisados nas linhagens 121 e 221-V. Os isolados expostos mostram maiores níveis de: *SAP2* (5,92), *SAP4* (23,74), *SAP10* (6,34), *ALS3* (17,68) e *HWP1* (7,10) na linhagem 121; *SAP2* (15,77), *SAP4* (15,22), *SAP9* (3,18), *SAP10* (25,92), *ALS3* (35,77) e *HWP1* (8,25) na linhagem 221-V. O tratamento com MIC de anfotericina diminuiu os níveis de expressão de *SAP4* na linhagem SC5314 e de *SAP9* na linhagem 121. Resultados estes que podem estar relacionados com a atividade fungicida da anfotericina e/ou seu mecanismo de ação em que este interage com o ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática fúngica, alterando a permeabilidade seletiva desta por originar poros permeáveis à saída de água e de pequenas moléculas essenciais à sobrevivência do microrganismo, especialmente íons de potássio, amônio e fosfato (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Em geral, os tratamentos com MIC não alteraram significativamente os níveis de expressão gênica de *C. albicans*. Entretanto, após tratamentos com subMICs, estas aumentaram significativamente sua expressão gênica. Esses resultados são preocupantes e mostram que a exposição de *C. albicans* às concentrações subinibitórias de antifúngicos (ex.: tratamentos profiláticos, falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, erros de dosagem ou tempo entre as doses ou, ainda, a não adesão ao tratamento) podem aumentar sua virulência.

A interação levedura-macróforo por 1 hora também alterou níveis de expressão dos genes estudados. *C. albicans* em interação com os macróforos mostrou um aumento médio nos níveis expressão dos genes: *ALS3* (5,81) na linhagem 121; *SAP2* (13,85) e *HWP1* (15,66) na linhagem 221-V, e, *HWP1* (10,87) na linhagem SC5314, quando comparado a amostra controle (FIGURA 13, 14 e 15). Resultados estes, que mostram a importância de Sap2p e das adesinas Hwp1p e Als3p na virulência de *C. albicans*, visto que os genes que codificam essas proteínas são regulados positivamente após a interação *Candida*-macróforo.

De modo geral, os genes *SAP9* e *SAP10* apresentaram uma diminuição em seus níveis de expressão em todos os tratamentos após interação levedura-macróforo, principalmente *SAP9* nas linhagens 121 e SC5314 e *SAP10* na linhagem 221-V. Sap9p está localizada na membrana celular, enquanto Sap10p pode estar na membrana e parede celular. Essas proteases são fundamentais em processos de adesão celular e durante a interação patógeno-hospedeiro (ALBRECHT *et al.*, 2006). Portanto, esses resultados podem estar associados a adaptação de *C. albicans* na tentativa de não ser reconhecida pelos macróforos, uma vez que

Sap9p e Sap10p poderiam funcionar como padrões de reconhecimento celular pelos fagócitos.

O gene *SAP2*, codificador da isoenzima Sap2p, foi regulado positivamente pelo contato levedura-macrófago, sendo ou não fagocitadas, uma vez que, não foi possível separar as células de levedura que foram cultivadas na presença de macrófagos daquelas que foram efetivamente fagocitadas pelos macrófagos. Tavanti *et al.* (2006) observaram regulação positiva na expressão de *SAP2* em isolados orais de *C. albicans* após fagocitose por macrófagos diferenciados a partir de células THP-1, utilizando reação em cadeia de polimerase convencional e gel de agarose.

A exposição de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de antifúngicos regulou positivamente a expressão de *SAP2*. Similar a estudos anteriores como de Copping *et al.* (2005) que trataram *C. albicans* com azóis e capofungina e observaram aumento na expressão de *SAP2*. Wu *et al.* (2000) também observaram aumento na secreção de isoenzimas Sapp em isolados de *C. albicans* após exposição a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  MIC de fluconazol e regulação positiva para *SAP2*. E ainda, similar a estudos do nosso grupo de pesquisa em que *C. albicans* expostas a concentrações subinibitórias de fluconazol também mostrou aumento na expressão de *SAP2*, cerca de 2 vezes maior que as amostras não expostas (SILVA *et al.*, 2015). Em outro estudo, *C. albicans* expostas à concentração de 1  $\mu$ g/mL de anfotericina B e cultivadas na presença de soro fetal de vitelo por 3 horas, expressou 3,36 vezes mais *SAP2* que o controle sem antifúngico (THEBERGE *et al.*, 2013).

*SAP2* é um dos genes *SAP* mais comumente expressos em *C. albicans* e, como observado em diversos estudos, sua expressão independe da fagocitose ou diferenciação morfológica e pode ocorrer em células fúngicas que passaram por condições de estresse bem como o contato com concentração subinibitórias de antifúngicos, como o fluconazol (COPPING *et al.*, 2005; NAGLIK *et al.*, 2003, 2008). A enzima Sap2p é capaz de hidrolisar várias proteínas dos hospedeiro como colágeno, lactoferrina salivar, e também proteínas do sistema imune como IgA e enzimas envolvidas no *burst* oxidativo em macrófagos (SCHALLER *et al.*, 2005). Sap2p também pode inativar receptores de complemento CR3 e CR4 em macrófagos (SVOBODA *et al.*, 2015). Além disso, Sap2p é um imunomodulador, capaz de induzir a produção de interleucina-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em infecções por *C. albicans*, podendo ser usado com sucesso como alvo no desenvolvimento de vacinas contra candidíase (PIETRELLA *et al.*, 2013; SANDINI *et al.*, 2011; VILANOVA *et al.*, 2004).

O gene *SAP4* foi regulado positivamente após exposição a concentrações subinibitórias de fluconazol e caspofungina. Esta regulação positiva pode ser comparável à observada em um estudo com *C. albicans* expostas à concentração de 1 µg/mL de anfotericina B e cultivadas na presença de soro fetal de vitelo por 3 horas a qual expressou 2,41 vezes mais *SAP4* que o controle sem antifúngico (THEBERGE *et al.*, 2013). *C. albicans* exposta à 0,25 µg/mL de fluconazol e cultivadas em meio RPMI 1640 na ausência de soro por 2 horas apresentaram formação de hifas e pseudo-hifas e regulação positiva do gene *SAP4*, com média 5,2 vezes maior que o controle (BARELLE *et al.*, 2008).

Os genes *SAP4-6* são estimulados durante a mudança de *C. albicans* de levedura para hifas e esses genes são conhecidos por contribuírem na invasão de tecidos do hospedeiro (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). A expressão de *SAP4-6* ocorre predominantemente em hifas, as quais se apresentam em grande parte em modelos *in vivo* de biofilmes (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; RICICOVÁ *et al.*, 2010). Além disso, a expressão de *SAP4* é fortemente regulada de forma positiva após 1 a 3 horas em ensaios *in vitro*, quando a filamentação de *C. albicans* é estimulada pela presença de soro (NAGLIK *et al.*, 2008).

Os genes *SAP9* e *SAP10* foram regulados positivamente após exposição de *C. albicans* às concentrações subinibitórias de fluconazol (SC5314), anfotericina e caspofungina (121 e 221-V). Similar a este estudo, a expressão de *SAP9* foi aumentada após tratamento com azóis e caspofungina (COPPING *et al.*, 2005). Em um estudo de proteoma de parede celular de *C. albicans*, foi observado um aumento relativo de Sap9p após exposição ao fluconazol (SORGO *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que linhagens resistentes ao fluconazol aumentam a expressão de *SAP10* (XU *et al.*, 2005). O contato levedura-macróforo não alterou significativamente a expressão desses dois genes.

Sap9p está localizada na membrana celular, enquanto Sap10p pode estar na membrana e parede celular. Essas proteases são fundamentais em processos de adesão celular e durante a interação patógeno-hospedeiro (ALBRECHT *et al.*, 2006). Quando deletado o gene *SAP9*, há a redução da formação de hifas verdadeiras, comparado à linhagem selvagem (STANISZEWSKA *et al.*, 2014). Mutantes nulos, com deleção de *SAP9* e *SAP10*, apresentam dano celular reduzido em seu hospedeiro e adesão diminuída em infecções orais experimentais (ALBRECHT *et al.*, 2006; STANISZEWSKA *et al.*, 2015). Além disso, *SAP9* é fundamental para o reconhecimento e a morte eficientes de *C. albicans* por neutrófilos humanos (HORNBAACH *et al.*, 2009).

Als3p é uma adesina, que semelhante a Sap9p e Sap10p, está ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e medeia a adesão a numerosos tipos de células e substratos hospedeiros (NAGLIK *et al.*, 2011; PHAN *et al.*, 2007; SCHILD *et al.*, 2011). A expressão do gene *ALS3* é regulada positivamente durante a infecção de células epiteliais orais *in vitro* e pode ser detectada *in vivo* durante infecções vaginais de *C. albicans* (CHENG *et al.*, 2005; WÄCHTLER *et al.*, 2011). Ambos os estudos, demonstraram um papel direto da Als3p como uma adesina. Além disso, Phan *et al.* (2007) descobriram que Als3p é invasina, ou seja, uma proteína requerida no processo de invasão celular. Esta proteína se liga às caderinas de células endoteliais e células epiteliais orais, e estas ligações induzem as células do hospedeiro a endocitar o fungo. A linhagem 121 apresentou um aumento na expressão de *ALS3* após contato levedura-macrófago, mostrando que essa adesina também pode ser regulada pelo contato com fagócitos. Além disso, amostras expostas a concentrações subinibitórias de anfotericina, caspofungina e fluconazol foram reguladas positivamente na expressão de *ALS3*. Linhagens resistentes ao fluconazol tendem a expressar maiores níveis de *ALS3* que linhagens susceptíveis (HOSSEINI *et al.*, 2019). Em um estudo com isolados de candidíase vaginal, 77,2% dos isolados expressaram *ALS3*, as quais eram resistentes ao fluconazol (ROUDBARMOHAMMADI *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que exposição de *C. albicans* à anfotericina pode aumentar a expressão de *ALS3* e *HWPI* (LU *et al.*, 2019). Entretanto, *C. albicans* cultivada em meio Sabouraud e uma dose alta de anfotericina (5 µg/mL) pode diminuir a expressão dos genes *HWPI*, *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP9* e *SAP10* (BENZAID *et al.*, 2019). O que mostra que o meio de cultura e a dose de antifúngicos podem influenciar para aumento ou diminuição da expressão desses genes.

Corroborando com os resultados aqui apresentados, em relação à influência do fluconazol na expressão de *HWPI*, um estudo utilizando RT-PCR mostrou que a diminuição da dose a concentrações subinibitórias aumenta a expressão de *HWPI* (KHODAVANDI *et al.*, 2011). Em relação ao contato levedura-macrófago, este aumentou significativamente os níveis de expressão de *HWPI* nas linhagens 221-V e SC5314. Resultado que pode ser comparado ao estudo de ORSI *et al.*, 2014, no qual *C. albicans* aumentou significativamente os níveis de mRNA de *HWPI* após serem expostos às células da micróglia, que são células imunitárias neuronais. A proteína Hwp1p também está ligada ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) na parede celular de formas filamentosas (DE GROOT *et al.*, 2013; MARTIN *et al.*, 2011; STAAB *et al.*, 1999). O gene *HWPI* é importante para o desenvolvimento de hifas, na adesão de levedura em células epiteliais do hospedeiro e no crescimento de biofilmes

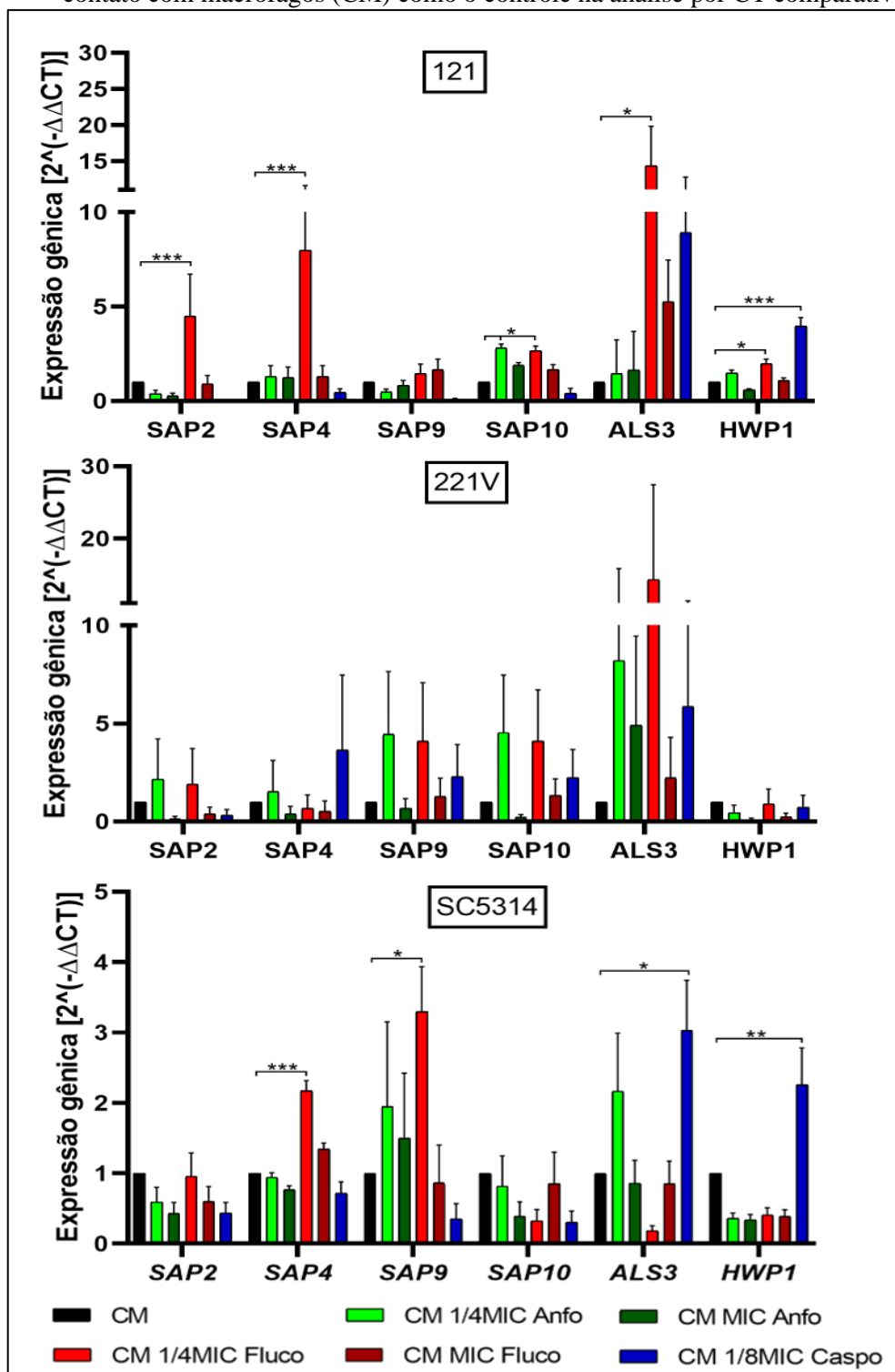
(NAILIS *et al.*, 2010; ORSI *et al.*, 2014). E de acordo com os resultados aqui apresentados, este gene também é uma importante adesina na interação *Candida*-macrófagos e pode ser regulado positivamente pelo tratamento com antifúngicos, principalmente pela anfotericina, que é fungicida e prejudica ou impede a filamentação (OLIVER, 2016; THEBERGE *et al.*, 2013).

Até o presente momento não foram encontrados artigos científicos publicados sobre a influência da caspofungina na expressão de *SAP4*, *SAP10*, *ALS3* e *HWPI*, e a influência de anfotericina na expressão de *SAP9* e *SAP10*.

Todas as variações nos níveis de expressão gênica citados anteriormente foram feitas a partir das análises por CT comparativo utilizando a amostra controle sem exposição a antifúngicos e macrófagos. Com o objetivo de explorar mais os dados obtidos, foram feitas outras análises utilizando as amostras CM como controle para as amostras que foram cultivadas em contato com macrófagos e antifúngicos (FIGURA 16). De acordo com os resultados apresentados nessa figura, a exposição de antifúngicos mais o contato com macrófagos foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) pelo uso de fluconazol (*SAP2*, *SAP4*, *SAP10*, *ALS3* e *HWPI*) e da caspofungina (*ALS3* e *HWPI*). Os desvios padrões observados nessa análise são maiores quando comparados aos das Figuras 13, 14 e 15.

Com relação a escolha do meio de cultura utilizado para o cultivo de *C. albicans* exposta aos MICs ou concentrações subinibitórias, foram testados 3 meios diferentes. Ainda que fossem utilizadas concentrações subinibitórias de 1/8 MIC da caspofungina, no meio *Yeast carbon base-bovine serum albumin* (YCB-BSA) houve inibição igual ou maior a 99% (dados não mostrados), inviabilizando os ensaios de interação e extração de RNA por não gerar células suficientes. O cultivo em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) também não foi satisfatório, pois após 18-24h de crescimento as células apresentavam-se com morfologia predominante de hifas e pseudohifas o que dificultava ou inviabilizava a contagem e interação com os fagócitos. Desse modo, avaliou-se o uso do meio YPD para cultivo da levedura com exposição de antifúngicos ou não. Esse meio de cultura é muito utilizado em trabalhos de expressão gênica de *C. albicans* e/ou interação patógeno-hospedeiro (GREEN *et al.*, 2005; NAGLIK *et al.*, 2008; ZAWROTNIAK *et al.*, 2017).

Figura 16 – Expressão gênica de *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3* e *HWP1* em *C. albicans* após exposição a antifúngicos e contato com macrófagos, utilizando a amostra *Candida* em contato com macrófagos (CM) como o controle na análise por CT comparativo.



Legenda. CM: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; CM 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de anfotericina; CM MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de anfotericina; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/4 da MIC de fluconazol; CM MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e a MIC de fluconazol; CM 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 1/8 da MIC de caspofungina. \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ .

Fonte: Da autora.

## 6 CONCLUSÕES

Todas as oito linhagens de *C. albicans* citadas nesse trabalho foram testadas quanto à sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina e fluconazol e foram classificadas como sensíveis, com exceção da 221-V que foi considerada resistente a caspofungina.

O estudo metabolômico realizado em parceria com a Università di Bologna possibilitou a quantificação de 66 metabólitos de *C. albicans*, os quais estão envolvidos principalmente no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), na glicólise, na gliconeogênese, no metabolismo de aminoácidos, lipídeos e ácidos nucléicos. Ademais, alguns desses metabólitos estão relacionados a virulência fúngica, tais como: aspartato, treonina, glicerol, arabitol, trehalose, acetona, acetato, piruvato e outros.

Os resultados de expressão gênica de *C. albicans* mostram que a interação levedura-macrófago e a exposição a antifúngicos podem regular positivamente a expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9*, *SAP10*, *ALS3* e *HWPI*, principalmente após exposição a concentrações subinibitórias de antifúngicos. Esses resultados são preocupantes por mostrarem que as concentrações subinibitórias de antifúngicos podem aumentar a virulência de *C. albicans*. Essas concentrações podem ser utilizadas como tratamento sistêmico empírico ou profilático para pacientes com fatores de risco para candidíase invasiva, bem como, podem ocorrer em falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, erros de dosagem ou tempo entre as doses ou, ainda, a não adesão ao tratamento. Além disso, compreender a expressão desses genes e metabólitos utilizados na patogênese fúngica podem auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos ou fármacos para candidíase.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICHOVA, I.; NAGLIK, J. R.; SCHALLER, M.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F. C.; SCHÄFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 688–94, 2006.
- ALMEIDA, A. A. De; MESQUITA, C. S. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, K. M. P. De. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 335–339, 2013.
- ARYAMLOO, P.; ASGARIAN-OMRAN, H.; ASLANI, N.; HOSSEIN-NATAJ, H.; SHOKOHI, T.; BADALI, H.; NABILI, M.; ABDOLLAHI GOHAR, A.; MOAZENI, M. Cellular apoptosis: An alternative mechanism of action for caspofungin against *Candida glabrata*. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 2, p. 9–15, 2019.
- ASLAN, S.; NOOR, E.; BAR-EVEN, A. Holistic bioengineering: rewiring central metabolism for enhanced bioproduction. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 23, p. 3935–3950, 2017.
- AZERANG, P.; KHALAJ, V.; KOBARFARD, F.; OWLIA, P.; SARDARI, S.; SHAHIDI, S. Molecular characterization of a fungus producing membrane active metabolite and analysis of the produced secondary metabolite. **Iranian Biomedical Journal**, v. 23, n. 2, p. 121–128, 2019.
- BAIN, J. M.; LOUW, J.; LEWIS, L. E.; OKAI, B.; WALLS, C. A.; BALLOU, E. R.; WALKER, L. A.; REID, D.; MUNRO, C. A.; BROWN, A. J. P.; BROWN, G. D.; GOW, N. A. R.; ERWIG, L. P. *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of  $\beta$ -glucan inhibit macrophage phagosome maturation. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e01874-14, 2014.
- BARELLE, C. J.; DUNCAN, V. M. S.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R.; ODDS, F. C. Azole antifungals induce up-regulation of *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells in vitro and in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 315–322, 2008.
- BENZAID, C.; BELMADANI, A.; DJERIBI, R.; ROUABHIA, M. The effects of mentha

- × piperita essential oil on *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 10, 2019.
- BI, S.; LV, Q.-Z.; WANG, T.-T.; FUCHS, B. B.; HU, D.-D.; ANASTASSOPOULOU, C. G.; DESALERMOS, A.; MUHAMMED, M.; WU, C.-L.; JIANG, Y.-Y.; MYLONAKIS, E.; WANG, Y. *SDH2* is involved in proper hypha formation and virulence in *Candida albicans*. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1141–1156, 2018.
- BORATE, H. B.; SAWARGAVE, S. P.; CHAVAN, S. P.; CHANDAVARKAR, M. A.; IYER, R.; TAWTE, A.; RAO, D.; DEORE, J. V.; KUDALE, A. S.; MAHAJAN, P. S.; KANGIRE, G. S. Novel hybrids of fluconazole and furanones: Design, synthesis and antifungal activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 16, p. 4873–4878, 2011.
- BORELLI, C.; RUGE, E.; SCHALLER, M.; MONOD, M.; KORTING, H. C.; HUBER, R.; MASKOS, K. The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 3, p. 738–748, 2007.
- BORG-VON ZEPELIN, M.; BEGGAH, S.; BOGGIAN, K.; SANGLARD, D.; MONOD, M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 543–554, 1998.
- BRAGA, P. R.; CRUZ, I. L.; ORTIZ, I.; BARREIROS, G.; NOUÉR, S. A.; NUCCI, M. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273–277, 2018.
- CABEZÓN, V.; LLAMA-PALACIOS, A.; NOMBELA, C.; MONTEOLIVA, L.; GIL, C. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 20, p. 4770–4786, 2009.
- CANELA, H. M. S.; CARDOSO, B.; VITALI, L. H.; COELHO, H. C.; MARTINEZ, R.; FERREIRA, M. E. da S. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.
- CAROLIS, E. D.; HENSGENS, L. A. M.; VELLA, A.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SENESI, S.; TAVANTI, A. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Medical Mycology**, v. 52, n. 2, p.

123–130, 2014.

CHEN, W. S.; YE, Y.; STEINBUSCH, K. J. J.; STRIK, D. P. B. T. B.; BUISMAN, C. J. N. Methanol as an alternative electron donor in chain elongation for butyrate and caproate formation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 201–208, 2016.

CHENG, G.; WOZNIAK, K.; WALLIG, M. A.; FIDEL, P. L.; TRUPIN, S. R.; HOYER, L. L. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1656–1663, 2005.

CHEW, S. Y.; CHEE, W. J. Y.; THAN, L. T. L. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 52, 2019.

CHIN, V.; LEE, T.; RUSLIZA, B.; CHONG, P. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1643, 2016.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. **M60**, 2017.

COELHO, I. M.; CLAUDINO, A. L. R.; CHAVASCO, J. M.; BIRMAN, E. G.; GAMBALE, W.; ALEVA, N. A.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R.; CHAVASCO, J. K. Antifungal susceptibility evaluation of *Candida albicans* isolated from buccal lesions of hiv-positive and HIV-negative patients. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 156–166, 2012.

COLLETTE, J. R.; ZHOU, H.; LORENZ, M. C. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

COLOMBO, A. L.; GARNICA, M.; ARANHA CAMARGO, L. F.; DA CUNHA, C. A.; BANDEIRA, A. C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A. L.; VALIAS DIDIER, M. E.; DIAS, V. C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38–44, 2013. a.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; DE QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; DA CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A. S.;

MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013. b.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–23, 2006.

COPPING, V. M. S.; BARELLE, C. J.; HUBE, B.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 645–654, 2005.

CORNISTEIN, W.; MORA, A.; ORELLANA, N.; CAPPARELLI, F. J.; DEL CASTILLO, M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, 2013.

COSTA, C. R.; JESUÍNO, R. S. A.; DE AQUINO LEMOS, J.; DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES, O.; E SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; DO ROSÁRIO RODRIGUES SILVA, M. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 91–98, 2010.

CREEK, D. J.; CHOKKATHUKALAM, A.; JANKEVICS, A.; BURGESS, K. E. V.; BREITLING, R.; BARRETT, M. P. Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 20, p. 8442–8447, 2012.

CULIBRK, L.; CROFT, C. A.; TEBBUTT, S. J. Systems biology approaches for host–fungal interactions: An expanding multi-omics frontier. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 20, n. 3, p. 127–138, 2016.

DA SILVA DANTAS, A.; LEE, K. K.; RAZIUNAITE, I.; SCHAEFER, K.; WAGENER, J.; YADAV, B.; GOW, N. A. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118, 2016.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.;

DOCKRELL, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8668, 2010.

DANHOF, H. A.; LORENZ, M. C. The *Candida albicans* ATO gene family promotes neutralization of the macrophage phagolysosome. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 11, p. 4416–4426, 2015.

DE GROOT, P. W. J.; BADER, O.; DE BOER, A. D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 4, p. 470–81, 2013.

DESSÌ, A.; LIORI, B.; CABONI, P.; CORSELLO, G.; GIUFFRÈ, M.; NOTO, A.; SERRAINO, F.; STRONATI, M.; ZAFFANELLO, M.; FANOS, V. Monitoring neonatal fungal infection with metabolomics. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 27, n. sup2, p. 34–38, 2014.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DUDLEY, E.; YOUSEF, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W. J. Targeted metabolomics and mass spectrometry. In: **Advances In Protein Chemistry And Structural Biology**. [s.l.: s.n.], p. 45–83.

EDDOUZI, J.; HOFSTETTER, V.; GROENEWALD, M.; MANAI, M.; SANGLARD, D. Characterization of a new clinical yeast species, *Candida tunisiensis* sp. nov., isolated from a strain collection from Tunisian hospitals. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 1, p. 31–9, 2013.

EUCAST - THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Clinical breakpoints for fungi**. 2018. Disponível em: <<http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

EUCAST, E. C. on A. S. T.; AFST, S. on A. S. T.; ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA, J. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum

inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. **EUCAST**, n. E.DEF 7.3.1, p. 1–21, 2017. Disponível em:

<[http://www.eucast.org/ast\\_of\\_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility\\_testing\\_of\\_yeasts/](http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/)>. Acesso em: 24 maio. 2019.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, 2014.

FERRARINI, M. G.; SIQUEIRA, F. M.; MUCHA, S. G.; PALAMA, T. L.; JOBARD, É.; ELENA-HERRMANN, B.; R. VASCONCELOS, A. T.; TARDY, F.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; SAGOT, M.-F. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 353, 2016.

FERREIRA, A. V. **Comparação do perfil associado à virulência e da sensibilidade antifúngica entre amostras de *Candida ssp* em casos de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar**. 2011. 107 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/265>. Acesso em: 13 jan. 2020.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H.; SCOTT, K. P.; LOUIS, P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 74, n. 1, p. 13–22, 2015.

FOSCHI, C.; LAGHI, L.; D'ANTUONO, A.; GASPARI, V.; ZHU, C.; DELLAROSA, N.; SALVO, M.; MARANGONI, A. Urine metabolome in women with *Chlamydia trachomatis* infection. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194827, 2018.

FOSCHI, C.; LAGHI, L.; PAROLIN, C.; GIORDANI, B.; COMPRI, M.; CEVENINI, R.; MARANGONI, A.; VITALI, B. Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1H-NMR. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172483, 2017.

FROHNER, I. E.; BOURGEOIS, C.; YATSYK, K.; MAJER, O.; KUCHLER, K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 240–252,

2009.

GARBE, E.; VYLKOVA, S. Role of amino acid metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 6, n. 3, p. 108-119, 2019.

GREEN, C. B.; ZHAO, X.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells.

**Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1051–1060, 2005.

GREGORI, C.; GLASER, W.; FROHNER, I. E.; REINOSO-MARTÍN, C.; RUPP, S.; SCHÜLLER, C.; KUCHLER, K. Efg1 controls Caspofungin-Induced Cell aggregation of *Candida albicans* through the adhesin Als1. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1694–1704, 2011.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181–195, 2011.

HENDRICKX, M. MALDI-TOF MS and filamentous fungal identification: A success story? **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 2, p. 60–65, 2017.

HIMMELREICH, U.; SORRELL, T. C.; DANIEL, H.-M. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Identification of Yeast. In: LION, T. (Ed.). **Human Fungal Pathogen Identification**. New York, NY: Humana Press, 2017. p. 289–304.

HOPE, W. W.; DRUSANO, G. L.; MOORE, C. B.; SHARP, A.; LOUIE, A.; WALSH, T. J.; DENNING, D. W.; WARN, P. A. Effect of neutropenia and treatment delay on the response to antifungal agents in experimental disseminated candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 285–295, 2007.

HORNBAACH, A.; HEYKEN, A.; SCHILD, L.; HUBE, B.; LÖFFLER, J.; KURZAI, O. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5216–24, 2009.

HOSSEINI, S. S.; GHAEMI, E.; NOROOZI, A.; NIKNEJAD, F. Zinc oxide nanoparticles inhibition of initial adhesion and *ALS1* and *ALS3* gene expression in *Candida albicans* strains from urinary tract infections. **Mycopathologia**, v. 184, n. 2, p. 261–271, 2019.

- HOYER, L. L.; GREEN, C. B.; OH, S.-H.; ZHAO, X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (*ALS*) gene family – a sticky pursuit. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 1–15, 2008.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 1997–2005, 2001.
- HUERGO, L. F.; DIXON, R. The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015.
- JACK, L.; BAL, A. M.; HARTE, S.; COLLIER, A. International guidelines: the need to standardize the management of candidaemia. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 11–12, p. 779–781, 2016.
- JAIN, N.; KOHLI, R.; COOK, E.; GIALANELLA, P.; CHANG, T.; FRIES, B. C. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1697–703, 2007.
- KANESHIRO, E. S. Sterol biosynthesis in *Pneumocystis*: unique steps that define unique targets. **Drug Resistance Updates**, v. 5, n. 6, p. 259–268, 2002.
- KAUR, R.; MA, B.; CORMACK, B. P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7628–7633, 2007.
- KHODAVANDI, A.; HARMAL, N. S.; ALIZADEH, F.; SCULLY, O. J.; SIDIK, S. M.; OTHMAN, F.; SEKAWI, Z.; NG, K. P.; CHONG, P. P. Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of *HWPI* gene expression. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 56–63, 2011.
- KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Cytocidal amino acid starvation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* acetolactate synthase (*ilv2*) mutants is influenced by the carbon source and rapamycin. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 929–939, 2010. a.
- KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Fungal homoserine kinase (*thr1Δ*) mutants are attenuated in virulence and die rapidly upon threonine starvation and serum incubation. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 5, p. 729–737, 2010. b.
- KITAHARA, N.; MORISAKA, H.; AOKI, W.; TAKEDA, Y.; SHIBASAKI, S.;

- KURODA, K.; UEDA, M. Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 127, 2015.
- KLEIN, M.; SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.
- KLEPSER, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225.e1-225.e10, 2011.
- KRANEVELD, E. A.; DE SOET, J. J.; DENG, D. M.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; KLIS, F. M.; CRIELAARD, W.; DE GROOT, P. W. J. Identification and differential gene expression of adhesin-like wall proteins in *Candida glabrata* biofilms. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 415–427, 2011.
- LACROIX, C.; GICQUEL, A.; SENDID, B.; MEYER, J.; ACCOCEBERRY, I.; FRANÇOIS, N.; MORIO, F.; DESOUBEAUX, G.; CHANDENIER, J.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; HENNEQUIN, C.; GUITARD, J.; NASSIF, X.; BOUGNOUX, M.-E. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 2, p. 153–158, 2014.
- LAGHI, L.; PICONE, G.; CRUCIANI, F.; BRIGIDI, P.; CALANNI, F.; DONDEERS, G.; CAPOZZI, F.; VITALI, B. Rifaximin modulates the vaginal microbiome and metabolome in women affected by bacterial vaginosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3411–20, 2014.
- LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805–17, 2011.
- LI, L.; LIAO, Z.; YANG, Y.; LV, L.; CAO, Y.; ZHU, Z. Metabolomic profiling for the identification of potential biomarkers involved in a laboratory azole resistance in *Candida albicans*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192328, 2018.
- LOO, A. S.; MUHSIN, S. A.; WALSH, T. J. Toxicokinetic and mechanistic basis for the safety and tolerability of liposomal amphotericin B. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 6, p. 881–895, 2013.

- LORENZ, M. C.; BENDER, J. a; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 5, p. 1076–87, 2004.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83–86, 2001.
- LU, Y.; ZHOU, Z.; MO, L.; GUO, Q.; PENG, X.; HU, T.; ZHOU, X.; REN, B.; XU, X. Fluphenazine antagonizes with fluconazole but synergizes with amphotericin B in the treatment of candidiasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.
- MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MULLER, E.; HORRE, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A.; SAHL, H.-G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2912–2917, 2009.
- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R. P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRAO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A. P.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011.
- MARTIN, R.; MORAN, G. P.; JACOBSEN, I. D.; HEYKEN, A.; DOMEY, J.; SULLIVAN, D. J.; KURZAI, O.; HUBE, B. The *Candida albicans*-specific gene *EEDI* encodes a key regulator of hyphal extension. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- MARTÍNEZ-SOLANO, L.; NOMBELA, C.; MOLERO, G.; GIL, C. Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*. **PROTEOMICS**, v. 6, n. S1, p. S133–S144, 2006.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.
- MEADOWS, R. A welcome chink in drug resistance. **PLoS biology**, v. 11, n. 10, p. e1001693, 2013.
- MEILLER, T. F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; SHIRTLIFF, M. E.; SCHEPER, M. A.;

WINKLER, R.; TON, A.; JABRA-RIZK, M. A. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5039, 2009.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. a; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–51, 2011.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Annals of parasitology**, v. 61, n. 1, p. 3–9, 2015.

MORGAN, J.; MELTZER, M. I.; PLIKAYTIS, B. D.; SOFAIR, A. N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L. H.; SEABERG, E. C.; HAJJEH, R. A.; TEUTSCH, S. M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 540–547, 2005.

MOTA, S.; ALVES, R.; CARNEIRO, C.; SILVA, S.; BROWN, A. J.; ISTEEL, F.; KUCHLER, K.; SAMPAIO, P.; CASAL, M.; HENRIQUES, M.; PAIVA, S. *Candida glabrata* susceptibility to antifungals and phagocytosis is modulated by acetate. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 919, 2015.

MOYES, D. L.; WILSON, D.; RICHARDSON, J. P.; MOGAVERO, S.; TANG, S. X.; WERNECKE, J.; HÖFS, S.; GRATACAP, R. L.; ROBBINS, J.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; BLAGOJEVIC, M.; THAVARAJ, S.; FÖRSTER, T. M.; HEBECKER, B.; KASPER, L.; VIZCAY, G.; IANCU, S. I.; KICHIK, N.; HÄDER, A.; KURZAI, O.; LUO, T.; KRÜGER, T.; KNIEMEYER, O.; COTA, E.; BADER, O.; WHEELER, R. T.; GUTSMANN, T.; HUBE, B.; NAGLIK, J. R. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64–8, 2016.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, 2004.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, 2003.

NAGLIK, J. R.; FOSTIRA, F.; RUPRAI, J.; STAAB, J. F.; CHALLACOMBE, S. J.; SUNDSTROM, P. *Candida albicans* *HWPI* gene expression and host antibody responses in colonization and disease. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. Pt 10, p. 1323–7,

2006.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D. L.; WÄCHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 963–976, 2011.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A. R.; RODGERS, C. a.; WOODMAN, A. J.; CHALLACOMBE, S. J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3266–3280, 2008.

NAGLIK, J. R.; RODGERS, C. A.; SHIRLAW, P. J.; DOBBIE, J. L.; FERNANDES-NAGLIK, L. L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N.; CHALLACOMBE, S. J. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 3, p. 469–479, 2003.

NAILIS, H.; KUCHARÍKOVÁ, S.; RICICOVÁ, M.; VAN DIJCK, P.; DEFORCE, D.; NELIS, H.; COENYE, T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC microbiology**, v. 10, p. 114, 2010.

NATTER, K.; KOHLWEIN, S. D. Yeast and cancer cells – common principles in lipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 2, p. 314–326, 2013.

NEWMAN, S. L.; BHUGRA, B.; HOLLY, A.; MORRIS, R. E. Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 770–7, 2005.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Current biology : CB**, v. 18, n. 14, p. 1017–24, 2008.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OLIVER, J. C. **Análise da expressão gênica diferencial de aspartato proteases**

**secretadas (SAP2 E SAP4) por *Candida albicans* exposta a concentrações subinibitórias de antifúngicos e contato com macrófagos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) -Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/960>>. Acesso em: 21 jan. 2020

ORSI, C. F.; BORGHI, E.; COLOMBARI, B.; NEGLIA, R. G.; QUAGLINO, D.; ARDIZZONI, A.; MORACE, G.; BLASI, E. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (*HWPI*) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 69–70, p. 20–7, 2014.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 2010.

PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L.; BRIONES, M. R. S. A novel allele of *HWPI*, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Medical Mycology**, v. 47, n. 8, p. 824–835, 2009.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; DISMUKES, W. E.; WALSH, T. J.; EDWARDS, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161–189, 2004.

PARRA-ORTEGA, B.; CRUZ-TORRES, H.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 505–12, 2009.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GUINEA, J.; MERINO, P.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M. J.; MARCO, F.; GARCÍA, J.; ROSELLÓ, E. M.; GÓMEZ-G-DE-LA-PEDROSA, E.; BORRELL, N.; PORRAS, A.; YAGÜE, G.; MIRANDA, C.; CAMPOS-HERRERO, I.; NAVARRO, D.; IGLESIAS, I.; RUBIO, C.; GOMILA, B.; SUAREZ, A.; GARCÍA-TAPIA, A. M.; VELASCO, D.; GARCÍA, I.; TORROBA, L.; SÁNCHEZ-REUS, F.; PAZOS, C.; CAMARENA, J. J.; ECHEVERRÍA, M. J.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; REZUSTA, A.; GÓMEZ-NIETO, A.;

MARTÍNEZ-ALARCÓN, J.; FONTANALS, D.; BUENDÍA, B.; AYATS, J.; BRATOS, M. Á.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M.; ROYO, G.; EZPELETA, G.; RAMÍREZ, I.; GUNA, R.; ESPERALBA, J. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1181–1187, 2012.

PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2676–84, 2001.

PEREIRA, E. M. **A  $\beta$ 2-glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de fase aguda**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-17012011-164607/publico/ElisangelaPereira.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2019.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, p. 1–11, 2015.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–63, 2007.

PHAN, Q. T.; MYERS, C. L.; FU, Y.; SHEPPARD, D. C.; YEAMAN, M. R.; WELCH, W. H.; IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS biology**, v. 5, n. 3, p. e64, 2007.

PIETRELLA, D.; PANDEY, N.; GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; PERITO, S.; KASPER, L.; BISTONI, F.; CASSONE, A.; HUBE, B.; VECCHIARELLI, A. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 3, p. 679–692, 2013.

PIETZKE, M.; MEISER, J.; VAZQUEZ, A. Formate metabolism in health and disease.

**Molecular metabolism**, v. 33, p. 23-37, 2019.

PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 269–73, 2009.

PROCOP, G. W.; ROBERTS, G. D. Emerging fungal diseases: the importance of the host. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 24, n. 3, p. 691–719, 2004.

PUIG-CASTELLVÍ, F.; ALFONSO, I.; PIÑA, B.; TAULER, R. 1H NMR metabolomic study of auxotrophic starvation in yeast using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Pathway Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30982, 2016.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–20, 1985.

RAUCEO, J. M.; DE ARMOND, R.; OTOO, H.; KAHN, P. C.; KLOTZ, S. A.; GAUR, N. K.; LIPKE, P. N. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1664–1673, 2006.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; SHAFIEI, S.; ZAREI-MAHMOUDABADI, A. Isolation, molecular identification, and antifungal susceptibility profiles of vaginal isolates of *Candida* species. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 410–417, 2016.

RICICOVÁ, M.; KUCHARÍKOVÁ, S.; TOURNU, H.; HENDRIX, J.; BUJDÁKOVÁ, H.; VAN ELDERE, J.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 3, p. 909–19, 2010.

RIPEAU, J.-S.; FIORILLO, M.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; DE REPENTIGNY, L. Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 8, p. 1094–102, 2002.

RODAKI, A.; BOHOVYCH, I. M.; ENJALBERT, B.; YOUNG, T.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 22, p. 4845–4855, 2009.

ROHDE, M.-T.; TISCHER, S.; HARMS, H.; ROHWERDER, T. Production of 2-hydroxyisobutyric acid from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 expressing (R)-3-hydroxybutyryl coenzyme A-isomerizing enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 3, 2017.

- RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225–227, 2009.
- ROUDBARMOHAMMADI, S.; ROUDBARY, M.; BAKHSHI, B.; KATIRAEI, F.; MOHAMMADI, R.; FALAHATI, M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. **Advanced biomedical research**, v. 5, p. 105, 2016.
- SAGAN, C. **Cosmos**. 1. ed São Paulo: Schwarcz S.A., 2017. 560p.
- SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; CHEUNG, B. P. K.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; YEUNG, K. W. S.; YAU, J. Y. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 114, n. 12, p. 857–66, 2006.
- SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; GUIRAO-ABAD, J. P.; ARGÜELLES, A.; GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; VALENTÍN, E.; ARGÜELLES, J.-C. Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and d-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 4, p. 1334–1339, 2013.
- SANDINI, S.; LA VALLE, R.; DEAGLIO, S.; MALAVASI, F.; CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F. A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 215–224, 2011.
- SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013.
- SAVASTANO, C.; DE OLIVEIRA SILVA, E.; GONÇALVES, L. L.; NERY, J. M.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L. T. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 367–372, 2016.
- SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as

virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, 2005.

SCHALLER, M.; ZAKIKHANY, K.; NAGLIK, J. R.; WEINDL, G.; HUBE, B. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2767–73, 2006.

SCHILD, L.; HEYKEN, A.; DE GROOT, P. W. J.; HILLER, E.; MOCK, M.; DE KOSTER, C.; HORN, U.; RUPP, S.; HUBE, B. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 1, p. 98–109, 2011.

SCHREVEENS, S.; VAN ZEEBROECK, G.; RIEDELBERGER, M.; TOURNU, H.; KUCHLER, K.; VAN DIJCK, P. Methionine is required for cAMP-PKA-mediated morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 258–275, 2018.

SEMREEN, M. H.; SOLIMAN, S. S. M.; SAEED, B. Q.; ALQARIHI, A.; UPPULURI, P.; IBRAHIM, A. S. Metabolic profiling of *Candida auris*, a newly-emerging multi-drug resistant *Candida* species, by GC-MS. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 399, 2019.

SILVA, K. E. S.; SILVA, N. C.; OLIVER, J. C.; CANTORE, M. S.; FERREIRA, C. B. R. J.; ARIOSIA, M. C. F.; DIAS, A. L. T. *SAP2* expression in standard strains of *Candida albicans* maintained under stress conditions. In: Anais 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis-SC. **Anais...** Florianópolis-SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2015. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/cd28cbm/resumos/R1057-2.PDF>>. Acesso em: 10 nov 2019.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: Role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1–11, 2014.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SILVERMAN, R. J.; NOBBS, A. H.; VICKERMAN, M. M.; BARBOUR, M. E.; JENKINSON, H. F. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species

communities. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4644–4652, 2010.

SORGO, A. G.; HEILMANN, C. J.; DEKKER, H. L.; BEKKER, M.; BRUL, S.; DE KOSTER, C. G.; DE KONING, L. J.; KLIS, F. M. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 8, p. 1071–1081, 2011.

SOUZA, T. B. De; ORLANDI, M.; COELHO, L. F. L.; MALAQUIAS, L. C. C.; DIAS, A. L. T.; DE CARVALHO, R. R.; SILVA, N. C.; CARVALHO, D. T. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 496–502, 2014.

SPIERING, M. J.; MORAN, G. P.; CHAUVEL, M.; MACCALLUM, D. M.; HIGGINS, J.; HOKAMP, K.; YEOMANS, T.; D'ENFERT, C.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Comparative transcript profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* identifies *SFL2*, a *C. albicans* gene required for virulence in a reconstituted epithelial infection model. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 2, p. 251–265, 2010.

SRINIVASAN, S.; MORGAN, M. T.; FIEDLER, T. L.; DJUKOVIC, D.; HOFFMAN, N. G.; RAFTERY, D.; MARRAZZO, J. M.; FREDRICKS, D. N. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015.

STAAB, J. F.; BRADWAY, S. D.; FIDEL, P. L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5407, p. 1535–8, 1999.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; MALEWSKI, T.; KURZATKOWSKI, W. Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes *SAP7*, *SAP8*, *SAP9*, *SAP10* in human serum in vitro. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 15–20, 2014.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; SIENNICKA, K.; PIŁAT, J.; SCHALLER, M.; KURZĄTKOWSKI, W. Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. **Postepy Mikrobiologii**, v. 51, n. 3, p. 236, 2012.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; ZUKOWSKI, K.; CHUDY, M. Role of *SAP7-10* and morphological regulators (*EFG1*, *CPH1*) in *Candida albicans*' hypha formation and adhesion to colorectal carcinoma Caco-2. **Polish journal of microbiology**, v. 64, n. 3,

p. 203–10, 2015.

SVOBODA, E.; SCHNEIDER, A. E.; SÁNDOR, N.; LERMANN, U.; STAIB, P.; KREMLITZKA, M.; BAJTAY, Z.; BARZ, D.; ERDEI, A.; JÓZSI, M. Secreted aspartic protease 2 of *Candida albicans* inactivates factor H and the macrophage factor H-receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18). **Immunology Letters**, v. 168, n. 1, p. 13–21, 2015.

TANG, X.; LEE, J.; CHEN, W. N. Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production. **Metabolic Engineering Communications**, v. 2, p. 58–66, 2015.

TAO, L.; ZHANG, Y.; FAN, S.; NOBILE, C. J.; GUAN, G.; HUANG, G. Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO<sub>2</sub> sensing and hyphal development in *Candida albicans*. **PLoS genetics**, v. 13, n. 8, p. e1006949, 2017.

TAVANTI, A.; CAMPA, D.; BERTOZZI, A.; PARDINI, G.; NAGLIK, J. R.; BARALE, R.; SENESI, S. *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 3, p. 791–800, 2006.

TAVEIRA, G. B.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; TRINDADE, F. G.; DA CUNHA, M.; GOMES, V. M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida species*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12, 2016.

THEBERGE, S.; SEMLALI, A.; ALAMRI, A.; LEUNG, K. P.; ROUABHIA, M. C. *albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 246, 2013.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–82, 2011.

TULLIO, V.; MANDRAS, N.; ALLIZOND, V.; NOSTRO, A.; ROANA, J.; MERLINO, C.; BANCHE, G.; SCALAS, D.; CUFFINI, A. Positive interaction of thyme (red) essential oil with human polymorphonuclear granulocytes in eradicating intracellular *Candida albicans*. **Planta Medica**, v. 78, n. 15, p. 1633–1635, 2012.

VEENSTRA, T. D. Metabolomics: the final frontier? **Genome Medicine**, v. 4, n. 4, p. 40, 2012.

VILANOVA, M.; TEIXEIRA, L.; CARAMALHO, I.; TORRADO, E.; MARQUES, A.; MADUREIRA, P.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; GAMA, M.; DEMENGEOT, J. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 334–42, 2004.

VOLMER, A. A.; SZPILMAN, A. M.; CARREIRA, E. M. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 9, p. 1329–1349, 2010.

VYLKOVA, S.; CARMAN, A. J.; DANHOF, H. A.; COLLETTE, J. R.; ZHOU, H.; LORENZ, M. C. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **mBio**, v. 2, n. 3, 2011.

WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HAEDICKE, K.; DALLE, F.; HUBE, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17046, 2011.

WANG, L.; CHEN, W.; FENG, Y.; REN, Y.; GU, Z.; CHEN, H.; WANG, H.; THOMAS, M. J.; ZHANG, B.; BERQUIN, I. M.; LI, Y.; WU, J.; ZHANG, H.; SONG, Y.; LIU, X.; NORRIS, J. S.; WANG, S.; DU, P.; SHEN, J.; WANG, N.; YANG, Y.; WANG, W.; FENG, L.; RATLEDGE, C.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28319, 2011.

WARGO, M. J. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2112–2120, 2013.

WILSON, L. S.; REYES, C. M.; STOLPMAN, M.; SPECKMAN, J.; ALLEN, K.; BENEY, J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value in Health**, v. 5, n. 1, p. 26–34, 2002.

WU, H.; DOWNS, D.; GHOSH, K.; GHOSH, A. K.; STAIB, P.; MONOD, M.; TANG, J. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan Horse mechanism. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 6, p. 2132–2144, 2013.

- WU, T.; WRIGHT, K.; HURST, S. F.; MORRISON, C. J. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1200–8, 2000.
- XU, Y.; CHEN, L.; LI, C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 798–804, 2008.
- XU, Z.; CAO, Y.-B.; ZHANG, J.-D.; CAO, Y.-Y.; GAO, P.-H.; WANG, D.-J.; FU, X.-P.; YING, K.; CHEN, W.-S.; JIANG, Y.-Y. cDNA array analysis of the differential expression change in virulence-related genes during the development of resistance in *Candida albicans*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 7, p. 463–472, 2005.
- YANG, Y.-L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 36, n. 4, p. 223–228, 2003.
- ZAMITH-MIRANDA, D.; HEYMAN, H. M.; CLEARE, L. G.; COUVILLION, S. P.; CLAIR, G. C.; BREDEWEG, E. L.; GACSER, A.; NIMRICHTER, L.; NAKAYASU, E. S.; NOSANCHUK, J. D. Multi-omics signature of *Candida auris*, an emerging and multidrug-resistant pathogen. **mSystems**, v. 4, n. 4, 2019.
- ZAWROTNIAK, M.; BOCHENSKA, O.; KARKOWSKA-KULETA, J.; SEWERYN-OZOG, K.; AOKI, W.; UEDA, M.; KOZIK, A.; RAPALA-KOZIK, M. Aspartic proteases and major cell wall components in *Candida albicans* trigger the release of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 414, 2017.
- ZHAO, X.; GUO, Y.; JIANG, C.; CHANG, Q.; ZHANG, S.; LUO, T.; ZHANG, B.; JIA, X.; HUNG, M.-C.; DONG, C.; LIN, X. JNK1 negatively controls antifungal innate immunity by suppressing CD23 expression. **Nature Medicine**, v. 23, n. 3, p. 337–346, 2017.
- ZHAO, X.; OH, S.-H.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1619–1630, 2005.
- ZHU, X.; TAO, Y.; LIANG, C.; LI, X.; WEI, N.; ZHANG, W.; ZHOU, Y.; YANG, Y.; BO, T. The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14360, 2015.