

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAMILA MIRANDA PERNAMBUCO DE LIMA

**Análise de expressão dos genes *SAP9* e *SAP10*, de aspectos bioquímico e ultraestrutural em linhagem padrão de *Candida albicans*, em estado planctônico e biofilme, antes e após a associação de Fluconazol e Guttiferona A**

Alfenas/MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAMILA MIRANDA PERNAMBUCO DE LIMA

**Análise de expressão dos genes *SAP9* e *SAP10*, de aspectos bioquímico e ultraestrutural em linhagem padrão de *Candida albicans*, em estado planctônico e biofilme, antes e após a associação de Fluconazol e Guttiferona A**

Dissertação apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Área de Concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Latercia Tranches Dias

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Lima, Camila Miranda Pernambuco de

Análise de expressão dos genes SAP9 e SAP10, de aspectos bioquímico e ultraestrutural em linhagem padrão de *Candida albicans*, em estado planctônico e biofilme, antes e após a associação de Fluconazol e Guttiferona A / Camila Miranda Pernambuco de Lima. -- Alfenas/MG, 2017.

82 f.

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. *Candida albicans*. 3. Fluconazol. 4. Expressão Gênica.  
I. Dias, Amanda Latercia Tranches. II. Título.

CDD-579.563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.  
CEP: 37130-001



**CAMILA MIRANDA PERNAMBUCO DE LIMA**

**“Análise de expressão dos genes SAP9 e SAP10, de aspectos bioquímico e ultraestrutural em linhagem padrão de *Candida albicans*, em estado planctônico e biofilme, antes e após a associação de Fluconazol e Guttiferona A”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 25 de abril de 2017.

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

Assinatura:

Profa. Dra. Ana Beatriz Alkmim Teixeira  
Loyola  
Instituição: UNIVÁS

Assinatura:

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por suas providências a cada instante!

Agradeço à minha orientadora, doutora e mestra, Amanda, que me acolheu e me ensinou tudo sobre o “ser professora” da forma mais simples e delicada, de maneira que até uma flor seria incapaz de tamanha doçura e leveza.

As amizades que o mestrado trouxe, Josidel e Naiara com seus maridos e festinhas anexas, Daniel e Leticia, pelos dramas e risadas laboratoriais...

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, os melhores que eu já conheci.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por ter mudado minha vida.

Aos meus pais, Ademir e Marta, minha irmã Carol e minha Tia Regina, por me aguentarem nos surtos de limpeza.

E ao meu marido, Idoeudson – Ido para todos – por me amar, me cuidar, me apoiar e me ajudar a esclarecer possíveis erros nos experimentos por meio de discussões técnico-científicas na área de microbiologia, fungos e biofilmes, mesmo sendo um programador...

Obrigada a todos que passaram pelo meu caminho durante o mestrado, pois, de alguma maneira, eu aprendi algo com vocês.

## RESUMO

**Introdução:** Dentre as espécies de fungos causadoras de infecções na corrente sanguínea, *Candida albicans* é a prevalente. A compreensão dos fatores associados à virulência deste fungo, dentre eles, a expressão das isoenzimas Aspartato Proteases Secretadas (Sapp) e a formação de biofilmes, são de grande relevância na tentativa de se encontrar possíveis alvos terapêuticos.

**Objetivos:** Avaliar os tipos de interação entre Fluconazol e Guttiferona A, em estado planctônico e biofilmes, por meio de análise morfotopográfica e da expressão gênica de *SAP9* e *SAP10*, afim de verificar possíveis mecanismos de ação do composto Guttiferona A em *C. albicans*.

**Metodologia:** Avaliamos a expressão gênica de *SAP9* e *SAP10*, quantificamos o ergosterol produzido nas células sob tratamento e avaliamos por meio de microscopia de força atômica (AFM) características ultraestruturais em células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans*, antes e após tratamento isolado e associado entre fluconazol (FLC) e Guttiferona A (GUT).

**Resultado:** A linhagem SC5314, em estado planctônico, foi sensível ao FLC (0,125 µg/mL) e a GUT (7,5 µg/mL). As associações apresentaram efeito sinérgico com inibição de 75% do crescimento, de *C. albicans* (FICI=0,156). As células sob associação apresentaram alterações morfológicas, como aumento de tamanho ( $p < 0,001$ ), redução na produção do ergosterol ( $p < 0,001$ ), e redução na expressão de *SAP9* e *SAP10* em células planctônicas, quando comparadas ao controle. Nos biofilmes, o fungo apresentou resistência de mais de 2000 vezes quando tratado com as substâncias isoladamente e não houve atividade nas associações. GUT 1024 µg/mL promoveu um aumento na biomassa dos biofilmes ( $p < 0,001$ ) e, sob tratamentos com 16 µg/mL deste composto, as células apresentaram um aumento de tamanho em relação ao controle ( $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** A associação de GUT ao FLC apresenta potencial farmacológico contra *C. albicans*, promovendo uma atividade sinérgica com alterações significativas na estrutura deste fungo.

**Palavras-Chave:** Biofilmes. *Candida albicans*. Fluconazol. Expressão Gênica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Among the species of fungi that cause bloodstream infections, *Candida albicans* is the most prevalent. The understanding of the factors associated with the virulence of this fungus, among them, the expression of the Secreted Aspartic Proteases isoenzymes (Sapp) and the formation of biofilms, are of great relevance in the attempt to find possible therapeutic targets.

**Objectives:** Evaluate the interaction between Fluconazole and Guttiferone-A, in planktonic cells and biofilms, through morphotopographic analysis and gene expression of *SAP9* and *SAP10*, in order to verify possible mechanisms of action of Guttiferone-A in *C. albicans*.

**Methodology:** We evaluated the gene expression of *SAP9* and *SAP10*, quantified the ergosterol produced in the cells under treatment and evaluated by means of atomic force microscopy (AFM) ultrastructural characteristics in planktonic cells and biofilms of *C. albicans* before and after isolated and associated treatment between Fluconazole (FLC) and Guttiferone A (GUT).

**Results:** The planktonic cells SC5314 strain was sensitive to FLC (0.125 µg / mL) and GUT (7.5 µg / mL). The associations showed a synergistic effect with inhibition of 75% growth of *C. albicans* (FICI = 0.156). Cells under association showed morphological changes, such as increase size ( $p < 0.001$ ), reduction ergosterol production ( $p < 0.001$ ), and reduction in *SAP9* and *SAP10* expression in planktonic cells when compared to control. In the biofilms, the fungus presented resistance of more than 2000 times when treated with the substances alone and there was no activity in the associations. GUT 1024 µg/mL promoted an increase in biofilm biomass ( $p < 0.001$ ) and, under treatments with 16 µg/mL, the cells had an increase in size compared to the control ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** The association of GUT to FLC has pharmacological potential against *C. albicans*, promoting a synergistic activity with significant changes in the structure of this fungus.

**Key words:** Biofilms. *Candida albicans*. Fluconazole. Gene Expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 –  | Blastoconídios de <i>Candida albicans</i> em processo de brotamento.  | 18 |
| Figura 2 –  | Esquema de formação de biofilmes .....  | 22 |
| Figura 3 –  | Imagem de microscopia de varredura a laser Confocal da formação de biofilme, metabolicamente ativo (vermelho alaranjado), de <i>C. albicans</i> em superfície acrílica .....  | 23 |
| Figura 4 –  | Mecanismo de ação do Fluconazol .....   | 24 |
| Figura 5 –  | Representação esquemática do isoblograma normalizado para combinações não constantes .....  | 27 |
| Figura 6 –  | Representação esquemática da estrutura química de Guttiferona- A .....  | 29 |
| Figura 7 –  | Montagem das placas de 96 poços com distribuição das diluições dos compostos de maneira que todas as doses se encontrassem em associação sobre o microrganismo.....   | 33 |
| Figura 8 –  | Processo de montagem das placas de 96 poços para a formação dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. ....   | 34 |
| Figura 9 –  | Processo de análise das placas de 96 poços com biofilmes de <i>Candida</i> spp. pelo método do XTT/Menadiona. ....  | 36 |
| Figura 10 – | Processo de Quantificação do ergosterol produzido pelas células com e sem tratamento. ....  | 38 |
| Figura 11 – | Perfil de sensibilidade das amostras de <i>C. albicans</i> ao FLC, em relação ao controle, obtido por teste de microdiluição em caldo, realizado a partir do documento M27-S4 (CLSI, 2012) e submetidos a leituras espectrofotométricas a 530nm, após 24h de exposição de acordo com o documento E.Def 7.3.1 (EUCAST, 2016) ( $p < 0,001$ ) ..... | 43 |
| Figura 12 – | Teste de padronização do crescimento em biofilmes (BF) por cultivo em placa, avaliado por meio da média obtida no ensaio de redução do XTT, após 48h da última lavagem.....   | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13 – Curvas de Dose-Resposta de Fluconazol (FLC) e Guttiferona A (GUT) sobre células planctônicas de <i>C. albicans</i> SC 5314.....   | 45 |
| Figura 14 – Isoblograma representativo de todas as associações com inibições acima de 50% .....   | 46 |
| Figura 15 – Tamanho das células planctônicas cultivadas sob os tratamentos 0,125 µg/mL para FLC, 7,5 µg/mL para GUT e Associação FLC+GUT (0,5 µg/mL de FLC x 0,469 µg/mL de GUT) (**p<0,001) .....  | 47 |
| Figura 16 – AFM de células planctônicas de <i>C. albicans</i> SC 5314 .....   | 48 |
| Figura 17 – Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol obtido da linhagem SC 5314 sob os tratamentos de GUT (7,5µg/mL), FLC (0,125µg/mL) e da associação com maior sinergismo (0,5µg/mL de FLC x 0,47µg/mL de GUT) .....   | 49 |
| Figura 18 – Porcentagem de produção do ergosterol / peso do sedimento obtido da linhagem SC 5314 sob os tratamentos de GUT (7,5 µg/mL), FLC (0,125 µg/mL) e da associação sinérgica com 75% de inibição do crescimento (0,5 µg/mL de FLC x 0,47 µg/mL de GUT) (p<0,001) ..... | 50 |
| Figura 19 – RT-PCR. Expressão dos genes <i>SAP9</i> e <i>SAP10</i> antes e após os tratamentos com doses inibitórias e subinibitórias de compostos com atividade antifúngica e a associação sinérgica.....  | 51 |
| Figura 20 – Curvas de Dose-Resposta de Fluconazol (FLC) e Guttiferona A (GUT) (µg/mL) sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> SC 5314, obtidas a partir da análise do ensaio de redução do XTT, após 48h de incubação. ....   | 52 |
| Figura 21 – Densidade ótica observada por meio de coloração com Cristal Violeta a 0,4% e Tamanho celular médio por AFM .....  | 53 |
| Figura 22 – Microscopia de força atômica de Biofilmes de <i>C. albicans</i> SC 5314 .....   | 54 |
| Figura 23 – Microscopia de força atômica de biofilmes de <i>C. albicans</i> SC 5314 tratados com GUT. ....  | 55 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 24 – RT-PCR. Expressão dos genes <i>SAP9</i> e <i>SAP10</i> antes e após os tratamentos com doses inibitórias de compostos com atividade antifúngica e da associação sinérgica .....    | 59 |
| Figura 25 – RT-PCR. Expressão dos genes <i>SAP9</i> e <i>SAP10</i> antes e após os tratamentos com doses subinibitórias de compostos com atividade antifúngica e da associação sinérgica ..... | 60 |
| Quadro 1 – Representação esquemática do cálculo da concentração inibitória fracionada – FICI. ....   | 26 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de <i>Candida</i> spp. de acordo com valores apresentados de IC pelo Método de Microdiluição em Caldo. .... | 32 |
| Tabela 2 – Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações de FLC a GUT. ....   | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |   |
|--------------|---|
| <i>ACT</i>   | - Gene codificante de Actina (Endógeno)                       |
| AFM          | - Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy)      |
| ASSOC. 75%   | - Associação Sinérgica com 75% de inibição do crescimento     |
| ATCC         | - American Type Culture Collection                            |
| BF           | - Biofilmes   |
| CLSI         | - Clinical and Laboratory Standards Institute                 |
| c-DNA        | - DNA complementar, sintetizado a partir do RNA               |
| $C_t$        | - Cycle Threshold   |
| CV           | - Cristal Violeta   |
| Ctrl         | - Controle  |
| DEPC         | - Dietilpirocarbonato   |
| 24 (28) DHE  | - 24 (28) Dehydroergosterol                                   |
| DNA          | - Ácido Desoxirribonucleico                                   |
| DTT          | - DL-Dithiothreitol   |
| DMSO         | - Dimetilsulfóxido  |
| dNTPs        | - Desoxirribonucleotídeos trifosfato                          |
| DO           | - Densidade óptica  |
| EDTA         | - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                          |
| EGTA         | - Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid            |
| <i>ERG3</i>  | - Gene codificante dos esteróis 14- $\alpha$ -methyl-3,6-diol |
| <i>ERG11</i> | - Gene codificante do Ergosterol                              |
| EROS         | - Espécies Reativas de Oxigênio                               |
| FAM          | - Fluoróforo 6-Carboxyfluorescein                             |
| FIC          | - Concentração inibitória fracionada                          |
| FICI         | - Índice de concentração inibitória fracionada                |
| FLC          | - Fluconazol  |
| GPI          | - Glicosilfosfatidilinositol                                  |
| GUT          | - Guttiferona A   |
| HPLC         | - Cromatografia Líquida de alta eficiência                    |
| IC           | - Inhibitory Concentration - Concentração Inibitória          |

|          |   |
|----------|---|
| Menad.   | - Menadiona   |
| MOPS     | - Ácido 3-(N-morpholino) propanosulfônico   |
| PBS      | - Solução tampão fosfato salina   |
| PCR      | - Reação em Cadeia da Polimerase  |
| pH       | - Potencial hidrogeniônico  |
| qPCR     | - Reação em cadeia da polimerase quantitativa   |
| q.s.p.   | - Quantidade suficiente para  |
| RNA      | - Ácido Ribonucleico  |
| rpm      | - Rotações por minuto   |
| RT-PCR   | - Reação em cadeia da polimerase por Transcrição Reversa                                      |
| Sapp     | - Proteína aspartato protease secretada   |
| SAP      | - Gene codificador das Aspartato Protease Secretada (Secreted aspartic protease)              |
| SDS      | - Dodecil Sulfato de Sódio  |
| SOD      | - Superóxido dismutase  |
| TRIS-HCl | - Tris(hidroximetil)aminometano tamponado com Ácido Clorídrico                                |
| UV       | - Ultravioleta  |
| XTT      | -2,3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-<br>[(phenylamino)carbonyl]-2Htetrazolium hydroxide |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 17 |
| 2.1      | <i>Candida</i> SPP. ....  | 17 |
| 2.1.1    | Aspartato Proteases .....   | 19 |
| 2.1.2    | Formação de Biofilmes .....   | 21 |
| 2.2      | ANTIFÚNGICOS.....   | 24 |
| 2.2.1    | Associações entre compostos .....   | 26 |
| 2.2.2    | Guttiferona A .....   | 28 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 30 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 30 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 30 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 31 |
| 4.1      | DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE<br>CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>C. albicans</i> .....    | 31 |
| 4.2      | FORMAÇÃO DE BIOFILME .....  | 33 |
| 4.2.1    | Determinação da sensibilidade em biofilmes de <i>C. albicans</i> .....                              | 35 |
| 4.3      | QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL .....   | 37 |
| 4.4      | MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA .....  | 39 |
| 4.5      | ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ASPARTATO<br>PROTEASES.....   | 39 |
| 4.5.1    | Tratamento do RNA e Transcrição Reversa.....  | 40 |
| 4.5.2    | PCR em tempo real .....   | 41 |
| 5.6      | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 42 |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 43 |
| 5.1      | ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ENSAIO DE ASSOCIAÇÕES<br>ENTRE COMPOSTOS SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS..... | 44 |
| 5.1.1    | Análise em Microscopia de Força Atômica (AFM) .....   | 46 |
| 5.1.2    | Quantificação do Ergosterol .....   | 48 |
| 5.1.3    | Análise da expressão gênica em células planctônicas .....   | 50 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 5.2 | ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ENSAIO DE ASSOCIAÇÕES<br>ENTRE COMPOSTOS SOBRE BIOFILMES..... | 52 |
| 6   | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 56 |
| 7   | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 63 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 64 |
|     | <b>ANEXO</b> .....   | 82 |

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas sistêmicas são uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos hospitalizados, principalmente internados em UTIs e pacientes transplantados receptores de medula óssea (BASSETTI et al., 2015; GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; YOUSIF; JAMAL; RAAD, I., 2015). *Candida* spp. se destaca como sendo um dos principais microrganismos promotores deste tipo de infecção, sendo, *Candida albicans*, a principal espécie do gênero isolada em ambientes hospitalares (ALP et al., 2015; CAGGIANO et al., 2015; MCMANUS; COLEMAN, 2014; QUINDÓS, 2014). Dados publicados em 2013, por Colombo e seus colaboradores, mostram que *Candida* spp. foi responsável por 6,9% dos casos neste tipo de infecção em sete hospitais particulares de alta qualidade, e dois hospitais públicos de referência brasileiros.

O sucesso de *C. albicans* como patógeno depende, em grande extensão, de sua habilidade em gerar diversidade não apenas ao nível genético mas também morfológico e fisiológico (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

A complexidade e invasividade de procedimentos médicos e o prolongamento do tempo de internação dos pacientes hospitalizados, encontrados em estado crítico de saúde, associado à aplicação de antibióticos de amplo espectro ou de antifúngicos, a tratamentos e medidas profiláticas e a fatores relacionados à virulência do microrganismo, permitiram o sobressalto de espécies resistentes, além do aumento das taxas de óbito decorrentes de infecções fúngicas, nas últimas décadas (FRANCOLINI; DONELLI, 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; HAMID et al., 2014; HORN, D. L. et al., 2009; PERES-BOTA et al., 2004).

A despeito de sua importância clínica, *C. albicans* tem sido assunto de extensivas pesquisas que objetivam desvendar os mecanismos que governam a virulência fúngica e a resistência a fármacos (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

São vários os fatores relacionados à virulência de *C. albicans* em hospedeiros humanos. A capacidade de *C. albicans* poder apresentar morfologias distintas entre levedura, hifa e pseudohifa é considerada fator crítico associado à virulência e essencial para patogenicidade do fungo tanto a nível superficial quanto sistêmico (ROMANI et al., 2015). Diferentes morfologias podem estar associadas à expressão

de fatores distintos, tal como a secreção de isoenzimas da família das aspartato proteases (Sapp). As Sapp são um dos principais fatores associados à virulência, tanto em colonização quanto em infecção por *Candida* spp. As Sapp estão envolvidas em processos de adesão, dano tecidual, obtenção de nutrientes e, também, na evasão do sistema imune hospedeiro (HUBE et al., 1994; HUBE; NAGLIK, 2001; SCHALLER et al., 2005).

A expressão diferencial destas proteases, pode acarretar em outro fator a ser considerado, a formação de biofilmes (STANISZEWSKA; BONDARYK; OCHAL, 2015). Além dos tecidos de hospedeiros, biofilmes também são encontrados em materiais hospitalares implantados, como cateteres para nutrição parenteral, o que pode agravar a situação dos pacientes por facilitar a contaminação sanguínea ou sepse (ORTEGA et al., 2011; YOUSIF; JAMAL; RAAD, 2015). Os biofilmes são estruturas complexas, nas quais os microrganismos estão aderidos a superfícies sólidas, bióticas ou abióticas, e envoltas em uma substância polimérica densa, o que permite proteção ao ataque de células fagocíticas do hospedeiro e resistência a fármacos antifúngicos (STANISZEWSKA; BONDARYK; OCHAL, 2015).

A resistência de *C. albicans* a antifúngicos azólicos é considerada um fenômeno multifatorial. Esta pode estar relacionada, por exemplo, a longos períodos de tratamento antifúngico e/ou profilaxia com azóis, como resultado de mutações ou aumento da expressão de genes envolvidos, por exemplo, na biossíntese do ergosterol (EDDOUZI et al., 2013).

Atualmente, tem-se baixo número de antifúngicos de amplo espectro disponíveis para tratamentos e, alguns destes, promovem efeitos colaterais sérios (CHITASOMBAT; KONTOYIANNIS, 2015; JOLY; BOLARD; YENI, 1992). Muitas terapias para o tratamento de infecções fúngicas têm como alvo, a via biossintética do ergosterol ou o próprio produto final, o ergosterol, um esterol de membrana fúngica, essencial ao crescimento e funções de membrana, o qual se constitui em um biorregulador da fluidez, simetria e integridade da membrana (LUPETTI et al., 2002). Sendo assim, a busca de novas estratégias para a prevenção e gerenciamento de infecções fúngicas é de suma importância (KATRAGKOU et al., 2014). A busca de novos compostos com atividade antifúngica, ou a associação dos mesmos com fármacos convencionalmente utilizados em esquemas terapêuticos, pode ser uma alternativa viável para o controle e/ou combate à resistência. Nesta via, a Guttiferona-A, um composto com baixa citotoxicidade em células de mamíferos e que apresenta

atividades antimicrobianas e antifúngicas, aparece como um potencial composto para estas associações (DIAS et al., 2012).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento significativo de casos graves de infecções promovidas por fungos, principalmente entre a população imunocomprometida, o que promoveu um salto no número de estudos relacionados a estes microrganismos (ALP et al., 2015; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; QUINDÓS, 2014). A causa mais recorrente de mortalidade neste grupo, em geral, são infecções na corrente sanguínea (WISPLINGHOFF et al., 2004). A invasividade de procedimentos médicos ou a perda da barreira protetora do indivíduo, são as principais portas de entrada para os microrganismos causadores destas infecções (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

As candidemias, como são chamadas as infecções na corrente sanguínea provocadas por *Candida* spp., destacam-se como um dos principais problemas clínicos relacionados a microrganismos, estando este gênero entre os cinco patógenos mais isolados e uma das principais causas de mortalidade (ALP et al., 2015; COLOMBO et al., 2006; QUINDÓS, 2014). Devido a seriedade dos casos, diversos estudos têm sido promovidos buscando melhores informações sobre as espécies envolvidas e tratamentos mais efetivos (COLOMBO et al., 2006; LUCA et al., 2012; MERSEGUER et al., 2015).

### 2.1 *Candida* SPP.

Taxonomicamente, o gênero *Candida* spp. pertence ao reino Fungi, grupo Ascomycota, filo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, família Saccharomycetidae e pode ser dividido em cerca de 200 espécies já catalogadas (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; INDEX FUNGORUM, 2015). Sendo, as de maior importância clínica, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. auris* (CAGGIANO et al., 2015; CALVO et al., 2016; HAMID et al., 2014; TODD, 2017).

Segundo Giolo e Svidzinski (2010), a reprodução das espécies deste gênero é, na maioria das vezes, assexuada, por meio de estruturas conhecidas como blastoconídios sendo, apenas em alguns casos, sexuada (Figura 1).

*Candida albicans* é a principal espécie do gênero isolada em ambientes hospitalares (ALP et al., 2015; CAGGIANO et al., 2015; MCMANUS; COLEMAN, 2014). Geralmente leveduriforme (Figura 1), pode ser encontrada em diversos ambientes, independente da presença ou ausência de oxigênio e sua nutrição se baseia na obtenção de carbono e nitrogênio através da degradação de proteínas e carboidratos presentes no meio (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

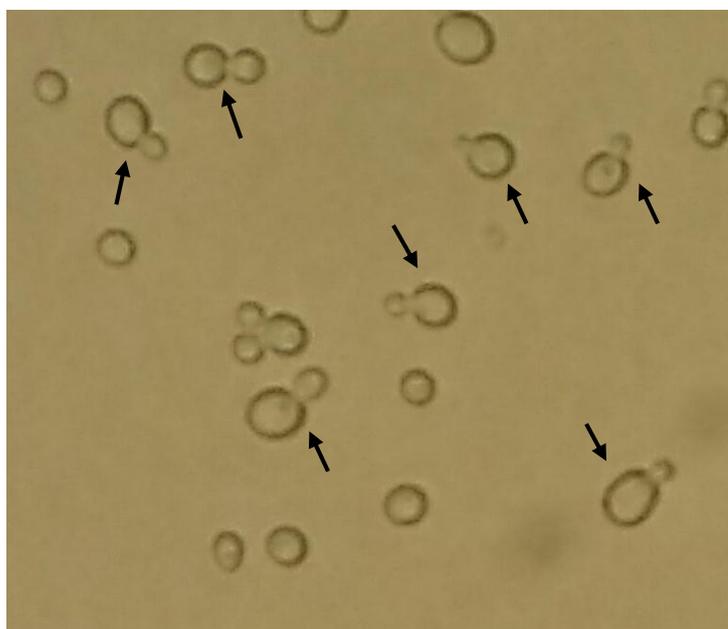


Figura 1 – Blastoconídios de *Candida albicans* em processo de brotamento ( ← ).

Fonte: Da autora (2016).

Estas, são encontradas, em geral, nos tratos gastrointestinal e geniturinário além da mucosa oral e pele humanas, fazendo parte de sua microbiota (BUU; CHEN, 2014; KUMAR et al., 2015). A relação entre este fungo e o hospedeiro é estável, controlada tanto pelo sistema imunológico quanto por competição com outros microrganismos presentes na microbiota local permitindo, assim, que o fungo sobreviva de forma comensal (CALDERONE; ODDS; BOEKHOUT, 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MATHÉ; DIJCK, VAN, 2013; PITERS; SANDERS; BOGAERT, 2015)

*Candida* spp. apresenta pleomorfismo, ou seja, a capacidade de se reestruturar de acordo com as condições ambientais ou com seu ciclo reprodutivo (KLEIN; TEBBETS, 2007; LACKEY et al., 2013). A capacidade de *C. albicans* poder apresentar morfologias distintas entre levedura, hifa e pseudohifa é considerada fator crítico associado à virulência e essencial para patogenicidade do fungo tanto a nível superficial quanto sistêmico (ROMANI et al., 2015).

Quando ocorre desequilíbrio em sua relação ao ambiente hospedeiro, como variação da temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes ou quedas na imunidade, *C. albicans* torna-se um patógeno oportunista (MOLERO et al., 1998). Em geral, estas alterações ocorrem com maior frequência em pacientes imunocomprometidos ou de alto risco, como residentes de UTI, ou com uma via expressa para a entrada de microrganismos no organismo hospedeiro, como o uso de nutrição parenteral e/ou cateter venoso central (CLEVELAND et al., 2015). Como alternativa profilática às infecções fúngicas neste grupo, tem ocorrido uma ampla aplicação de doses subinibitórias de agentes antifúngicos, sendo os compostos azólicos considerados eficientes e com boa biodisponibilidade (BLOT, 2006; CHANG et al., 2016; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). O alvo destes compostos é o ergosterol, importante esterol da membrana fúngica (KHAN, A. et al., 2010). Estes compostos bloqueiam a via de síntese deste esterol, promovendo uma membrana frágil e comprometendo a integridade desta (LUPETTI et al., 2002). A exposição a estes agentes pode provocar uma expressão gênica diferenciada, em estágios distintos da infecção, promovendo a virulência do fungo (BARELLE et al., 2008; COSTA et al., 2010). Dentre as alterações gênicas despontadas pela presença de antifúngicos, está a variação na expressão de genes da família das Aspartato Proteases (*SAP*) (BARELLE et al., 2008; COSTA et al., 2010).

### 2.1.1 Aspartato Proteases

As Aspartato Proteases Secretadas (*Sapp*) são expressas por uma família de genes que codificam 10 tipos de enzimas hidrolíticas consideradas como um dos fatores principais associados à virulência de *C. albicans* (HUBE; NAGLIK, 2001).

Estas, são responsáveis pela aderência das células aos diversos tipos de superfícies, geração de danos às membranas celulares do hospedeiro e ainda atuantes no escape do sistema imune do mesmo, por meio da degradação de moléculas sinalizadoras (HUBE, NAGLIK, 2001; STANISZEWSKA; BONDARYK; PIŁAT; et al., 2012; TOBOUTI et al., 2015).

As Sapp são decodificadas como preproenzimas e classificadas de acordo com suas sequências homólogas (BEGGAH et al., 2000; STANISZEWSKA; BONDARYK; SIENNICKA; et al., 2012). Sap1p a Sap3p são mais encontradas durante infecções superficiais e em meios ácidos, com pH 2,0 a 5,0, geralmente em mucosas sendo capazes de degradar diversas proteínas do hospedeiro além de matriz extracelular (HUBE; NAGLIK, 2001; SCHALLER et al., 2005). Sap4p a Sap6p são geralmente mais expressas durante a formação de hifas e em pH neutro, estando diretamente ligadas à promoção de infecções sistêmicas por facilitarem a invasão tecidual (HUBE et al., 1994; WHITE; AGABIAN, 1995; WU et al., 2013). Sap7p e Sap8p são bastante divergentes e, por isso, não são incluídas em subfamílias (NAGLIK et al., 2008). Sap7p é mais expressa em ambientes promotores de tensão e meios séricos, como é o caso da corrente sanguínea (STANISZEWSKA et al., 2014). Sap8p é mais expressa na forma levedura, com temperaturas em torno de 25°C, durante a fase inicial de crescimento exponencial, sendo ativa em torno de pH 2,5 (AOKI et al., 2011; MONOD et al., 1998).

Segundo Schaller e colaboradores (2005), as preproenzimas Sap1p a Sap8p são processadas pela via secretória e liberadas para o meio extracelular. Sap9p e Sap10p permanecem ancoradas à membrana por meio do glicosilfosfatidilinositol, sendo as únicas desta família ligadas à célula (ALBRECHT et al., 2006; SCHALLER et al., 2005).

Sap9p e Sap10p possuem semelhanças com as yapsinas, encontradas em *Saccharomyces cerevisiae*, e são responsáveis pela manutenção da integridade da parede celular, estando ligadas à morfologia (CHAFFIN, 2008; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Sap9p estão, em geral, localizadas na membrana celular, enquanto Sap10p se concentra em ambas as localidades, membrana e parede (ALBRECHT et al., 2006). Elas também atingem diretamente proteínas necessárias para processos celulares, em alvos distintos, sendo fundamentais durante a interação patógeno-hospedeiro e em processos de adesão celular (ALBRECHT et al., 2006). Sabe-se que estas SAP possuem afinidade para clivagem em peptideos com resíduos

basicos ou dibasicos, como a histatina 5, um importante peptídeo antimicrobiano salivar, para Sap9p (BOCHENSKA et al., 2016; SCHILD et al., 2011). Quando deletado somente o gene *SAP9*, há a redução da formação de hifas verdadeiras, comparado à linhagem selvagem (STANISZEWSKA et al., 2014). Mutantes nulos, nos quais houve a 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).

Com todas estas características relacionadas a adesão e invasão tecidual, as Sapp são consideradas cruciais para a iniciação da formação de biofilme, sendo importantes codificadores para tal evento (BONDARYK; OCHAL; STANISZEWSKA, 2014; STANISZEWSKA; BONDARYK; PIŁAT; et al., 2012; TOBOUTI et al., 2015).

### 2.1.2 Formação de Biofilmes

Biofilmes são considerados um evento multifatorial, promovido pela expressão de adesinas e proteases aspárticas (FINKEL; MITCHELL, 2011; NOBILE et al., 2012).

De acordo com Chandra e colaboradores (2001) os biofilmes de *C. albicans* são estruturas formadas a partir de células de leveduras que foram depositadas em superfícies bióticas ou abióticas e que se aderiram às mesmas, iniciando a formação de microcolônias. A partir destas células surgem hifas, pseudohifas e é secretada uma matriz extracelular polimérica densa e rígida, composta principalmente por polissacarídeos semelhantes aos da parede celular, proporcionando uma estrutura tridimensional altamente heterogênea (Figura 2) (CHANDRA et al., 2001; IÑIGO; PEMÁN; POZO, 2012; YOUSIF; JAMAL; RAAD, 2015).

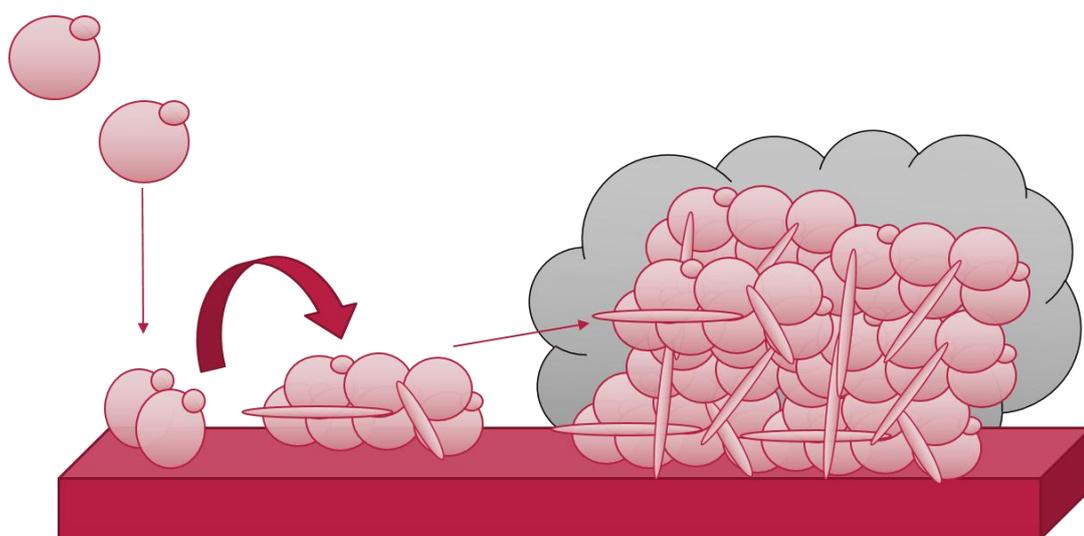


Figura 2 – Esquema de formação de biofilmes.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: As leveduras são depositadas em superfícies e se aderem às mesmas, iniciando a formação de microcolônias. A partir destas células surgem hifas e é secretada matriz extracelular.

A formação desta estrutura está diretamente relacionada ao aumento da resistência aos fármacos utilizados em tratamentos contra infecções por *Candida* spp. (CHANDRA et al., 2001; TOBUDIC et al., 2012). A densa matriz secretada faz com que seja baixa ou incompleta a entrada dos agentes antimicrobianos mas permite a eliminação de metabólitos celulares produzidos em seu interior (Figura 3) (FRANCOLINI; DONELLI, 2010).

Juntamente com as células de *C. albicans* outras diversas linhagens microbianas também fazem uso da estrutura fornecida pelo biofilme para se estabelecerem, formando um complexo polimicrobiano (CHANDRA et al., 2001; FRANCOLINI; DONELLI, 2010; JENKINSON; DOUGLAS, 2002). Como demonstrado em estudo conduzido por Baillie, Adam e Douglas (2002), biofilmes mistos também podem estar associados a fracassos terapêuticos como exemplo a relação mutualística em biofilmes de *C. albicans* e *Staphylococcus epidermidis*. Segundo os autores, o polímero secretado por *S. epidermidis* impede a penetração de fluconazol no biofilme, protegendo *C. albicans*, e a matriz secretada pelo fungo protege a bactéria, impedindo a ação da vancomicina (BAILLIE; ADAM; DOUGLAS, 2002).

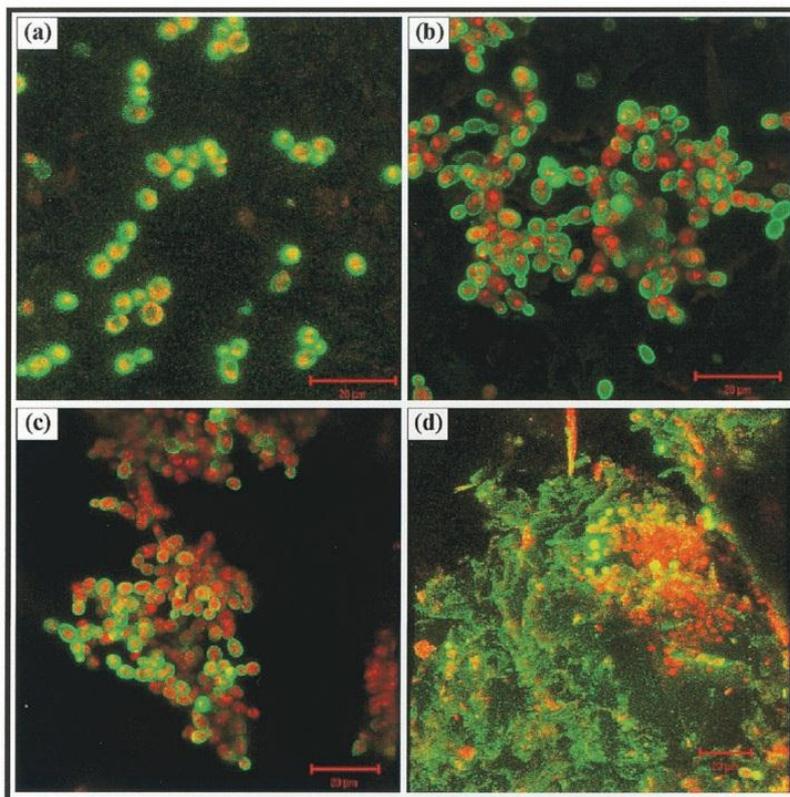


Figura 3 – Imagem de microscopia de varredura a laser Confocal da formação de biofilme, metabolicamente ativo (vermelho alaranjado), de *C. albicans* em superfície acrílica.

Fonte: (CHANDRA et al., 2001)

Nota: (a) Células leveduriformes; (b; c) Fase de maturação celular e adesão; (d) formação de hifas e produção da matriz extracelular polimérica, em verde.

Além desta interação celular outros tipos de mecanismos promotores de resistência são encontrados em biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Entre estes podemos destacar as bombas de efluxo, que atuam em células planctônicas e fases iniciais da maturação de biofilmes; a redução da síntese do ergosterol; o *quorum sensing*; alterações na expressão gênica; a formação e distribuição coordenada da matriz secretada e a presença e persistência de células após a apresentação a medicamentos, entre outros (DONLAN; COSTERTON, 2002; MATHÉ; DIJCK, 2013; TAFF et al., 2013).

## 2.2 ANTIFÚNGICOS

De acordo com Castro, Henrique e Chaves (2006), *C. albicans* é uma espécie considerada naturalmente sensível a todos os tipos de antifúngicos (CASTRO; HENRIQUE; CHAVES, 2006).

Entre estes medicamentos, empregados na prevenção e no tratamento de infecções fúngicas, está o fluconazol, um composto da classe dos triazólicos cuja aplicação é ampla devido a seus efeitos colaterais menores, quando comparados a outros agentes antifúngicos, e a ter boa atuação contra o patógeno promovendo a obtenção de resultados eficazes (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; HORN et al., 2009; LIU et al., 2014; MORSCHHÄUSER, 2002).

O fluconazol atua diretamente na biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima lanosterol-14 $\alpha$ -demetilase do citocromo P450, por meio de competição com seu substrato, promovendo assim a perda da estrutura e função da membrana além da estagnação do crescimento celular (Figura 4) (MORSCHHÄUSER, 2002). Este desfecho faz com que o fluconazol seja considerado um agente fungistático, que impede o crescimento do fungo apenas (LI et al., 2008).

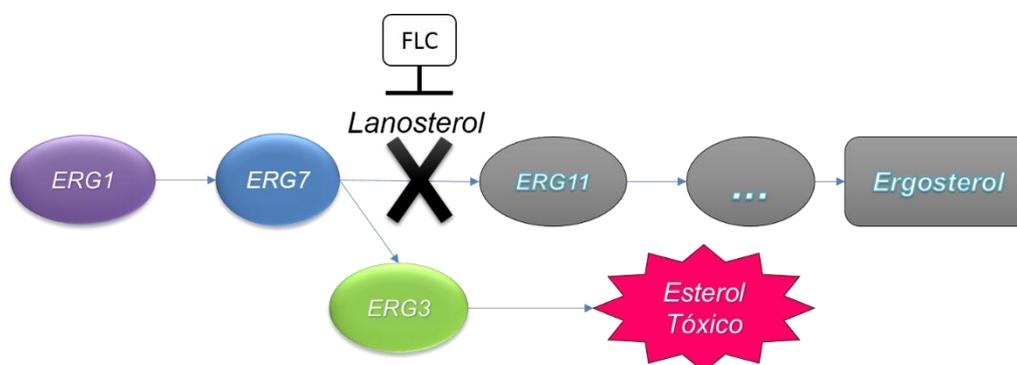


Figura 4 – Mecanismo de ação do Fluconazol.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: O Fluconazol age por meio de competição com a enzima Lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, se ligando ao seu substrato, o Lanosterol, e o inativando, inibindo assim a expressão do gene *ERG11* e a formação do ergosterol.

Geralmente, este medicamento é administrado oralmente em doses de 200mg diários, não tendo variação caso aplicado via intravenoso (FIOCRUZ, 2006; MERMEL et al., 2009; PERON et al., 2016). Por ter boa biodisponibilidade, atinge rapidamente a corrente sanguínea, tendo pico plasmático até 2 horas após a administração, penetrando facilmente nos tecidos e sendo excretado lentamente pelos rins

(FIOCRUZ, 2006; MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA, 2011). Devido a esta cinética, o fármaco possui uma meia-vida média de 20 a 50 horas (FIOCRUZ, 2006; PAPPALARDO, 2009). Por conta destas configurações, o fluconazol acaba sendo o fármaco de primeira escolha para tratamentos antifúngicos tratamentos profiláticos quando utilizado em doses subinibitórias (LIAO et al., 2015).

Em geral, estas concentrações subinibitórias de antifúngicos, principalmente de compostos triazólicos, são utilizadas na tentativa de controle à infecções em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI), portadores de cateteres intravenosos, soropositivos para o HIV (Human Immunodeficiency Virus) , entre outros tipos de pacientes imunocomprometidos, (ANDES et al., 2012; CASTAGNOLA et al., 2004; COSTA et al., 2010). No entanto, de acordo com alguns estudos, *C. albicans* cultivadas sob estas condições de subconcentrações, quando tratadas com concentrações efetivas mínima ou máxima, podem apresentar o aumento da expressão dos genes *SAP*, amentando também a resistência aos fármacos utilizados (WU et al., 2000).

Além dos azóis, outros compostos também são utilizados em tratamentos antifúngicos como a classe dos polienos, representados pela nistatina e anfotericina B; as equinocandinas, como a caspofungina, e a flucitosina (PERON et al., 2016; TOKA ÖZER; DURMAZ; YULA, 2016).

Com o uso deliberado destes, no tratamento e prevenção, tem-se observado insucesso dos mesmos (CASTRO; HENRIQUE; CHAVES, 2006). Com isso, diversas linhagens já estão sendo identificadas como resistentes aos medicamentos tradicionais utilizados (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015; QUINDÓS, 2014)

A busca por novas drogas, para se contornar esta resistência, tem se tornado foco de diversos trabalhos na procura de compostos com potenciais terapêuticos. No entanto, a associação destes compostos a fármacos já disponíveis comercialmente, tem se mostrado bastante atraente nos últimos anos, devido a suas ações de potencialização da atividade antimicrobiana (CARRADORI et al., 2016; JACKSON et al., 2015; LI et al., 2015; LIU et al., 2014).

### 2.2.1 Associações entre compostos

Pelo método do tabuleiro de damas, ou *checkerboard*, alguns pesquisadores têm estudado diversos tipos de associações entre diferentes tipos de fármacos (CARRADORI et al., 2016; FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004; LI et al., 2015). Este método permite a obtenção da curva de dose-resposta e, a partir desta, avaliar o índice de concentração inibitória fracionada (FICI). Este índice é formado por duas análises somatórias, ambas analisam a menor concentração de cada composto, capaz de inibir 50% do crescimento (IC) sob associação, e dividi-la pela menor concentração do mesmo com mesma atividade, quando isolado (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Quando todas as concentrações inibitórias fracionadas (FIC) são obtidas, estas são somadas. Índices acima de 4 indicam antagonismo entre as drogas, no qual os resultados são completamente opostos àqueles obtidos pelos fármacos isolados (Quadro 1) (CARRADORI et al., 2016). Acima de 1 até 4 apresentam indiferença. Se o FICI estiver na faixa de 1 a 0,5, a interação é aditiva ou somatória apenas. A partir do momento que este índice é menor que 0,5, a potencialização ou efeito sinérgico é confirmado (CARRADORI et al., 2016; CHOU, 2006; FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004; FOUCQUIER; GUEDJ, 2015; GESSNER, 1995).

Quadro 1 – Representação esquemática do cálculo da concentração inibitória fracionada – FICI.

| Amostra                 | Dose           | FIC             | FICI              |
|-------------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| < IC Composto combinado | A              | $\frac{A}{A_i}$ | (FIC A) + (FIC B) |
| IC Composto isolado     | A <sub>i</sub> | A <sub>i</sub>  |                   |
| < IC FLC combinado      | B              | $\frac{B}{B_i}$ |                   |
| IC FLC isolado          | B <sub>i</sub> | B <sub>i</sub>  |                   |

Fonte: (CARRADORI et al., 2016).

Nota: FLC, Fluconazol; IC 50, Concentração inibitória mínima para inibição de 50% do crescimento; <IC, menor concentração do composto sob combinação, capaz de inibir 50% do crescimento.

A ação de potencialização, conhecida como sinergismo, é uma das quatro possíveis interações. Para serem avaliados, os resultados devem ser verificados em um gráfico, chamado isoblograma, que é formado pelas concentrações isoladas capazes de inibir 50% do crescimento (IC50) do microrganismo estudado, sendo estas doses, obtidas a partir das curvas de dose-resposta (KRUSE; VIDAL; TREZZI, 2006). As IC50 de cada fármaco são plotadas nos eixos X e Y, e a linha que liga estes dois pontos é a isóbole de atividade (Figura 5) (KRUSE; VIDAL; TREZZI, 2006).

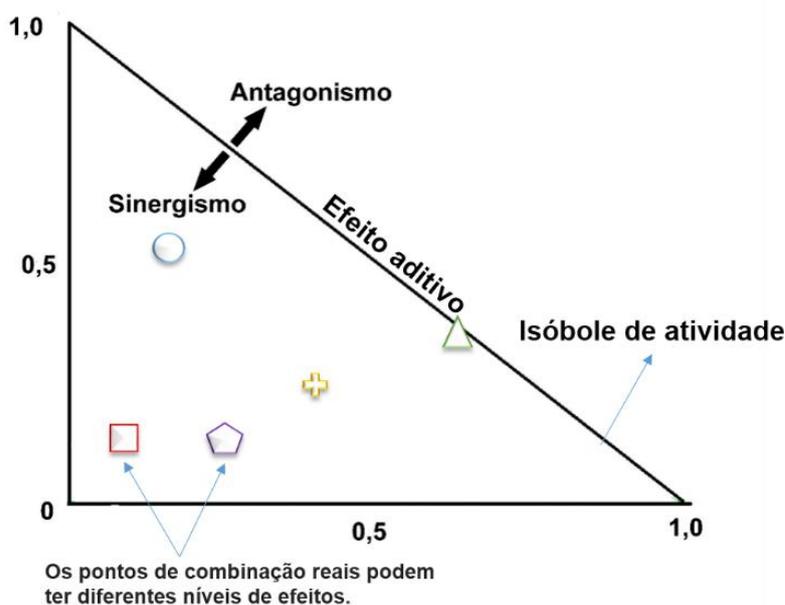


Figura 5 – Representação esquemática do isoblograma normalizado para combinações não constantes.

Fonte: (KRUSE; VIDAL; TREZZI, 2006)

Nota: O isoblograma é formado pelas concentrações isoladas capazes de inibir 50% do crescimento (IC50) do microrganismo estudado. Estas são plotadas nos eixos X e Y e a linha que liga estes dois pontos é a isóbole de atividade. Quanto mais abaixo da Isóbole, maior é a potencialização. Da mesma forma, quanto mais acima desta, mais antagônica é a combinação.

A ação sinérgica entre compostos tem sido explorada atualmente como sendo uma ferramenta contra *Candida* spp., tanto na modulação da expressão de isoenzimas para invasão tecidual quanto na formação de biofilmes (BONDARYK; OCHAL; STANISZEWSKA, 2014; FELDMAN et al., 2014; JEBALI et al., 2014; KIM et al., 2012; LIU et al., 2014; LOPES et al., 2013). Testes com compostos bioativos também têm apresentado grande importância em estudos de diversas atividades,

proporcionando o conhecimento de ações como antioxidantes e antimicrobianas (GARCÍA; TORRES; MACÍAS, 2015; VALDÉS et al., 2015).

### 2.2.2 Guttiferona A

Entre os compostos com potenciais bioativos de interesse farmacêutico, a família Clusiaceae (Guttiferae), que são angiospermas amplamente distribuídas nas regiões dos trópicos, tem se destacado pelo grande número de produtos (SANTA-CECÍLIA et al., 2013). No Brasil, são encontrados 23 dos quase 50 gêneros descritos desta família, sendo divididos em cerca de 180 espécies (SANTA-CECÍLIA et al., 2013). Dentre as aplicações de seus bioprodutos estão as atividades antitumoral, antiparasitárias e antimicrobianas (AL-MASSARANI et al., 2013; CRUZ et al., 2006; DIAS et al., 2012; NALDONI et al., 2009). Entre seus compostos ativos, encontra-se a Guttiferona A, uma benzofenona encontrada em diferentes espécies desta família mas ainda pouco estudada (FROMENTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2009). Ela apresenta baixa toxicidade a células humanas, tendo citotoxicidade com doses acima de 68,2 µg/mL (DIAS et al., 2012).

Gustafson e colaboradores (1992) estudaram diferentes formas da Guttiferona frente ao vírus HIV, entre elas a Guttiferona A. Estes autores encontraram efeito dos compostos sobre as células infectadas com o vírus com baixas dosagens, enquanto que a citotoxicidade à células normais foi acima de 50 µg/mL (GUSTAFSON et al., 1992). Guttiferona A também apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de atividade antifúngica contra *Candida* spp. (DIAS et al., 2012).

A estrutura desta substância (Figura 6) apresenta caráter lipofílico que facilita a atuação contra os microrganismos (DIAS et al., 2012; NALDONI et al., 2009). Guttiferona-A pode atuar na membrana, por exemplo, da mitocôndria, aumentando a permeabilidade desta (PARDO-ANDREU et al., 2011). O aumento da permeabilidade provoca a perda energética e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo na célula cancerígena (PARDO-ANDREU et al., 2011). Porém, ainda se sabe muito pouco sobre o mecanismo de ação deste composto. Neste sentido, buscamos saber se a Guttiferona-A apresenta alguma ação

em relação a morfologia fúngica. Por microscopia de força atômica (AFM), uma técnica de análise celular não-invasiva, e pela quantificação do ergosterol formado, poderemos observar parâmetros de textura superficial e possíveis mecanismos de ação do composto. Alterações na expressão gênica de *SAP9* e *SAP10*, poderão nos mostrar também alterações que estejam relacionadas a manutenção da integridade superficial.

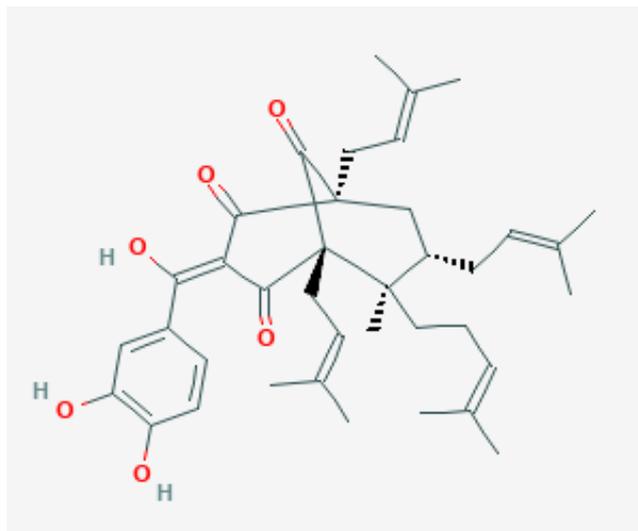


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura química de Guttiferona-A.  
Fonte: ("Guttiferone A | C38H50O6 - PubChem", [s.d.]

### 3 OBJETIVOS

Para entendermos melhor como estes compostos podem atuar sobre *C. albicans*, objetivamos alguns pontos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os tipos de interação entre Fluconazol e Guttiferona A, em estado planctônico e biofilmes, e análise morfotopográfica e da expressão gênica de *SAP9* e *SAP10*, afim de verificar possíveis mecanismos de ação do composto Guttiferona A em *C. albicans*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade antifúngica isolada de fluconazol e Guttiferona A sobre *C. albicans* em estado planctônico e biofilme.
- b) Avaliar a atividade antifúngica combinada e definir o tipo de interação entre fluconazol e Guttiferona A sobre *C. albicans* em estado planctônico e biofilme.
- c) Avaliar a morfotopografia em células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* antes e após os tratamentos isolados e combinados entre fluconazol e Guttiferona A.
- d) Avaliar o teor de ergosterol e a expressão dos genes *SAP9* e *SAP10* em células planctônicas de *C. albicans* antes e após os tratamentos isolados e combinados entre fluconazol e Guttiferona A.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma triagem das amostras para a escolha de uma que fosse sensível ao Fluconazol (FLC) de acordo com o documento E.Def 7.3.1 (EUCAST, 2016). A linhagem padrão de *Candida albicans* SC5314 (gentilmente cedida pelo Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan, UNIFAL-MG), estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi inoculada em meio Ágar Sabouraud (HiMedia Laboratories), sendo incubada a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24h para crescimento. Posteriormente, uma colônia deste inóculo foi subcultivada em CHROMagar™ por 48 horas, para confirmação da pureza (EUCAST, 2016). A partir deste, selecionamos uma colônia e incubamos novamente para o crescimento e posterior realização dos testes.

O antifúngico sintético testado foi o Fluconazol (FLC) (SIGMA) com pureza  $\geq 98\%$  HPLC, solubilizado em água destilada estéril e posteriormente diluído em meio sintético RPMI-1640 (com glutamina e sem bicarbonato) tamponado a  $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$  com MOPS 0.165M (EUCAST, 2016; MELO, A. S. et al., 2011).

A Guttiferona-A (GUT), substância extraída a partir de sementes de *Rheedia brasiliensis*, coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram identificadas por um botânico da instituição e depositadas no herbário desta (VIC2604) (DEROGIS et al., 2008; SANTOS et al., 1999). As sementes foram secas e trituradas, tendo seu extrato obtido por maceração com n-hexano, sendo então filtrado e seco em rotaevaporador (DEROGIS et al., 2008). O composto foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos da UFV.

### 4.1 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *C. albicans*.

O teste de microdiluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras foi realizado segundo o documento E.Def 7.3.1 (EUCAST, 2016), com algumas modificações sugeridas no documento M27-S4 (2012) (CLSI, 2012; EUCAST, 2016).

A faixa de concentração dos compostos utilizados variou de 0,25 a 128 µg/mL para Fluconazol e de 0,060 a 100 µg/mL para Guttiferona-A, preparados no momento do teste. Após o preparo das diluições de fluconazol e Guttiferona-A, foram adicionados à placa de microtitulação estéril de 96 poços, volumes de 50 µL de cada diluição do antifúngico (Figura 7).

Em um tubo à parte, as células de *C. albicans*, previamente cultivadas em ágar Sabouraud, foram inoculadas em solução salina 0,9% e padronizadas a uma concentração de 0,5 na escala nefelométrica de McFarland. Estas células foram ressuspensas em 10 mL de RPMI 1640 (1:10) e 100 µL dessa suspensão do inóculo foi transferido para cada poço da placa. Um controle negativo (branco), com 200 µL do meio de cultura sem adição de microrganismo, foi realizado na coluna 1 da microplaca.

Nas colunas de 2 a 11, correspondentes as linhas A a G, foram realizados os testes com os compostos e microrganismos, de maneira isolada e combinada. A linha H apresentou a turvação da substância. Na coluna 12 realizamos o controle de crescimento (controle positivo), com 100 µL de meio de cultura e 100 µL da suspensão de leveduras, sem ativos, e na coluna 1, controle do meio de cultura (Figura 7).

As microplacas foram incubadas a 35°C por 48h e a leitura feita em leitor automatizado de placas a 530 nm. A concentração inibitória (IC), ou *endpoint*, foi determinada como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir 50% do crescimento microbiano em relação ao poço controle. Para os compostos utilizados foram determinadas apenas as IC<sub>50</sub>. (ARENDRUP et al., 2012; CLSI, 2008).

Os perfis de sensibilidade e resistência ao Fluconazol foram lidos a 530nm em leitor de placas automatizado e interpretados conforme proposto no documento M27-S4 (Tabela 2) (CLSI, 2012; EUCAST, 2016). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Tabela 1 – Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de *Candida* spp. de acordo com valores apresentados de IC pelo Método de Microdiluição em Caldo.

| Antifúngico | Sensibilidade (µg/mL) | Sensibilidade Dose Dependente (µg/mL) | Resistência (µg/mL) |
|-------------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Fluconazol  | ≤2                    | 4                                     | ≥8                  |

Fonte: Documento M27-S4 (CLSI, 2012).

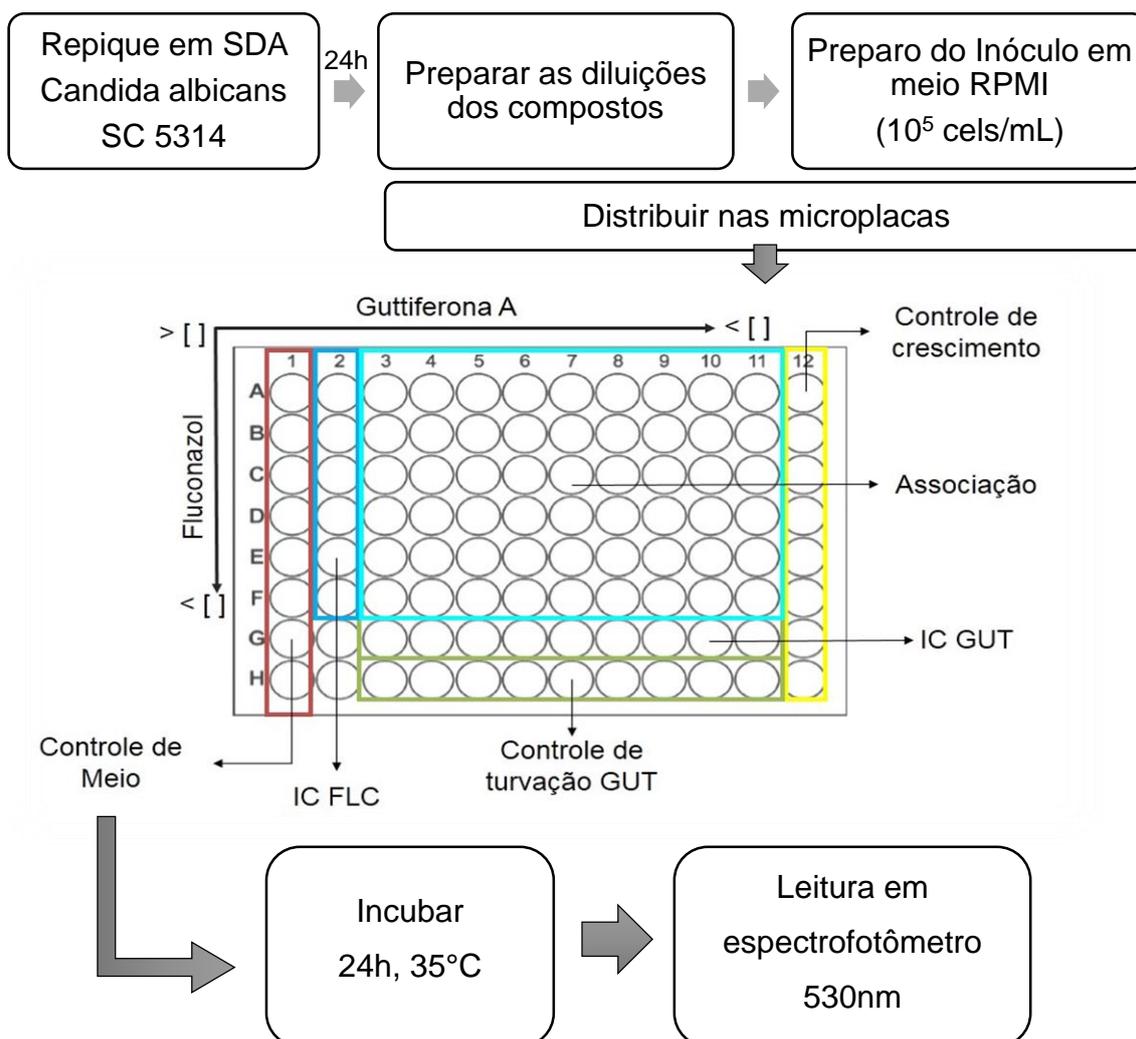


Figura 7 – Montagem das placas de 96 poços com distribuição das diluições dos compostos de maneira que todas as doses se encontrassem em associação sobre o microrganismo.

Fonte: Da autora, 2017.

## 4.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os biofilmes foram formados de acordo como descrito inicialmente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações sugeridas por Melo e colaboradores (2011). Realizamos um subcultivo de *C. albicans* em caldo RPMI 1640 e este foi incubado por 18 horas em estufa de agitação orbital com programação de 180 rpm, a 35°C. As células foram colhidas e lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina (Phosphate Buffered Saline - PBS) pH 7,2 e ajustadas a uma densidade óptica

de 0,4 em leitor espectrofotométrico a 530nm, equivalente a  $1-5 \times 10^7$  células/mL, em caldo RPMI 1640, para utilização logo após o preparo.

A adesão é iniciada por meio de interações hidrofóbicas e cargas eletrostáticas (SENEVIRATNE et al., 2008). Sendo assim, as placas escolhidas foram de poliestireno não tratado e, as cargas, foram estabilizadas pela umidificação de sua base externa, facilitando o processo de adesão e a expressão gênica específica para tal. Este processo dura em torno de 1,5h, podendo ser estendido até 2h (SENEVIRATNE et al., 2008). Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 100µL da ressuspensão celular e esta foi incubada em estufa de agitação orbital por 1,5h, a 37°C e 75rpm.

Posteriormente cada poço foi lavado com 150 µL de PBS, para a remoção de células não aderidas, e incubados por mais 24h sob as mesmas condições. Para controle do meio, uma coluna de poços em cada placa de microtitulação foi manuseada de maneira idêntica, exceto pela não adição de suspensão de *Candida* spp (Figura 8). Após esta incubação, os biofilmes foram lavados uma vez com 150 µL de PBS e invertidos em papel absorvente estéril para remoção máxima de tampão residual. Em seguida, estes foram expostos aos tratamentos.

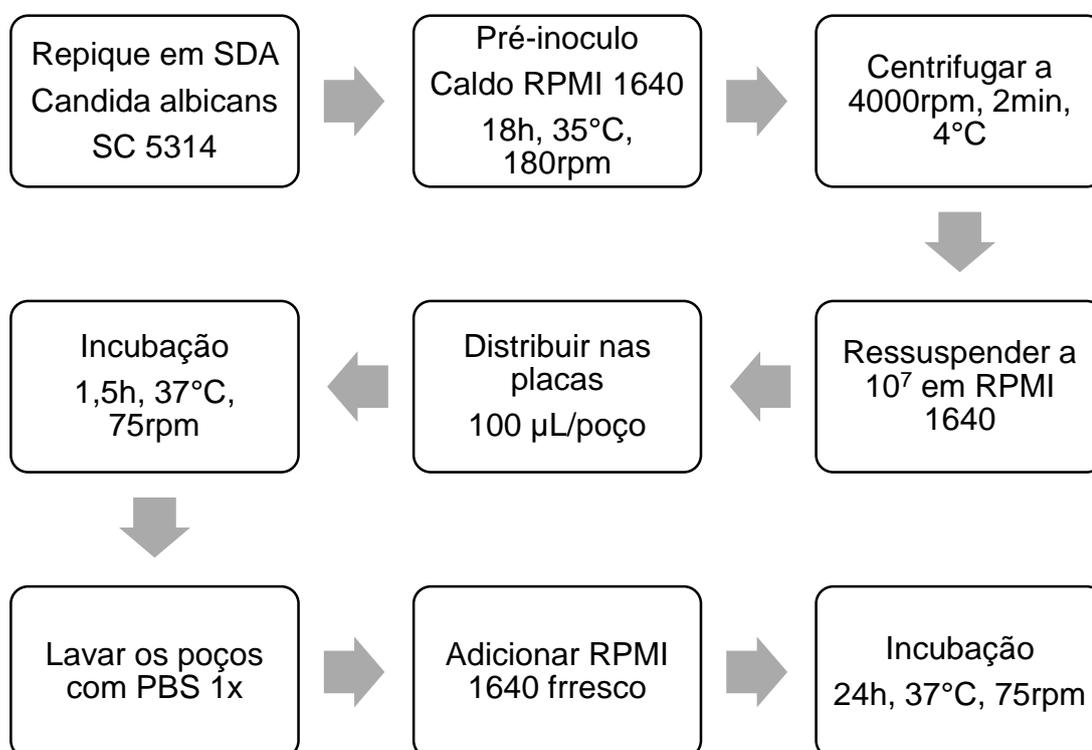


Figura 8 – Processo de montagem das placas de 96 poços para a formação dos biofilmes de *Candida* spp.

Fonte: Da autora, 2017.

#### 4.2.1 Determinação da sensibilidade em biofilmes de *C. albicans*.

Foram testadas 7 diluições seriadas, na razão de 1:2 (v/v), do Fluconazol, variando entre 16 e 1024 µg/mL, e 9 diluições de Guttiferona-A, partindo de 4 a 1024 µg/mL, preparadas no dia do teste em meio RPMI-1640, como descrito anteriormente no item 4.2.

Novamente, nas colunas de 2 a 11 foram realizados os testes com os compostos e microrganismos, no entanto neste, a linha H comportou os testes de inibição da substância isolada. Na coluna 12 realizamos o controle de crescimento (controle positivo), com 200 µL de meio de cultura, sem ativos, e na coluna 1, foi realizado o controle do meio de cultivo. Como não há adição de suspensão de microrganismos, foram adicionados 100µL de cada diluição de Fluconazol e Guttiferona-A tendo, nos poços de atividade isolada, a concentração ajustada com 100µL RPMI (Figura 7, com exclusão do controle de turvação).

As microplacas foram incubadas a 35°C, por 48h a 75rpm.

Após 48h, cada poço teve o meio aspirado e lavado com 200 µL de tampão PBS por três vezes, para a remoção de células não aderidas e dos compostos. Em seguida foi feita a avaliação da atividade metabólica do biofilme, realizada através do ensaio de redução do XTT.

Para avaliação da atividade metabólica foi realizado o ensaio de redução do XTT (2,3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Sigma- Aldrich), conforme método descrito anteriormente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações.

O XTT foi solubilizado a 1 mg/mL em PBS e reservado. Uma solução de Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) foi preparada (0,4 mM) em acetona e misturada a solução de XTT, a uma proporção de 1:5 (v/v), respectivamente. Em seguida a mistura foi ressuspensa em 20 mL de PBS e filtrada.

Em cada poço, pré-lavados três vezes com PBS, foram adicionados 200µL da solução XTT-Menadiona e a placa incubada ao abrigo da luz, durante 2h a 37°C. A mudança na coloração é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada, portanto, quanto maior a absorbância, maior o número de células metabolicamente ativas, uma vez que o ensaio de redução de XTT quantifica a

capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel (XTT) (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja).

Após a incubação, 100  $\mu\text{L}$  de solução foram transferidos para uma nova placa e avaliados em leitor de microplacas a 490 nm (Figura 9). Todas as densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco e a absorbância do controle positivo (biofilme formado sem adição de antifúngico) foi considerada 100%. A IC das células sésseis foi determinada de acordo com a inibição de, no mínimo, 50% da atividade metabólica dos biofilmes tratados com Fluconazol e Guttiferona-A. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

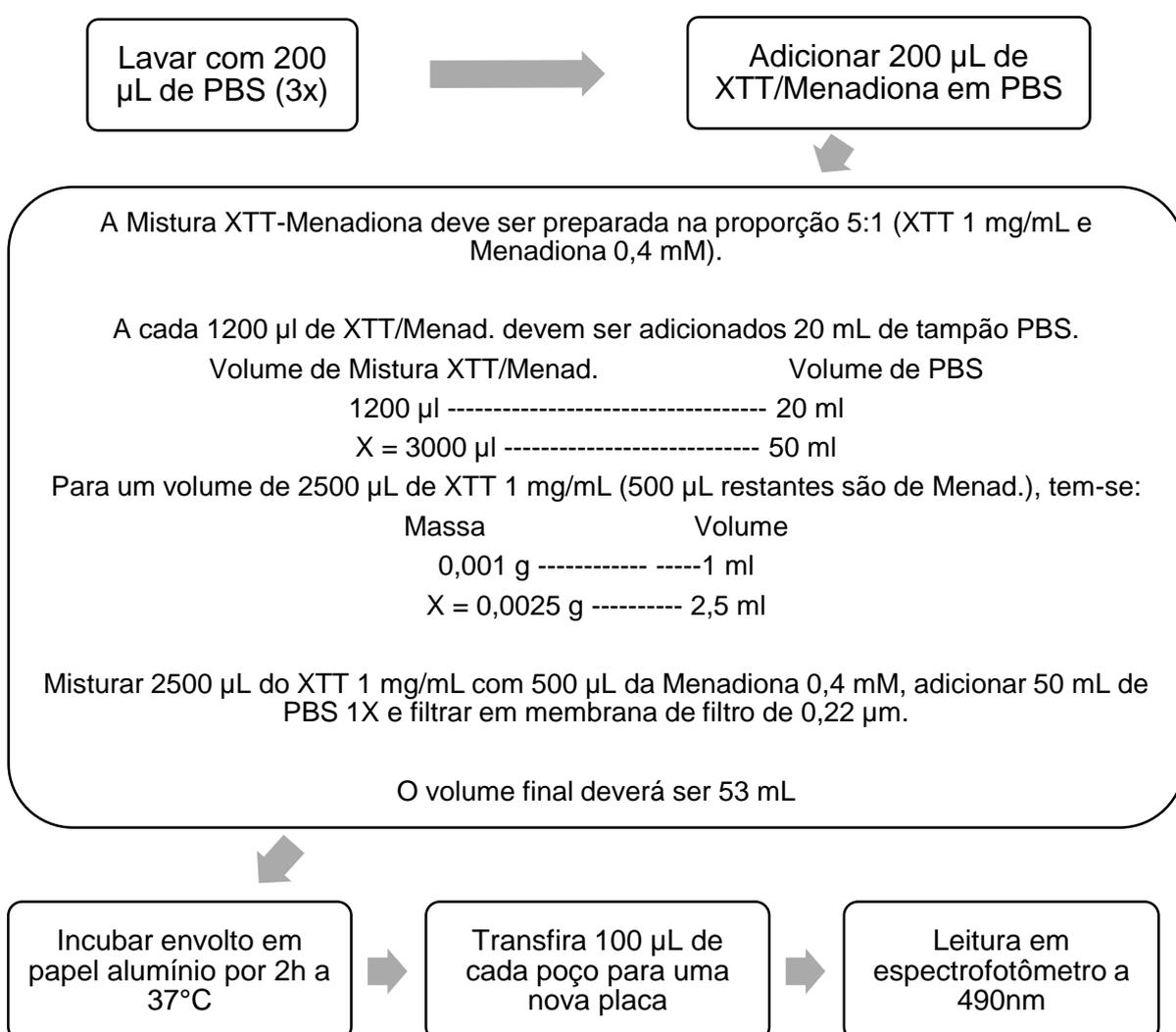


Figura 9 – Processo de análise das placas de 96 poços com biofilmes de *Candida* spp. pelo método do XTT/Menadiona.

Fonte: Da autora, 2017.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL

A quantificação do ergosterol prosseguiu de acordo com o protocolo descrito por Breivik e Owades (1956) com algumas modificações. A partir de um repique de 24h de *C. albicans* em ágar Sabouraud, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de Caldo Sabouraud contendo tratamentos correspondentes a IC e 1/4 IC de cada composto e da associação com maior sinergismo.

Os valores de tratamento foram 0,125µg/mL e 0,031µg/mL para FLC; e 7,5 µg/mL e 1,875 µg/mL para GUT. Para a associação, escolhemos aquela que apresentou maior sinergismo: 0,5µg/mL de FLC associado a 0,47µg/mL de GUT e 1/4 desta, 0,125 µg/mL somados a 0,117 µg/mL de GUT. Um controle de crescimento e de meio também foram realizados.

Os cultivos foram incubados por 16 horas, a 130rpm e 35°C. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação a 2700 rpm por 5 minutos, lavadas 1x com água destilada estéril e o peso do sedimento foi determinado. Em cada amostra foram adicionados 3mL de solução alcoólica de KOH 25% (25g de KOH diluídos em 35mL de água destilada estéril e quantidade suficiente para – q.s.p. 100mL de Etanol P.A.) e agitados vigorosamente durante 1 minuto. As suspensões foram transferidas para tubos de vidro com tampa e incubados durante 1 hora em banho-maria a 85°C, sendo resfriados logo após, a temperatura ambiente. O esterol foi separado pela adição de 1mL de água destilada estéril e 3mL de N-Heptano, seguido por agitação vigorosa durante 3 minutos. A fase transparente foi então transferida para novos tubos de vidro e incubadas a -20°C por 24 horas (Figura 10).

Para a quantificação, uma alíquota de 0,6mL da amostra foi diluída 5x em Etanol PA e lida em espectrofotômetro entre 230 e 300nm (UV). A presença do ergosterol e do esterol intermediário 24(28) DHE resultam em uma curva de 4 picos e, a ausência destes, em uma linha tênue.

O ergosterol é calculado de acordo com a porcentagem da quantidade de células, ou peso do sedimento. Para isso, usamos:

$$\% \text{Ergosterol} = \left( \frac{[A_{(281,5)} / 290] \times F}{\text{Peso do sedimento}} \right) \left( \frac{[A_{(230)} / 518] \times F}{\text{Peso do sedimento}} \right)$$

Onde  $F$  é o fator de diluição no Etanol e 290 e 518 são os  $E$  values (%/cm) determinados pelo ergosterol e 24(28)DHE cristalinos, respectivamente (BREIVIK; OWADES, 1956).

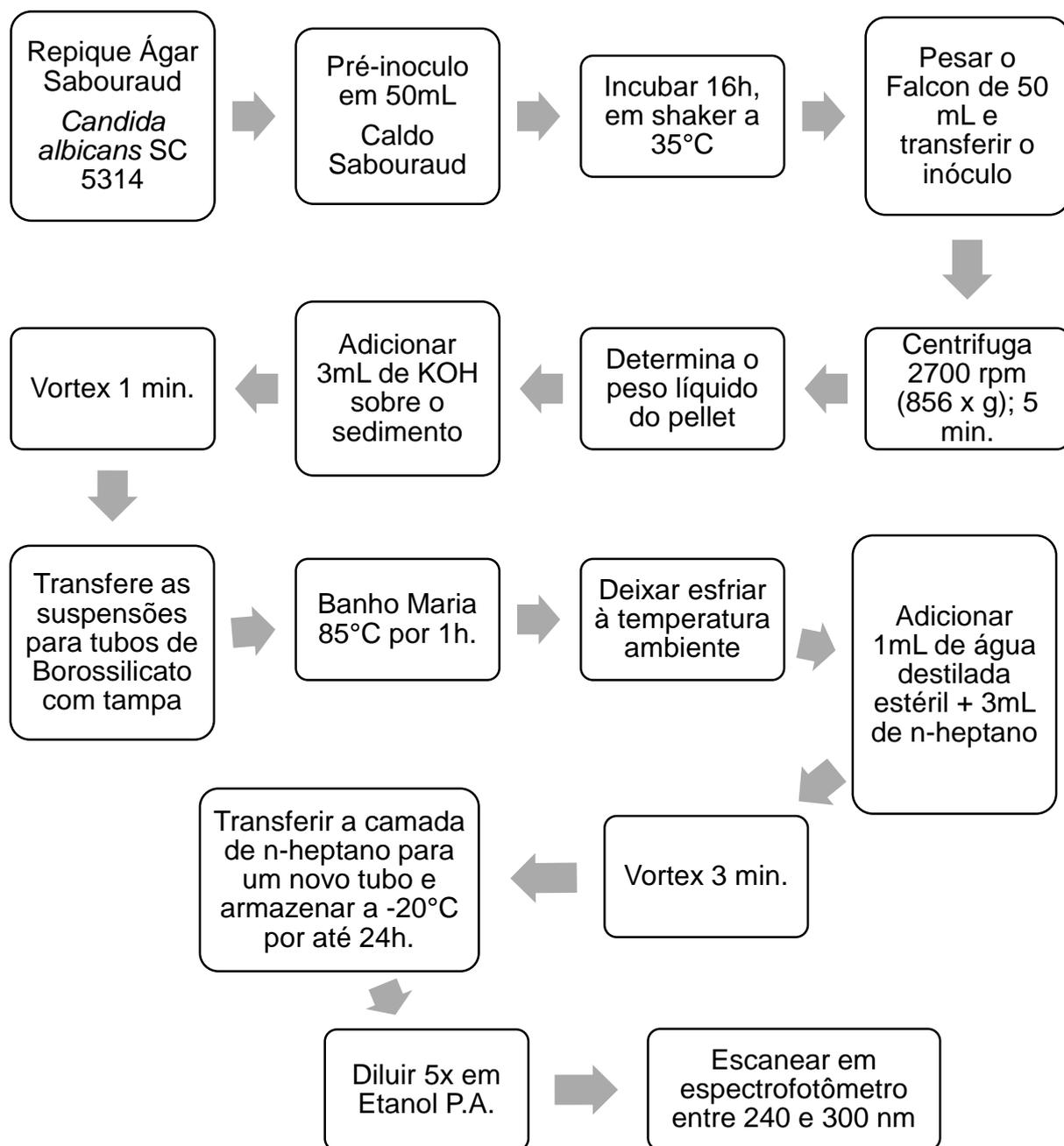


Figura 10 – Processo de Quantificação do ergosterol produzido pelas células com e sem tratamento. Fonte: Da autora, 2017.

#### 4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para avaliar a topografia celular e dos biofilmes, utilizamos 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), obtido por meio do FINEP (Proc. 0179/12).

As células tratadas foram colocadas sobre lamínulas 13mm e secas a temperatura ambiente. As imagens possuem, aproximadamente, 50µm x 50µm e 20µm x 20µm 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).

#### 4.5 ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ASPARTATO PROTEASES

As concentrações nas quais foi conferida as ICs e a ação sinérgica foram selecionadas e refeitas em volumes de 50mL em RPMI 1640. As células foram colhidas e lavadas duas vezes com PBS gelado, sendo centrifugadas por 4 minutos, a 4000 rpm, sob temperatura de 4°C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de tampão de extração (760 µL de Água DEPC; 100 µL de TRIS-HCL 2M, pH8; 40 µL de NaCl 0,25M (14,62g diluído a 1M); 50 µL de EDTA 0,5M; 50 µL SDS), preparado no momento do procedimento, junto a uma pequena porção de pérolas de vidro.

A suspensão foi agitada vigorosamente por 20 minutos, para rompimento da parede celular do fungo, e, em seguida, centrifugada por 2 minutos a 14000rpm. O sobrenadante obtido foi recolhido e adicionado sobre 1mL de TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific), já contido em um novo tubo. Após isso, os tubos foram homogeneizados, foi adicionado 400µl de clorofórmio e novamente agitados. Durante todo o procedimento os tubos foram mantidos, quando possível, em banho gelo. As amostras foram centrifugadas novamente por 15 minutos, a 4000 rpm, estando sempre sob temperatura de 4°C.

A fase aquosa obtida foi transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionado isopropanol, em volume aproximadamente igual ao conteúdo já presente no tubo (1:1) e agitados. Estes tubos foram incubados em freezer por 30 minutos para a precipitação do material genético. Decorrido este tempo, foi feita a centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O RNA foi então, lavado duas vezes com álcool 75%, nas condições já programadas de centrifugação (14000rpm/15min./4°C), removido o máximo do sobrenadante e seco à temperatura ambiente. Para isto, os tubos foram deixados com as tampas abertas por 10 minutos, sobre a bancada. O RNA obtido foi então ressuspensão em 30µl de água livre de RNases (DEPC).

#### 4.5.1 Tratamento do RNA e Transcrição Reversa.

Para operar a construção da fita de DNA complementar (c-DNA) as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific).

Após a quantificação realizamos o tratamento com DNase I (Invitrogen™ - ThermoFisher Scientific), para a eliminação de possíveis contaminantes e DNA residual. Para este procedimento, foram calculados e adicionados em tubos para PCR, aproximadamente, 2000 ng de amostra de RNA diluídos em 8 µL de água, 1 µL do Reaction Buffer 10x (400mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM MgSO<sub>4</sub> e 10mM CaCl<sub>2</sub>) e 1µL de DNase I (1U/µL). Após serem gentilmente homogeneizados, foram incubados por cerca de 15 minutos à temperatura de aproximadamente 37°C. Após este repouso, uma solução de parada (20mM EGTA; pH 8,0) foi adicionada para blindar os íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e impedir que catalisassem a hidrólise do RNA.

Os tubos foram então aquecidos a 70°C durante 10 minutos para a desnaturação da DNase I e do RNA e, em seguida, resfriados em banho de gelo, seguindo imediatamente para a transcrição reversa.

A transcrição reversa foi realizada de acordo com as indicações do fabricante da enzima recombinante, com algumas modificações. Para isso, foram preparadas duas misturas (Mix 1 e Mix 2). Os Mixes foram constituídos em um frasco cada um, para posterior distribuição sobre as amostras. No Mix 1, foram adicionados os

desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs – 10mM) e o primer Oligo-dT (0,5 µg/mL). Todos foram calculados previamente para que contivessem 1µL de dNTPs e 1µL do primer específico por tubo de amostra. No Mix 2, foram adicionados 2µL de DL-Dithiothreitol (DTT - 0,1M), 4µL de tampão 5x First-Strand Buffer (250mM Tris-HCl, pH 8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>) e 1 µL da polimerase recombinante M-MLV (200U/µL), multiplicados pela quantidade de amostra. Todas as amostras foram padronizadas com uma concentração de RNA de, aproximadamente, 1000ng/tubo e destes, utilizamos 11µL.

Nos tubos já contendo 11µL das amostras, foi adicionado o Mix 1, de acordo com as concentrações descritas acima, e estes prosseguiram para o termociclador (Applied Biosystems - ThermoFisher Scientific). O aparelho foi programado para realizar 5 minutos a 65°C, onde, decorridos 4 minutos e 30 segundos, foi adicionado o Mix 2. Em seguida, os tubos passaram por 50 minutos de incubação a 37°C. Após isto, as amostras foram expostas durante 5 minutos a uma temperatura de 95°C e, então, finalizando o processo a 12°C.

#### 4.5.2 PCR em tempo real

Para PCR em tempo real (qPCR) foram utilizadas sondas de hidrólise duplamente marcadas do tipo TaqMan®, que possuem o fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e o “quencher” Iowa Black®FQ na extremidade 3'. As sequências dos primers utilizados foi retirada do trabalho de Naglik e colaboradores (2008), para síntese destes (Anexo I).

Para a detecção da expressão do gene *SAP10* nas amostras, 3 µL de cDNA foram adicionados a 10µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X e 1 µL da mistura contendo os iniciadores para o gene *SAP10* (18µM).

No StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems - ThermoFisher Scientific), um ciclo de 50°C por 2 minutos removeu qualquer ligação inadequada evitando contaminação cruzada. Em seguida, um ciclo de 95°C por 10 minutos promoveu a desnaturação das cadeias de cDNA e a ativação da Taq polimerase. A amplificação ocorreu através da realização de 40 ciclos, sendo cada um de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O nível de background fluorescente (“baseline”) e o limiar para a fluorescência FAM (“Threshold”) foram programados manualmente.

Os dados obtidos na RT-PCR foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Os “Cycle Threshold” ( $C_T$ ), pontos que detectam o ciclo no qual cada reação atinge o limiar da fase exponencial, são utilizados para análise relativa de alterações da expressão do gene alvo comparado a expressão do mesmo gene em um grupo controle de crescimento sem tratamento (SCHMITTGEN; LIVAK, 2001).

Resultados com  $C_T$  indeterminado foram considerados válidos e relatados como negativos para a presença do DNA alvo. Resultados com  $C_T \leq 37$  estão relatados como positivos para a presença do DNA alvo. Quanto maior for o valor do  $C_T$ , menor foi o número de cópias do gene amplificado.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O trabalho utiliza o delineamento inteiramente casualizado.

Realizamos testes de Análise de Variância e com o pós-teste de Bonferroni para o teste de médias, com intervalo de confiança de 95%, e Regressão Não-Linear para as análises de Dose-Resposta dos compostos. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, considerando significativas quando  $p\text{-valor} < 0,05$ .

Em todas as análises matemáticas utilizamos o software GraphPad® Prism 5.01 (2009), enquanto que, para as análises de interações, foi usado o software ComboSyn, Inc. (2005) e para análise de imagens de AFM foi utilizado o programa XEI™ 1.8.2 AFM Data Analysis Software (2013).

## 5 RESULTADOS

As amostras padrões ATCC 90028, ATCC 64548, ATCC 10231, ATCC 09543 e SC 5314 de *Candida albicans* foram testadas e a sensibilidade das linhagens foram analisadas de acordo com o documento EUCAST E.Def 7.3.1 (2016), com algumas modificações (Figura 11). A amostra ATCC 10231 ( $0,133 \pm 0,01$ ) apresentou resistência a todas as doses de Fluconazol testadas. As linhagens ATCC 09543 ( $0,0691 \pm 0,03$ ) e ATCC 64548 ( $0,0571 \pm 0,04$ ) se mostraram sensíveis a tratamentos com  $0,5 \mu\text{g/mL}$  de FLC (CLSI, 2012; EUCAST, 2016). SC 5314 ( $0,0598 \pm 0,01$ ) foi a única linhagem que obteve inibição de 50% do crescimento com doses inferiores a  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . A partir dos dados obtidos, optamos trabalhar com esta linhagem.

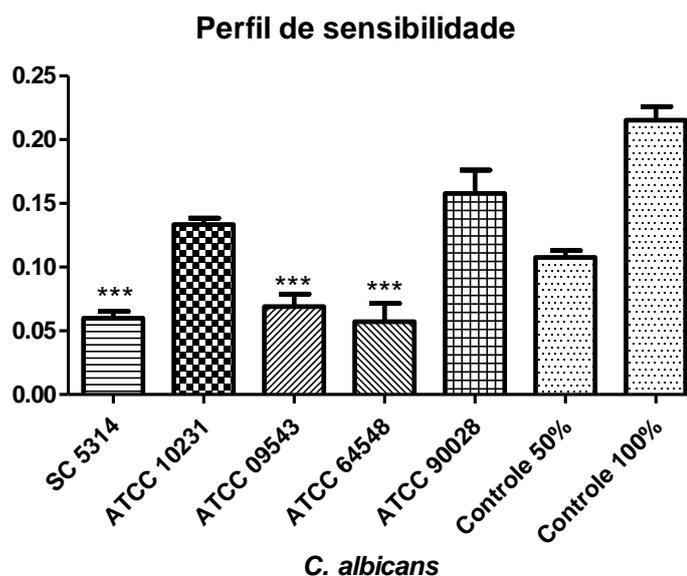


Figura 11 – Perfil de sensibilidade das amostras de *C. albicans* ao FLC, em relação ao controle, obtido por teste de microdiluição em caldo, realizado a partir do documento M27-S4 (CLSI, 2012) e submetidos a leituras espectrofotométricas a 530nm, após 24h de exposição de acordo com o documento E.Def 7.3.1 (EUCAST, 2016) ( $p < 0,001$ ).

Fonte: Da autora, 2017.

Com a amostra definida, os biofilmes (BF) foram formados e padronizados em seu crescimento, sendo todos os aspectos de desenvolvimento e adesão celular observados. Após a incubação de 48h, foi realizado o ensaio de redução do XTT. Esta análise mostrou a atividade metabólica homogênea na placa ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).

### Padronização do crescimento

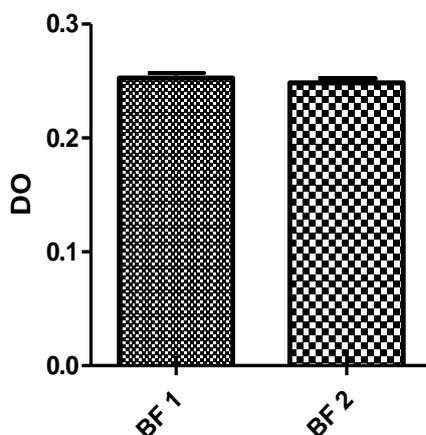


Figura 12 – Teste de padronização do crescimento em biofilmes (BF) por cultivo em placa, avaliado por meio da média obtida no ensaio de redução do XTT, após 48h da última lavagem.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Não houve diferença significativa entre os testes ( $p > 0,05$ ).

## 5.1 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ENSAIO DE ASSOCIAÇÕES ENTRE COMPOSTOS SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS

As células planctônicas se mostraram sensíveis ao fluconazol (FLC), com inibição de 50% do crescimento, quando tratadas com doses a partir de 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Sob os tratamentos com Guttiferona A (GUT), a mesma linhagem necessitou de 7,5  $\mu\text{g/mL}$  para ter seu crescimento inibido em 50% (Figura 13).

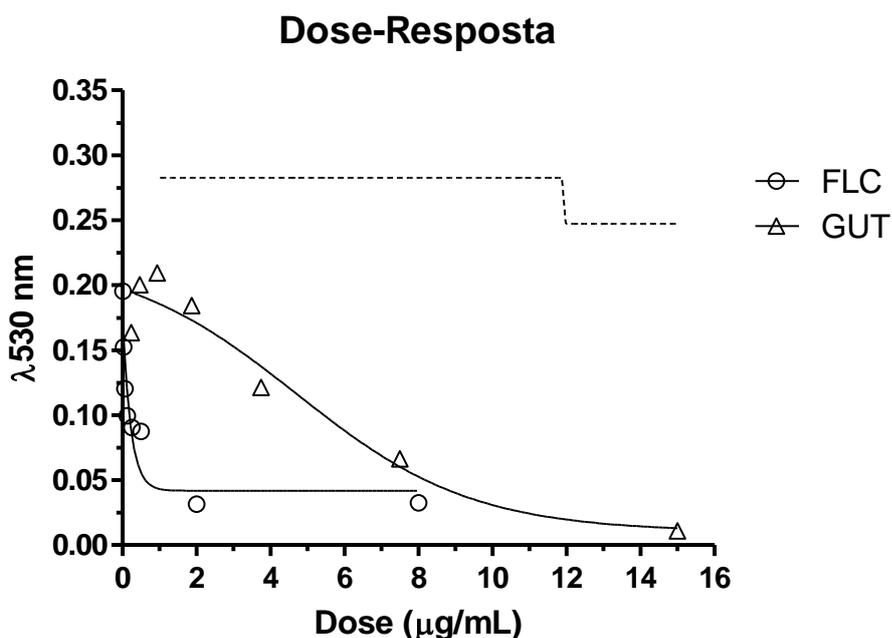


Figura 13 – Curvas de Dose-Resposta de Fluconazol (FLC) e Guttiferona A (GUT) sobre células planctônicas de *C. albicans* SC 5314.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Linha tracejada corresponde a 100% do crescimento celular. Teste de microdiluição em caldo baseado nos documentos M27-S4 (CLSI, 2012) e E.Def 7.3.1 (EUCAST, 2016). As placas foram submetidas a leituras espectrofotométricas a 530 nm após 48h de exposição. DO – Densidade óptica celular.

Pelo *checkerboard*, cruzamos as concentrações de cada fármaco isolado obtendo as combinações entre estes. As inibições variaram entre 50% a 90% com um FICI = 0,156 (Tabela 3). As combinações foram então analisadas no Isoblograma, que leva em consideração a lei de ação das massas, permitindo uma análise mais detalhada do efeito promovido. A associação que apresentou maior sinergismo foi 0,5 μg/mL de FLC combinado a 0,469 μg/mL de GUT (Figura 14). Esta combinação provocou a inibição de 75% do crescimento celular, enquanto que, 0,5 μg/mL de FLC sozinho foi capaz de inibir apenas 50% do crescimento.

Tabela 2 – Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações de FLC a GUT.

|               | Concentração (μg/mL) | FIC    | FICI  |
|---------------|----------------------|--------|-------|
| MIC GUT comb. | 0,234                | 0,0312 | 0,156 |
| IC GUT        | 7,5                  |        |       |
| MIC FLC comb. | 0,016                | 0,1248 |       |
| IC FLC        | 0,125                |        |       |

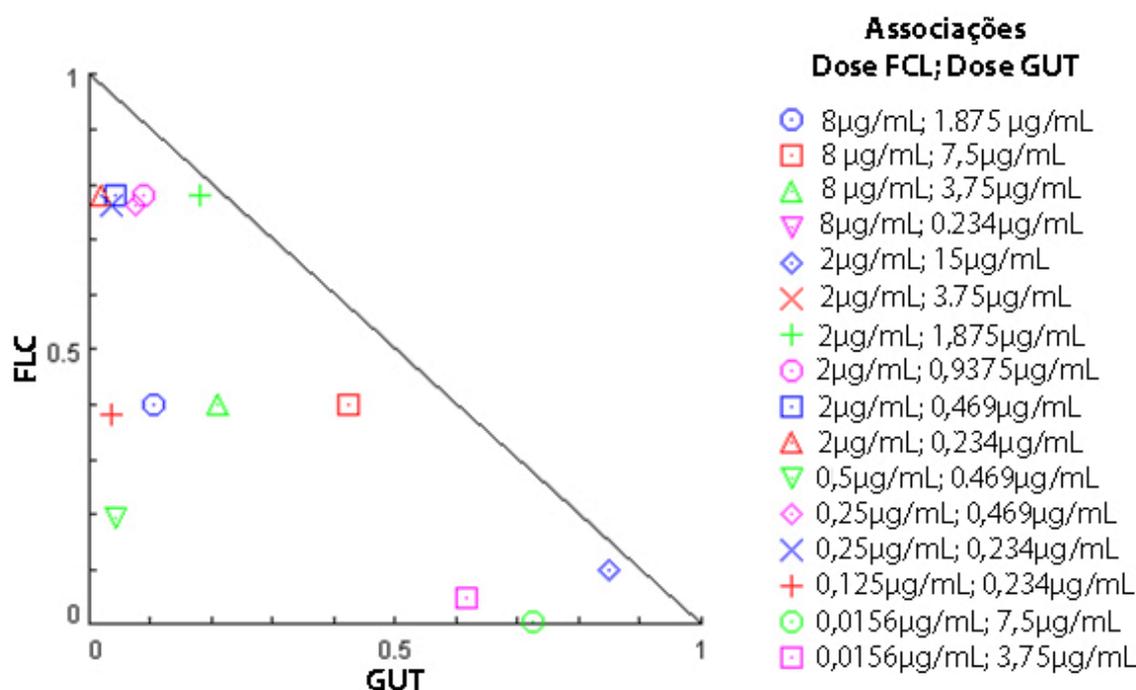


Figura 14 – Isoblograma representativo de todas as associações com inibições acima de 50%.  
Fonte: Da autora, 2017.

Nota: A posição dos pontos mostra a potencialização dos efeitos do fluconazol sobre as células do biofilme. Quanto mais próximo do 0 maior é o efeito, ou seja, maior será o sinergismo.

A partir destes dados, passamos a testar apenas as concentrações inibitórias 0,125 µg/mL para FLC, 7,5 µg/mL para GUT e a associação 0,5 µg/mL de FLC com 0,469 µg/mL de GUT, que apresentou 75% de inibição do crescimento celular. Testamos também ¼ destas, de modo a saber qual significância haveria em hipótese de profilaxia, sendo 0,0312 µg/mL para o FLC, 3,75 µg/mL para a GUT e ¼ de cada dose usada na associação selecionada (FLC 0,125 µg/mL x GUT 0,117 µg/mL).

### 5.1.1 Análise em Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para avaliar se os compostos e a associação provocavam alterações na topografia da célula, analisamos microscopicamente por força atômica. Neste podemos observar que, no controle de crescimento, as células variaram de tamanhos, tendo, em média, 2,69 µm de diâmetro ( $\pm 1,09$ ). As células planctônicas tratadas com FLC (2,75 µm  $\pm$  0,14) e GUT (2,93 µm  $\pm$  0,22) não apresentaram alterações topográficas nem quanto o tamanho celular, em relação ao controle ( $p > 0,05$ ). Quando

aplicado o tratamento associado ( $3,76 \mu\text{m} \pm 0,62$ ), as células exibiram um tamanho maior do que as células sem tratamento ( $p < 0,001$ ) (Figuras 15 e 16).

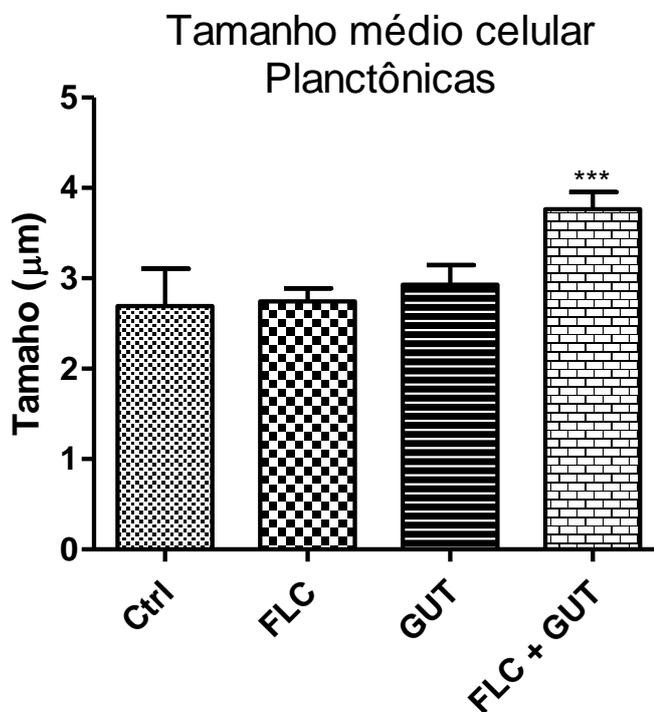


Figura 15 – Tamanho das células planctônicas cultivadas sob os tratamentos  $0,125 \mu\text{g/mL}$  para FLC,  $7,5 \mu\text{g/mL}$  para GUT e Associação FLC+GUT ( $0,5 \mu\text{g/mL}$  de FLC x  $0,469 \mu\text{g/mL}$  de GUT) (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Média de células contadas por análise: 10 células.

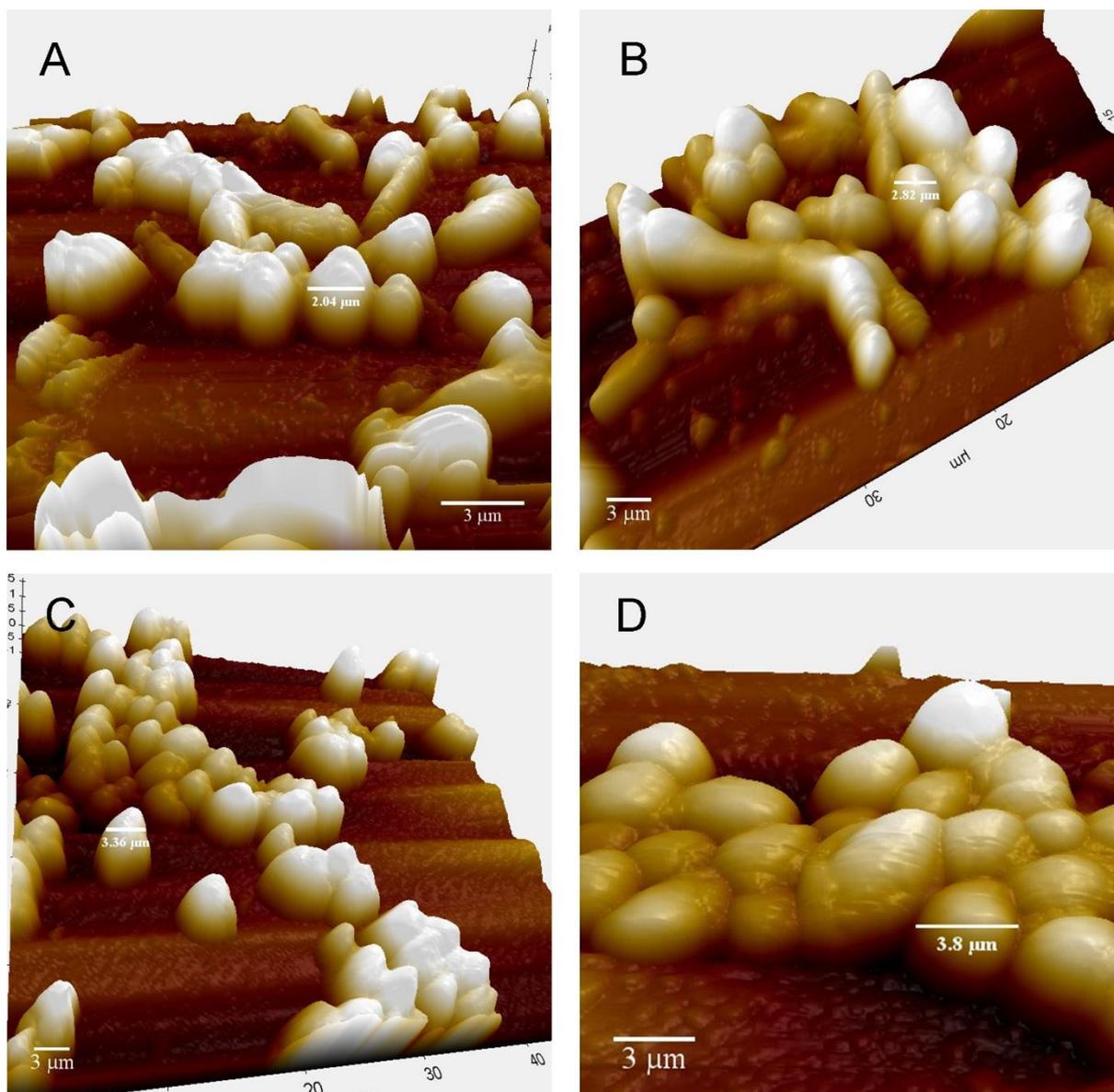


Figura 16 – AFM de células planctônicas de *C. albicans* SC 5314.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: (A) Controle de crescimento; (B) FLC 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (C) GUT 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (D) Associação de maior ação sinérgica – 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FLC + 0,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de GUT.

### 5.1.2 Quantificação do Ergosterol

Devido ao crescimento do fungo ter sido reduzido a 25% com a associação entre FLC e GUT, sob baixas dosagens (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FLC x 0,469  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GUT), e estas células apresentarem aumento de tamanho, hipotetizamos a ocorrência de um possível ponto de ação na membrana e/ou na parede celular. Com o objetivo de

verificar se a GUT atua na via de síntese do ergosterol, principal esterol da membrana do fungo, realizarmos a quantificação deste.

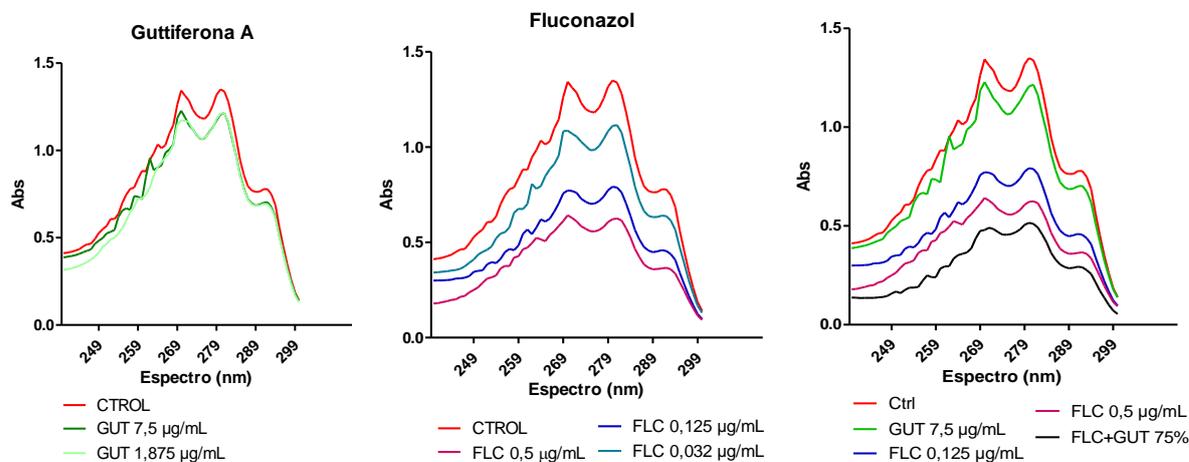


Figura 17 – Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol obtido da linhagem SC 5314 sob os tratamentos de GUT (7,5µg/mL), FLC (0,125µg/mL) e da associação com maior sinergismo (0,5µg/mL de FLC x 0,47µg/mL de GUT).

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: A presença do ergosterol é percebida pela altura dos picos, quanto maior a concentração, mais alto o pico.

Observamos que, a produção deste esterol em células de *C. albicans* sem tratamento, é responsável por 1,86% ( $\pm 0,11$ ) do peso líquido celular. Sob tratamento com FLC, que atua diretamente nesta via, a produção se restringiu pela metade, atingindo em média 1,17% ( $\pm 0,23$ ) do peso líquido celular ( $p < 0,05$ ). O tratamento com GUT não apresentou redução significativa no esterol, sendo responsável por cerca de 1,7% ( $\pm 0,02$ ) do peso líquido das células ( $p > 0,05$ ). Com tratamento subinibitório de  $\frac{1}{4}$  da IC de GUT, a quantificação se manteve, o que nos leva a descartar a possibilidade de atuação deste composto pela via de síntese do ergosterol (Figura 17). No entanto, quando associados, os compostos promoveram uma forte queda na produção do esterol, chegando a 0,79% do peso líquido obtido ( $p < 0,001$ ) (Figura 18).

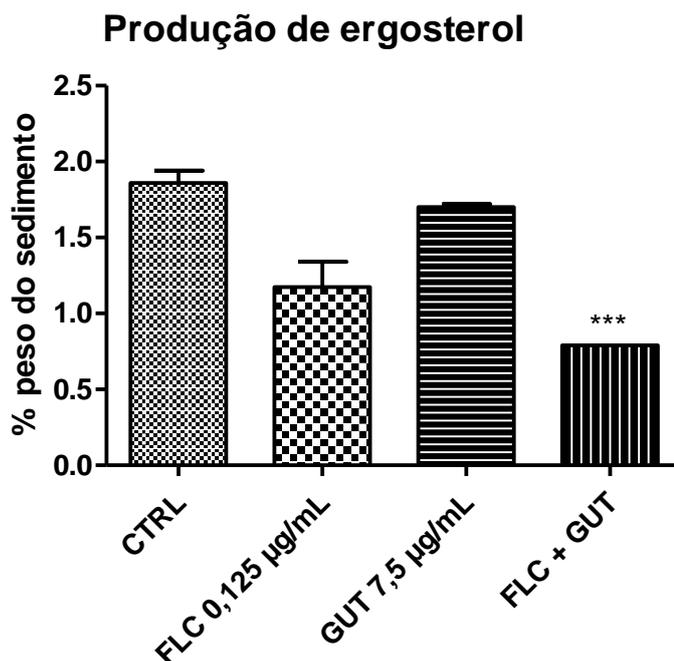


Figura 18 – Porcentagem de produção do ergosterol / peso do sedimento obtido da linhagem SC 5314 sob os tratamentos de GUT (7,5 µg/mL), FLC (0,125 µg/mL) e da associação sinérgica com 75% de inibição do crescimento (0,5 µg/mL de FLC x 0,47 µg/mL de GUT) ( $p < 0,001$ ).

Fonte: Da autora, 2017.

### 5.1.3 Análise da expressão gênica em células planctônicas

Avaliamos quantitativamente os genes *SAP9* e *SAP10*, que estão ligados a manutenção da morfologia celular de *C. albicans*. O método utilizado foi pelo TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific) conforme descrito anteriormente. Os controles de crescimento apresentaram, visualmente, uma maior densidade celular, enquanto que, as células tratadas, apresentaram um menor volume em massa devido aos tratamentos de inibição do crescimento. A qualidade do material extraído pôde ser verificada pelos valores das relações 260/280, que avalia a pureza do material, e 260/230, que quantifica a relação entre a quantidade de RNA total extraído e os valores de fenóis, contidos na diluição (BUSTIN et al., 2009).

Sob tratamento, *SAP9* teve sua expressão levemente alterada, chegando a ter 1,2 vez a expressão do considerado normal (grupo controle), quando as células foram

tratadas com GUT 7,5  $\mu\text{g/mL}$  (IC50). A presença de  $\frac{1}{4}$  desta concentração aumentou para 1,5 vez a expressão de *SAP9*. Este mesmo perfil de aumento na expressão foi observado nos tratamentos com FLC, tanto nas concentrações inibitórias (0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) quanto em  $\frac{1}{4}$  destas (Figura 19).

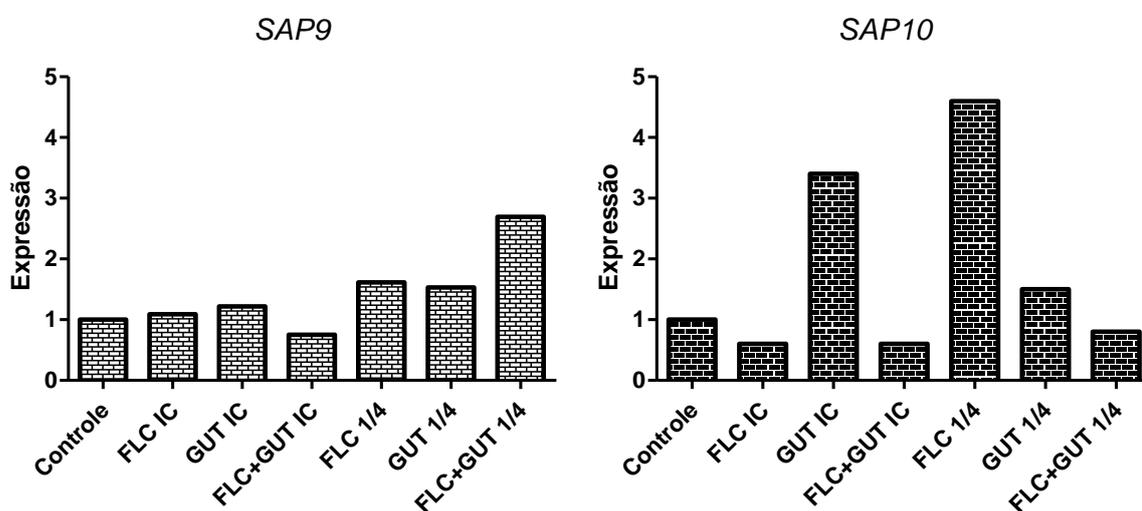


Figura 19 – RT-PCR. Expressão dos genes *SAP9* e *SAP10* antes e após os tratamentos com doses inibitórias e subinibitórias de compostos com atividade antifúngica e a associação sinérgica.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Valores de *SAP9* e *SAP10* expressos pela média dos Ct obtidos. Variação: *ACT1* (0 - 2Ct).

A associação permitiu uma redução na expressão do gene *SAP9* a níveis abaixo dos expressos pelo controle, enquanto que, a presença destas drogas em doses de  $\frac{1}{4}$ , também associadas, aumentou em quase 3 vezes a expressão deste gene. As doses subinibitórias da associação foram bastante baixas, girando em torno de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  de FLC e 0,117  $\mu\text{g/mL}$  de GUT. Esta dose isolada de FLC, não apresentou tamanha potencialização na inibição da expressão.

A *Sap10p*, frente aos tratamentos, foi suprimida com FLC e com a associação, nas doses inibitórias testadas. No entanto, a GUT 7,5  $\mu\text{g/mL}$  promoveu um aumento de mais de 3 vezes, comparado ao controle, enquanto que  $\frac{1}{4}$  do FLC regulou em quase 5 vezes acima da expressão do grupo controle. A presença de  $\frac{1}{4}$  de GUT aumentou a expressão em 1,5 vez. Na associação, ambos os tratamentos (IC e  $\frac{1}{4}$ ) suprimiram a expressão desta aspartato protease.

As alterações na expressão ocorridas sob os tratamentos com a associação podem ter influenciado na alteração da morfologia celular observada pela microscopia de força atômica.

## 5.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ENSAIO DE ASSOCIAÇÕES ENTRE COMPOSTOS SOBRE BIOFILMES

A partir dos dados obtidos com as células planctônicas, iniciamos os tratamentos dos biofilmes com doses a partir de 16  $\mu\text{g/mL}$  para FLC e GUT. Nestes, já foi constatado que a resistência aos antimicrobianos pode ser aumentada em até 1000 vezes (TOBUDIC et al., 2012).

A linhagem *C. albicans* SC5314, não apresentou suscetibilidade ao fluconazol (Figura 18), sendo a inibição máxima obtida de 25% do crescimento, corroborando os testes feitos por Ramage e colaboradores (2002). De acordo com este autor, por ser o FLC um agente fungistático, ele apresenta fraca ou nenhuma atividade sobre células em biofilmes (RAMAGE et al., 2002). Além disso, nem a GUT, nem as associações foram capazes de inibir a atividade metabólica celular, mostrando a capacidade de resistência desta conformação (Figura 20).

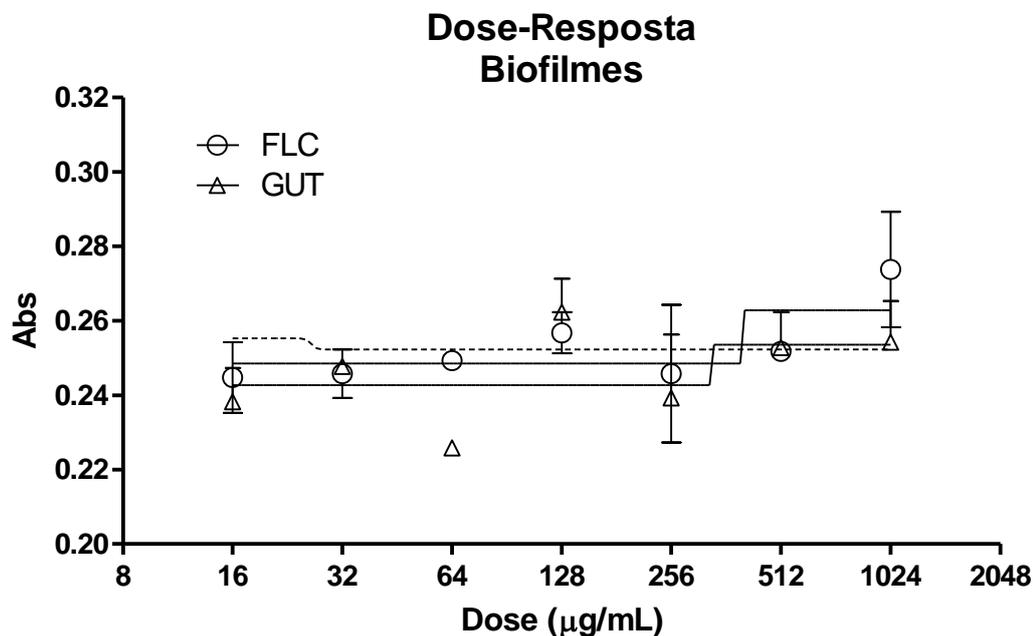


Figura 20 – Curvas de Dose-Resposta de Fluconazol (FLC) e Guttiferona A (GUT) ( $\mu\text{g/mL}$ ) sobre biofilmes de *C. albicans* SC 5314, obtidas a partir da análise do ensaio de redução do XTT, após 48h de incubação.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: FLC (16 – 1024  $\mu\text{g/mL}$ ); GUT (16 – 1024  $\mu\text{g/mL}$ ); Linha tracejada corresponde ao controle de crescimento.

Com estes dados, selecionamos as concentrações máximas e mínimas de FLC (16  $\mu\text{g/mL}$  e 1024  $\mu\text{g/mL}$ ) e GUT (16  $\mu\text{g/mL}$  e 1024  $\mu\text{g/mL}$ ) testadas para avaliarmos topograficamente os biofilmes, utilizando a Microscopia de Força Atômica (AFM).

Nos biofilmes, observamos uma concentração de matriz extracelular elevada e a presença de hifas (Figura 21). A GUT 1024  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um aumento no volume da biomassa, avaliada pelo cristal violeta 0,4%, quando comparado com o controle e outros tratamentos ( $p < 0.001$ ) (Figuras 21 e 23). Esta diferença também pode ser observada quando analisamos as imagens em AFM, no qual os biofilmes de GUT 1024  $\mu\text{g/mL}$  apresentam uma altura (z) de até 3  $\mu\text{m}$ , enquanto que nos demais, a altura média é de 1,3  $\mu\text{m}$  (Figura 20). Apesar disto, foram as células tratadas com GUT 16  $\mu\text{g/mL}$  que se mostraram maiores em relação ao controle e aos demais tratamentos ( $p < 0,001$ ) (Figura 21).

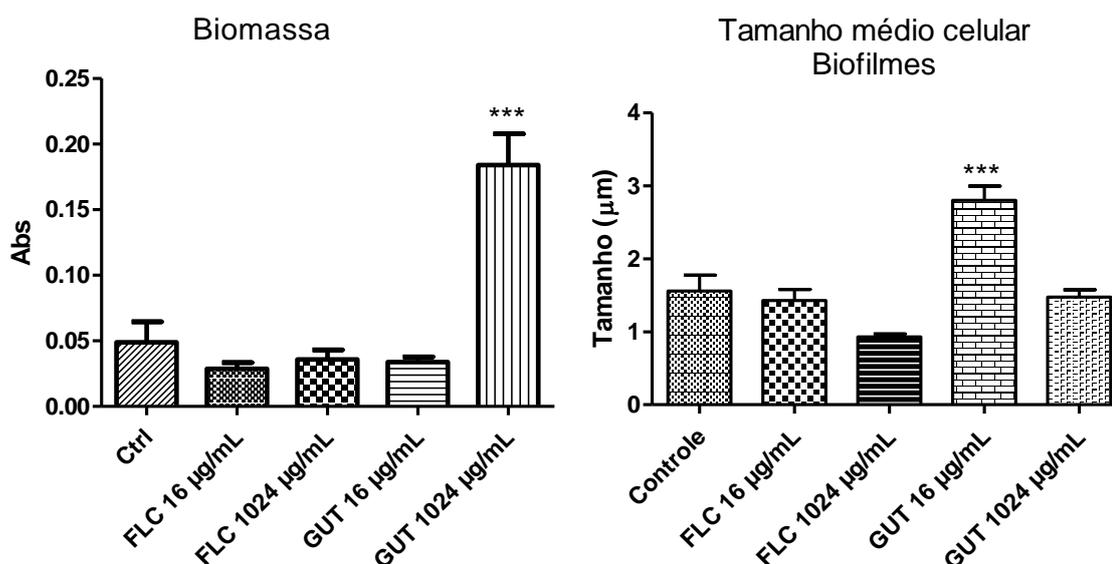


Figura 21 – Densidade óptica observada por meio de coloração com Cristal Violeta a 0,4% e Tamanho celular médio por AFM.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Os tratamentos com GUT 1024  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram aumento na biomassa formada, quando comparado aos demais tratamentos e controle ( $p < 0.001$ ), no entanto, o tamanho médio das células se mostrou aumentado nos tratamentos com GUT 16  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ).

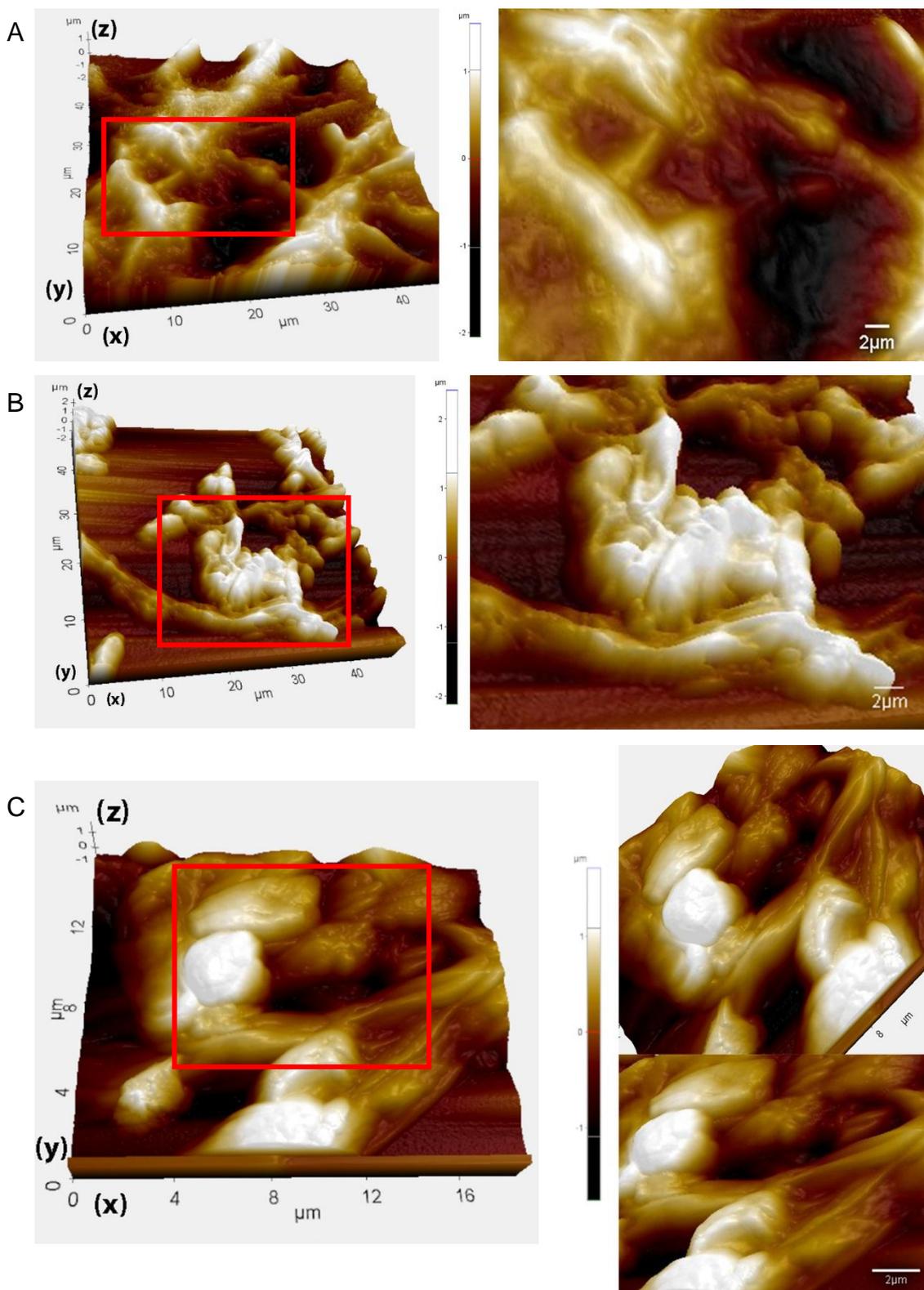


Figura 22 – Microscopia de força atômica de Biofilmes de *C. albicans* SC 5314.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: (A) Controle de crescimento; (B) FLC 16  $\mu\text{g/mL}$ ; (C) FLC 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Eixos “x”, “y” e “z” representam, respectivamente, largura, comprimento e altura. Os níveis de altura estão representados também pela cor: quanto mais clara a coloração, mais alto, ou espesso, é o biofilme.

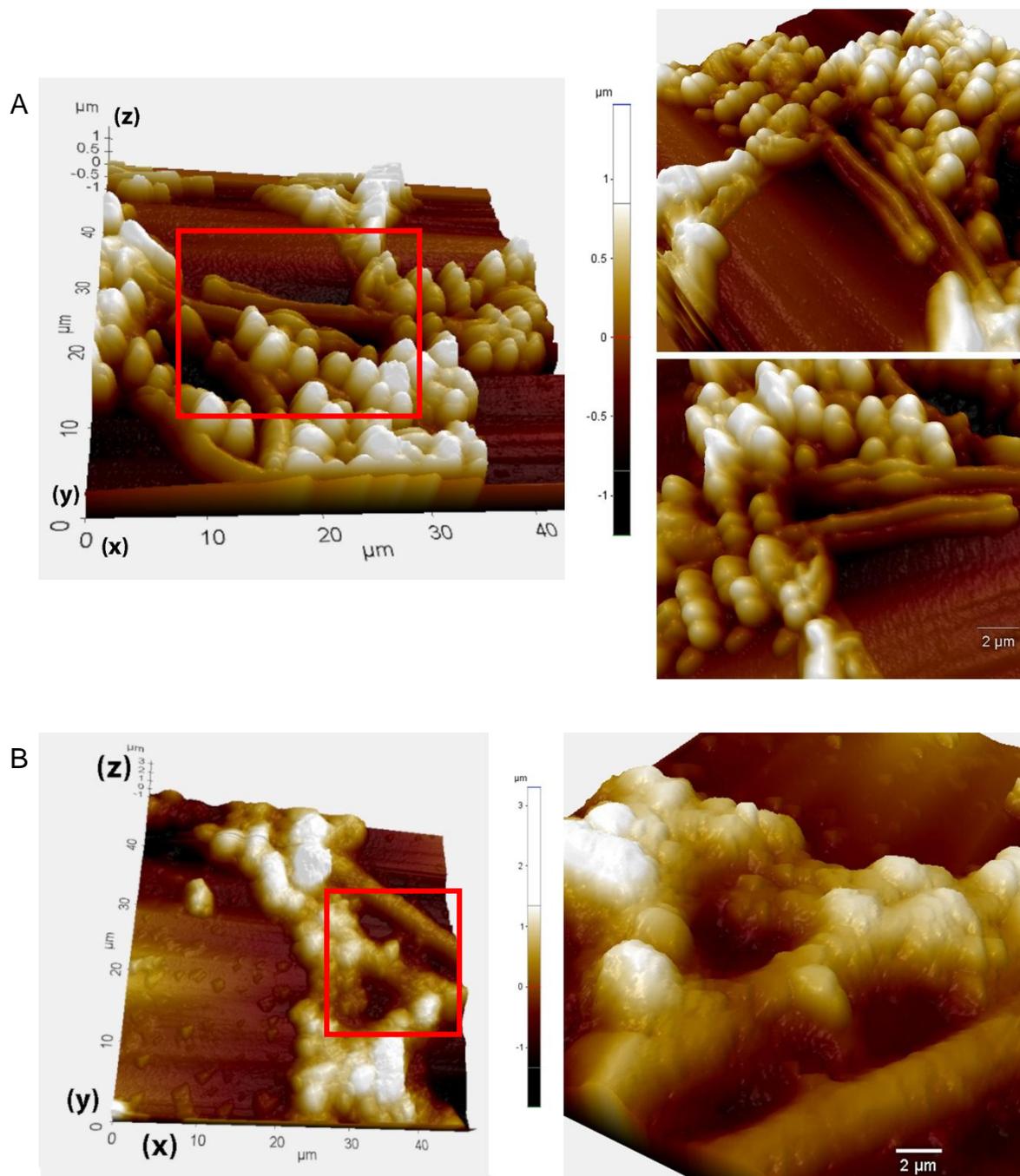


Figura 23 – Microscopia de força atômica de Biofilmes de *C. albicans* SC 5314 tratados com GUT.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: (A) GUT 16  $\mu\text{g/mL}$ ; (B) GUT 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Eixos “x”, “y” e “z” representam, respectivamente, largura, comprimento e altura. Os níveis de altura estão representados também pela cor: quanto mais clara a coloração, mais alto, ou espesso, é o biofilme.

## 6 DISCUSSÃO

Infecções fúngicas provocadas por *Candida* spp. são a causa mais recorrente de morbidade e mortalidade no mundo todo (TOKA ÖZER; DURMAZ; YULA, 2016). Para o tratamentos destas, é utilizado o fluconazol, um dos fármacos mais importantes em tratamentos de candidíase, sendo primeira escolha para estes fins, devido a seus efeitos colaterais reduzidos em comparação aos demais fármacos de mesma finalidade (PUIG-ASENSIO et al., 2014; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016). No entanto, devido ao amplo uso deste como tratamento e em medidas profiláticas, tem-se observado o aumento da resistência e o surgimento de espécies emergentes com sensibilidade reduzida frente a este fármaco (TOKA ÖZER; DURMAZ; YULA, 2016). Com o objetivo de avaliar os efeitos associativos entre biocompostos e fármacos, diversos trabalhos têm despontado no cenário de combate a esta resistência (CHANG et al., 2016; GARCÍA; TORRES; MACÍAS, 2015).

Nos estudos em busca de atividades sinérgicas, que têm sido amplamente promovidos, o FLC se destaca dentre os medicamentos usados devido a seu amplo uso. Ele apresenta efeitos sinérgicos comprovados com diversos tipos de compostos como Eugenol e Metileugenol (fenilpropanol), Berberina (alcaloide), Fluoxetina (antidepressivo), Ciclosporina A (imunossupressor) e Glabridina (isoflavona). (AHMAD; KHAN; KHAN; et al., 2010; GU et al., 2016; LI et al., 2015; LIU et al., 2014; UPPULURI et al., 2008)

Por conta de suas características e biodisponibilidade, ele acaba sendo também um dos fármacos de primeira escolha para tratamentos antifúngicos e tratamentos profiláticos, aplicações em doses subinibitórias utilizadas geralmente em pacientes imunocomprometidos, como transplantados de medula óssea (JIANG et al., 2013; MARR et al., 2000). O uso destas doses subinibitórias está relacionado à redução dos casos de candidemia e mortalidade entre estes pacientes (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014). Concentrações subinibitórias reduzem o volume de células produzidas mas ainda há o crescimento, mostrando que a ação do FLC sobre o fungo é dependente da dose. (AHMAD; KHAN; MANZOOR; et al., 2010; NAVARATHNA et al., 2005).

Em nossos estudos buscamos avaliar os efeitos do Fluconazol (FLC) associado a Guttiferona A (GUT). As doses encontradas como inibitórias para FLC (0,125 µg/mL)

sobre as células planctônicas foram comuns a de outros trabalhos já realizados na área, com esta mesma linhagem celular, e revelam a sensibilidade desta de acordo com os padrões exigidos internacionalmente (BUJDÁKOVÁ; KULKOVÁ; CERNÁKOVÁ, 2012; CLSI, 2012; COLOMBO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2013; EUCAST, 2016). Sob associações, obtivemos vários perfis de interação, sendo que as associações sinérgicas e aditivas, foram as que mais se destacaram. Assim, selecionamos os tratamentos mais efetivos isolados e em associação, com índices de inibição de crescimento acima de 50% e  $\frac{1}{4}$  dos mesmos para avaliação sob doses subinibitórias.

A GUT já havia sido avaliada como agente fungistático em trabalhos realizados anteriormente corroborando os resultados obtidos neste estudo (DIAS et al., 2012). Além disso, ela já se mostrou ser menos tóxica a células de mamíferos e mais seletiva a patógenos (DIAS et al., 2012; PEREIRA et al., 2010).

A toxicidade de GUT pode estar ligada ao fato desta ser uma benzofenona serina/cisteína protease poliisoprenilada, e sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada aos grupos prenil ligados a sua estrutura (AGA et al., 1994; DIAS et al., 2012; MARCUCCI et al., 2001). Quanto mais grupos prenil ligados, maior é a lipofilicidade do composto (MARCUCI et al., 2001). Com esta característica, o composto pode apresentar uma certa fluidez pela membrana. Uma vez dentro da célula, existem diversos pontos onde este composto pode atuar. Um deles, é o fato deste estimular a produção espécies reativas de oxigênio (EROS) por interação com a membrana das mitocôndrias (PARDO-ANDREU et al., 2011). *C. albicans* é geralmente exposta a estes produtos durante sua interação com fagócitos, tanto intra como extracelularmente (ENJALBERT et al., 2007; MIRAMÓN et al., 2012). Para se defender, a levedura produz agentes antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), expressa na superfície celular ancorada à membrana por meio do glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FRADIN et al., 2005). No entanto, um estresse catiônico é capaz de inibir a resposta antioxidante do fungo, fazendo com que este não consiga escapar do fagossomo, tornando eficiente a defesa do hospedeiro (KALORITI et al., 2014). Em *C. albicans*, a responsável pela manutenção da homeostase catiônica, morfogênese, progressão do ciclo celular, entre outras diversas funções, é a calcineurina (FOX; HEITMAN, 2002). Ela também é responsável pelo alívio do estresse celular gerado, quando a produção de ergosterol pela lanosterol-14- $\alpha$ -demetilase é inibida por compostos azólicos, promovendo o acúmulo de esteróis 14-

$\alpha$ -methyl-3,6-diol, codificados pelo gene *ERG3* e que são tóxicos na membrana (FOX; HEITMAN, 2002; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

Avaliando morfotopograficamente as células planctônicas tratadas com o FLC e com a GUT, estas não apresentaram alterações significativas em relação ao seu tamanho ou forma, quando comparadas as células do grupo controle ( $p > 0,05$ ). No entanto, na associação, observamos que apesar de inibir cerca de 75% do crescimento, as células remanescentes apresentaram um tamanho alterado, sendo estas, maiores do que as demais, quando comparada aos outros cultivos tratados e ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). O aumento do tamanho celular implica em diferenças na resposta do hospedeiro. Microrganismos pequenos são mais facilmente fagocitados que microrganismos maiores ou hifas, desencadeando a resposta oxidativa apenas dentro do fagócito, no caso neutrófilos, controlando a liberação de IL-1 $\beta$  e reduzindo o recrutamento celular imunológico (WARNATSCH et al., 2017). Microrganismos maiores requerem uma resposta granulomatosa, devido ao seu tamanho em relação ao patógeno ser inferior (BRANZK et al., 2014). A resposta imunológica aumentada está relacionada ao aumento de danos aos tecidos do hospedeiro pois há a liberação de EROS extracelularmente para o combate patógeno-hospedeiro (BRANZK et al., 2014; WARNATSCH et al., 2017). Além disso, em meios líquidos as células são partículas e, dependendo da velocidade do meio, seu tamanho pode influenciar em mecanismos como adesão e colonização (DONLAN, 2002).

Esta associação também reduziu significativamente a produção de ergosterol, principal esteroide da membrana fúngica e alvo dos compostos triazólicos ( $p < 0,001$ ) (MORSCHHÄUSER, 2002). O FLC aplicado de maneira isolada também reduziu a produção deste, porém em níveis superiores aos da associação. Isto pode ser explicado pelo fato de que o esteroide tóxico produzido pela atuação do FLC aumenta a fluidez da membrana, permitindo a entrada de outros compostos (SORGO et al., 2011). Atividade semelhante pode ser observada em estudos com Berberina associada ao FLC, onde este fármaco promoveu o aumento da Berberina intracelular, efeito que não foi observado quando o bioativo foi aplicado isoladamente sobre as células de *C. tropicalis*, linhagem menos sensível ao FLC e maior potencial patogênico do que *C. albicans* (SHAO et al., 2016; WILSON et al., 2014).

Fenótipos anormais também são encontrados em mutantes nulos nos genes codificadores das aspartato proteases *SAP9* e *SAP10*, além destes não obterem uma separação efetiva das células parentais com as filhas (ALBRECHT et al., 2006).

Os tratamentos promovidos em nosso trabalho alteraram a expressão dos genes *SAP9* e *SAP10*, essenciais para a manutenção da integridade da membrana e adesão (ALBRECHT et al., 2006). Com exceção da IC da associação (0,5 µg/mL de FLC x 0,469 µg/mL de GUT), todos os outros tratamentos promoveram um suave aumento da expressão de *SAP9*. Com a *SAP10*, apenas a IC de GUT atuou de forma a aumentar sua expressão (Figura 24).

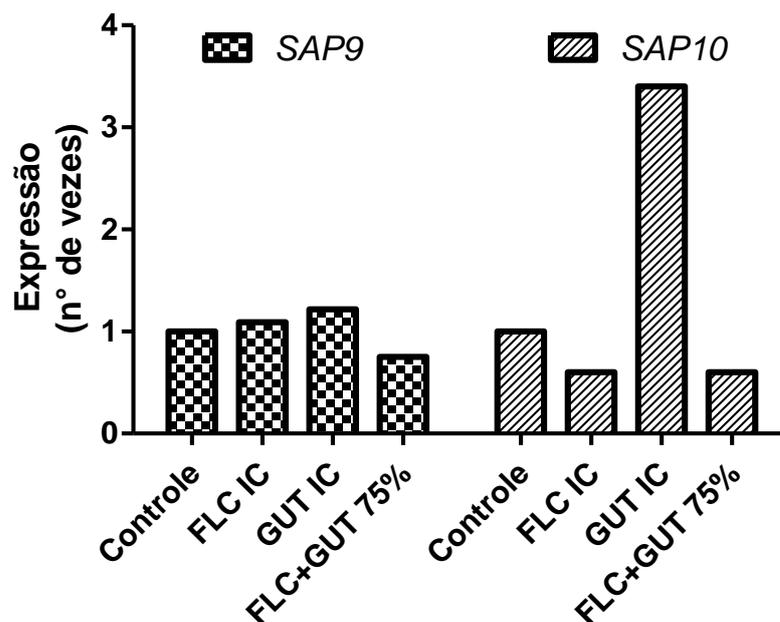


Figura 24 – RT-PCR. Expressão dos genes *SAP9* e *SAP10* antes e após os tratamentos com doses inibitórias de compostos com atividade antifúngica e da associação sinérgica.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Valores de *SAP9* e *SAP10* expressos pela média dos Ct obtidos. Variação: *ACT1* (0 - 2Ct).

Em tratamentos isolados, a IC de GUT apresenta efeito maior sobre *SAP10*, superexpressando esta protease em mais de 3 vezes, quando comparado ao controle. As células tratadas com a IC de FLC, tiveram a expressão de *SAP10* inferior a no grupo controle e, nas células cultivadas sob associação, esta expressão foi ainda menor (Figura 24).

Atividade específica de Sapp aumenta progressivamente com a inibição do crescimento promovida por compostos azólicos, sendo, proteínas relacionadas ao reparo da parede, como a Sap9p, as mais expressas (COPPING et al., 2005; SORGO et al., 2011). Em linhagens sensíveis à antifúngicos, a redução da atividade de Sapp é de maneira dose dependente, enquanto que, em linhagens resistentes, há o

aumento da atividade destas proteases (WU et al., 2000). Os tratamentos com  $\frac{1}{4}$  das ICs promoveram expressões maiores do que os tratamentos inibitórios (Figura 25) confirmando os dados que o cultivo de células fúngicas na presença de concentrações subinibitórias de FLC aumenta a produção de Sapp, sejam as linhagens sensíveis ou resistentes (BARELLE et al., 2008).

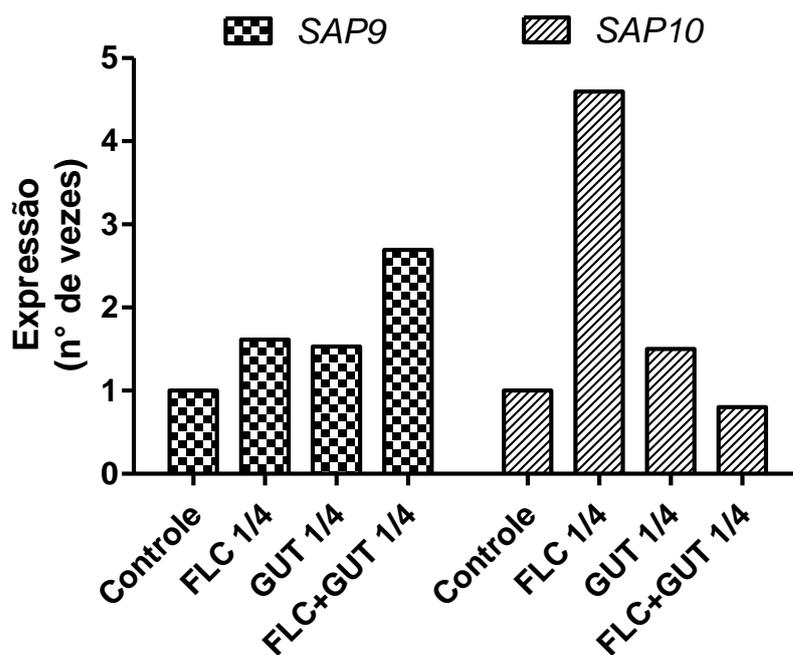


Figura 25 – RT-PCR. Expressão dos genes *SAP9* e *SAP10* antes e após os tratamentos com doses subinibitórias de compostos com atividade antifúngica e da associação sinérgica.

Fonte: Da autora, 2017.

Nota: Valores de *SAP9* e *SAP10* expressos pela média dos Ct obtidos. Variação: *ACT1* (0 - 2Ct).

Quando as células foram cultivadas na presença de  $\frac{1}{4}$  da associação (FLC 0,125  $\mu\text{g/mL}$  x GUT 0,117  $\mu\text{g/mL}$ ), o gene *SAP10* foi suprimido mas, *SAP9* passou a ser superexpresso, chegando a quase 3 vezes a quantidade expressa pelo grupo controle (Figura 25). A Sap9p é mais expressa, geralmente, em modelos de infecções de mucosa *in vitro* e *in vivo*, seguida por Sap10p, e, a ausência de um destes genes, faz com que o outro seja superexpresso de maneira compensatória (ALBRECHT et al., 2006; NAGLIK et al., 2008).

Estas proteases, Sap9p e Sap10p, também são responsáveis por processos como a formação e manutenção de biofilmes, que são estruturas heterogêneas

diretamente relacionados à resistência aos fármacos e a tratamentos (CHANDRA et al., 2001). Em sua fase inicial de formação, a quantidade de células é baixa, permitindo que os tratamentos atuem com maior facilidade. Conforme ocorre a maturação do biofilme, a densidade celular aumenta exponencialmente, dificultando a erradicação deste (LAMFON et al., 2004).

Lamfon (2004) mostrou em seus estudos que, tratando os biofilmes no início, a queda da viabilidade é de até 99,2%. Após 24h, os biofilmes tratados não apresentam diferenças entre si e entre o controle de crescimento (LAMFON et al., 2004; RAMAGE et al., 2002). O fluconazol apresenta uma leve atividade sobre esta conformação celular, chegando a inibir até 30% do crescimento celular (RAMAGE et al., 2002). Em nossos biofilmes, não foi diferente. Este fármaco apresentou baixa ação, com 25% de redução da viabilidade, ou nenhuma atividade, expondo a resistência de *C. albicans*, nesta forma de vida, acima de 2000 vezes, quando comparadas às IC das células planctônicas (> concentração, sem atividade, aplicada sobre os biofilmes / IC do composto referente em células planctônicas).

A toxicidade da GUT sobre as células planctônicas também não se repetiu sobre os biofilmes. Sob baixas dosagens (16 µg/mL) ela estimulou o aumento de tamanho das células e, quando tratados com altas doses (1024 µg/mL) as células apresentaram o tamanho normal em relação ao controle, mas, aumentaram a produção de biomassa, elevando a espessura e resistência dos biofilmes.

A tolerância de células de *C. albicans* em biofilmes expostos ao fluconazol também está relacionada a calcineurina, uma fosfatase  $Ca^+$ /Calmodulina dependente (FOX et al., 2001; UPPULURI et al., 2008). Isto explica a manutenção da viabilidade das células nos biofilmes aos tratamentos com o fluconazol e nas associações. Nesta linha de pensamento, as altas taxas de calcineurina requeridas para a manutenção celular, devido ao estresse na membrana, também podem ter mantido a homeostase catiônica, evitando estresse oxidativo que poderia ser promovido pela GUT. Assim, tem-se a resposta do fungo com agentes antioxidantes e o combate ao acúmulo de esteróis tóxicos na membrana, mantendo a integridade desta.

Efeitos sinérgicos entre o FLC e a Ciclosporina, um imunossupressor de células T utilizado na prevenção de rejeição a transplantes, já foram comprovados devido a este inibir a produção de calcineurina aumentando o estresse da membrana (CRUZ et al., 2002).

Sendo assim, estudos contínuos a este trabalho se fazem necessários para elucidação dos mecanismos de ação do composto GUT e de suas associações a fármacos utilizados nos tratamentos em infecções fúngicas. Outro fator importante é o esclarecimento da resposta fúngica frente a fatores que lhe provocam estresse, como a atuação de fármacos em doses inibitórias e subinibitórias.

## 7 CONCLUSÕES

*Candida albicans* SC5314, em estado planctônico, foi sensível ao Fluconazol, tendo inibição de 50% do seu crescimento a partir de tratamentos com 0,125 µg/mL. Guttiferona A apresentou atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans* SC5314, com doses a partir de 7,5 µg/mL e inibições de até 90% do crescimento com doses acima de 15 µg/mL. Quando submetidos a associações, os compostos obtiveram efeito sinérgico, com inibição de até 75% e FICI de 0,1562.

O FLC reduziu pela metade a quantidade de ergosterol produzida pelas células planctônicas. Quando avaliada a associação, esta, apresentou efeito de redução na síntese de ergosterol maior que o fármaco isolado ( $p < 0,001$ ), enquanto que a GUT não apresentou atividade significativa ( $p > 0,05$ ). Além disso, as células tratadas com a associação apresentaram uma morfologia alterada, tendo seu tamanho aumentado em relação ao tamanho das células do grupo controle ( $p < 0,001$ ).

Nos biofilmes, o fungo apresentou resistência de mais de 2000 vezes quando tratado com cada droga isolada. Também não apresentou inibições quando testados sob associações dos compostos estudados. No entanto, um aumento na biomassa dos biofilmes tratados com GUT 1024 µg/mL foi observado com a Microscopia de Força Atômica e com avaliação da biomassa produzida por meio do Cristal Violeta 0,4% ( $p < 0,001$ ).

A expressão de *SAP10* foi suprimida nos tratamentos com as concentrações inibitórias de 50%, no entanto, quando tratados com concentrações subinibitórias (1/4 da IC), estes, apresentaram uma expressão aumentada em até 2x em relação ao controle, revelando sua sensibilidade. Sap9p foi expressa acima dos níveis encontrados no controle, com exceção do tratamento com a associação de 75% (0,5 µg/mL de FLC x 0,469 µg/mL de GUT), na qual sua expressão foi reduzida em relação ao controle.

## REFERÊNCIAS

- AGA, H. et al. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1994. v. 58, n. 5, p. 945–946.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L. A.; et al. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical Candida isolates. **Journal of Medical Microbiology**, 2010. v. 59, n. 10, p. 1178–1184.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N.; et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against Candida. **Microbial Pathogenesis**, 2010. v. 48, n. 1, p. 35–41. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2009.10.001>>.
- AL-MASSARANI, S. M. et al. Phytochemical, antimicrobial and antiprotozoal evaluation of Garcinia Mangostana pericarp and alfa-mangostin, its major xanthone derivative. **Molecules**, 2013. v. 18, n. 9, p. 10599–10608.
- ALBRECHT, A. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of Candida albicans target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**, 2006. v. 281, n. 2, p. 688–694.
- ALP, S. et al. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. **Mycoses**, 7 ago. 2015. v. 58, n. 8, p. 498–505. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26155849>>. Acesso em: 17 jul. 2015.
- ANDES, D. R. et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: A patient-level quantitative review of randomized trials. **Clinical Infectious Diseases**, 2012. v. 54, n. 8, p. 1110–1122.
- AOKI, W. et al. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in Candida albicans. **Journal of Biochemistry**, 1 out. 2011. v. 150, n. 4, p. 431–438. Disponível em: <<http://jb.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jb/mvr073>>. Acesso em: 17 ago. 2016.
- ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive

document EDef 7.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). **Clinical Microbiology and Infection**, 2012. v. 18, n. 7.

BAILLIE, G. S.; ADAM, B.; DOUGLAS, L. J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, 1 abr. 2002. v. 51, n. 4, p. 344–349. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11926741>>. Acesso em: 22 jul. 2015.

BARELLE, C. J. et al. 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**, 2008. v. 61, n. 2, p. 315–322.

BASSETTI, M. et al. Clinical and Therapeutic Aspects of Candidemia: A Five Year Single Centre Study. **Plos One**, 2015. v. 10, n. 5, p. e0127534. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127534>>.

BEGGAH, S. et al. Intra- and intermolecular events direct the propeptide-mediated maturation of the *Candida albicans* secreted aspartic proteinase Sap1p. **Microbiology**, 2000. v. 146 ( Pt 1, p. 2765–2773. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11065355](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11065355)>.

BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. Urinary tract infections and *Candida albicans*. **Central European Journal of Urology**, 2015. v. 68, p. 96–101. Disponível em: <<http://www.termedia.pl/Urinary-tract-infections-and-Candida-albicans-,57,24840,0,1.html>>.

BLOT, S. Effect of fluconazole consumption on long-term trends in candidal ecology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 30 maio. 2006. v. 58, n. 2, p. 474–477. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757503>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

BOCHENSKA, O. et al. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. **Acta Biochimica Polonica**, 8 jul. 2016. v. 63, n. 3, p. 403–410. Disponível em: <[http://www.actabp.pl/#File?./html/3\\_2016/2016\\_1318.html](http://www.actabp.pl/#File?./html/3_2016/2016_1318.html)>. Acesso em: 18 out. 2016.

BONDARYK, M.; OCHAL, Z.; STANISZEWSKA, M. Sulfone derivatives reduce

growth, adhesion and aspartic protease SAP2 gene expression. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014. v. 30, n. 9, p. 2511–2521.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nature Immunology**, 14 set. 2014. v. 15, n. 11, p. 1017–1025. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4236687&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

BREIVIK, O. N.; OWADES, J. L. Spectrophotometric Semimicrodetermination of Ergosterol in Yeast. **Agricultural and Food Chemistry**, 1956. v. 537, n. 3, p. 360–363.

BUJDÁKOVÁ, H.; KULKOVÁ, N.; CERNÁKOVÁ, L. Susceptibility to caspofungin and fluconazole and als1/als3 gene expression in biofilm and dispersal cells of *Candida albicans* / profil osjetljivosti na kaspofungin I flukonazol I ekspresija gena als1 I als3 u stanicama biofilma te planktonskim stanicama . **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, 2012. v. 63, n. 4, p. 497–503. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334045>>.

BUSTIN, S. A et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, 2009. v. 55, n. 4, p. 611–622.

BUU, L.-M.; CHEN, Y.-C. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Journal of biomedical science**, 2014. v. 21, n. 1, p. 22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24628998>>.

CAGGIANO, G. et al. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **BioMed research international**, jan. 2015. v. 2015, p. 256580. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4439500&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

CALDERONE, R.; ODDS, F. C.; BOEKHOUT, T. *Candida albicans*: Fundamental research on an opportunistic human pathogen. **FEMS Yeast Research**, 2009. v. 9, n. 7, p. 971–972.

CALVO, B. et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, out. 2016. v. 73, n. 4, p. 369–374. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452195>>. Acesso em: 5 maio 2017.

CARRADORI, S. et al. Antimicrobial activity, synergism and inhibition of germ tube formation by *Crocus sativus* -derived compounds against *Candida* spp. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 10 maio. 2016. p. 1–5. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2016.1180596>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

CASTAGNOLA, E. et al. Antifungal prophylaxis with azole derivatives. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, mar. 2004. v. 10 Suppl 1, p. 86–95. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748805>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

CASTRO, T.; HENRIQUE, D.; CHAVES, G. C. Mecanismos de resistência da candida sp. **Infarma**, 2006. v. 18, n. 9/10, p. 30–35.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1 set. 2008. v. 72, n. 3, p. 495–544. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00032-07>>.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, set. 2001. v. 183, n. 18, p. 5385–94. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 maio 2015.

CHANG, Y.-L. et al. New Facets of Antifungal Therapy. **Virulence**, 7 nov. 2016. v. 7, n. 7, p. 00–00. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2016.1257457>>.

CHITASOMBAT, M. N.; KONTOYIANNIS, D. P. The “cephalosporin era” of triazole therapy: isavuconazole, a welcomed newcomer for the treatment of invasive fungal infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 3 jul. 2015. v. 16, n. 10, p. 1543–1558. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100603>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

CHOU, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, 1 set. 2006. v. 58, n. 3, p. 621–681. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.58.3.10>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, jan. 2015. v. 10, n. 3, p. e0120452. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4378850&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

CLSI. **CLSI document M27-S4 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

CLSI, C. And L. S. I. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. [S.l.]: [s.n.], 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of clinical microbiology**, 1 ago. 2006. v. 44, n. 8, p. 2816–23. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00773-06>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003. v. 36, n. 5, p. 599–607.

COPPING, V. M. S. et al. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005. v. 55, n. 5, p. 645–654.

CORDEIRO, R. A. et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical mycology**, 2013. v. 51, n. 1, p. 53–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22712455>>.

COSTA, C. R. et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, fev. 2010. v. 169, n. 2, p. 91–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685156>>. Acesso em: 27 jul. 2015.  
CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, 2006. v. 13, n. 6, p. 442–445.

CRUZ, M. C. et al. Calcineurin is essential for survival during membrane stress

in *Candida albicans*. **The EMBO journal**, 15 fev. 2002. v. 21, n. 4, p. 546–59. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847103>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of garciniaphenone and ketoenol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 2008. v. 46, n. 3, p. 278–282.

DIAS, K. S. T. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2012. v. 20, n. 8, p. 2713–2720.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, set. 2002. v. 8, n. 9, p. 881–90. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732559&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Artigo de imunofluorescência: **Clinical microbiology reviews**, abr. 2002. v. 15, n. 2, p. 167–93. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=118068&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

EDDOUZI, J. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 jul. 2013. v. 57, n. 7, p. 3182–3193. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629718>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

ENJALBERT, B. et al. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Infection and immunity**, 1 maio. 2007. v. 75, n. 5, p. 2143–51. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339352>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

EUCAST. EUCAST E.DEF 7.3.1 EUCAST antifungal MIC method for yeasts. 2016. v. 7.3.1, p. 1–21.

FELDMAN, M. et al. Therapeutic potential of thiazolidinedione-8 as an antibiofilm agent against *Candida albicans*. **PLoS ONE**, 2014. v. 9, n. 5, p. 2–9.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, fev. 2011. v. 9, n. 2, p. 109–118.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2475>>.  
Acesso em: 28 mar. 2017.

FIOCRUZ. Fluconazol. Rio de Janeiro. 2006.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Isobograma: **Antimicrobial agents and chemotherapy**, nov. 2004. v. 48, n. 11, p. 4097–102. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=525430&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology research & perspectives**, 2015. v. 3, n. 3, p. e00149. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4492765&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>>.

FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, 2001. v. 39, n. 4, p. 835–849.

FOX, D. S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: The corruption of calcineurin. **BioEssays**, out. 2002. v. 24, n. 10, p. 894–903. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.10157>>.

FRADIN, C. et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Molecular Microbiology**, 18 fev. 2005. v. 56, n. 2, p. 397–415. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x>>.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm based-medical device related infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, mar. 2010. v. 59, n. 3, p. 227–38. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412300>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

FROMENTIN, Y. et al. *Symphonia globulifera*, a widespread source of complex metabolites with potent biological activities. **Planta Medica**, 2015. v. 81, n. 2, p. 95–107.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PEREZ, M.; BAGAN, J. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, 2014. v. 6, n. 5, p. e576–e582. Disponível em: <<http://www.medicinaoral.com/odo/volumenes/v6i5/jcedv6i5p576.pdf>>.

GARCÍA, B.; TORRES, A.; MACÍAS, F. Synergy and Other Interactions between Polymethoxyflavones from Citrus Byproducts. **Molecules**, 6 nov. 2015. v. 20, n. 11, p. 20079–20106. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26561798>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

GESSNER, P. K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. **Toxicology**, 28 dez. 1995. v. 105, n. 2–3, p. 161–79. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571354>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2010. v. 46, n. 3, p. 225–234.

GU, W. et al. **The Synergistic Effect of Azoles and Fluoxetine against Resistant Candida albicans Strains Is Attributed to Attenuating Fungal**. [S.l.]: American Society for Microbiology, 2016. V. 60.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. **Developments in fungal taxonomy**. [S.l.]: [s.n.], 1999. V. 12.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, hiv-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, 1992. v. 48, n. 46, p. 10093–10102.

Guttiferone A | C38H50O6 - PubChem. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5352090#section=Top>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

HAMID, M. E. et al. Candida and other yeasts of clinical importance in Aseer region, southern Saudi Arabia. Presentation of isolates from the routine laboratory setting. **Saudi medical journal**, out. 2014. v. 35, n. 10, p. 1210–4. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4362108&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, 2009. v. 48, n. 12, p. 1695–1703. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/599039>>.

HUBE, B. et al. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, out. 1994. v. 14, n. 1, p. 87–99. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7830564>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

HUBE, B.; NAGLIK, J. R. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Allergy**, 2001. v. 58, n. 12, p. 1224–1234. Index Fungorum. [S.l.], 2015. Disponível em: <<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=256187>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

IÑIGO, M.; PEMÁN, J.; POZO, J. L. DEL. Antifungal activity against *Candida* biofilms. **The International Journal of Artificial Organs**, 6 nov. 2012. v. 35, n. 10, p. 0–0. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138707>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

JACKSON, D. N. et al. *Garcinia xanthochymus* Benzophenones Promote Hyphal Apoptosis and Potentiate Activity of Fluconazole against *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 20 out. 2015. v. 59, n. 10, p. 6032–6038. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195512>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

JEBALI, A. et al. Triangular gold nanoparticles conjugated with peptide ligands: A new class of inhibitor for *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase. **Biochemical Pharmacology**, 2014. v. 90, n. 4, p. 349–355. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295214003128>>.

JENKINSON, H. F.; DOUGLAS, L. J. Interactions between *Candida* Species and Bacteria in Mixed Infections. [S.l.]: ASM Press, 2002.

JIANG, Z. et al. Discovery of highly potent triazole antifungal derivatives by heterocycle-benzene bioisosteric replacement. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2013. v. 64, p. 16–22.

JOLY, V.; BOLARD, J.; YENI, P. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, set. 1992. v. 36, n. 9, p. 1799–804. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1416870>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

KALORITI, D. et al. Mechanisms underlying the exquisite sensitivity of *Candida albicans* to combinatorial cationic and oxidative stress that enhances the potent fungicidal activity of phagocytes. **mBio**, 2014. v. 5, n. 4, p. 1–11.

KATRAGKOU, A. et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2014. v. 70, n. 2, p. 470–478. Disponível em: <<http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dku374>>.

KHAN, A. et al. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, 2010. v. 161, n. 10, p. 816–823. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.008>>.

KIM, Y. S. et al. Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. **PLoS ONE**, 2012. v. 7, n. 6, p. 1–8.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current opinion in microbiology**, ago. 2007. v. 10, n. 4, p. 314–9. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412142&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema ii eda síntese de carotenóides. 2006. v. 24, p. 331–336.

KUMAR, R. et al. Novel aggregation properties of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase sap6 mediate virulence in oral Candidiasis. **Infection and Immunity**, 2015. v. 83, n. June, p. 2614–2626.

LACKEY, E. et al. Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, out. 2013. v. 12, n. 10, p. 1356–68. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3811340&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

LAMFON, H. et al. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: A

longitudinal study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2004. v. 53, n. 2, p. 383–385.

LI, L. P. et al. Synergistic Antifungal Activity of Berberine Derivative B-7b and Fluconazole. **PLOS ONE**, 19 maio. 2015. v. 10, n. 5, p. e0126393. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4438075&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 jul. 2015.

LI, Y. et al. In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2008. v. 61, n. 3, p. 577–585.

LIAO, X. et al. Risk factors for fluconazole-resistant invasive candidiasis in intensive care unit patients: An analysis from the China Survey of Candidiasis study. **Journal of Critical Care**, ago. 2015. v. 30, n. 4, p. 862.e1-862.e5. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002430>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

LIU, W. et al. Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. **PLoS ONE**, 24 jul. 2014. v. 9, n. 7, p. e103442. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103442>>.

LOPES, G. et al. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PLoS ONE**, 2013. v. 8, n. 8.

LUCA, C. DE et al. Candidemia: Species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. **New Microbiologica**, 2012. v. 35, n. 4, p. 459–468.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, 1 fev. 2002. v. 8, n. 2, p. 76–81. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491402022803>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

MARCUCCI, M. et al. Phenolic compounds from *Brazilia propolis* with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol**, 2001. v. 74, p. 105–112.

MARR, K. A. et al. Candidemia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients: Evolution of Risk Factors after the Adoption of Prophylactic

Fluconazole. **The Journal of Infectious Diseases**, jan. 2000. v. 181, n. 1, p. 309–316. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315193>>.

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, mar. 2009. v. 44, n. 3, p. 1230–1239. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995931>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

MATHÉ, L.; DIJCK, P. VAN. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, 2013. v. 59, n. 4, p. 251–264.

MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, jan. 2014. v. 21, p. 166–78. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813004206>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. Fluconazol - Forma farmacêutica e apresentações. 2011, p. 1003.

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp . isolates , including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical mycology**, 2011. v. 49, n. April, p. 253–262.

MERMEL, L. A. et al. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, jul. 2009. v. 49, n. 1, p. 1–45. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/599376>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

MERSEGUEL, K. B. et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC infectious diseases**, jan. 2015. v. 15, p. 57. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4339437&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

MIRAMÓN, P. et al. Cellular Responses of *Candida albicans* to Phagocytosis and the Extracellular Activities of Neutrophils Are Critical to Counteract Carbohydrate Starvation, Oxidative and Nitrosative Stress. **PLoS ONE**, 2012. v.

7, n. 12.

MOLERO, G. et al. *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. **International Microbiology**, 1998. v. 1, n. 2, p. 95–106.

MONOD, M. et al. Differential regulation of SAP8 and SAPS, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**, 1 out. 1998. v. 144, n. 10, p. 2731–2737. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802014>>. Acesso em: 1º dez. 2015.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2002. v. 1587, n. 2–3, p. 240–248.

NAGLIK, J. R. et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, 2008. v. 154, n. 11, p. 3266–3280.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, set. 2003. v. 67, n. 3, p. 400–28, table of contents. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 out. 2015.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, abr. 2009. v. 12, n. 2, p. 403–407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19459744>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

NAVARATHNA, D. H. M. L. P. et al. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005. v. 56, n. 6, p. 1156–1159.

NOBILE, C. J. et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in *Candida albicans*. **Cell**, 20 jan. 2012. v. 148, n. 1–2, p. 126–138. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265407>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and

outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, fev. 2011. v. 77, n. 2, p. 157–161. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216030>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

PAPPALARDO, M. C. M. S. **Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo da correlação clínico-laboratorial da criptococose de sistema nervoso central associada à AIDS**. [S.l.]: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2009.

PARDO-ANDREU, G. L. et al. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2011. v. 253, n. 3, p. 282–289. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.011>>.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, abr. 2010. v. 17, n. 5, p. 339–345. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762221>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

PERES-BOTA, D. et al. Potential risk factors for infection with *Candida* spp. in critically ill patients. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2004. v. 10, n. 6, p. 550–555. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00873.x>>.

PERON, I. H. et al. Resistance Surveillance in *Candida albicans*: A Five-Year Antifungal Susceptibility Evaluation in a Brazilian University Hospital. **PLOS ONE**, 14 jul. 2016. v. 11, n. 7, p. e0158126. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0158126>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

PITERS, W. A. A. De S.; SANDERS, E. A. M.; BOGAERT, D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 19 ago. 2015. v. 370, n. 1675, p. 20140294. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26150660>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

PUIG-ASENSIO, M. et al. Impact of Therapeutic Strategies on the Prognosis of Candidemia in the ICU\*. **Critical Care Medicine**, jun. 2014. v. 42, n. 6, p. 1423–1432. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-201406000-00014>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2014. v. 31, n. 1, p. 42–48. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140613001010>>.

RAMAGE, G. et al. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Three Antifungal Agents against Preformed. **Society**, 2002. v. 46, n. 11, p. 3634–3636.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology spectrum**, out. 2016. v. 4, n. 5, p. 1–20. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27763259>>.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 2013. v. 15, n. 3, p. 397–404. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722013000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

SANTOS, M. H. Dos et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, set. 1999. v. 22, n. 5, p. 654–660. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40421999000500005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000500005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 30 ago. 2016.

SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, nov. 2005. v. 48, n. 6, p. 365–377. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262871>>. Acesso em: 5 abr. 2015.

SCHILD, L. et al. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. **Eukaryotic Cell**, jan. 2011. v. 10, n. 1, p. 98–109. Disponível em:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019796&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 ago. 2015.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, dez. 2001. v. 25, n. 4, p. 402–8. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Cell density and cell aging as factors modulating

antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, set. 2008. v. 52, n. 9, p. 3259–66. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533466&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 ago. 2015.

SHAO, J. et al. Antiproliferation of berberine in combination with fluconazole from the perspectives of reactive oxygen species, ergosterol and drug efflux in a fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolate. **Frontiers in Microbiology**, 2016. v. 7, n. SEP, p. 1–10.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, jun. 2011. v. 75, n. 2, p. 213–67. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646428>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

SORGO, A. G. et al. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, 2011. v. 10, n. 8, p. 1071–1081.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; SIENNICKA, K.; et al. In vitro study of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap3 and Sap4 to Sap6 expression in *Candida albicans* pleomorphic forms. **Polish Journal of Microbiology**, 2012. v. 61, n. 4, p. 247–256.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; PIŁAT, J.; et al. Virulence factors of *Candida albicans*. Art. em Polonês. **Przegląd epidemiologiczny**, jan. 2012. v. 66, n. 4, p. 629–33. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484392>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

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

STANISZEWSKA, M. et al. 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**, 2015. v. 64, n. 3, p. 203–10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26638528>>.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; OCHAL, Z. Susceptibility of *Candida albicans* to New Synthetic Sulfone Derivatives. **Archiv der Pharmazie**, 2015. v. 348, n. 2, p. 132–143. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/ardp.201400360>>.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future microbiology**, 2013. v. 8, n. 10, p. 1325–37. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3859465&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

TOBOUTI, P. L. et al. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of *Candida albicans* -Associated Denture Stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, 2015. p. n/a-n/a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jopr.12285>>.

TOBUDIC, S. et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, maio. 2012. v. 55, n. 3, p. 199–204. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793943>>. Acesso em: 22 jul. 2015.

TODD, B. Clinical Alert: *Candida Auris*. **The American journal of nursing**, abr. 2017. v. 117, n. 4, p. 53–55. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333744>>. Acesso em: 5 maio 2017.

TOKA ÖZER, T.; DURMAZ, S.; YULA, E. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, set. 2016. v. 22, n. 9, p. 629–32. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452427>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

UPPULURI, P. et al. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, mar. 2008. v. 52, n. 3, p. 1127–32. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180354>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

VALDÉS, L. et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food Funct.**, 11 jun. 2015. v. 6, n. 8, p. 2424–2439. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068710>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

WARNATSCH, A. et al. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. **Immunity**, mar. 2017. v. 46, n. 3, p. 421–432. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317300754>>.

WHITE, T. C.; AGABIAN, N. Candida albicans secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **Journal of Bacteriology**, 1995. v. 177, n. 18, p. 5215–5221.

WILSON, D. et al. Distinct roles of Candida albicans-specific genes in host-pathogen interactions. **Eukaryotic cell**, ago. 2014. v. 13, n. 8, p. 977–89. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4135803&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jun. 2015.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2004. v. 39, n. 3, p. 309–317.

WU, H. et al. Candida albicans secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. **The FASEB Journal**, 1 jun. 2013. v. 27, n. 6, p. 2132–2144. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430844>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

WU, T. et al. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by Candida albicans isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2000. v. 44, n. 5, p. 1200–1208.

YOUSIF, A.; JAMAL, M. A.; RAAD, I. Biofilm-Based Central Line-Associated Bloodstream Infections. **Advances in experimental medicine and biology**. [S.l.]: [s.n.], 2015, V. 830, p. 157–179.

## ANEXO

ANEXO – Primers descritos para a família *SAP* e para os genes de normalização *ACT1* e *CEF3*.

| Gene         | Forward (5'–3')                | Reverse (5'–3')              | Probe (5'–3')                            |
|--------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| <i>SAP1</i>  | TTCATCGCTCTTGCTATTGCTT         | TGACATCAAAGTCTAAAGTGACAAAACC | TTAGTTGATGCTTCTCCAGCTAAAAGATCOCC         |
| <i>SAP2</i>  | TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG     | TGGATCATATGTCCCTTTTGT        | CACTTATAGTGATCAAACCTGCAGATTTCT           |
| <i>SAP3</i>  | GGACCAGTAACATTTTTATGAGTTTTGAT  | TGCTACTCCAACAACCTTTCAACAAT   | CATCAAAATTCAAAGCAACAAACCCTGGAG           |
| <i>SAP4</i>  | CAATTTAACTGCAACAGGTCCTCTT      | AGATATTGAGCCCACAGAAATTCC     | TGCCACATCATTCTACCAGTATCGTCG              |
| <i>SAP5</i>  | CATTGTGCAAAGTAACTGCAACAG       | CAGAATTTCCCGTCGATGAGA        | TCCTCTTTTGTCCACATCACCATCTCTACCA          |
| <i>SAP6</i>  | CCTTTATGAGCACTAGTAGACCAAAACG   | TTACGCAAAGGTAACCTTGATCAAGA   | AGCAAATAATTGATTTTAAACAGAAGCACCACCAA      |
| <i>SAP7</i>  | ATGGACACAGTGTGAAATATGAAGTG     | TCAGTGGAGGATGGACCATTAGA      | CATTGCCCTCTTCATCAGCACAAAAAGG             |
| <i>SAP8</i>  | TCTCAAGAAATTATCCCCAAAATA       | TCGGTTCCATTATCAGAATTTGTTC    | AGTGGCCAGATCTCTACTAACACCAAAAATAACAAGAATT |
| <i>SAP9</i>  | ATTTACTCCACAGTTTATATCACTGAAGGT | CCACCAGAACCACCCTCAGTT        | CAGGTGCATATTCAACGTTCTCCCCATTG            |
| <i>SAP10</i> | CCCGGTATCCAATAGAATCGAA         | TCAGTGAATGTGACGAATTTGAAGA    | ACCACCAGAAGCAACATTTCCGTTTTTG             |
| <i>ACT1</i>  | GACAATTTCTCTTTCAGCACTAGTAGTGA  | GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA      | ACTGTAACCACGTTTCAGACAAAATCTTGGACAA       |
| <i>CEF3</i>  | GCTGTCAAAGCCATCTTACCAA         | GCTCTCAAGATGGCAACTTTTTC      | TTGACAACCTTGACCAACACCAACAATGGA           |

Fonte: Naglik et al. 2008; *Quantitative expression of the Candida albicans secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis*

