



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ANELISE MARIA COSTA VASCONCELOS ALVES

**MECANISMO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL (TNF) FRENTE AO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS***

FORTALEZA-CE

2017

ANELISE MARIA COSTA VASCONCELOS ALVES

**MECANISMO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
(TNF) FRENTE AO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A477m Alves, Anelise Maria Costa Vasconcelos.

MECANISMO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) FRENTE AO BIOFILME DE CANDIDA ALBICANS / Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves. – 2017. 109 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

1. Biofilme. 2. TNF . 3. Diacetilquitobiose. I. Título.

CDD 616.9

ANELISE MARIA COSTA VASCONCELOS ALVES

**MECANISMO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
(TNF) FRENTE AO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em: 11/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Edmara Costa Chaves
Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profª. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
À minha família.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus ter me guiado e cuidado de mim em cada passo! Por ter me dado a minha vida e colocado no meu caminho cada colega, mestre, oportunidade e ensinamento que fizeram que esse curso de doutorado fosse possível.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pela capacitação profissional que me proporcionaram. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

À Central Analítica por ter disponibilizado a sua estrutura física para a realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pela oportunidade concedida, por ter me orientado de forma brilhante, por todos os conhecimentos transmitidos e, acima de tudo, pela confiança que depositou em mim. Agradeço também por todo apoio e compreensão em relação as minha limitações de tempo em virtude do meu trabalho e pelo exemplo de pessoa ética e transparente.

À Dra. Virginia Claudia Girão pela análise morfológica das imagens, por todo o seu incentivo, carinho e amizade.

À Dra. Profa. Dra. Ana Caroline Rocha de Melo Leite pelo suporte dado ao longo de todo curso desde o processo seletivo até o presente momento, mas principalmente, por todo carinho e amizade nos últimos anos.

À Dra. Profa. Dra. Edmara Costa Chaves pelo aceite em participar da banca e por todo incentivo, atenção e carinho desde que eu estudava na Universidade Estadual do Ceará (UECE), sendo um exemplo de profissional e ser humano.

Aos professores participantes da banca examinadora pela disponibilidade, contribuições e por dividirem comigo este momento tão importante da minha vida acadêmica: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara e Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Aos colegas do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO), em especial, Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, Morgana Ramos Martins Xerez, Rodolfo de Melo Nunes e Fernanda Maria Aragão Ximenes Porto, pela convivência amistosa durante todos esses anos, além de todos os conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), pelo conhecimento e experiência compartilhados. Em especial, aos professores Raimunda Samia Nogueira Brilhante, Marcos Fabio Gadelha Rocha e Cibele Carvalho pelo acolhimento, disponibilidade e conhecimento.

À Dra. Rossana Aguiar Cordeiro por toda disponibilidade ao longo doutorado para orientar e ajudar quando foi necessário, além do aceite em participar da qualificação. Meu sincero obrigada!

À professora Débora Castelo-Branco pela ajuda execução das análises de confocal, mas acima de tudo por toda disponibilidade e amizade que foi fortalecida ao longo desses últimos anos.

Aos colegas de pós-graduação e integrantes do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), em especial, o Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira, Jonathas Sales de Oliveira, Glauca Morgana de Melo Guedes, Giovana Riello, Lucas Alencar, Rosana Serpa, Antonio José Evangelista, Ewerton Caracas, Felipe Magalhães, Jaime Acosta, Kleybson Sousa, Livia Galdino, Lucilene Queiroz e Vandbergue Santos pela agradável convivência, apoio e suporte nas execuções do experimentos.

À secretária do PPGMM, Carolinda Vilma Soares de Oliveira, por toda a ajuda e suporte em todos os procedimentos acadêmicos, carinho e atenção ao logo de todo o curso de doutorado. Agradeço de coração a Carol por estar sempre disposta ajudar com um sorriso no rosto e uma ternura encantadora, suportando toda a minha ansiedade e dúvidas frequentes desde a seleção até o momento da defesa.

A todos meus amigos que mesmo não tendo participado dessa tese de forma direta, fizeram que ela fosse possível com todo pelo incentivo, apoio, paciência e carinho. Em especial, agradeço as minhas amigas que acompanharam o processo do começo ao fim, Juliana Jales de Hollanda Celestino, Erika Helena Salles de Brito, Ana Beatriz Duarte e Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, sempre com uma palavra positiva e apoio incondicional, com quem pude compartilhar cada angústia, frustração e alegria.

A todos meus colegas de trabalho do Instituto Federal do Ceará (IFCE) e Universidade Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) que me apoiaram e incentivaram para que eu conseguisse conciliar essa dupla jornada de trabalho e pós-graduação. Principalmente, as minhas “limoeiretes”, Barbara Cerqueira, Kelma de Freitas Felipe, Carla Bezerra e Ana Caroline Cabral Cristino, e às professoras da Unilab Emilia Chaves e Andrea Linard.

A minha família que me apoiou ao longo destes anos, principalmente, a minha irmã, Ana Abigail Costa Vasconcelos Alves, que com suas demonstrações de carinho diário e apoio em todos os meus momentos que precisei. Obrigada, Ana! E a minha mãe, Rita Costa Alves (*in memoriam*), por seu amor e seu apoio incondicional! Por seu exemplo que guia cada atitude mesmo com sua ausência física!

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é
alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

A *Candida albicans* é um fungo polimórfico que exprime como principal fator de virulência a formação de biofilmes, especialmente, em implantes médicos na superfícies de pacientes imunossuprimidos, causando infecções potencialmente fatais. O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pleitrópica que denota diversas funções nos mecanismos de defesa do hospedeiro, dentre os quais promover a inflamação e, conseqüentemente, inibir o crescimento de microrganismos. Em protozoários, o TNF pode afetar o crescimento destes por meio dos seus domínios semelhante à lectina, espacialmente distintos dos receptores de TNF. No conhecimento que se tem, não há relatos de um efeito TNF direto em leveduras, que não possuem receptores de TNF. Assim, este trabalho objetivou demonstrar que o TNF afeta o crescimento *in vitro* de *Candida albicans* por meio de um mecanismo independente do receptor de TNF. Para tal, quatro cepas de *Candida albicans* produtoras de biofilme (duas fortes e duas fracas formadoras) foram cultivadas na presença ou ausência de soluções de TNF. A susceptibilidade ao TNF foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo. Os biofilmes foram cultivados em placas de 96 poços e avaliados empregando ensaio de redução de sal de XTT (2,3-Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida), microscopia óptica de campo claro, microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Também foram avaliada características bioquímicas do biofilme, como quantificação de proteína e o índice de hidrofobicidade (IH). Assim, foi observado que o TNF não alterou o crescimento planctônico de *Candida albicans*. O TNF inibiu, contudo, de maneira dose-dependente, a formação de biofilme, por intermédio da modulação da transição de hifa-filamento. A pré-incubação com o anticorpo contra TNF, adalimumab, mas não com o receptor solúvel de TNF acoplado a imunoglobulina G, etanercept, causou um bloqueio da atividade do TNF. A pré-incubação com o carboidrato N, N'-Diacetilquitobiose, um dos principais componentes da parede celular da *Candida albicans*, que se liga ao domínio semelhante à lectina do TNF, bloqueou o efeito do TNF contra o crescimento de biofilme de *Candida albicans*. Em conclusão, esse é o primeiro trabalho que demonstra um efeito direto do TNF contra a formação do biofilme de *Candida albicans*, ou seja, sem a participação de seus receptores clássicos ou células mamíferas. O bloqueio do efeito do TNF pela N, N'-diacetilquitobiose sugere que este efeito é mediado por meio de um domínio lectina da citocina.

Palavras-chave: Biofilme. TNF. Diacetilquitobiose.

ABSTRACT

Candida albicans is a polymorphic fungus and has as main virulence factor the biofilm formation, particularly, in prosthetic materials and host surfaces of immunosuppressed patients, causing life-threatening infections. Tumor necrosis factor (TNF) is a pleiotropic cytokine that has several functions in the defense mechanisms of the host, among which promote inflammation and, consequently, inhibit the growth of microorganisms. In protozoa, TNF can affect the growth of these through their lectin domains that are spatially distinct from TNF receptors. To our knowledge, a direct TNF effect on yeasts, which lack TNF receptors, has never been reported. Thus, the present study aims to demonstrate that TNF affects the in vitro growth of *Candida albicans* through a mechanism independent of the TNF receptor. For this, four strains biofilm producer *Candida albicans* (two strong producer and two weak producer) were cultured in the presence or absence of TNF solutions. Susceptibility to TNF was evaluated using the broth microdilution method. Biofilms were grown on 96-well microtitre plates and evaluated using XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)- 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay, optical, confocal and scanning and transmission electron microscopy. Biochemical biofilm characteristics such as protein quantification and hydrophobicity index (HI) were also evaluated. Thus, it was observed that TNF did not alter *Candida albicans* planktonic growth. However, TNF dose-dependently inhibited growing but not established biofilm development, virtually halting yeast filamentation. Preincubation with the TNF antibody adalimumab but not with the immunoglobulin G coupled TNF soluble receptor etanercept blocked TNF activity. Preincubation with the carbohydrate N,N'-diacetylchitobiose, a major component of the yeast cell wall, that binds to TNF lectin domain, abrogated TNF effect against *Candida albicans* growing biofilm. In conclusion, this is the first demonstration of a receptor independent TNF and no mammalian cells activity, on other words, direct effect against *C. albicans* biofilm growth. Blockade of TNF effect by N,N'-diacetylchitobiose suggests that it is mediated via the lectin domain of the cytokine.

Keywords: Biofilm. TNF. Diacetylchitobiose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Aspectos morfológicos de células de *Candida albicans* cultivadas *in vitro* em RPMI 1640 observados por microscopia eletrônica de varredura. Em a, as setas indicam a formação de um tubo germinativo (TB) e blastoconídio (B). Em b, as setas representam pseudo-hifa (P) e hifa verdadeira (H). Aumento de 10.000 x. Barra =10µm..... 25
- Figura 2 – Esquema ilustrativo dos fatores envolvidos da transição entre as distintas formas morfológicas de *Candida albicans*. pH- potencial de hidrogênio; GlcNAC- N-acetilglicosamina e CO₂- Dióxido de Carbono..... 26
- Figura 3 – Esquema ilustrativo dos principais fatores envolvidos na formação e desenvolvimento de um biofilme microbiano. 29
- Figura 4 – - Representação esquemática das etapas de formação do biofilme de *Candida albicans*: adesão inicial (adesão de leveduras em suspensão ao substrato), adesão irreversível(formação de colônias e e formação de hifas), crescimento/maturação (secreção de matriz extracelular (MEC) e multiplicação celular, formando uma estrutura tridimensional complexa) e dispersão (liberação de células para colonizar outro sítio e formar novos biofilmes). EPS- Substância exopolimérica..... 33
- Figura 5 – Efeito das concentrações (0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL) de TNF murino (mTNF) sobre o biofilme de cepas forte formadoras de biofilme (CEMM 01.05.006 e ATCC 10.2.31) em formação (a) e maduro (formado) (b) e cepas fraca formadoras de biofilme (51BMv e 49BMv) em formação (c) e maduro (formado) (d) de *Candida albicans*. Atividade metabólica foi avaliada por ensaio de redução enzimática do sal de XTT. Os dados representam média ± SEM da densidade óptica (D.O.) a uma absorvância de 492 nm. * - Diferença significativa em relação ao controle (P<0,001)..... 56
- Figura 6 – Cinética das células isoladas de biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) coradas com azul de lactofenol e analisadas por microscopia óptica após cultivo de 6, 24 ou 48h na ausência ou presença de TNF murino (mTNF) na concentração de 20 ng/mL. As figuras a,c,e mostram células do biofilme em formação de *Candida*

albicans ATCC 10.2.31 cultivadas na presença de RPMI 1640 (controle não tratado) e as figuras b,d,f são células de biofilme em formação de *Candida albicans* cultivados sob mTNF (20 ng/mL) por 6, 24 ou 48h. Aumento de 200 x. Barra = 50 μ m.....

58

- Figura 7 – Efeito das concentrações de 10 e 20 ng/mL do TNF murino (mTNF) sobre a morfologia do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação comparado ao controle (não-tratado) após 6, 24 e 48 h de cultivo. Os dados representam média \pm SEM do índice de filamentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. $P < 0,001$ quando comparado ao controle..... 59
- Figura 8 – Efeito das concentrações de 10, 20 e 40 ng/mL do TNF murino (mTNF) sobre a morfologia das células de biofilme maduro de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) comparado ao controle (não tratado). a: controle positivo, não tratado. B: 10 ng/mL de mTNF, c: 20 ng/mL de mTNF e d: 40 ng/mL de mTNF. Aumento de 200 x. Barra: 50 μ m..... 60
- Figura 9 – Efeito das concentrações de 10; 20 e 40 ng/mL de TNF murino (mTNF) sobre a morfologia do biofilme maduro comparado ao controle (não tratado) após 96 h de cultivo. Os dados representam média \pm SEM do índice de filamentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200 x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. $p < 0,05$ quando comparado ao controle..... 61
- Figura 10 – Viabilidade celular da *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em um biofilme em formação sob de mTNF (20 ng/mL) distintos tempos (6, 24 e 48 h). (a) controle positivo, células de *Candida albicans* cultivadas em RPMI 1640 sem suplementação, após 6 h de cultivo, (b) mTNF (20 ng/mL) após 6 h, (c) controle positivo após 24 h de cultivo, (d) mTNF (20 ng/mL) após 24 h, (e) controle positivo após 48 h de cultivo, (f)

- mTNF (20 ng/mL) após 48h..... 62
- Figura 11 – Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), proveniente de biofilme em formação cultivado em RPMI 1640 (controle) (a) e sob 40 ng/mL de mTNF (b). a: mostra hifas verdadeiras com citoplasma homogêneo. Aumento de 20.000 vezes. Barra =500 nm. b: traz *Candida albicans* em forma de levedura, com sinais ultraestruturais de degeneração, citoplasma floculado, parede celular e membranas não preservadas. Aumento de 40.000 vezes. Barra= 250 nm..... 64
- Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra os efeitos de diferentes concentrações de mTNF na formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). (a) Controle (mTNF ausente); (b) 0,1 ng/mL de mTNF; (c) 10 ng/mL de mTNF; (d) 20 ng/mL de mTNF. As setas apontam para as formas de pseudo-hifas. Aumento de 2000 x. Barra = 50 µm..... 65
- Figura 13 – Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), ilustrando o efeito do mTNF sobre a ultraestrutura da parede celular da *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). (a) Controle positivo (mTNF ausente), em que se pode observar células de variadas morfologias mostrando parede homogênea e lisa. Aumento de 22.9850 x. Barra = 4 µm. (b) 0,1 ng/mL de mTNF, no qual se verificou alteração da parede com mudança de aspecto para rugoso comparado ao controle. Aumento de 20.010 x. Barra = 5 µm..... 66
- Figura 14 – Índice de hidrofobicidade (IH) observado no controle (biofilme não tratado com mTNF) e nas concentrações de TNF murino (mTNF) (40, 20, 10, 1 e 0,5 ng/mL) no biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 após cultivo de 48 h a 35°C. A porcentagem de hidrofobicidade da superfície celular de cada amostra foi calculada pela fórmula $\% \text{ IH} = (\text{D.O. controle} - \text{D.O. teste}) \times 100 / \text{D.O. controle}$, com D.O. quantificada por espectrofotometria a absorvância de 660 nm. Os dados são mostrados em média \pm SEM com significância de $p < 0,05$. *- Significa difere significativamente do controle..... 68

- Figura 15 – Composição proteica de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação cultivado havendo mTNF (1; 10; 20 e 40 ng/mL). A quantificação foi feita pelo método colorimérico de Bradford com leitura em espectrofotômetro a uma absorvância de 595 nm. Os dados são exibidos em média \pm SEM com significância de $p < 0,05$. *- Difere significativamente do controle..... 69
- Figura 16– Efeito das concentrações (1, 20 e 40 ng/mL) de TNF humano (hTNF) sobre o biofilme em formação (a) e maduro (formado) (b) de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). Atividade metabólica foi avaliada por ensaio de redução enzimática do sal XTT. Os dados se mostram em média \pm SEM (Absorvância 492nm); *P < 0,001..... 70
- Figura 17 – Efeito de drogas anti-TNF, adalimumab e etanercept, associadas ou não ao TNF humano (hTNF) em biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). Os tratamentos foram 20 e 40 ng/mL de TNF humano (hTNF) (a e b), 40 e 100 ng/mL de adalimumab (ADA ng/mL) (a), 10 e 100 ng/mL de Etanercept (ETA)(b), 100 ng/mL de imunoglobulina G humana (IgG) (a e b) ou controle positivo amostras cultivadas apenas em meio RPMI 1640 (-). A atividade biológica foi mensurada por ensaio de redução de sal de XTT com leitura a uma absorvância de 492nm. Os dados estão expressos em média \pm SEM com *P < 0,001..... 71
- Figura 18 – N, N'-diacetilquitobiose bloqueia o efeito do TNF na formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) (a, b). N, N'-diacetilquitobiose (Chi μ g / mL) isolado ou combinado com hTNF (a) ou mTNF (b) (ng / mL) ou meio (-). Avaliação da atividade por XTT do biofilme de *Candida albicans* em meio suplementado com hTNF ou mTNF e/ou celobiose (Cel) (c), manose (Man) (d) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc)(d), xilose (Xi) (e), glicose (Gli)(e) e arabiose(Ara) (e). Os dados representam a média \pm SEM . *Dados diferem significativamente do controle(-), P < 0,001..... 72

- Figura 19 – Microscopia óptica de células isoladas de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 cultivados com RPMI 1640 sem suplementação (controle) (a), hTNF 20ng/mL (b), hTNF (20 ng/mL) associado com N, N'-diacetilquitobiose (100 µg /mL) (c), e N, N'-diacetilquitobiose (100 µg /mL) (d) por 48 h. Aumento: 200 x. Barra= 20 µm. 74
- Figura 20- O índice de filamentação dos da células de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em biofilme em formação após 48 h de crescimento com RPMI 1640 sem suplementação (controle positivo) (-), hTNF (20ng/mL), hTNF (20 ng/mL) associado com N,N'-diacetilquitobiose (Chi) (100 µg /mL) e N,N'-diacetilquitobiose (Chi) (100 µg /mL). Os dados representam média ± SEM do índice de filamentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. * - Diferença significativa em relação ao controle (P<0,001)..... 75
- Figura 21- Efeito do farnesol (FAR) e/ou TNF murino (mTNF) em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação. *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) de biofilme em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-), mTNF (20 ng/mL) isolado ou combinado com farnesol (50 µM) ou farnesol isolado. A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorvância de 492nm. Os dados representam a média ± SEM da densidade óptica (D.O.)*P <0,001 quando comparado ao controle..... 76
- Figura 22- Efeito de diferentes concentrações de Interleucina 1 (IL-1) sobre biofilme em formação de *Candida albicans*. Biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-) ou diferentes concentrações de IL-1 (0,5; 1; 10 e 20 ng/mL). A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorvância de 492 nm. Os dados representam a média ± SEM da densidade óptica (D.O.)*P <0,001 quando comparado ao controle. Analisados por meio de ensaio de redução do XTT. Os

dados estão apresentados em média \pm SEM com $*P < 0.001$ 77

Figura 23- Efeito de concentrações de Interleucina 17 (IL-17) sobre biofilme em formação de *Candida albicans*, com análise procedida por meio de ensaio de redução do XTT. Biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-) ou diferentes concentrações de IL-17 (1; 2,5; 5; 10 e 50 ng/mL). A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorvância de 492 nm. Os dados representam a média \pm SEM da densidade óptica (D.O.) $*P < 0,001$ quando comparado ao controle..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (MIC) do TNF murino (mTNF) em células planctônicas das cepas fortes formadoras de biofilme de <i>Candida albicans</i> : ATCC 10.2.31 e CEMM 01-05-006. SI: sem inibição ($p < 0,05$).....	55
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Substâncias testadas no biofilme em formação de <i>Candida albicans</i>	47
Quadro 2 - Drogas anti-TNF e carboidratos testados na pré-incubação com TNF (mTNF e hTNF) na formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adalimumab
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ara	Arabiose
Cel	Celbiose
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ETA	Etanercept
FAR	Farnesol
hTNF	TNF humano
IgG	Immunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-17	Interleucina 17
LIO	Laboratório de Investigação em Osteoartropatias
Man	Manose
mTNF	TNF murinho
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
MIC	Concentração Inibitória Mínima
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
CHI	N, N-diacetilquitobiose
RPMI	Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Xi	Xilose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Gênero <i>Candida spp.</i>	23
2.2	<i>Candida albicans</i>	23
2.2.1	Morfologia	24
2.2.2	Fatores de virulência e interações com hospedeiro	27
2.3	Biofilme	29
2.3.1	Características gerais	29
2.3.2	Etapas de formação do biofilme	31
2.3.3	<i>Quorum sensing</i>	33
2.3.4	Resistência dos biofilmes ao ambiente e antifúngicos	34
2.3.5	Técnicas laboratoriais de identificação de biofilme	36
2.4	Relação do TNF e <i>Candida albicans</i>	38
2.5	N, N'-diacetilquitobiose	40
3	PERGUNTA DE PARTIDA	42
4	HIPÓTESES	43
5	OBJETIVOS	44
5.1	OBJETIVO GERAL	44
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6	MATERIAIS E MÉTODOS	45
6.1	Local do estudo	45
6.2	Microrganismos	45
6.3	Reagentes e soluções	45
6.4	Preparo do inóculo	46
6.5	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>	46
6.6	Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	47
6.7	Estudo do biofilme maduro de <i>Candida albicans</i>	48
6.8	Ensaio de ligação ao domínio de TNF semelhante à lectina	48
6.9	Quantificação do biofilme pelo método de redução do sal de tetrazólio (XTT)	50
6.10	Análise da relação hifa/blastoconídio no biofilme de <i>Candida albicans</i>	50

6.11	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
6.12	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	51
6.13	Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)	52
6.14	Avaliação da hidrofobicidade da superfície celular.....	52
6.15	Quantificação dos níveis de proteína.....	53
6.16	Análise estatística.....	54
7	RESULTADOS.....	55
7.1	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do TNF murino (mTNF).....	55
7.2	Efeito do mTNF sobre o biofilme de <i>Candida albicans in vitro</i>	55
7.3	Morfologia do biofilme.....	57
7.4	Microscopia confocal de varredura a laser	61
7.5	Análise ultraestrutural.....	63
7.6	mTNF altera a hidrofobicidade do biofilme de <i>Candida albicans</i>	67
7.7	mTNF altera os níveis de proteína do biofilme.....	68
7.8	Interferência da origem do TNF.....	69
7.9	Efeito das drogas anti-TNF.....	70
7.10	Bloqueio do efeito do TNF pela N, N'diacetilquitobiose.....	71
7.11	Papel do farnesol na via do mTNF no biofilme de <i>Candida albicans</i>	75
7.12	Efeito da IL-1 e IL-17.....	76
8	DISCUSSÃO.....	78
9	CONCLUSÕES.....	90
10	PERSPECTIVAS.....	91
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
12	ANEXO.....	106

1 INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é um fungo comensal oportunista que pode ser encontrado na microbiota da pele e mucosas dos seres humanos. Atualmente, essa espécie é responsável por uma grande parte de infecções oportunistas, particularmente em imunossuprimidos. A taxa de mortalidade nessas situações pode atingir 40% das pessoas afetadas, com grave influência na saúde humana e na economia (NOBILE; JOHNSON, 2015). Dentre os fatores envolvidos na patogenicidade da *Candida albicans*, a capacidade de formar biofilme por esse fungo merece destaque (MATHÉ; DIJCK, 2013).

Os biofilmes são modalidades de vida microbiana constituída por populações sésseis, envolvidas por uma matriz polimérica extracelular, que exprimem características distintas do crescimento planctônico, em vida livre, correspondente. Microrganismos associados à formação de biofilme exibem elevada resistência a agentes antimicrobianos e defesas próprias do hospedeiro. A rigor, essa habilidade aumenta em até 1000 vezes a resistência dos microrganismos, quando comparada à sua sobrevivência em configuração planctônica (COSTERTON et al., 1995).

Assim, uma vez estabelecidas, essas comunidades microbianas são por demais difíceis de erradicação. Diversos mecanismos que conferem essa resistência do biofilme incluem a própria matriz extracelular, que atua como barreira física, as células com reduzida taxa metabólica, conhecidas como células dormentes ou persistentes (“*persisters*”), maior facilidade de transferências de genes de resistência e refratariedade à fagocitose pelas células do sistema de defesa, contribuindo para a persistência e gravidade das infecções (RAJENDRAN et al., 2016).

Quando, porém, os biofilmes são formados em dispositivos implantados e cateteres permanentes, sua remoção, o que nem sempre é viável, pode ser crucial para se obter um tratamento eficaz da infecção, uma vez que o acesso dos agentes antimicrobianos não ocorre adequadamente, viabilizando a persistência do microrganismo (NETT et al., 2007; MATHÉ, DJICK, 2013; PIERCE et al., 2017).

Nos últimos anos, demandam-se novas estratégias para prevenir o crescimento do biofilme, já que é mais difícil seu bloqueio quando estabelecido. Essas opções levam em consideração medidas contra o microrganismo e/ou o microambiente desenvolvido no biofilme (LEBEAUX et al., 2014).

O fator de necrose tumoral (TNF, da sigla em inglês) é uma citocina que participa em várias etapas da resposta inflamatória, interferindo tanto em mecanismos da resposta imune inata quanto adaptativa. Com efeito, o TNF tem papel relevante na defesa contra microrganismos, particularmente aqueles de crescimento intracelular, como as micobactérias e fungos.

Analogamente a outras citocinas, o TNF atua sobre células mamíferas, por meio do acoplamento a receptores específicos, quer nas membranas celulares, quer solúveis, desencadeando-se ativação de mecanismos de transdução intracelular e expressão de genes da resposta aguda inflamatória.

Em artropatias inflamatórias e doença inflamatória intestinal, o TNF é associado à quimiotaxia de células inflamatórias, edema, dor e reabsorção óssea, entre outras ações (FILLER et al., 2005; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016). Assim, o TNF participa de mecanismos relacionados aos sinais e sintomas, bem como dano estrutural nessas doenças.

Desse modo, o bloqueio do TNF por anticorpos monoclonais ou pelo uso de receptores solúveis de TNF agregados à porção Fc de imunoglobulina G (IgG) tornou-se a alternativa para tratamento de doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide e doença de Crohn. Dado seu papel na defesa contra microrganismos, no entanto, assim como no mecanismo de vigilância antitumoral, especialmente linfomas, o uso de bloqueadores do TNF aumenta o risco de infecções consideradas oportunistas, bem como existiria o risco teórico de aumentar a ocorrência de tumores (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

Até onde se sabe, não há demonstração de ação do TNF diretamente sobre fungos. A rigor, o TNF tem ação antimicrobiana via estimulação de células do hospedeiro por meio de mecanismos da resposta inflamatória. Em protozoários, entretanto, já foi observado que o TNF pode afetar seu crescimento via um domínio lectina-símile na molécula do TNF, localizado distante dos sítios de acoplamento do TNF aos seus receptores clássicos. Essa atividade de TNF é inibida por pré-incubação de TNF com N, N'-diacetilquitobiose, um dissacarídeo com afinidade específica para sítios desse domínio de lectina do TNF (LUCAS et al., 1994). Vale ressaltar que a N, N'-diacetilquitobiose é um carboidrato da parede celular de *Candida albicans*. Embora outros açúcares façam parte da parede desse fungo em muito maior quantidade, particularmente mananas, fucanas e N-acetil-glucosamina, existe especificidade para a N,N'-diacetilquitobiose (MASUOKA, 2004).

Considerando que a ação do TNF em protozoários poderia ser encontrada em outros microrganismos, investigou-se o efeito da adição dessa citocina ao cultivo *in vitro* de *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que o TNF interfere na formação do biofilme de *Candida albicans*, desvendando um papel protetor do TNF contra infecções oportunistas sistêmicas, desconhecido até então.

Além da importância na compreensão da patogênese das infecções por *Candida albicans* e, possivelmente, por outros fungos, esse achado também pode oferecer alternativa na profilaxia da formação de biofilme quando da implantação de sondas, materiais de síntese e mesmo próteses em pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida spp.*

O gênero *Candida* está inserido no reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae. Este gênero é composto por fungos polimórficos que podem ser encontrados na microbiota humana e animal, normalmente de maneira simbiótica (YAPAR, 2014).

Candida sp., entretanto, é um patógeno importante para a clínica médica, por causar infecções mucocutâneas e infecções sistêmicas potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos (TSUI et al., 2008) e em situações como: história de diabetes, neutropenia, tratamento oncológico, transplante de órgãos, hemodiálise, amplo uso de agentes antimicrobianos e/ou hospitalização prolongada (PUNITHAVATHY et al., 2012).

São identificadas cerca de 150 espécies do gênero *Candida* na natureza, entretanto as que apresentam importância clínica são apenas 15: *Candida albicans*, complexo *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* e *Candida norvegensis* (YAPAR, 2014). Destas, a maioria das infecções, em torno de 95%, é causada por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, porém, a principal causadora de infecção é a *Candida albicans* (MAHMOUDABADI et al., 2014).

2.2 *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um fungo polimórfico que coloniza o trato gastrointestinal e reprodutivo, bem como a pele da maioria dos seres humanos. Em pessoas saudáveis, é um fungo comensal, não ocasionando problemas a saúde do hospedeiro. Em situações como uso de antibióticos, alterações no sistema imunológico, estresse, infecções, terapias imunossupressoras, variações ambientais (como pH) e/ou mudanças na dieta, pode ocorrer uma alteração da microbiota do hospedeiro, desencadeando a colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro pela *Candida albicans*. Como consequência, um quadro infeccioso pode se instalar. Essas infecções variam desde transtornos superficiais da mucosa e dérmicos, como aftas, infecções vaginais e erupções cutâneas, até infecção hematogênica sistêmica (NOBILE; JOHNSON, 2015).

A candidúria, candidíase vulvovaginal e candidíase oral são as modalidades mais comuns da doença. A candidemia, porém, é um grande desafio em saúde pública, por ser uma infecção de progressão rápida e de altos índices de morbidade e mortalidade, variando de 30% a 70% (MAHMOUDABADI et al., 2014; MATHÉ; DIJCK, 2013).

As infecções por *Candida albicans* são caracterizadas como oportunistas, exprimindo grande relevância clínica entre os pacientes portadores de HIV e os submetidos a terapias anticâncer ou imunossupressora. Outra importância clínica da *Candida albicans* é a capacidade de formar o biofilme, principalmente em pessoas com dispositivos médicos implantados. Vale ressaltar que esta é a espécie do gênero *Candida* mais prevalente na formação de biofilme fúngico (HARRIOTT, NOVERR, 2011).

2.2.1 Morfologia

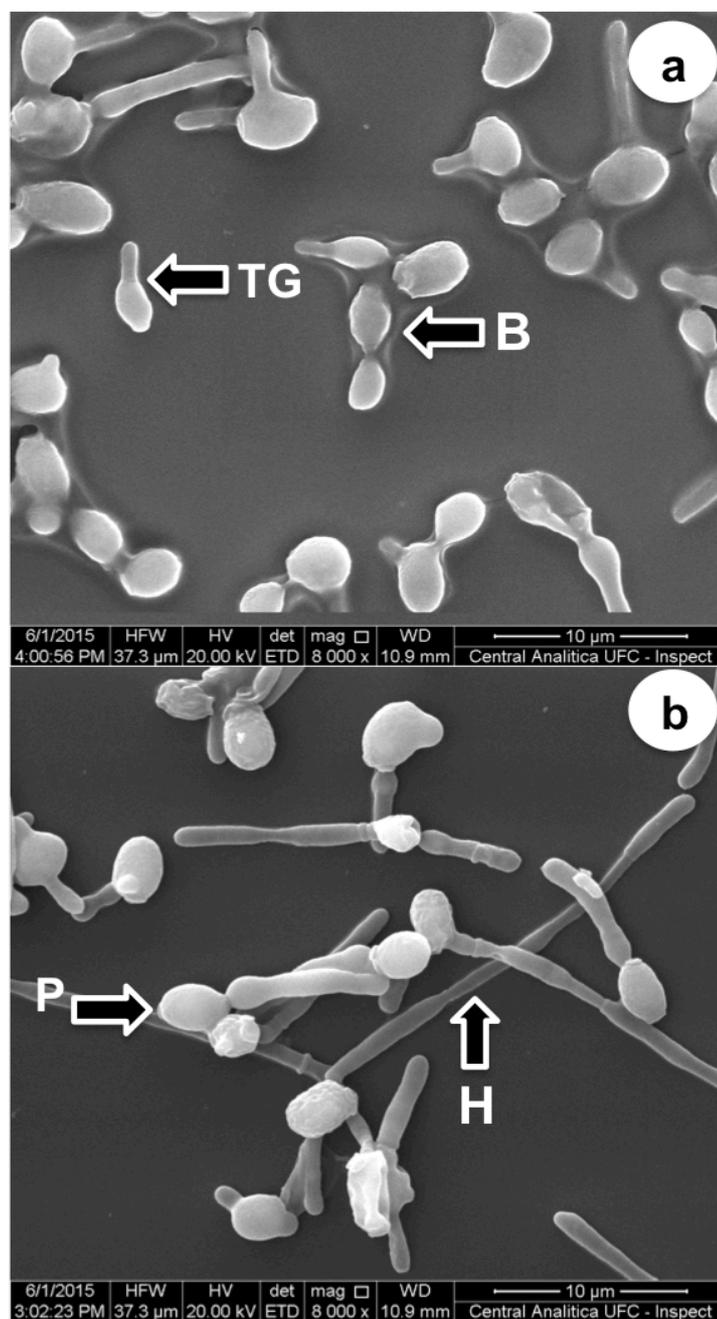
Candida albicans pode se mostrar de três formas distintas: leveduras (ou blastoconídios), pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Cada delas traz características próprias, não apenas relacionadas à morfologia, mas também à patogenia, resistência ambiental, capacidade de formação de biofilme, metabolismo e características bioquímicas e epigenéticas (WANG et al., 2017; MURCIANO et al., 2012).

As leveduras (ou blastoconídio) caracterizam-se por serem células redondas ou ovais que medem, em média, aproximadamente, 2,0 a 4,0 μm , podendo apresentar tanto brotamento axial como bipolar (SIDRIM; ROCHA, 2004). Esta é a configuração mais fácil de disseminação hematogênica. Já em relação a pseudo-hifa, ela é alongada elipsoide, que permanece unida uma às outras pelo sítio de septação e cresce em um padrão de ramificação. Por fim, hifas verdadeiras são longas e altamente polarizadas e demonstram constrições não óbvias entre as células (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As pseudo-hifas e hifas são classificadas como modelos filamentosos da *Candida albicans*, sendo responsáveis pelo processo mecânico de invasão tecidual. As filamentosas também dificultam a fagocitose realizada pelas células do sistema de defesa (LIM et al., 2012).

As leveduras unicelulares reproduzem-se assexuadamente por gemulação. Entre a fase de leveduras e a formação de hifas existe um estado de transição, os tubos germinativos. As pseudo-hifas podem ocorrer quando a gemulação falha na separação desde a célula mãe, o que produz filamentos alongados que mantêm as constrições nas junções do septo. Os filamentos das pseudo-hifas podem consistir em células semelhantes a hifas (SUDBERY et al., 2011).

Figura 1- Aspectos morfológicos de células de *Candida albicans* cultivadas *in vitro* em RPMI 1640 observados por microscopia eletrônica de varredura. Em a, as setas indicam a formação de um tubo germinativo (TG) e blastoconídio (B). Em b, as setas representam pseudo-hifa (P) e hifa verdadeira (H). Aumento de 10.000 x. Barra =10 μ m.

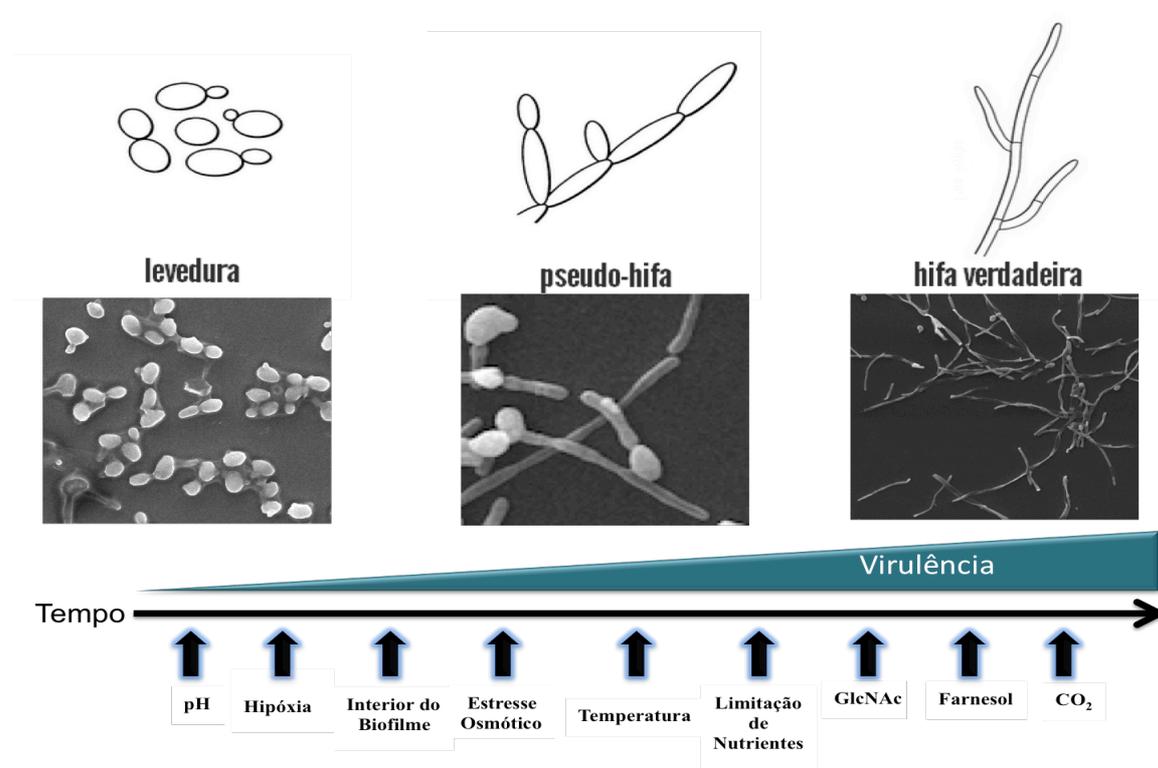


Fonte: Arquivo pessoal

A transição levedura-hifa é amplamente estudada nos últimos anos por estar associada à virulência da *Candida albicans*. O crescimento das hifas é promovido por condições ambientais como crescimento a temperatura de 37°C, hipóxia, estresse osmótico, *quorum sensing*, limitação de nutrientes, metabolismo de aminoácidos, existência de soro, pH neutro, alta concentração de CO₂ e ocorrência de N-acetilglicosamina. Para as leveduras, o crescimento é favorecido a temperatura de 30°C em pH ácido (pH 4,0). Quando se dá a formação de pseudo-hifas, temperatura de 35 °C e pH igual a 5,5 favorecem esse processo (SUDBERY et al., 2011; NADEEM et al., 2013).

No biofilme, o fatores de regulação de maior destaque são o farnesol e o tirosol, moléculas de comunicação intercelular, denominadas *quorum sensing*, que permitem o controle populacional e mudanças morfológicas (GOW; HUBE, 2012). Todos esses fatores são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição e consequente expressão de genes responsáveis pela modificação morfológica.

Figura 2- Esquema ilustrativo dos fatores envolvidos da transição entre as distintas formas morfológicas de *Candida albicans*. pH- potencial de hidrogênio; GlcNAC- N-acetilglicosamina e CO₂. - Dióxido de Carbono.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Fatores de virulência e interações com hospedeiro

A patogenicidade da *Candida albicans* é mediada por uma série de fatores de virulência, como adesão (adesinas e invasinas), produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas), tigmotropismo, mudança fenotípica, transição morfológica levedura-hifa, e a formação de biofilme (GOW; HUBE, 2012). Além disso, a *Candida albicans* exprime mecanismos de resistência a oscilações ambientais, como: rápida adaptação às flutuações do pH ambiental, flexibilidade metabólica, poderosos sistemas de aquisição de nutrientes e mecanismos robustos de resposta ao estresse (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; LIM et al., 2012).

No desenvolvimento da candidíase, há uma transição da fase comensal para o estágio parasitário com o hospedeiro, dependente da expressão dos fatores de virulência e falha do sistema imunológico do hospedeiro. Essa interação é caracterizada por três estádios diferentes e dinâmicos, assim denominados: (I) adesão, (II) invasão e (III) dano (MOYES et al., 2015).

A adesão de *Candida albicans* aos tecidos do hospedeiro depende de forças atrativas relacionadas à carga superficial das células (interação de Van Der Waals, interação hidrofóbica e movimento browniano) e a um conjunto de proteínas (adesinas), que medeiam a aderência a superfícies abióticas, a outras células de *Candida albicans*, a outros microrganismos e ao hospedeiro (WILLIAMS et al., 2013).

As adesinas mais bem caracterizadas são membros da família Als, Hwp1 e Eap1. Os genes ALS codificam glicoproteínas de superfície celular ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Das oito proteínas Als, a adesina Als3 predominante nas hifas destaca-se no processo de adesão (ZHAO et al., 2004; MOYES et al., 2015). Outra adesina da *Candida albicans* importante é a Hwp1, uma proteína ligada a GPI, expressa principalmente nas hifas (FELDMAN et al., 2014). A Hwp1 é um substrato para transglutaminases de mamífero, cuja reação faz ligação covalente entre a parede da *Candida albicans* e células hospedeiras (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005).

Proteínas independentes da morfologia também podem contribuir para a adesão. Estas incluem proteínas ligadas a GPI (Eap1, Iff4 e Ecm33), proteínas não covalentes associadas à parede (Mp65), proteases associadas à superfície celular (Sap9 e Sap10) e a proteína de superfície do tipo integrina (MOYES et al., 2012).

A invasão da *Candida albicans* depende da formação de hifas e pode ocorrer por meio de duas vias, a saber: endocitose induzida e penetração ativa. A endocitose induzida ocorre pela ligação de proteínas especializadas da superfície celular (invasinas), em particular a Als3 (nas hifas), que se ligam a um receptor do hospedeiro em células epiteliais ou endoteliais (E-caderina, N-caderina) do hospedeiro.

Além da Als3, a Ssa1, um membro expresso na superfície celular da família 70 de proteína de choque térmico (Hsp70), também denota um importante papel nesse processo (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A penetração ativa nas células e tecidos do hospedeiro requer que a hifa esteja viável com formação de vacúolos normais, integridade da parede celular, extensão das hifas e outras forças físicas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Células fúngicas podem detectar a topografia da superfície do hospedeiro e responder crescendo em direção única, fenômeno chamado de tigmotropismo. Para tal, o *quorum sensing* é essencial, atuando tanto na regulação da morfologia (crescimento de levedura ou hifa) quanto na invasão profunda dos tecidos, como observado em análises histológicas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O dano causado diretamente pelo fungo ocorre pela penetração das hifas nos tecidos dos hospedeiros (ação mecânica), bem como secreção e liberação de hidrolases. O dano tecidual também pode ser o resultado de uma superativação do sistema imune com infiltração maciça de neutrófilos ou, finalmente, uma resposta sistêmica inadequada e desequilibrada, causando sepse. Assim, o reconhecimento imunológico pode não só ser benéfico e crucial para combater fungos invasores, mas também pode ser uma parte importante do processo da doença (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A transição morfológica ocorre nas etapas patogênicas da *Candida albicans*, com a de hifa apresentando diversos fatores de virulência ausentes da levedura, como: adesinas (Hwp1 e Als3), invasinas, secreção de enzimas (Sap4-6, fosfolipases, lipases e hemolisinas) e invasão tecidual mecânica. A configuração de hifa também exprime a capacidade de espoliar ferro (Als3), evadir-se da fagocitose, destruir espécies reativas de oxigênio e formar biofilme (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Nesse contexto, os biofilmes são considerados um importante fator de virulência por aumentar a resistência da *Candida albicans* aos tratamentos antifúngicos tradicionais, de modo que será mais bem detalhado no tópico abaixo (SILVA et al., 2017).

2.3 Biofilme

2.3.1 Características gerais

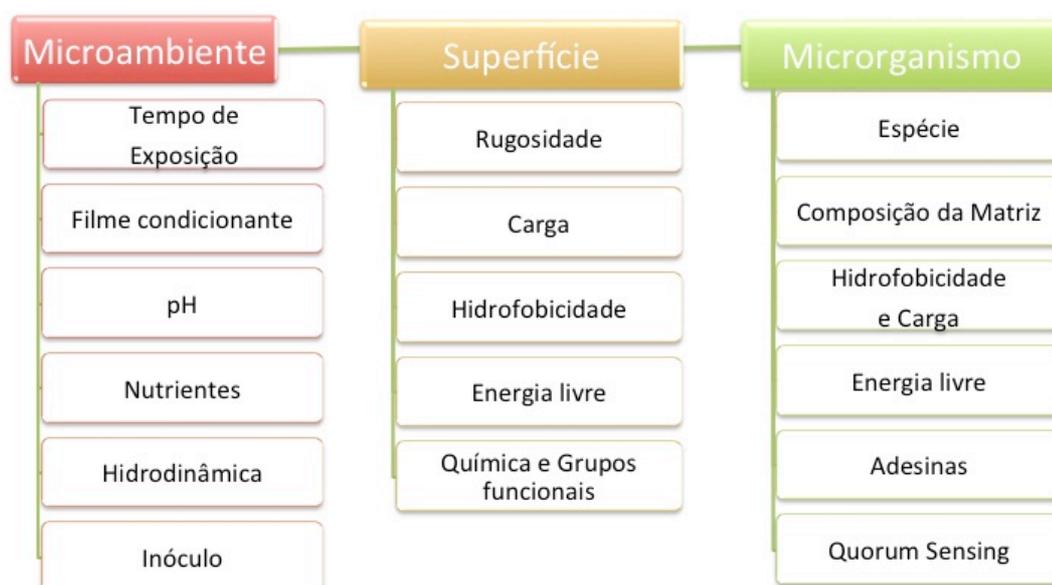
Os biofilmes são complexas comunidades heterogêneas de microrganismos envoltos por uma matriz composta por substância polimérica extracelular, produzida pelos próprios microrganismos, aderida a superfícies biótica e/ou abiótica (COSTERTON et al., 1995).

As primeiras observações foram de Antonie van Leuwenhoek, em amostras de dente. Posteriormente, Zobell observou a formação de biofilme em distintas superfícies, em cascos de navio. Nos anos de 1960, começaram os postulados sobre o *quorum sensing*, observando que as bactérias *Vibrio fischeri* expressavam bioluminescência após atingir certo número de bactérias (HOIBY, 2014).

A teoria do biofilme como se conhece hoje, entretanto, só surgiu na década de 1970, com os estudos de Costerton, o qual foi capaz de afirmar que as bactérias se encontravam, predominantemente, em biofilmes. Desde então, uma série de estudos foram empreendidos em relação a estrutura, composição e fisiologia de biofilmes (CHANDRA et al., 2001; DONLAN, 2002; AZEVEDO; CERCA, 2012; ZARNOWSKI et al., 2014).

É válido mencionar o fato de que a formação do biofilme depende de uma série de fatores associados ao microrganismo e à superfície em que se constitui o biofilme, além de características do próprio microambiente, conforme expresso na Figura 3.

Figura 3 – Esquema ilustrativo dos principais fatores envolvidos na formação e desenvolvimento de um biofilme microbiano.



Fonte: Arquivo pessoal

Os componentes estruturais do biofilme são microrganismo, matriz extracelular e componentes de origem não biológica. Os microrganismos são uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, na qual existem distintos fenótipos, metabolismo e transcrição genética. São percebidas muitas alterações fenotípicas, principalmente nos aparatos de motilidade (em bactérias e protozoários), no tamanho da célula e no metabolismo, decorrentes da restrição de nutrientes e de oxigênio em algumas fases, da variação na taxa de reprodução e em toda a regulação gênica (DONLAN, 2002; AZEVEDO; CERCA, 2012; GULATI; NOBILE, 2016).

É importante ressaltar a noção de que biofilmes microbianos podem ser produzidos por apenas uma espécie (biofilme monoespécie) ou pelo consórcio de vários microrganismos (biofilme misto), que podem incluir fungos, bactérias, protozoários e algas (AZEVEDO; CERCA, 2012). Os biofilmes mistos são os mais comuns na natureza, podendo ser compostos por espécies do mesmo reino ou de reinos diferentes, podendo uma espécie auxiliar a outra na adesão, por meio da liberação de metabólitos no meio. Pode ser, entretanto, desvantagem decorrida de competição por nutrientes ou acúmulo de metabólitos tóxicos (DONLAN, 2002; AZEVEDO; CERCA, 2012).

Acredita-se que a maioria dos microrganismos está organizada em biofilmes (ROMLING, BALSALOBRE, 2012). O predomínio do crescimento dos microrganismos como biofilme é compreensível, considerando as inúmeras vantagens que essa modalidade de vida tem, como facilidade de adaptação, proteção física, fator de colonização, heterogenicidade de metabolismo, facilidade de troca de informação genética, resistência a antimicrobianos, oscilações de pH e osmolaridade (AZEVEDO; CERCA, 2012).

Os biofilmes são as estruturas microbianas que permitem a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios estritos. Corroborando essa afirmação, estudo realizado por Fox et al. (2014) demonstrou que biofilmes formados por *Candida albicans* exibem um gradiente de oxigênio que permite a proliferação e a sobrevivência das bactérias anaeróbias como *Clostridium perfringens* em seu interior. Este biofilmes se caracterizam por serem heterogêneos, com múltiplas constituições morfológicas, incluindo levedura, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (EL ABED et al., 2012; BONHOMME ; D'ENFERT, 2013; SOLL; DANIELS, 2016).

A matriz representa 90% da biomassa do biofilme, sendo esta um gel altamente hidratado (85% a 95% de água) composto por carboidratos (glicose, manose, ramnose e N-acetilglucosamina), DNA extracelular (eDNA), proteínas, lipídeos e sais minerais. Esses componentes têm proporção variável de acordo com a espécie formadora de biofilme (COSTERTON et al., 1995; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; PIERCE et al., 2017).

Em biofilmes formados por *Candida albicans*, a composição da matriz é de glicoproteínas (55%), carboidratos (25%), lipídeos (15%) e eDNA (5%) (ZARNOWSKI et al., 2014; GULATI; NOBILE, 2016; PIERCE et al., 2017). A matriz tem importante papel atuando na adesão, proteção física, adsorção de nutrientes, atividade enzimática, fonte de nutrientes, troca de informação genética e coesão (PIERCE et al., 2017).

Em relação aos componentes inorgânicos, água e sais minerais, distribuídos por meio de microcanais internos (estruturas características dos biofilmes), são importantes na distribuição de nutrientes, no escoamento de metabólitos (alguns potencialmente patogênicos ao ser humano) nas enzimas necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (PIERCE et al., 2017).

Atualmente, sabe-se que a formação de biofilme tem importância para a Odontologia com o desenvolvimento de cárie e doença periodontal; para a Medicina, no caso de implantes médicos e infecções crônicas; na indústria, com perdas econômicas com a biodegeneração de cascos de navio, turbinas e recuperação de petróleo; além da indústria alimentícia e da saúde pública com a contaminação de água e alimentos (AZEVEDO; CERCA, 2012).

Os biofilmes podem ser usados, contudo, de maneira vantajosa, como: a produção de compostos em reatores, biorremediação (processo que utiliza seres vivos para reverter uma contaminação ambiental), manutenção da cadeia alimentar, reciclagem de nutrientes e manutenção do equilíbrio da flora microbiana de um órgão ou mesmo no ambiente nos casos de biofilmes de microrganismos comensais (AZEVEDO; CERCA, 2012).

2.3.2 Etapas de formação do biofilme

A formação do biofilme é um processo que pode ser definido nas fases de adesão inicial, adesão irreversível, maturação e desprendimento (AZEVEDO; CERCA, 2012; MATHÉ; DIJCK, 2013).

A adesão inicial se caracteriza pela ligação do microrganismo planctônico ao substrato, interação célula-superfície e sua colonização inicial. Esta ligação, contudo, é reversível, em virtude das interações não serem específicas, representadas pela pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, ácido-base de Lewis e hidrofobicidade. Este processo leva de uma a duas horas para ocorrer e, no caso da *Candida albicans*, essa se mostra como blastoconídios, não sendo percebidas alterações fenotípicas. Os genes para a produção da substância exopolimérica (EPS), no entanto, são ativados logo após o contato entre célula e superfície (AZEVEDO; CERCA, 2012; BONHOMME; D'ENFERT, 2013).

O processo de adesão inicial depende de alguns fatores, como o pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, *quorum sensing*, compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura. Para que ocorra a adesão, o substrato deve conter um filme condicionante, formado pela adsorção de compostos orgânicos (GULATI; NOBILE, 2016; PAULONE et al., 2017).

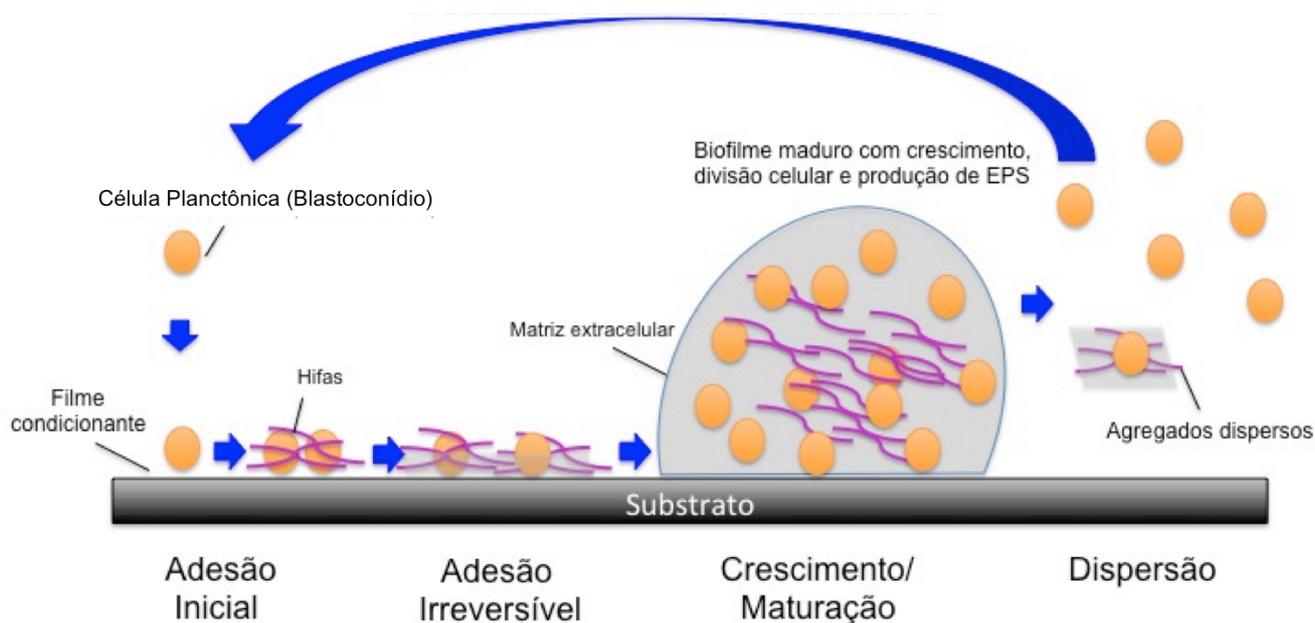
No âmbito das interações físico-químicas na adesão inicial, destaca-se a hidrofobicidade, representada pelo grau de capacidade de molhadura da superfície em meio aquoso, favorecendo a adesão em superfícies hidrofóbicas (AZEVEDO; CERCA, 2012). Assim, quanto maior a hidrofobicidade da célula, maior a facilidade de adesão inicial de um microrganismo (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; AZEVEDO; CERCA, 2012).

A etapa seguinte é a adesão irreversível que se caracteriza pelas microcolônias, correspondendo a um amontoado de células aderidas entre si e a uma superfície. O período para formação de microcolônias é de três a quatro horas, e, após 11 horas, já é possível se observar agregados irregulares de *Candida albicans* no substrato (BONHOMME; D'ENFERT, 2013). A estrutura de biofilme de *Candida albicans* se desenvolve em uma bicamada composta de leveduras, tubos germinativos e hifas jovens, com uma matriz de substâncias exopoliméricas (EPS). Nessa etapa, os genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e na produção de substâncias exopoliméricas (EPS) estão totalmente ativos. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela própria matriz extracelular que envolve parcialmente os microorganismos (AZEVEDO; CERCA, 2012; GULATI; NOBILE, 2016).

A maturação, a seu turno, caracteriza-se pela estrutura organizada na qual há a estabilização do crescimento e maturação da estrutura. O material extracelular aumenta com o tempo de incubação, até que as leveduras, as pseudo-hifas e as hifas estejam totalmente inseridas na matriz extracelular. Além disso, observa-se aumento da densidade populacional, da espessura do biofilme e da estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente. O aumento da população de um biofilme acontece, tanto pela divisão celular, quanto pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas (AZEVEDO; CERCA, 2012; GULATI; NOBILE, 2016).

Por fim, quando o biofilme mostra um número de microrganismos maior do que suportado pela comunidade, células similares às células planctônicas iniciais se desprendem do biofilme no meio ambiente, podendo formar um novo biofilme em outro sítio, caracterizando, assim, um ciclo de contaminações. Esse processo é modulado na *Candida albicans* essencialmente pelo farnesol (FLEMING, RUMBAUGH, 2017)

Figura 4- Representação esquemática das etapas de formação do biofilme de *Candida albicans*: adesão inicial (adesão de leveduras em suspensão ao substrato), adesão irreversível (formação de colônias e formação de hifas), crescimento/maturação (secreção de matriz extracelular (MEC) e multiplicação celular, formando uma estrutura tridimensional complexa) e dispersão (liberação de células para colonizar outro sítio e formar novos biofilmes). EPS- Substância exopolimérica.



Fonte: Arquivo pessoal

2.3.3 Quorum sensing

Quorum sensing é um sistema de sinalização entre microrganismos em biofilmes microbianos e em vida planctônica, constituído por moléculas sinalizadoras que permitem a regulação de variados processos dentro do biofilme, como a densidade populacional, produção de matriz, morfogênese, crescimento, síntese de enzimas (proteases, lipases e alginases) e resistência ao estresse oxidativo. A via de ação do *quorum sensing* se dá pelo controle da expressão de genes relacionados a cada um dos processos a serem modulados, estando esse sistema sempre vinculado a densidade populacional (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Candida albicans foi o primeiro eucarionte em que se demonstrou a existência de *quorum sensing*, sendo o farnesol (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrieno-1-ol) e o tirosol (2- [4-hidroxifenil] etanol) as duas moléculas mais conhecidas (HORNBY et al., 2001; PIERCE et al., 2015). O farnesol age como molécula autorreguladora, inibindo o crescimento de hifas e a expressão de genes específicos

para a formação de um biofilme (RAMAGE et al., 2002). Este é gerado endogenamente na célula por ação enzimática da desfosforilação de farnesil difosfato, um precursor da síntese de esteróis (SILVA, 2009). O acúmulo de farnesol, além de bloquear a transição de leveduras para hifas em altas densidades celulares, inibe a formação de tubos germinativos desencadeada por substâncias como o soro, prolina ou N-acetilglucosamina (PIERCE et al., 2015). Vários estádios de desenvolvimento do biofilme são influenciados pelo farnesol, incluindo a adesão das células a superfície, arquitetura de biofilmes maduros e a dispersão de células do biofilme (DEVEAU; HOGAN, 2011; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). Farnesol e seus derivados são precursores da síntese do ergosterol e possuem papel na resistência antifúngica do biofilme (YU et al., 2012).

O tirosol, uma molécula de ação antioxidante, derivado de tirosina, atua opostamente ao farnesol, acelerando a formação dos tubos germinativos e estimulando o processo de filamentação do fungo e maturação do biofilme. Portanto, a morfologia e o desenvolvimento de biofilme por *Candida albicans* são controlados pelo balanço entre as quantidade de farnesol e tirosol (CHEN et al., 2004).

Apesar de ser bem conhecida a função destas duas moléculas de *quorum sensing*, pode haver outros presentes na regulação da organização dos biofilmes. A *Candida albicans* também secreta feniletanol e triptofol, álcoois aromáticos identificados como moléculas de *quorum sensing* em *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda não está completamente elucidada, porém a relação entre essa molécula e os mecanismos celulares da *Candida albicans* (CHEN et al., 2006; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

2.3.4 Resistência dos biofilmes ao ambiente e antifúngicos

Os biofilmes exprimem elevadas tolerância aos antifúngicos, às injúrias ambientais e às ações do sistema imunológico, quando comparados a células em estado planctônico. A resistência dos biofilmes decorre de vários fatores, como matriz extracelular, metabolismo reduzido, limitação de nutrientes, alterações na expressão gênica, aumento na concentração de esterol, alta densidade celular, regulação positiva das bombas de efluxo e células *persisters* (MATHÉ, DJICK, 2013).

O fator de maior destaque é a matriz extracelular, pois alguns componentes desta são capazes de sequestrar cátions, metais e toxinas, conferindo também proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dissecação. Um constituinte conhecido da matriz de biofilme que contribui para as suas propriedades de resistência a fármacos é o β -1,3-glucano, polissacarídeo predominante na parede da *Candida albicans* (NETT et al., 2007; PIERCE at al., 2017). Assim, o tratamento de biofilmes com β -1,3-glucanase aumenta a susceptibilidade dos biofilmes ao fluconazol (NETT et al., 2007) e a

adição de β -1,3-glucanos aumenta a tolerância das células planctônicas ao fluconazol (MITCHELL et al., 2013). Finalmente, o eDNA é também um componente da matriz que contribui, provavelmente de forma indireta, para a resistência da *Candida albicans* aos fármacos (MARTINS et al., 2010). MARTINS et al. (2012) relataram que o tratamento de biofilmes com DNase aumentou a atividade de caspofungina e anfotericina B na destruição de biofilmes maduros de *Candida albicans*. Foi sugerido pelos autores que esse efeito pode ser devido o eDNA modular a expressão de genes envolvidos na modificação de lipopolissacarídeos e / ou reduzir a penetração de drogas no biofilme. A redução da penetração pode se dá pelo eDNA se ligar aos antimicrobianos carregados positivamente atuando como um quelante e impedindo a ação direta dos mesmos sobre os biofilmes (CHIANG et al., 2013).

Outros componentes podem atuar na resistência a fármacos, pois ainda não está completamente elucidado o papel da matriz na resistência aos antifúngicos, em parte por causa das dificuldades na identificação de seus constituintes (NETT et al., 2007; PIERCE et al., 2017).

Outro fator que dificulta a ação de fármacos contra o biofilme de *Candida albicans* é o fato de este ser heterogêneo, mostrando células com distintas morfologias (hifas, pseudo-hifas e leveduras), ciclo de vida, metabolismo e expressão gênica em relação a glicólise, metabolismo de ácidos graxos e síntese de ergosterol (BONHOMME; D'ENFERT, 2013).

A existência de células *persisters* em seu interior é outro fator importante para resistência. As *persisters* são variantes fenotípicas capazes de sobreviver a concentrações de antibióticos bem acima dos MICs (Concentração Mínima Inibitória) pelo fato de que o seu metabolismo se encontrar em estado latente (LAFLEUR et al., 2006; LEWIS, 2012). As células *persisters* em biofilmes de *Candida albicans* foram mostradas pela primeira vez em 2006, quando Lafleur et al. (2006) observaram que a maioria da população do biofilme de *Candida albicans* morria com as concentrações de anfotericina B (AMB) relativamente baixas e cerca de 1% da população eram resistentes mesmo a concentrações elevadas do fármaco e foram nomeadas *persisters*. Quando testado o efeito de AMB na formação de biofilmes por duas cepas de *Candida albicans*, SC5314 e GDH 2346, demonstrou-se que os biofilmes formados pela última cepa continham pequena quantidade de células que eram resistentes a concentrações de AMB de 100 μ g / mL após 24 h de exposição, enquanto a MIC para as células planctônicas desta cepa é 1,3 μ g / mL. Surpreendentemente, os biofilmes formados por SC5314 não mostraram células sobreviventes após o mesmo tratamento, ou seja, não traziam *persisters* (AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2010). Consequentemente, observa-se que a resistência do biofilme de *Candida albicans* é um somatório de fatores que serão variáveis de acordo com as condições ambientais e a cepa dos microrganismos envolvidos na formação do biofilme.

2.3.5 Técnicas laboratoriais de identificação de biofilme

A avaliação de todos os processos e características dos componentes celulares e inertes do biofilme permite compreender como esses microrganismos se organizam. Essas informações podem ser utilizadas na prevenção e tratamento dos biofilmes de importância médica (AZEVEDO; CERCA, 2012; FRANKLIN et al., 2015).

O estudo do biofilme permite observar características como composição, organização especial, injúrias celulares ou transição de estágio de desenvolvimento, permitindo inferir sobre a adesão e formação do biofilme, suscetibilidade a agentes antimicrobianos e as relações interespecíficas em biofilmes mistos. Essa avaliação é realizada por métodos visuais como microscopia de luz de campo claro, confocal, de contraste de fase, de epifluorescência (ou fluorescência), de força atômica e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (AZEVEDO; CERCA, 2012; PANTANELLA et al., 2013; DOUTERELO et al., 2014).

Na microscopia de luz de campo claro, é necessário o uso de corantes, sendo, no caso da *Candida albicans*, o corante de escolha o lactofenol ou azul de algodão. No método do azul de algodão, a visualização e a preservação dos fungos são excelentes, uma vez que não ocorre plasmólise. O azul de algodão é corante diferencial para quitina e celulose, elementos da parede celular dos fungos (LACAZ, 2002). Além da análise direta do biofilme, pode-se realizar a análise histológica dos tecidos invadidos por biofilmes utilizando microscopia de luz e avaliar o seu comportamento *in vivo*. Em outras palavras, podem ser observadas o grau de invasão e as lesões promovidas pelo biofilme microbiano (OHTA et al., 2007).

A análise morfológica mais utilizada no estudo de biofilmes, entretanto, é a microscopia de epifluorescência (ou fluorescência) e a confocal, pois este tipo de microscopia se destaca por permitir a avaliação *in situ* do biofilme, mantendo a sua integridade, dispensando o uso de fixadores ou corantes. Com auxílio de marcadores fluorescentes ou sondas, é possível se obter informações sobre morfologia, metabolismo celular, filogenia celular, além de adesão, arquitetura física e química dos polímeros (COSTERTON et al., 1995). Outra característica importante é permitir a análise da viabilidade e contagem de células vivas e mortas *in situ* utilizando o recurso de marcadores fluorescente LIVE-DEAD. No caso do confocal, a grande vantagem reside na redução ou eliminação da fluorescência de zonas fora do plano focal e em permitir obter a informação independentemente de várias secções ópticas em espécies espessas. Além disso, essa técnica associada a *softwares* específicos permite projeções tridimensionais dos espécimes observados e projeção de planos perpendiculares ao plano da amostra (AZEVEDO; CERCA, 2012; DOUTERELO et al., 2014).

A microscopia eletrônica pode ser de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). Em ambas as técnicas, a desvantagem, de maneira geral, está na perda da matriz ao longo do processamento, em virtude, desidratação. A exceção mostra-se no microscópio eletrônico de varredura com modo ambiental, no qual não é necessário o processamento para análise das amostras, nem a amostra precisa ser colocada em alto vácuo, permitindo estudos em células vivas (STOKES; DONALD, 2000).

A MET permite avaliar o microrganismo formador do biofilme de maneira individual e suas características, como espessura de parede celular, integridade de membranas e do núcleo, bem como a ocorrência de vacúolos. Já a aplicação da MEV está na observação do biofilme como um todo, dos fenômenos de adesão e filamentação e interação dos microrganismos, principalmente, em biofilmes mistos (BRAGADEEWARAN et al., 2010).

Os estudos dos componentes da matriz extracelular são essenciais para caracterizar o biofilme ante a importância na resistência aos tratamentos. O estudo da composição da matriz pode ser feito por análises bioquímicas utilizando métodos colorimétricos como Bradford e reação sulfo-fosfo-vanilina (SPV), técnicas de biologia molecular ou ELISA. O grande desafio, contudo, é a extração dos componentes dessa matriz (COMTE et al., 2006).

As análises colorimétricas são indiretas, mensuradas por espectrofotometria, medida de absorção ou transmissão de luz. A maioria dos métodos utilizados em Bioquímica Clínica envolve a determinação espectrofotométrica de compostos corados (cromóforo) obtidos pela reação entre o composto a ser analisado e o reagente (reagente cromogênico), originando um produto colorido. Os métodos que se baseiam nesse princípio são denominados métodos colorimétricos, os quais geralmente, são específicos e muito sensíveis. A utilização de compostos coloridos decorre do fato de eles absorverem luz visível (COMPRI-NARDY et al., 2009). Os métodos colorimétricos também são largamente utilizados para avaliação do crescimento do biofilme, tanto pela avaliação da quantidade de biomassa como ocorre no teste de cristal violeta, como pela avaliação do metabolismo celular pelo 2,3-bis (2- metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido (XTT) . O cristal violeta é um derivado de anilina, exibindo afinidades por moléculas negativamente carregadas, como os radicais fosfatos dos ácidos nucleicos, que se encontram no citoplasma das células e matriz extracelular, além dos polissacarídeos na matriz. Com efeito, as células (vivas ou mortas), assim como a matriz, são coradas pelo cristal violeta, permitindo inferir a quantidade de biomassa do biofilme (PEETERS et al., 2008). Já o XTT é um sal de tetrazólio reduzido a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima ativa somente em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. O formazano permite uma modificação da cor da solução, quantificado fotometricamente e é relacionado com o número de células viáveis (ROEHM et al., 1991).

Nos estudos dos biofilmes, também se demanda compreender as etapas de formação do biofilme como a adesão. O método mais prático para avaliar a adesão inicial é pela mensuração da hidrofobicidade. Esta propriedade do biofilme está associada aos componentes da superfície celular dos microrganismos que promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofilinas). O índice de hidrofobicidade pode ser alvo de alteração no que concerne ao tempo de incubação e fases de desenvolvimento do biofilme que podem ser inferidos com essa técnica (CHIA et al., 2008; ROSENBERG, KJELLEBERG, 1986). Quanto maior o índice de hidrofobicidade maior é a capacidade de formar biofilme. Uma das maneiras de avaliar é a leitura da absorvância do biofilme antes e depois da exposição a hidrocarbonetos, como xileno, octano e hexadecano. Os hidrocarbonetos simulam a superfície de adesão, promovendo a extração dos componentes hidrofóbicos e permitindo mensurá-los (CHIA et al., 2008).

2.4 Relação do TNF e *Candida albicans*

O TNF desempenha papel importante na defesa do hospedeiro e regulação da resposta imune (KOLLIAS et al., 1999). Esta citocina, entretanto, também é um fator importante na patogênese de doenças autoimunes como a artrite reumatoide. Na clínica médica, é comum o uso de três antagonistas do TNF no controle da artrite reumatoide: etanercept, infliximabe e adalimumab. Estudos indicam, todavia, que o uso de antagonistas de TNF está associado a um aumento da incidência de infecções oportunistas, como tuberculose, histoplasmose e listeriose. Além disso, a administração destes agentes está associada a um aumento da incidência de infecções invasivas por *Candida albicans*, provavelmente, pelo fato de que o TNF desempenhar papel importante na defesa do hospedeiro contra as infecções por *Candida albicans* (FILLER et al., 2005).

O TNF é liberado em resposta a infecções fúngicas e estimula a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão de leucócitos, o que leva ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, fagocitose e morte de fungos (FILLER et al., 2005). Em ratos, a expressão de TNF é aumentada durante as primeiras 12 h de infecção e está correlacionada com a migração de um grande número de leucócitos para os focos de infecção. O papel do TNF foi demonstrado tanto em animais nocaute para o gene TNF (TNF - / -), quanto pela inoculação de anticorpos policlonais anti-TNF. Em ambos os casos, o crescimento da *Candida albicans* nos tecidos dos hospedeiros foi exacerbado, quando comparado ao controle (MARINO et al., 1997; LOUIE et al., 1994). LOUIE et al. (1994) demonstraram aumento dos níveis de TNF sérico em camundongos com candidíase sistêmica provocada pela inoculação de *Candida*

albicans. A citocina demonstrou um efeito protetor, indicando a capacidade do hospedeiro em inibir o crescimento deste patógeno.

O TNF também estimula a expressão ou medeia a atividade de várias outras moléculas envolvidas na defesa contra *Candida albicans*. Por exemplo, em estudos *in vitro* foi possível observar que células endoteliais respondem à infecção por *Candida albicans*, expressando E-selectina, molécula de adesão vascular celular (VCAM-1), molécula de adesão intercelular (ICAM-1), e secretando IL-8 e fator ativador de plaquetas (PAF), que participam no recrutamento de leucócitos no local da infecção (OROZCO; FILLER, 2000; IM; CHOI; KO, 1997).

As respostas biológicas ao TNF são mediadas por dois receptores, TNFRp55 e TNFRp75. A porção extracelular de ambos os receptores é encontrada como TNFR solúvel na circulação. Embora os domínios extracelulares partilhem homologia uns com os outros, os domínios intracelulares não têm homologia, fato indicativo de que os dois receptores podem utilizar mecanismos diferentes para sinalização intracelular. Quando os camundongos TNFRp55 - / - estão infectados com *Candida albicans*, estes apresentam uma defesa deficiente contra este fungo e vão a óbito rapidamente. Em contraste, aos camundongos TNFRp75 - / - que apresentam o quadro clínico, mas a infecção não chega a ser letal. Isso indica que o TNF medeia a defesa do hospedeiro contra as infecções por *Candida albicans* predominantemente por meio de TNFRp55 (FILLER et al., 2005).

O efeito regulador do TNF junto aos macrófagos e neutrófilos contra cepas de *Candida albicans* já está documentado (OHTA et al., 2007). Não há, porém, estudos que provem a possível ação dessa substância diretamente sobre os microrganismos, sem que haja o intermédio de células da resposta inflamatória, bem como não há relatos de que haja receptores clássicos para o TNF ou citocinas outras em fungos, incluindo espécies de *Candida spp*.

Considerando a alta incidência de infecções fúngicas em pacientes que fazem uso de agentes bloqueadores do TNF, é razoável supor, no entanto, que a própria citocina interfere no desenvolvimento de fungos patogênicos como os do gênero *Candida*. Além disso, já foi observada em protozoários uma via de ação de TNF independente de receptor clássico, atuando por um domínio semelhante à lectina, localizado distante dos sítios de acoplamento do TNF aos seus receptores clássicos. Essa via é bloqueada quando há uma incubação prévia do TNF com um dos polissacarídeos que compõe a parede celular da *Candida albicans*, denominado N, N'-diacetilquitobiose (HESSION et al., 1987; SHERBLOM et al., 1988; LUCAS et al., 1994; MASUOKA, 2004), indicando ser possível que o TNF atue diretamente sobre a *Candida albicans*, mesmo na ausência de receptores clássicos de TNF em fungos.

2.5 N, N'-diacetilquitobiose

O N,N'-diacetilquitobiose é um oligossacarídeo considerado a unidade básica estrutural da quitina, formado por duas moléculas de N-acetil- β -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopirranose; GlcNAc) (MASUOKA, 2004). Esta nomenclatura deriva do fato de que a chitobiose foi originalmente isolada da acetólise da quitina, e o nome da quitobiose foi dado ao dissacárido principal por analogia com a celobiose, o dissacárido que é a unidade estrutural da celulose (BERGMANN; ZERVAS; SILBERKWEIT, 1931). Estudos posteriores demonstraram que a chitobiose é um dímero de glucosamina, de modo que a unidade de repetição de quitina é o derivado N-acetilado de chitobiose, isto é, N, N'-diacetilquitobiose (ZECHMEISTER; GRASSMANN; TÖTH; BENDCR, 1932). Precisamente, a chitobiose é o dímero β (1,4) da glucosamina (GlcN β -4GlcN) e o correspondente derivado de N, N'-diacetil é N-acetil-D-glucosaminil - β (1,4) -N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc β -4GlcNAc) ou N, N'-diacetilquitobiose (IUPAC-IUB, 1987).

A quitina, por sua vez, é o polissacarídeo mais abundante depois da celulose, sendo constituinte estrutural da parede celular de muitos fungos e de algumas algas, do exoesqueleto de insetos, da carapaça de crustáceos, das conchas de moluscos e dos ovos de nematoides (LEHANE et al., 1997; HEGEDUS et al., 2009).

Além da função estrutural conhecida o N, N'-diacetilquitobiose também atua como indutor da síntese de quitinases e fonte de nutrientes (LUCAS et al., 1994).

Nas bactérias quitinolíticas, microrganismos autóctones do ecossistema marinho e degradação da quitina através da produção de quitinase, como *Vibrio* sp., *Streptomyces* sp. e *Serratia* sp., o N, N'-diacetilquitobiose não é apenas um produto de degradação principal da quitina, mas também é responsável por induzir a produção de quitinase. Ele também pode ser utilizado como fonte de carbono pela *Escherichia coli*, apesar dessa bactéria não produzir quitinases, entretanto, no ambiente intestinal, as bactérias quitinolíticas liberam o N, N'-diacetilquitobiose, permitindo o seu uso. Além disso, diacetilquitobiose é usado como uma fonte alternativa de N-acetilglucosamina por algumas bactérias (MATHISELVAM et al., 2013; YOU et al., 2013).

O N, N'-diacetilquitobiose também tem papel na ligação ao TNF e análogos provenientes do fluido celomático de anelídeos (*Eisenia foetida*) e protozoários (tripanossomos). O TNF apresenta domínio semelhante à lectina de que se liga a N, N'-diacetilquitobiose que está na bolsa flagelar de tripanossomo africano (*Trypanosoma brucei*) e americano (*Trypanosoma cruzi*), exercendo atividade

tripanosomicidal (LUCAS et al., 1994; FONTT et al., 2002; MASUOKA, 2004). Essa atividade é bloqueada quando realizado um bloqueio prévio com N, N'-diacetilquitobiose, mas não com celobiose, que seria seu análogo, demonstrando a especificidade de TNF (MAGEZ et al., 1997). Além disso, o domínio semelhante à lectina do fator de necrose tumoral (TNF), mimetizado pelo péptido TIP, realiza a mesma atividade tripanosomicidal e é alvo de inibição quando pré-incubado com N, N'-diacetilquitobiose (LUCAS et al., 1994; FONTT et al., 2002; MASUOKA, 2004).

Em fungos, o N, N'-diacetilquitobiose está relacionado aos processos de remodelamento da parede (morfogênese), aquisição de nutrientes, autólise de hifas e mecanismos de defesa contra outros fungos, processos em que há a produção de quitinases e, conseqüentemente, quebra de quitina (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; SEIDL, 2008).

A morfogênese é um dos principais fatores de virulência da *Candida albicans*, transição de hifa para levedura. Durante esse processo, as quitinases são responsáveis pela formação do tubo germinativo, no alongamento, na ramificação, na fusão e na autólise das hifas e no reparo da parede celular. O N, N'-diacetilquitobiose e N-acetil-D-glicosamina têm o papel de sítio de ação das quitinases, mas também de indutor do processo. Nesses casos, as quitinases estão localizadas nas camadas internas da parede celular, próximas à membrana plasmática (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

O papel do TNF como membro da resposta inata contra infecções por *Candida albicans* é bem conhecido, entretanto, considerando esse dímero na parede da *Candida albicans*, isso faz com que se questione um papel direto dessa citocina sobre o crescimento desse fungo.

3 PERGUNTA DE PARTIDA

- O TNF interfere no crescimento e desenvolvimento da forma planctônica e em biofilme de *Candida albicans*?

4 HIPÓTESES

- O TNF inibe o crescimento, *in vitro*, de *Candida albicans*
- O TNF altera a formação do biofilme de *Candida albicans*

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do TNF perante desenvolvimento de *Candida albicans in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento planctônico *in vitro* de *Candida albicans* na presença de TNF.
- Avaliar a formação do biofilme *in vitro* de *Candida albicans* na presença de TNF.
- Determinar o efeito da adição de TNF ao biofilme pré-formado de *Candida albicans*.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local do estudo

Foi realizado um estudo experimental no Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM, no Laboratório de Investigação de Osteoartropatias - LIO, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

6.2 Microrganismos

No estudo, foram utilizadas duas cepas de *Candida albicans* forte formadoras de biofilme (CEMM 01.05.006 e ATCC 10.2.31), bem como duas fracas produtoras de biofilme isoladas (49BMv e 51BMv). Todas as cepas foram provenientes da micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM).

As cepas utilizadas neste estudo encontravam-se estocadas em ágar batata-dextrose, acrescido de glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para avaliação da viabilidade celular, as cepas foram repicadas em ágar-batata e incubadas por até 96 horas a 35°C , com observações diárias. Para a confirmação da identificação das culturas, após o período de incubação, foram realizados testes fenotípicos baseados em análises macro e micromorfológicas, bem como testes fisiológicos (SIDRIM; ROCHA, 2004; SIDRIM et al., 2010). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

Adicionalmente, foi analisado o crescimento de cada isolado em meio cromogênico (HiCrome Candida differential Agar, HiMedia, Mumbai, Índia), incubados por 48 horas para constatar a pureza das colônias (ALFONSO et al., 2010; SIDRIM et al. 2010). Por fim, a ausência de contaminação bacteriana foi determinada por meio do método de Gram.

6.3 Reagentes e soluções

Todos os reagentes foram da Sigma (Sigma Chemical Corporation, EUA), exceto o TNF recombinante murino (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA).

As soluções de TNF foram diluídas em PBS (phosphate-buffered saline-solução salina tamponada com fosfato) estéril (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), como recomendado pelo fabricante, na concentração de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anfotericina (AMB) (Sigma Chemical Corporation, EUA) foi diluída conforme indicação do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Para os testes, a AMB foi diluída em meio de cultivo RPMI 1640 na concentração de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ e armazenada a -20°C (CLSI, 2008). As drogas anti-TNF foram diluídas em água destilada estéril, como recomendado pelo fabricante, em uma concentração estoque de 10 mg/mL e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O

farnesol foi diluído em DMSO para uma solução estoque de 250mM e, em seguida, em meio RPMI 1640 para obter a concentração final de 50mM mg/mL. Os oligossacarídeos foram diluídos em água miliQ para uma concentração estoque de 100 mM e estocadas a 4 °C.

As concentrações testadas das substâncias foram preparadas no momento da utilização a partir das soluções de estoque utilizando meio RPMI 1640 com L-glutamina e tamponado com ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (0,165 M), conforme descrito nos quadros 1 e 2.

6.4 Preparo do inóculo

No preparo do inóculo utilizado para a formação do biofilme, as cepas foram repicadas em ágar-batata por 24 horas a 35 °C. Após o período de incubação, foi retirada uma porção da colônia, com o auxílio de alça microbiológica, sendo esta ressuspensa em 5 mL de solução salina a 0,9%, a qual foi agitada em vórtex, por 15 segundos, e, em seguida, feito o ajuste do inóculo a concentração de 0,5 na escala de McFarland para aquisição de uma concentração de $5,0 - 6,5 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, foram realizadas diluições consecutivas na proporção de 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS 0,156 M, pH 7,0, para a obtenção de uma concentração final entre $0,25 - 2,5 \times 10^3$ células/mL (CLSI, 2008).

6.5 Teste de sensibilidade *in vitro*

Foi analisada a concentração inibitória mínima, dentre as concentrações 0,1; 0,5; 1; 10 e 20 ng/mL, do TNF murino (mTNF) nas cepas ATCC 10.2.31 e CEMM 01.05.06 de *Candida albicans*, por meio da técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com modificações.

Resumidamente, este ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços (INLAB) com fundo em forma de “U”, nas quais foram onde primeiramente adicionados 100 µL do meio RPMI 1640 em cada poço, e, em seguida, adicionaram-se 100 µL de TNF nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 10 e 20 ng/mL. Para realização do controle do experimento, a coluna 10 de cada placa foi separada para controle positivo do experimento (anfotericina B), a coluna 11 foi separada para controle negativo do experimento, ou seja, o inóculo e o meio sem a citocina, e a coluna 12 foi dividida em duas partes com quatro poços cada uma, em que em uma metade era feito o controle de esterilidade da droga em teste e a outra era usada para controle de esterilidade do meio RPMI 1640. A placa foi incubada a 35°C e, então, foi realizada a leitura visual com 24 e 48 horas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme a leitura preconizada pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008). Após 24 e 48 horas de incubação, por meio de interpretação visual, a

concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração de mTNF capaz de inibir em 50% o crescimento fúngico em relação aos poços do controle livre da citocina; exceto para anfotericina B (AMB) isolada, na qual a MIC considerada foi de 100% de inibição (CORDEIRO et al., 2015; PFALLER et al., 2006; CLSI, 2008).

6.6 Formação de biofilme de *Candida albicans*

A cultura do biofilme de *Candida albicans* foi realizada em placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico nos poços, acrescidos de 100 µL de RPMI 1640 tamponados com MOPS suplementado com distintas substâncias compiladas no Quadro 1.

Quadro 1- Substâncias testadas no biofilme em formação de *Candida albicans*.

Substância	Sigla	Concentrações	Referência
Anfotericina	AMB	10 µg/mL	SIDRIM et al., 2015
TNF murino	mTNF	0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL	SONG et al., 2008; MORICONI et al., 2011; SUGITA et al., 2013
TNF humano	hTNF	1; 20 e 40 ng/mL	SONG et al., 2008; MORICONI et al., 2011; SUGITA et al., 2013
Farnesol	FAR	50 µM	ALEM et al., 2006
Interleucina 1	IL-1	0,5; 1; 10 e 20 ng/mL	SUGITA et al., 2013
Interleucina 17	IL-17	1; 2,5; 5; 10 e 50 ng/mL	JOVANOVIC et al., 1998; FRIDAY, FOX, 2016

O inóculo fúngico utilizado neste teste foram das cepas CEMM 01.05.006, ATCC 10.2.31, 49BMv e 51BMv e foi preparado em uma concentração de $5,0 - 6,5 \times 10^6$ UFC/mL, conforme descrito anteriormente.

Para o controle positivo foram adicionados 100 μ L de RPMI 1640 e 100 μ L do inóculo fúngico aos poços controle. No controle negativo, foram adicionados 200 μ L de RPMI 1640 ao poço. Em seguida, foram incubados a 35 °C, por 48 horas. Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes, independentemente (CHATZIMOSCHOU et al., 2011; SIDRIM et al., 2015).

6.7 Estudo do biofilme maduro de *Candida albicans*

A ação do TNF no biofilme maduro de *Candida albicans* foi avaliada, conforme Sidrim et al. (2015), quando investigaram a ação de drogas antifúngicas no biofilme de *Candida albicans*. O cultivo do biofilme de *Candida albicans* foi realizado em placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato. Para investigação da atividade do TNF no biofilme maduro, os poços receberam apenas 100 μ L do inóculo fúngico, acrescidos de 100 μ L de RPMI 1640 ou 200 μ L de RPMI 1640 (controle negativo) e, em seguida, foram incubados a 35 °C, por 48 horas.

Após incubação, o sobrenadante foi aspirado, os poços foram lavados com 200 μ L de PBS, por duas vezes, em seguida uma alíquota de 200 μ L de uma solução de meio RPMI 1640 suplementado com TNF humano ou murino (0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL final) ou AMB (10 μ g/mL final) foram adicionadas a cada poço da placa e foram incubados por mais 48 horas a 35°C. Após o segundo período de incubação, o sobrenadante foi aspirado, os poços lavados novamente e, então, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução de XTT, conforme descrito na sequência. Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes, independentemente (CHATZIMOSCHOU et al., 2011; SIDRIM et al., 2015).

6.8 Ensaio de ligação ao domínio de TNF semelhante à lectina

Para avaliar a ligação do TNF a carboidratos e a drogas anti-TNF, foi realizada a metodologia do biofilme em formação com algumas modificações. Baseado nos trabalhos de Ghezzi et al. (1998), Raponi et al. (1997), Nadesalingam et al. (2005) e Wang et al. (2013), em placa de 96 poços de fundo chato, foi pré-incubado, por 1 h, 50 μ L de mTNF ou hTNF na concentração final de 20 ng/mL, o melhor resultado em estudos piloto, com 50 μ L ou drogas anti-TNF (etanercept, adalimumab e imunoglobulina G) ou polissacarídeos ou dissacarídeos (manose, N-acetilglucosamina, arabiose, xilose, glicose, celobiose ou N, N-diacetilquitobiose) nas concentrações descritas no Quadro 2 abaixo. Para o controle, foram adicionados 100 μ L por poço mTNF, hTNF, drogas anti-TNF (etanercept, adalimumab e imunoglobulina G) ou carboidratos (manose, N-acetilglucosamina, arabiose, xilose, glicose, celobiose

ou N, N-diacetilquitobiose) de forma isolada mantendo as mesmas concentrações finais dos poços em que foi adicionado 50 µL.

Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL de inóculo de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 (concentração de 5,0 – 6,5 x 10⁶ UFC/mL) em cada poço. Então, a placa foi levada à estufa e a amostra incubada a 35 °C, por 48 horas. Então, usou-se para análise a técnica de redução de sal de XTT.

Quadro 2- Drogas anti-TNF e carboidratos testados na pré-incubação com TNF (mTNF e hTNF) na formação de biofilme de *Candida albicans*.

Substância	Sigla	Concentrações	Referência
Etanercept	ETA	10 e 100 ng/mL	CHEN et al., 2015
Adalimumab	ADA	40 e 100 ng/mL	CHEN et al., 2015; SUGITA et al., 2013
Imunoglobulina G	IgG	100 ng/mL	WALDMAN et al., 1972;
N,N-diacetilquitobiose	CHI	0,1; 1; 10 e 100 µg / mL	LUCAS et al., 1994
Celobiose	Cel	10 e 100 µg / mL	LUCAS et al., 1994
N-Acetilglucosamina	GlcNAc	50 mM	NADESALINGAM et al., 2005; WANG et al., 2013
Arabiose	Ara	50 mM	NADESALINGAM et al., 2005; WANG et al., 2013
Xilose	Xi	50 mM	NADESALINGAM et al., 2005; WANG et al., 2013
Glicose	Gli	50 mM	NADESALINGAM et al., 2005; WANG et al., 2013

6.9 Quantificação do biofilme pelo método de redução do sal de tetrazólio (XTT)

Os biofilmes das cepas CEMM 01.05.006, ATCC 10.2.31, 49BMv e 51BMv de *Candida albicans* em formação e maduro foram retiradas das estufas após incubação de 48 ou 96 h, respectivamente. O sobrenadante foi aspirado, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de TBS (0,05% Tween 20 em tampão Tris) para remoção dos microrganismos não aderentes. Então, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução do 2,3-bis (2- metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido (XTT, Sigma, Alemanha). Para tal, em cada poço foram adicionados 75 µL de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6 µL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril (pH=7,2). As placas foram incubadas a 35 °C, sob agitação de 80 rotações por minuto (rpm), durante cinco horas. Então, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa e a atividade metabólica no interior do biofilme foi avaliada mediante a redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à formazan, lida ao espectrofotômetro a 492 nm (Epoch; Bio-Tek, Winooski, VT). Este ensaio avalia a atividade metabólica no interior do biofilme por via da redução enzimática do sal XTT a XTT formazano, que resulta numa reação colorimétrica, a qual foi, então, medida a 492 nm. Os resultados estão correlacionados também com a densidade celular, permitindo assim uma medição semiquantitativa da atividade metabólica e do número de células viáveis no biofilme. Foi realizado controle de esterilidade para cada solução utilizada (solução salina, RPMI 1640, citocinas, drogas anti-TNF, farnesol e polissacarídeos). Todo o experimento foi efetuado em triplicata e repetido três vezes (ROEHM et al., 1991; RAMAGE et al., 2001; SIDRIM et al., 2015).

6.10 Análise da relação hifa/blastoconídio no biofilme de *Candida albicans*

Biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação e maduro foram preparados conforme descrito nos tópicos 6.6. e 6.7, respectivamente, expostos ao mTNF ou hTNF nas concentrações 0,5; 1; 10, 20 e 40 ng/mL associados ou não a N, N'-diacetilquitobiose (100µg/mL). Após incubação, descarte do sobrenadante e lavagem dos poços com PBS estéril para remoção das células não aderidas, 20 µL de corante azul de algodão (azul de lactofenol) foram adicionados em cada poço, realizadas a remoção, solubilização e homogeneização das células aderidas do biofilme no próprio corante. Em seguida, 10 µL do conteúdo foram transferidos para uma lâmina de microscopia de vidro, coberta com lamínula e levados ao microscópio para análise.

Posteriormente, as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio óptico (Fisher Scientific, Houston, TX) com câmera acoplada (Leica DFC 295). As imagens obtidas foram em um aumento de 200 x. Foi realizada uma contagem de blastoconídios (leveduras) (B) e formas filamentosas

(hifas e pseudo-hifas) (F) em dez campos distintos no controle positivo e concentrações do TNF (mTNF e hTNF) com auxílio de um retículo micrométrico (U-OCMSQ10/10) e, então, calculada a relação das formas filamentosas, usando a seguinte fórmula: $F \times 100 / B + F$ (RAMAGE et al., 2007).

6.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Candida albicans (ATCC 10.2.31) foi incubada por 48 h a 35°C RPMI 1640, suplementado ou não com mTNF (0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL) com lamínulas de vidro estéreis (diâmetro de 5 mm), em placas de 24 poços, para permitir o desenvolvimento de biofilme. A cultura foi realizada de modo semelhante ao descrito no item 6.6; entretanto, o volume do inóculo foi de 500 µL e o volume de cada solução de mTNF foi de 500 µL por poço. Após a incubação, as lâminas foram removidas do fundo de cada poço foram lavadas três vezes, em solução estéril de tampão salino fosfato (PBS), para remoção de células não aderidas. Seguindo a lavagem, o biofilme foi fixado. Para tal, as lâminas foram imersas em solução de Karnovsky (Gluteraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4% e tampão Cacodilato 0,10 M, pH 7,2) em temperatura ambiente por duas horas. O material foi, então, desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 95% e 100%) por 15 minutos em cada, em seguida, foi feita a secagem do material na estufa. Posteriormente, as lâminas foram imersas em hexametildisilano (HMDS) por 30 minutos e deixadas secar novamente na estufa (TRAN et al., 2009). Em seguida, as amostras foram recobertas com ouro, utilizando uma metalizadora Emitech Q150T e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (FEI Inspect S50) a uma voltagem de aceleração de 13 Kv. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram capturadas com magnificação de 2.000-20.000 vezes. A metalização e a microscopia foram realizados na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

6.12 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) estudados para MET foram cultivados de maneira semelhante ao protocolo de MEV descrito acima. Resumidamente, incubados por 48 h a 35°C em RPMI 1640 sozinho ou suplementado com mTNF, em placas de 24 poços, contendo em cada poço 500 µL inóculo, 500 µL de 40 ng/mL de mTNF e lamínulas de vidro estéreis (diâmetro de 5 mm). Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas em solução estéril de tampão salina fosfato (PBS) e, então, fixados os biofilmes aderidos a elas utilizando solução de Karnovsky (2,50% glutaraldeído e 4,0% paraformaldeído em tampão cacodilato a 0,10 M, pH 7,2) por 6h.

Então, as amostras foram lavadas em cacodilato (0,10 M) e pós- fixadas em tetróxido de ósmio a 1% contendo ferrocianeto de potássio a 0,8% e CaCl₂ a 5 mM por 1 h. Então, as amostras foram

contrastadas *in block*. Para tal, as amostras de biofilme de *Candida albicans* foram incubadas com acetato de uranila *overnight*. Posteriormente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e embebida em resina Spur. Então, com auxílio de um ultramicrotomo (RMC), foram realizados cortes ultrafinos na espessura de 60-90 nm. Os *grids* contendo os cortes ultrafinos foram levados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011, operando a uma voltagem de 80 Kv para análise e obtenção das imagens (ISHIDA et al., 2009). A realização do processamento, os cortes ultrafinos e microscopia foram realizados no Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará.

6.13 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

Os biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) cultivados por 6, 24 e 48h na ocorrência de mTNF (20 ng/mL) ou controle não tratado, cultivados da mesma maneira como descrito na metodologia de MEV e MET (itens 6.9 e 6.10), exceto pela lamínula que foi substituída por uma lâmina thermanox. O meio de cultivo foi removido e a thermanox lavada em 2 mL de PBS por quatro vezes seguidas. Posteriormente, o biofilme foi incubado com marcadores fluorescentes do *kit* DEAD/ LIVE, constituído de 1 mL de solução salina, 1 µL de Syto e 1 µL de iodeto de propídeo do *kit* de viabilidade LIVE/DEAD® BacLight™ L7007 (Molecular Probes, Invitrogen Brasil Ltd., São Paulo, SP). Após o período de incubação de 15 minutos na ausência de luz e a 37°C, a amostra foi levada ao microscópio confocal modelo Nikon C2. A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em 20 campos para avaliar, cinco campos para cada uma das quatro direções, a fim de que não houvesse a possibilidade de análise de um mesmo campo repetidas vezes. Para o SYTO®-9 (verde, identifica as células viáveis), foi utilizada a excitação do laser em 488 nm, e o detector espectral foi programado para a faixa de 495 a 575 nm. Para o iodeto de propídeo (vermelho/ evidencia as células não viáveis), a excitação foi em 532 nm, e a detecção de 595 a 730 nm (SAINI; CHHIBBER; HARJAI, 2014).

6.14 Avaliação da hidrofobicidade da superfície celular

Para avaliar o efeito do TNF sobre a adesão do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), foi realizada a mensuração do índice de hidrofobicidade de acordo com o método descrito por Feldman et al. (2014). Este método se baseia no uso do xileno como o solvente orgânico para remoção das partículas hidrofóbicas, permitindo quantificá-las. Resumidamente, o biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) crescido em placa de 96 poços com a adição de mTNF (0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL) ou não foram lavados com PBS e, então, suspenso no mesmo tampão e homogeneização após remoção mecânica do biofilme da superfície da placa em que estava aderido. Essa suspensão teve a densidade

óptica (D.O. controle) determinada espectrofotometricamente a 660 nm. A absorvância da suspensão de leveduras foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 660 nm. Posteriormente, a suspensão de biofilme de *Candida albicans* em PBS foi posta em contato com xileno, em proporção 2,5:1; v/v em seguida, levado ao vórtex sob agitação durante 2 min. Então, os microtubos foram deixados em repouso durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período de incubação, a absorvância da fase aquosa foi determinada em espectrofotômetro (Epoch; Bio-Tek, Winooski, VT) a 660 nm e o índice de hidrofobicidade foi calculado utilizando a seguinte fórmula $IH = (D.O. controle - D.O. teste) \times 100 / D.O. controle$, na qual D.O. controle = densidade óptica a 660 nm, antes do tratamento xileno e D.O. teste = densidade óptica a 660 nm após tratamento xileno. As leveduras com índice de hidrofobicidade celular menor do que 10% foram classificadas como células altamente hidrofílicas, enquanto leveduras com índice maior que 90% são consideradas altamente hidrofóbicas e aquelas que expressaram índice de hidrofobicidade de 10 a 90% foram consideradas com hidrofobicidade média (HAZEN et al., 2000). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes, independentemente.

6.15 Mensuração dos níveis de proteína total

A mensuração dos níveis de proteína no biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Bradford modificado (BRADFORD, 1976). Para tal, o biofilme formado em placas de 24 poços após o período de incubação de 48 h havendo ou não de mTNF (1; 10; 20 e 40 ng/mL), conforme descrito anteriormente, teve o meio de cultura removido e, então, adicionado 500 μ L de PBS. Em seguida, o biofilme foi removido da superfície da placa onde estava aderido e transferido para microtubos. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 16000 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante removido. Este foi liofilizado e pesado para mensuração da massa total dos componentes do biofilme. As amostras liofilizadas foram diluídas em solução salina nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:50. Então, a cada poço de uma placa de microtitulação foram adicionados 20 μ L da amostra a ser dosada e 180 μ L de reagente de Bradford – 0,1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa com 5% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido fosfórico (filtrado em papel filtro número 1). Juntamente com as amostras, uma curva-padrão de 0,5 a 1,5 μ g de proteína/20 μ L foi feita utilizando-se uma solução-padrão de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma). A preparação foi incubada por 1 h a temperatura ambiente ao abrigo da luz e os valores de absorvância determinados a 595 nm em espectrofotômetro (Epoch; Bio-Tek, Winooski, VT). A concentração proteica da amostra foi determinada, fazendo-se uso da equação da curva-padrão.

6.16 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm SEM de 3 experimentos independentes. Foi utilizada a Análise de Variância *one-way*, seguida de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para dados não paramétricos. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *software* PRISMA® v.8.0 (Stafsoft, USA).

7 RESULTADOS

7.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do TNF murino (mTNF)

A concentração inibitória mínima (MIC) do TNF murino (mTNF) nas cepas fortes formadoras de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31 e CEMM 01.05.006) foi avaliada por leitura visual. A análise permitiu verificar a ausência de efeito inibitório de todas as concentrações de mTNF (0,1; 0,5; 1; 10 e 20 ng/mL) avaliadas sobre o crescimento de *Candida albicans*, quando está na forma planctônica conforme pode ser observado nos resultados expressos na Tabela 1. Assim, não foi possível determinar o MIC do mTNF neste estudo. O teste de sensibilidade foi realizado em triplicada e repetido três vezes de forma independente, considerando $p < 0,05$.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (MIC) do TNF murino (mTNF) em células planctônicas das cepas fortes formadoras de biofilme de *Candida albicans*: ATCC 10.2.31 e CEMM 01-05-006. SI: sem inibição ($p < 0,05$).

Cepa	mTNF (ng/mL)				
	0,1	0,5	1	10	20
ATCC 10.2.31	SI	SI	SI	SI	SI
CEMM 01-05-006	SI	SI	SI	SI	SI

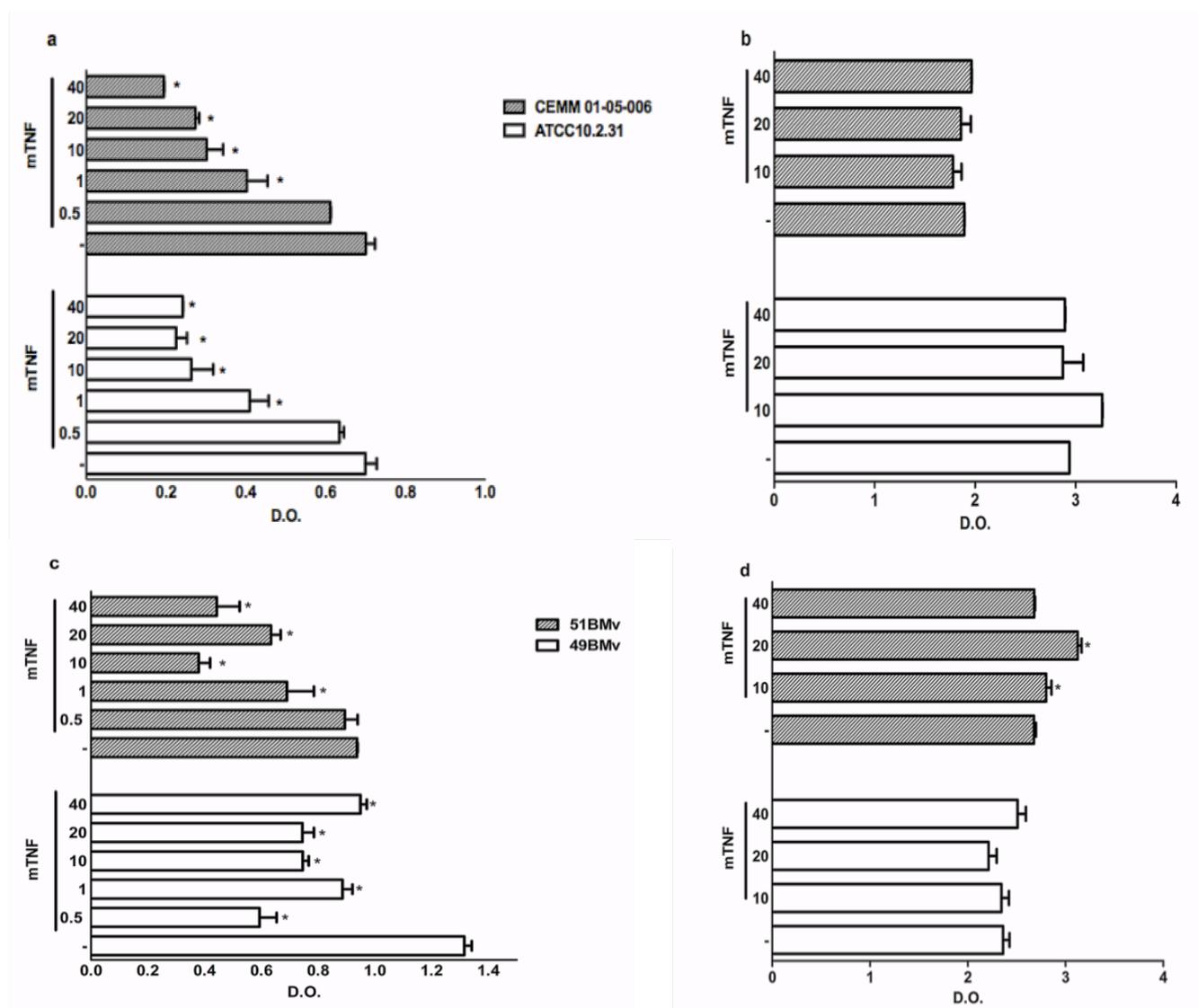
7.2 Efeito do mTNF sobre o biofilme de *Candida albicans* *in vitro*

Todas as cepas de *Candida albicans* (CEMM 01.05.006, ATCC 10.2.31, 49BMv e 51BMv) testados foram capazes de formar biofilme. A formação do biofilme foi avaliada pela atividade metabólica deste por via do ensaio de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT), ensaio de redução de XTT, em que houve a avaliação, comparando a absorbância dos poços com distintas concentrações de TNF murino (mTNF) testadas e a absorbância dos poços controle livres de citocina (RPMI 1640 não suplementado). Com auxílio desta técnica, foi possível verificar que a formação do biofilme por todas as cepas avaliadas de *Candida albicans* foi significativamente inibida pela adição de diferentes concentrações de mTNF (1, 10, 20 e 40

ng/mL)(Figura 5 a; 5 c).

Na Figura 5a, observamos as duas cepas fortes produtoras de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31 e CEMM 01-005-006), a inibição ocorreu em todos os tratamentos com mTNF a partir da concentração de 1 ng/mL e de modo dose-dependente ($p < 0,001$).

Figura 5- Efeito das concentrações (0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/mL) de TNF murino (mTNF) sobre o biofilme de cepas forte formadoras de biofilme (CEMM 01.05.006 e ATCC 10.2.31) em formação (a) e maduro (formado) (b) e cepas fraca formadoras de biofilme (51BMv e 49BMv) em formação (c) e maduro (formado) (d) de *Candida albicans*. Atividade metabólica foi avaliada por ensaio de redução enzimática do sal de XTT. Os dados representam média \pm SEM da densidade óptica (D.O.) a uma absorbância de 492 nm. * - Diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,001$).



As cepas fracas formadoras de biofilme (49BMv e 51BMv) tiveram um comportamento errático, com uma redução da formação de biofilme quando expostas a todas as concentrações de mTNF. No entanto, sem uma relação diretamente proporcional ao aumento da dose de citocina como pode ser observado na Figura 5c. A concentração de 0,5 ng/mL não apresentou em princípio efeito sobre a formação de biofilme na cepa 51BMV, contudo promoveu a inibição do biofilme na cepa 49BMv de *Candida albicans* (Figura 5c)($P < 0,001$).

Para o biofilme maduro (formado), as concentrações de mTNF (10; 20 e 40 ng/mL), ao contrário do observado para o biofilme em formação, não alteraram a atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* das fortes (ATCC 10.2.31, CEMM 01-005-006) produtoras de biofilme de forma estatisticamente significativa como ilustrado na Figura 5b ($p < 0,05$).

Os biofilmes formados pelas cepas fraca produtoras de biofilme, no entanto, expressou um discreto aumento nas concentrações de 20 e 10 ng/mL de mTNF na cepa 51BMv ($P < 0,001$), conforme gráfico expresso na Figura 5d.

A anfotericina B (AMB) foi usada como controle positivo, tanto na etapa de formação de biofilme quanto no biofilme já formado, e, em ambas etapas, esta droga na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ exerceu um efeito inibitório/ eliminatório do biofilme, conforme esperado (dados não mostrados).

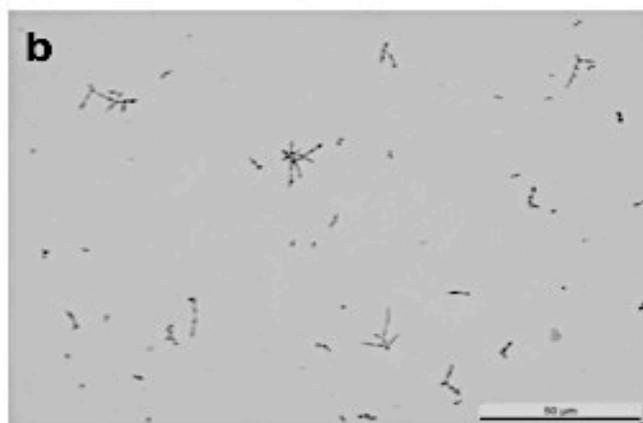
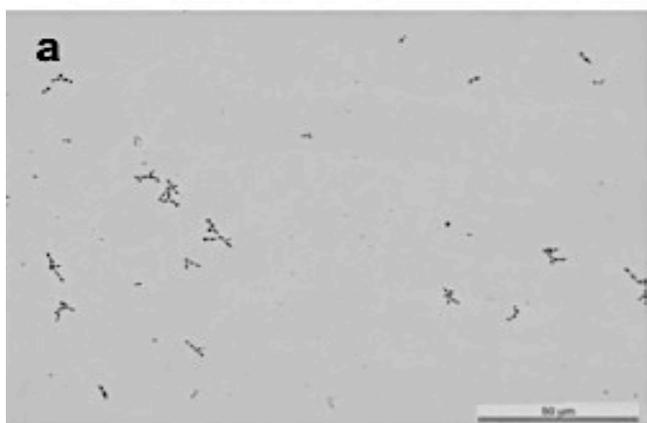
7.3 Morfologia do biofilme

Neste estudo, foi observado o efeito das concentrações de mTNF de 0,5; 1; 10; 20 e 40 ng/ml na morfologia do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), em formação e maduro. Após a coloração das células isoladas do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), mediante a técnica de azul de lactofenol, visualizou-se, em microscópio óptico de campo claro, a distribuição de formas filamentosas (hifas e pseudohifas), alongadas, com ou sem septos verdadeiros, e leveduriformes (blastoconídios), fungos arredondados. No método do azul de lactofenol, o corante se liga a quitina e celulose na parede celular dos fungos.

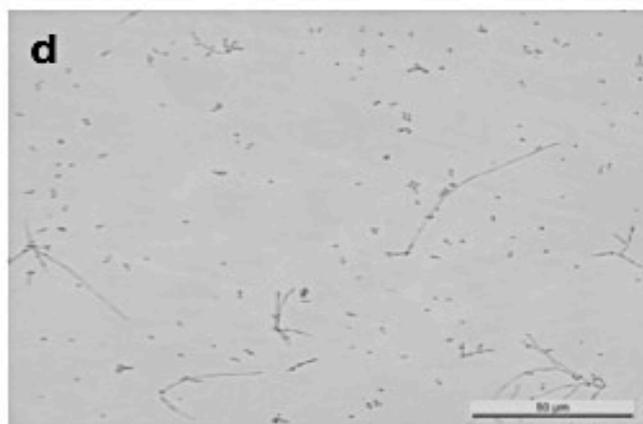
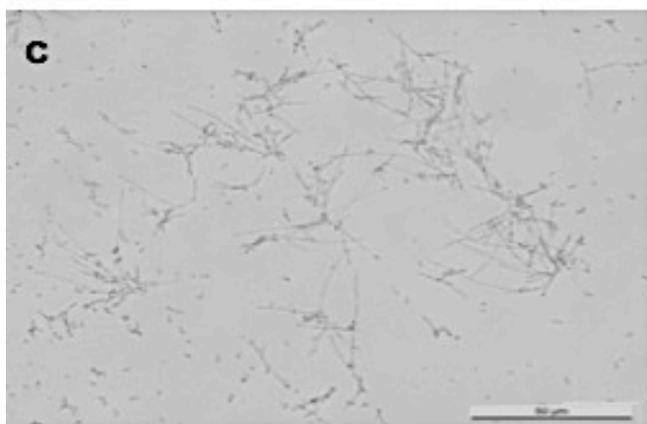
O controle positivo, biofilme cultivado na ausência de mTNF, mostrou a multiplicação e transição de levedura para hifa (filamentação) de maneira proporcional aos tempos de cultura analisados (6, 24 e 48h).

Figura 6- Cinética das células isoladas de biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) coradas com azul de lactofenol e analisadas por microscopia óptica após cultivo de 6, 24 ou 48h na ausência ou presença de TNF murino (mTNF) na concentração de 20 ng/mL. As figuras a,c,e mostram células do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 cultivadas na presença de RPMI 1640 (controle não tratado) e as figuras b,d,f são células de biofilme em formação de *Candida albicans* cultivados sob mTNF (20 ng/mL) por 6, 24 ou 48h. Aumento de 200 x. Barra = 50 μ m.

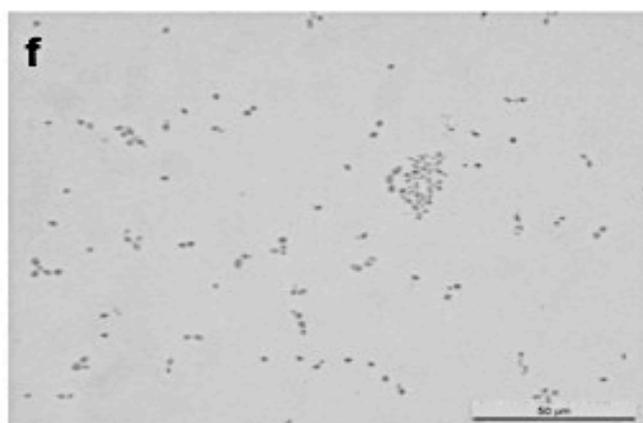
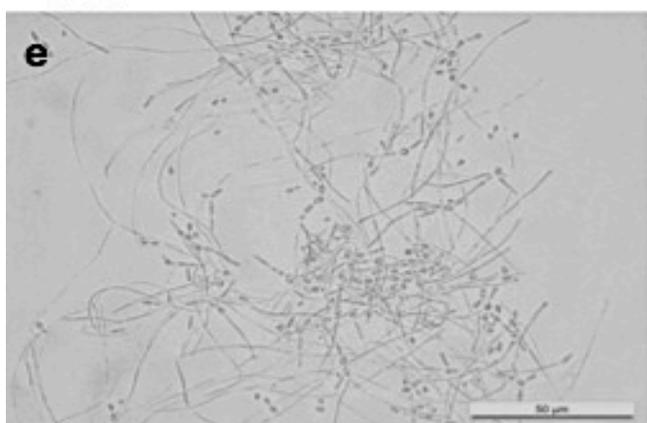
6h



24h



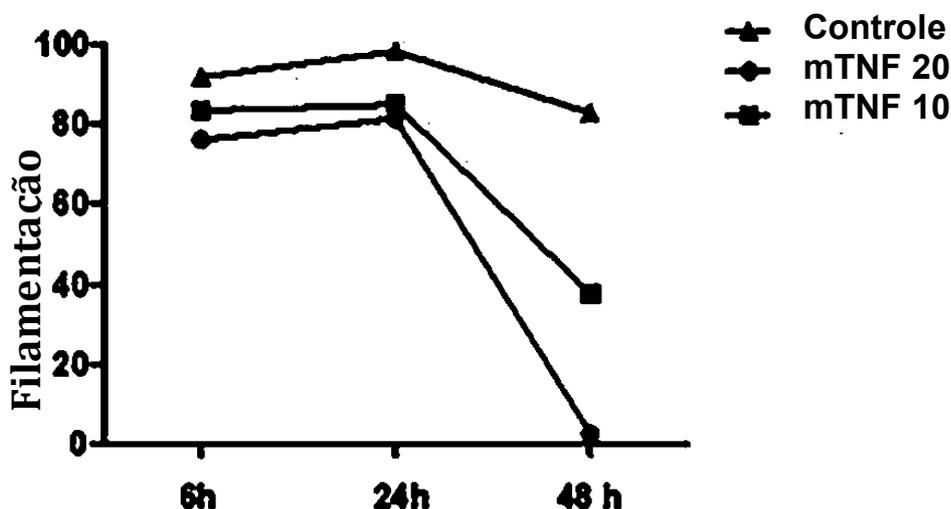
48h



Após 24 h, foi observado um predomínio de hifas e pseudo-hifas como pode ser observado na Figura 6c. Os biofilmes de *Candida albicans* tratados com 20 ng/mL de mTNF são mostrados na Figuras 6 (b; d; f). Ao observar a amostra de biofilme de *Candida albicans*, incubada com 20 ng/mL de mTNF, visualizou-se um bloqueio na morfogênese, prevalecendo a forma de blastoconídios com uma maior dispersão de células, em comparação ao controle, mesmo com aumento do tempo de cultivo. O biofilme maduro de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) resultante de 48h de cultivo em RPMI 1640, grupo-controle, mostrou células com morfologia de hifas verdadeiras com grande densidade celular.

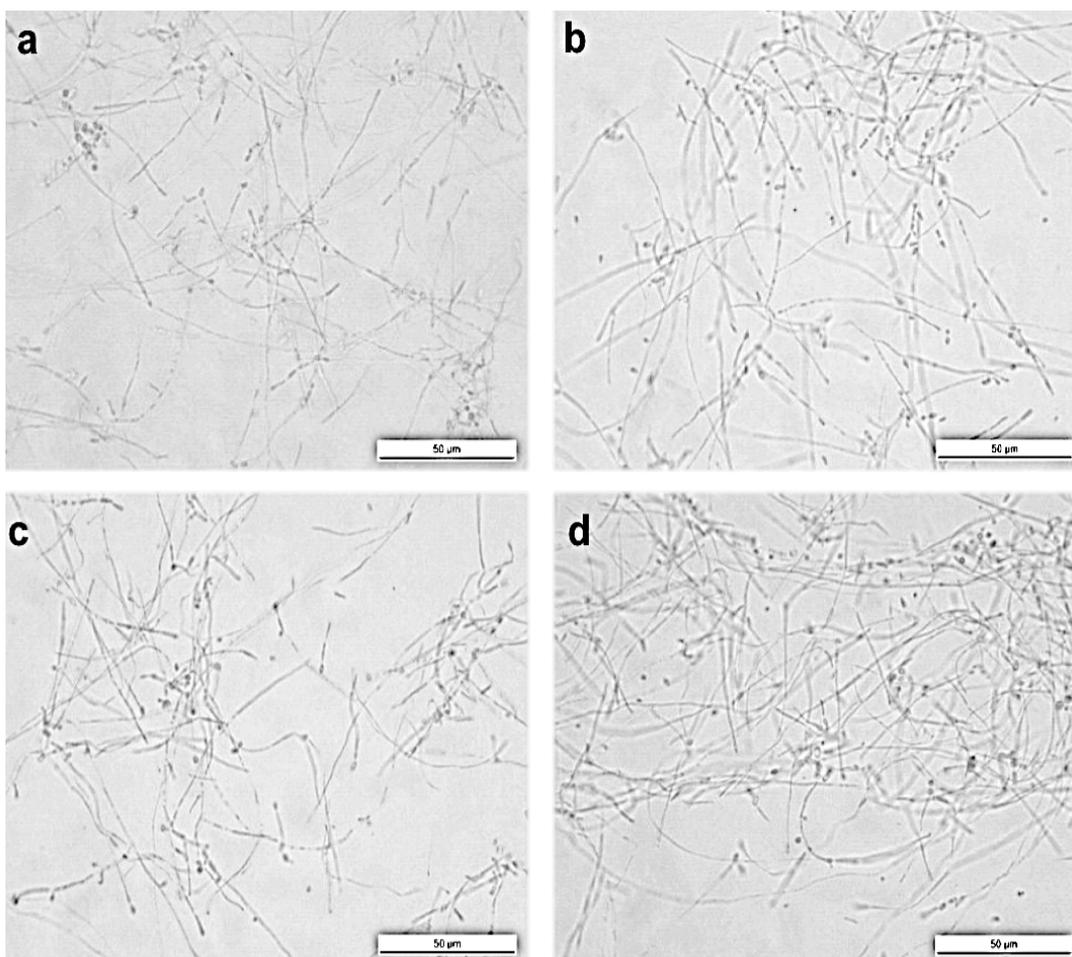
A avaliação quantitativa desses achados morfológicos se deu pelo cálculo do índice de filimentação, que foi baseado na contagem de blastoconídios (B) e formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) (F) em 10 (dez) campos distintos nos diferentes tratamentos e aplicada a fórmula $F \times 100 / B + F$. Este índice permitiu inferir que após 6 h de incubação (Figura 7) é semelhante a proporção de formas filamentosas (hifas e pseudohifas) nos biofilmes tratados ou não com mTNF nas concentrações de 10 ou 20 ng/mL, entretanto, após 24 e 48 h de incubação, as amostras cultivados sob mTNF apontaram um menor índice de filimentação comparado ao controle de forma dose-dependente. Além disso, no intervalo de 24 e 48 h de cultivo, houve redução vertiginosa na proporção de hifas/ leveduras nos tratamentos com mTNF de forma dose-dependente, em comparação ao controle, conforme pode ser observado no gráfico da Figura 7.

Figura 7- Efeito das concentrações de 10 e 20 ng/mL do TNF murino (mTNF) sobre a morfologia do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação comparado ao controle (não-tratado) após 6, 24 e 48 h de cultivo. Os dados representam média \pm SEM do índice de filimentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. $P < 0,001$ quando comparado ao controle.



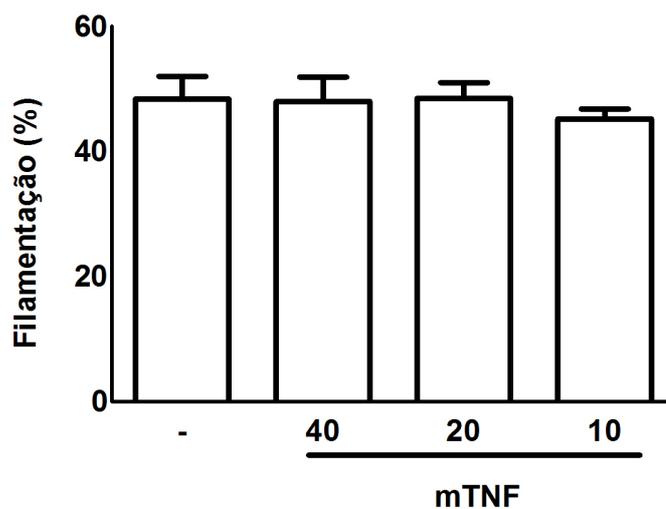
Na Figura 8 (a-d) observamos comportamento do biofilme maduro de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) formado na ausência de TNF e exposto as diferentes concentrações (10, 20 e 40 ng/mL) da citocina após 48 h de cultivo. De modo semelhante aos resultados obtidos pela técnica de XTT, não foi observado no biofilme maduro exposto ao mTNF (10, 20 ou 40 ng/mL) e cultivado por mais 48h, qualquer alteração em sua morfologia com quando comparado ao controle (Figura 8a), apresentando uma preponderância de células com características morfológicas de hifas independente da concentração de mTNF adicionada ao meio (Figura 8 b-d).

Figura 8- Efeito das concentrações de 10, 20 e 40 ng/mL do TNF murino (mTNF) sobre a morfologia das células de biofilme maduro de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) comparado ao controle (não tratado). a: controle positivo, não tratado. B: 10 ng/mL de mTNF, c: 20 ng/mL de mTNF e d: 40 ng/mL de mTNF. Aumento de 200 x. Barra: 50 μ m.



No biofilme maduro, o índice de filamentação confirmou o que foi observado nas imagens de microscopia óptica de campo claro, um predomínio de formas filamentosas, e, conseqüentemente, elevado índice de filamentação (Figura 9). Novamente, inferiu-se a ausência de efeito do mTNF no biofilme maduro, com índices de filamentação semelhante entre o Grupo-controle e as amostras tratadas com distintas concentrações de mTNF (10; 20 e 40 ng/mL), $p < 0,05$.

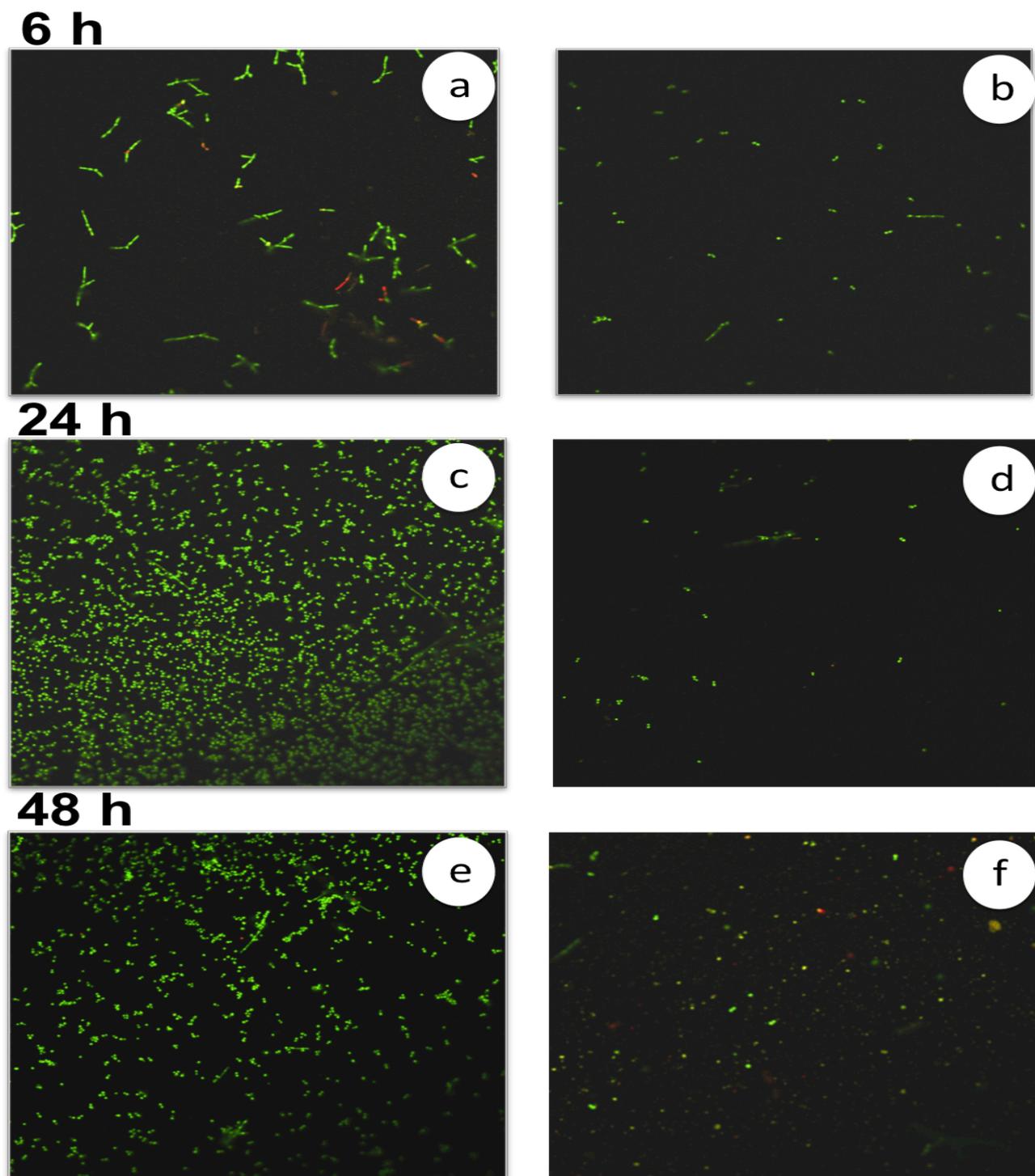
Figura 9- Efeito das concentrações de 10; 20 e 40 ng/mL de TNF murino (mTNF) sobre a morfologia do biofilme maduro comparado ao controle (não tratado) após 96 h de cultivo. Os dados representam média \pm SEM do índice de filamentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200 x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. $p < 0,05$ quando comparado ao controle.



7.4 Microscopia confocal de varredura a laser

A análise de microscopia confocal demonstrou que a cinética do efeito do mTNF (20 ng/mL) associando os critérios de morfologia do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) e número de células fúngicas viáveis podem ser identificadas por duas cores de fluorescência, verde para células viáveis e vermelho para células não-viáveis. Na Figura 10 (a-f), nas primeiras 6h, já se observa um menor número de células viáveis no tratamento com mTNF (Figura 10b), em comparação ao controle (Figura 10a). Em ambos os grupos, tratado e não tratado, entretanto, se observou o predomínio de células dispersas viáveis.

Figura 10- Viabilidade celular da *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em um biofilme em formação sob de mTNF (20 ng/mL) distintos tempos (6, 24 e 48 h). (a) controle positivo, células de *Candida albicans* cultivadas em RPMI 1640 sem suplementação, após 6 h de cultivo, (b) mTNF (20 ng/mL) após 6 h, (c) controle positivo após 24 h de cultivo, (d) mTNF (20 ng/mL) após 24 h, (e) controle positivo após 48 h de cultivo, (f) mTNF (20 ng/mL) após 48h.



Após 24h, é possível observar a formação de uma camada de células viáveis nas amostras do Grupo-controle positivo, ou seja, células de *Candida albicans* crescidas na ausência de mTNF, entretanto nas amostras tratadas com a concentração de 20 ng/mL desta citocina, foram vistas apenas células dispersas na forma levedura (Figura 10d). Após 48h, na amostra do controle positivo do biofilme, sem contato prévio com o mTNF na concentração de 20 ng/mL, notou-se estrutura espessa homogênea de coloração, predominantemente, esverdeada. Para a amostra de biofilme, incubada com a concentração de 20 ng/mL de mTNF, as imagens geradas pelo microscópio mostraram a não formação do biofilme, a dispersão de células viáveis e inviáveis (Figura 10f).

As amostras do grupo-Controle negativo, amostras de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) cultivadas sob anfotericina B (AMB) na concentração de 10 µg/mL, foram analisadas, porém nenhum sinal foi detectado, demonstrando que não houve adesão, tampouco formação de biofilme independentemente do período de cultivo conforme esperado.

7.5 Análise ultraestrutural

Para investigar o efeito do mTNF na ultraestrutura do biofilme de *Candida albicans* (ATCC10.2.31), foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

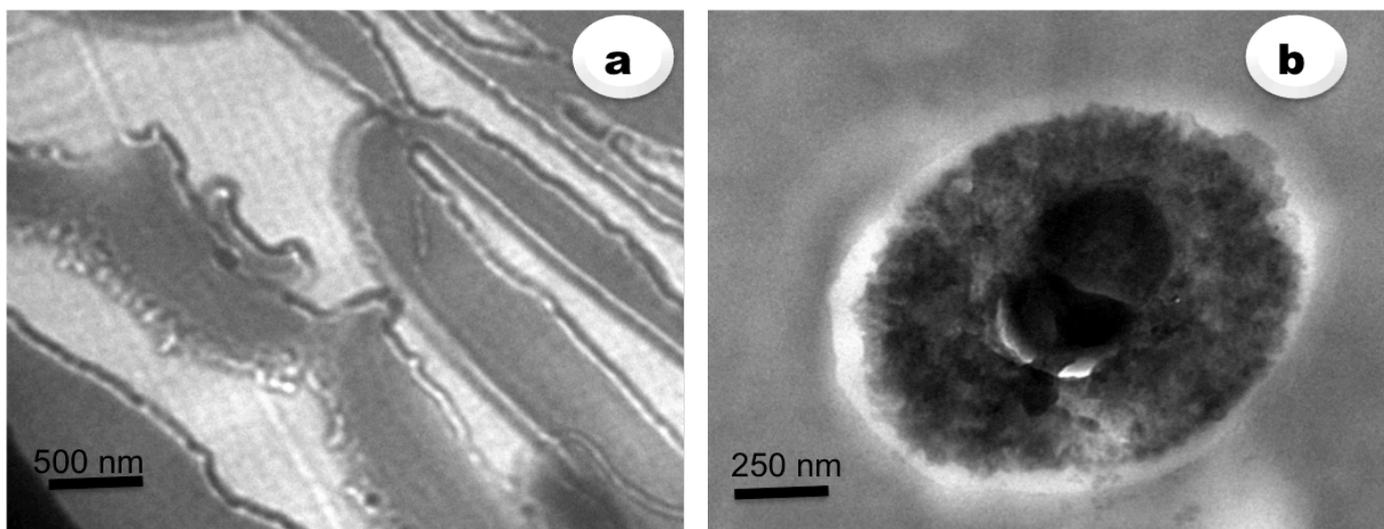
Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), leveduras provenientes do biofilme tratado com mTNF apontaram pronunciadas alterações morfológicas, baixa eletrodensidade e perda de integridade da membrana celular (Figura 11b). Além disso, o citoplasma não aparece homogêneo, indicando floculações. No grupo tratado com mTNF, apenas formas morfológicas encontradas na amostra eram de blastoconídios/leveduras.

As células não tratadas, Grupo-controle, têm parede e membrana citoplasmática intactas, separadas por um espaço de baixa densidade e apenas a forma de hifa foi observada nas amostras. Em nenhuma das amostras tratadas ou não tratadas (controle), contudo, foi possível a observação de organelas como mitocôndrias.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) cultivada com mTNF em distintas concentrações mostrou um efeito dose-dependente na formação de biofilme (Figura 12). Nas amostras de controle positivo do crescimento do biofilme, ou seja, aquelas amostras de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) cultivadas apenas em RPMI 1640, foram observadas ao microscópio imagens de biofilmes espessos, compostos por múltiplas camadas de células,

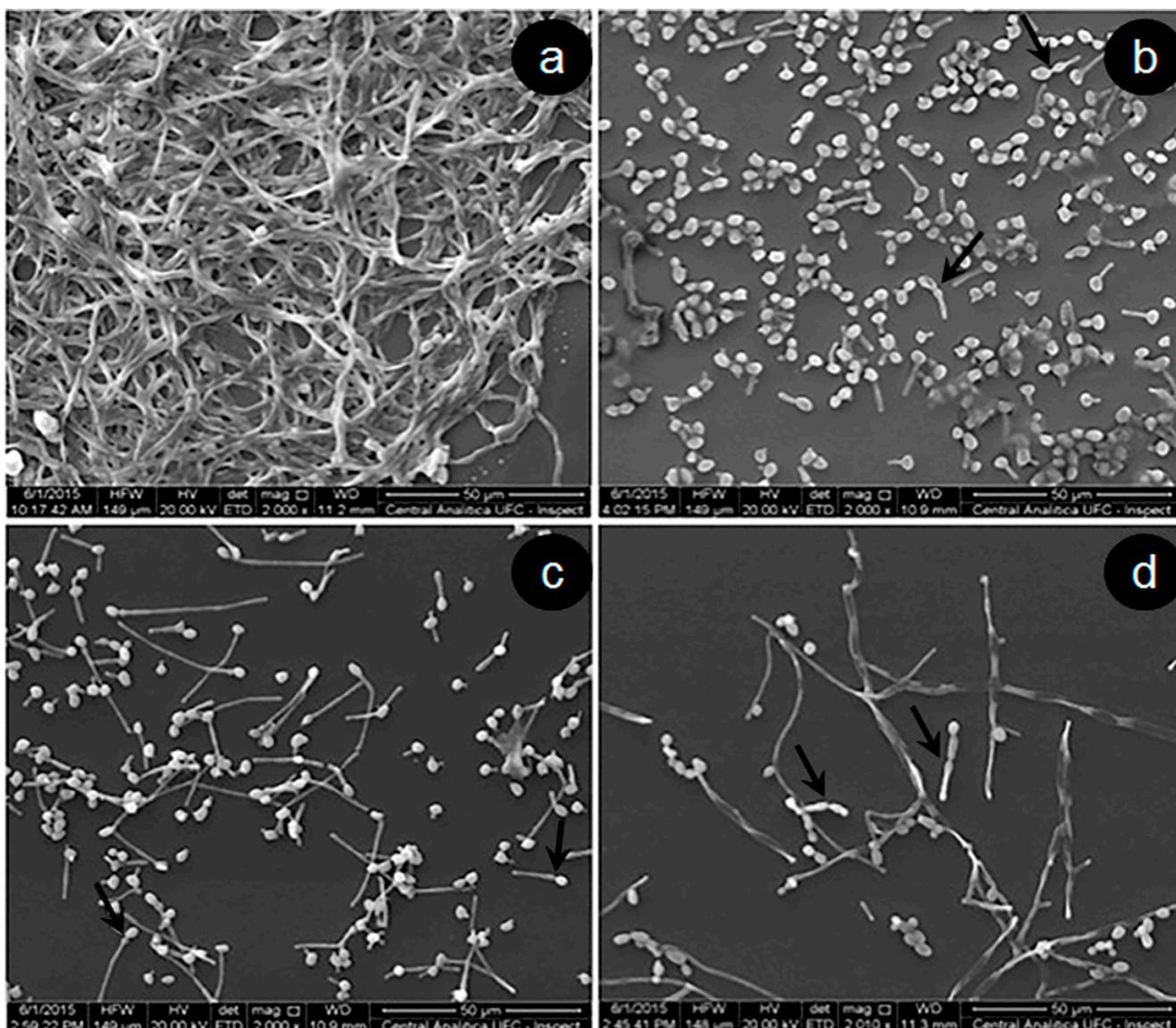
homogeneamente dispostas com predomínio de células filamentosas, principalmente hifas verdadeiras, como mostra a Figura 12.

Figura 11- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), proveniente de biofilme em formação cultivado em RPMI 1640 (controle) (a) e sob 40 ng/mL de mTNF (b). a: mostra hifas verdadeiras com citoplasma homogêneo. Aumento de 20.000 vezes. Barra = 500 nm. b: traz *Candida albicans* em forma de levedura, com sinais ultraestruturais de degeneração, citoplasma floculado, parede celular e membranas não preservadas. Aumento de 40.000 vezes. Barra = 250 nm.



Em relação à amostra incubada com variadas concentrações de mTNF, notou-se com poucas células aderidas dispersamente com menor densidade celular de forma dose-depedente. A microscopia eletrônica de varredura revelou que o mTNF prejudicou a formação de hifas verdadeiras, de modo que somente os blastoconidíós e as pseudo-hifas foram observados nas amostras tratadas com mTNF(Figura 12b-d), enquanto os biofilmes não tratados demonstraram estrutura típica, densa, com levedura, pseudo-hifas e hifas (Figura 12a). Em aumentos maiores, nas imagens, foram divisados diferenças ultraestruturais entre as células do biofilme de *Candida albicans* crescidas apenas em RPMI 1640 e as crescidas sob distintas concentrações de mTNF tratamento com alterações importantes na aparência da superfície de liso para áspero, indicando danos externos de parede celular, conforme pode ser observado na Figura 13

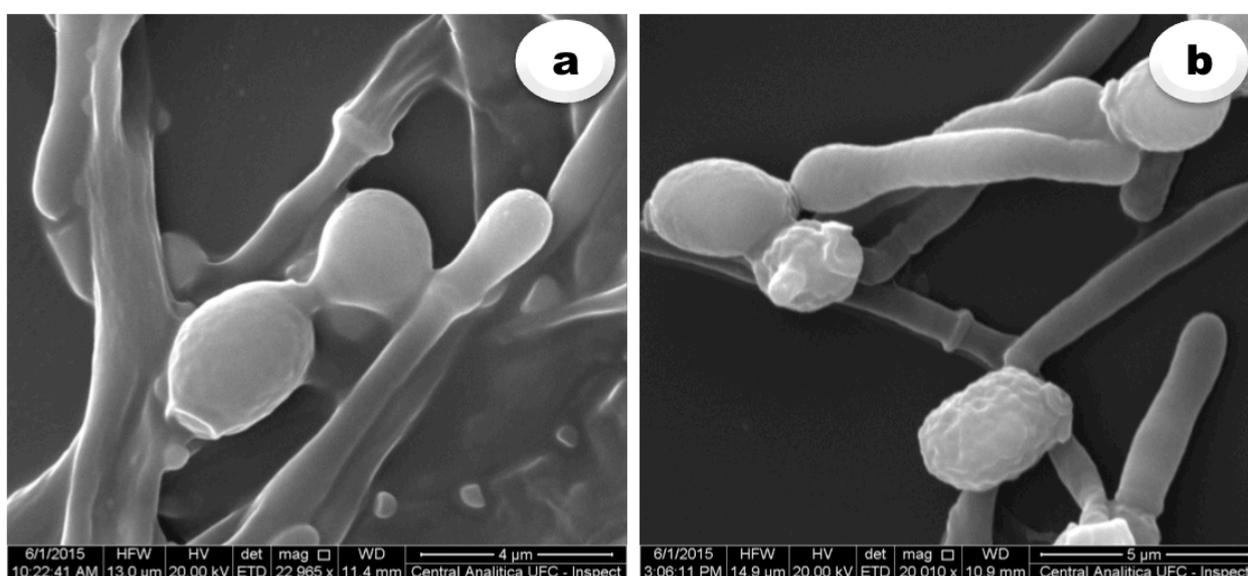
Figura 12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra os efeitos de diferentes concentrações de mTNF na formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). (a) Controle (mTNF ausente); (b) 0,1 ng/mL de mTNF; (c) 10 ng/mL de mTNF; (d) 20 ng/mL de mTNF. As setas apontam para as formas de pseudo-hifas. Aumento de 2000 x. Barra = 50 μ m.



A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite avaliar, além da topologia geral do biofilme, a superfície fúngica com maior resolução e profundidade de campo do que os microscópios de luz. Assim, nas imagens, foram divisados diferenças ultraestruturais entre as células do biofilme de *Candida albicans* crescidas apenas em RPMI 1640 e as crescidas sob distintas concentrações de mTNF

tratamento com alterações importantes na aparência da superfície de liso para áspero, indicando danos externos de parede celular, conforme pode ser observado na Figura 13.

Figura 13- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), ilustrando o efeito do mTNF sobre a ultraestrutura da parede celular da *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). (a) Controle positivo (mTNF ausente), em que se pode observar células de variadas morfologias mostrando parede homogênea e lisa. Aumento de 22.9850 x. Barra = 4 μ m. (b) 0,1 ng/mL de mTNF, no qual se verificou alteração da parede com mudança de aspecto para rugoso comparado ao controle. Aumento de 20.010 x. Barra = 5 μ m.

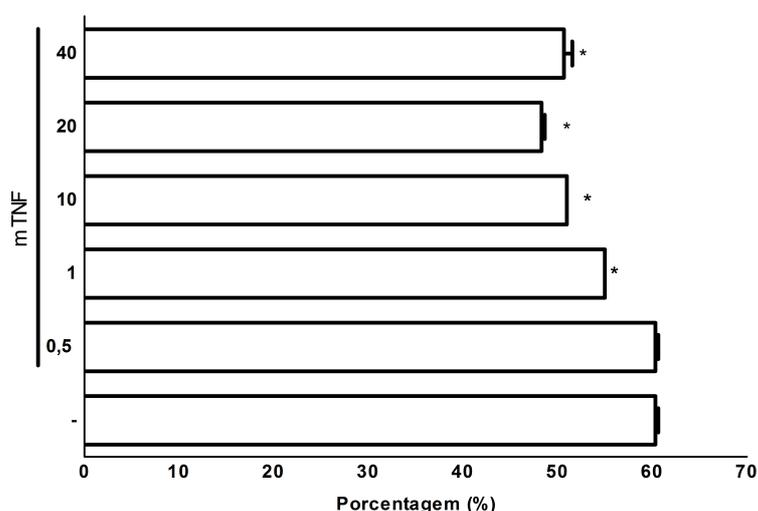


7.6 mTNF altera a hidrofobicidade do biofilme de *Candida albicans*

A exposição de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) nas concentrações de 10, 20 e 40 ng/mL de mTNF por 48 h interferiu dose-dependentemente na hidrofobicidade. Para avaliação da hidrofobicidade da superfície celular fúngica foi realizado o teste de solubilização em hidrocarboneto. Neste caso, foi utilizado o xileno para tal fim.

Considerando que amostras com a média de índice de hidrofobicidade superior a 90% são altamente hidrofóbicas e com menos de 10% altamente hidrofílicas, e os valores intermediários ($90\% < IH < 10\%$) são considerados com média hidrofobicidade. As amostras de controle positivas, não tratadas com TNF, exibiram um comportamento de hidrofobicidade média com taxas superiores a 60% de índice de hidrofobicidade. Já nas amostras de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), foi observada uma redução significativa da hidrofobicidade de 60% para valores entre 48-50% de hidrofobicidade nos tratamentos com 10, 20 e 40 ng/mL de mTNF, médias dos índices de hidrofobicidade que são apresentados em porcentagens, conforme é expresso no gráfico da ($P > 0,05$).

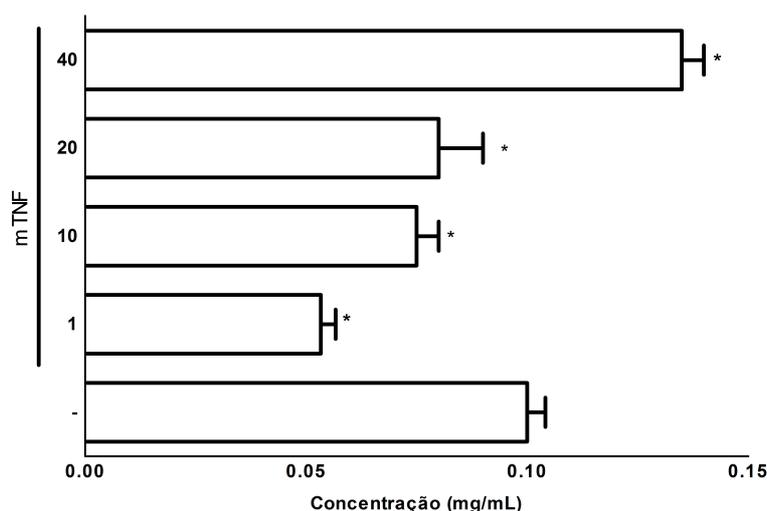
Figura 14 - Índice de hidrofobicidade (IH) observado no controle (biofilme não tratado com mTNF) e nas concentrações de TNF murino (mTNF) (40, 20, 10, 1 e 0,5 ng/mL) no biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 após cultivo de 48 h a 35°C. A porcentagem de hidrofobicidade da superfície celular de cada amostra foi calculada pela fórmula $\% \text{ IH} = (\text{D.O. controle} - \text{D.O. teste}) \times 100 / \text{D.O. controle}$, com D.O. quantificada por espectrofotometria a absorvância de 660 nm. Os dados são mostrados em média \pm SEM com significância de $p < 0,05$. *- Significa difere significativamente do controle.



7.7 mTNF altera os níveis de proteína do biofilme

A análise dos níveis de proteína no biofilme de *Candida albicans* havendo mTNF (1; 10; 20 e 40 ng/mL) pelo método de Bradford demonstrou uma redução dos níveis de proteína em todos os tratamentos com mTNF, em comparação ao controle não tratado, como pode ser observado na Figura 15. O controle, que consistiu em biofilme de *Candida albicans* cultivado em RPMI 1640, sem suplementação de mTNF, demonstra uma concentração de 0,15 mg/mL de proteínas totais, todavia, a adição de mTNF nas concentrações de 1, 10 e 20 ng/mL reduziu essa concentração para valores de 0,04 a 0,010 mg/mL. Os níveis de proteína, contudo, reduziram de modo inversamente proporcional ao crescimento da concentração de 1 a 20 ng/mL de mTNF, como pode ser verificado no gráfico da Figura 15. Na concentração de 40 ng/mL de mTNF, observamos um aumento dos níveis de proteína comparado ao controle.

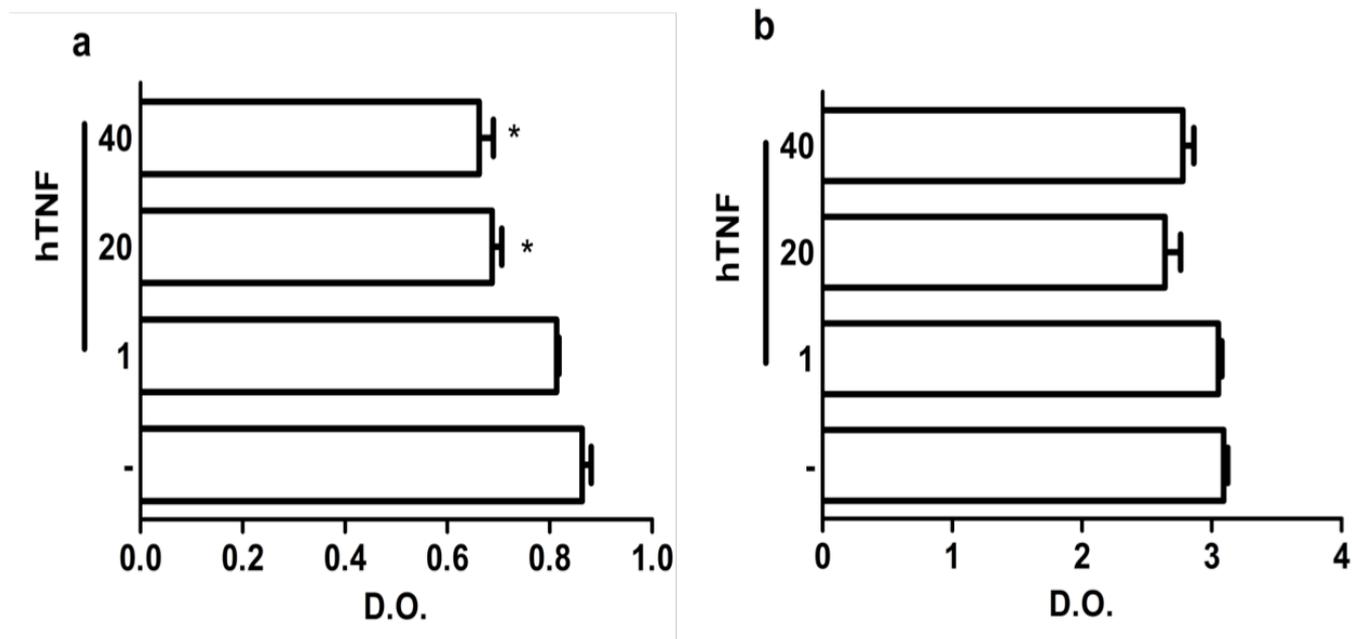
Figura 15- Composição proteica de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação cultivado havendo mTNF (1; 10; 20 e 40 ng/mL). A quantificação foi feita pelo método colorimérico de Bradford com leitura em espectrofotômetro a uma absorvância de 595 nm. Os dados são exibidos em média \pm SEM com significância de $p < 0,05$. *- Difere significativamente do controle.



7.8 Interferência da origem do TNF

O TNF humano e murino são moléculas bem semelhantes, entretanto, para maior aplicabilidade do estudo na clínica médica, foi testado se o TNF humano (hTNF) teria capacidade de inibir a formação de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). O uso de hTNF nas concentrações de 1, 20 e 40 ng/mL demonstrou que as maiores concentrações (20 e 40 ng/mL) promoveram a inibição da formação de biofilme de *Candida albicans*, quando comparado ao controle de modo semelhante ao mTNF (Figura 16). Mais uma vez, no entanto, foi observada a ausência de efeito do TNF no biofilme já formado mesmo no TNF de origem humana; há manutenção da atividade metabólica das células de *Candida albicans* no biofilme maduro adicionado de hTNF comparado ao controle não tratado (Figura 16b). Este resultado foi observado em ensaio de redução de XTT e confirmado por análise morfológica após coloração de azul de lactofenol.

Figura 16- Efeito das concentrações (1, 20 e 40 ng/mL) de TNF humano (hTNF) sobre o biofilme em formação (a) e maduro (formado) (b) de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). Atividade metabólica foi avaliada por ensaio de redução enzimática do sal XTT. Os dados se mostram em média \pm SEM (Absorbância 492nm); *P < 0,001.

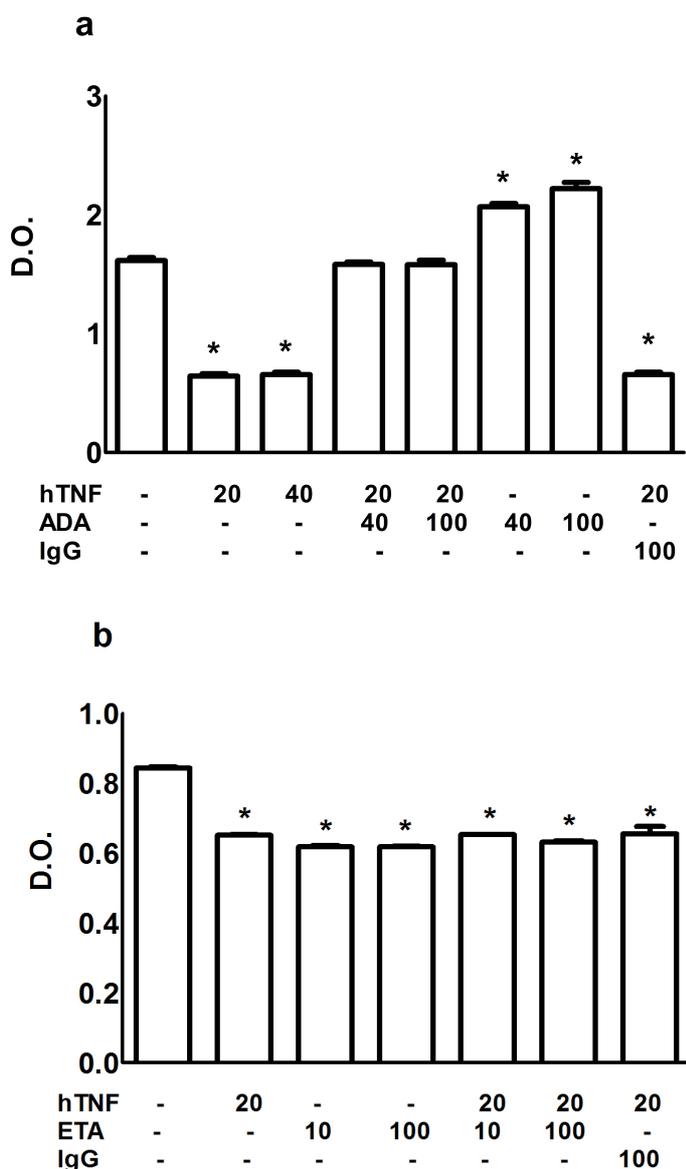


Nas observações de microscopia óptica, conforme descrito em relação ao mTNF, o hTNF inibiu a formação de hifas com amostras cultivadas sob 10 e 20 ng/mL por 48 h a 35°C, sendo observados apenas blastoconídeos e pseudo-hifas. Enquanto, isso, nas amostras de controle positivo, verificou-se o predomínio de formas filamentosas como observado nos testes anteriores com TNF de origem murina, indicando que a origem do TNF não interfere no seu efeito inibitório sobre a formação de biofilme e *Candida albicans* (ATCC 10.2.31).

7.10 Efeito das drogas anti-TNF

As células de *Candida sp.* são desprovidas de receptores clássicos de TNF, então, questionou-se se as drogas usadas na clínica médica como inibidores de hTNF poderiam alterar o efeito do hTNF sobre os biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31).

Figura 17- Efeito de drogas anti-TNF, adalimumab e etanercept, associadas ou não ao TNF humano (hTNF) em biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). Os tratamentos foram 20 e 40 ng/mL de TNF humano (hTNF) (a e b), 40 e 100 ng/mL de adalimumab (ADA ng/mL) (a), 10 e 100 ng/mL de Etanercept (ETA)(b), 100 ng/mL de imunoglobulina G humana (IgG) (a e b) ou controle positivo amostras cultivadas apenas em meio RPMI 1640 (-). A atividade biológica foi mensurada por ensaio de redução de sal de XTT com leitura a uma absorvância de 492nm. Os dados estão expressos em média \pm SEM com *P < 0,001.



A pré-incubação de hTNF na concentração de 20 ng/mL com o anticorpo monoclonal humanizado anti-TNF, adalimumab (ADA), nas duas concentrações testadas de 40 e 100 ng/mL, inibiu o efeito do hTNF sobre o crescimento do biofilme de *Candida albicans* em formação, enquanto o adalimumab isolado (40 e 100 ng/mL) aumentou a atividade metabólica do biofilme quando comparado

ao biofilme não tratado com hTNF (Figura 17a). Neste ensaio, as concentrações de hTNF (20 e 40 ng/mL) apresentaram o mesmo efeito inibitório na formação do biofilme de *Candida albicans* observado nas avaliações prévias. Entretanto, a adição de IgG ao meio de cultivo (RPMI 1640) não interferiu no efeito inibitório do hTNF sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31).

Por outro lado, a pré-incubação com o receptor de hTNF solúvel acoplado a IgG, etanercept (ETA), nas concentrações de 10 e 100 ng/mL, não alterou o efeito do hTNF (20 ng/mL) e a adição de concentrações de etanercept sozinho (10 e 100 ng/mL) reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme, semelhante ao hTNF isolado conforme é apresentado no gráfico da Figura 17b. Como controle, a incubação com imunoglobulina irrelevante (IgG) não alterou o efeito inibitório do hTNF sobre a formação do biofilme. Contudo, o hTNF na concentração de 20 ng/mL apresentou o efeito inibitório na formação do biofilme conforme esperado (Figura 17b).

7.11 Bloqueio do efeito do TNF pela N, N'-diacetilquitobiose

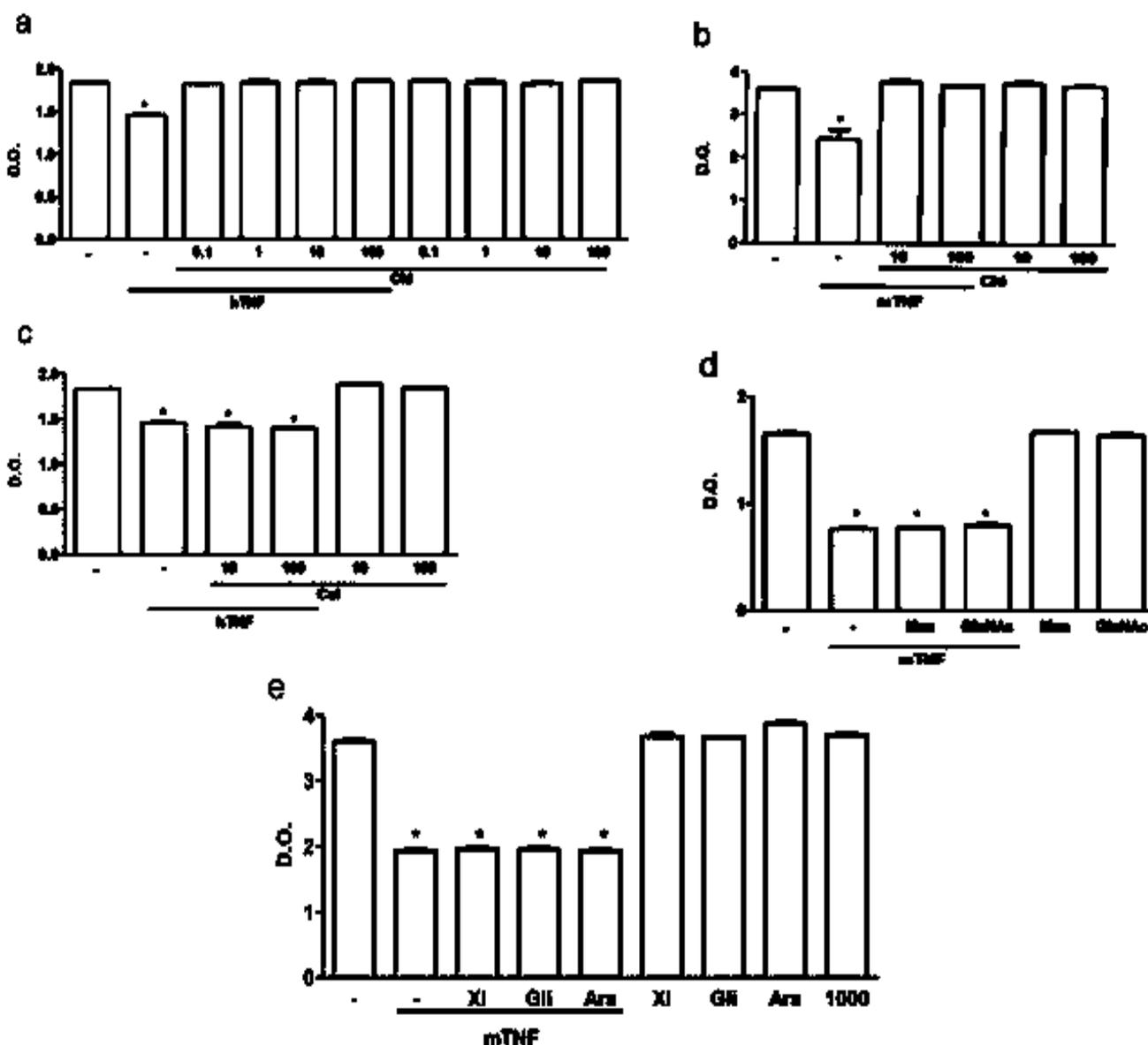
A pré-incubação de TNF (20 ng/mL) com N, N'-diacetilquitobiose (0,1; 10; 100 e 1000 µg/ mL) por 1 h bloqueou o efeito inibitório dessa citocina sobre a formação de biofilme, independentemente da origem do TNF (murino ou humano) ou da dose utilizada de N, N'-diacetilquitobiose, restaurando a capacidade da *Candida albicans* de filamentação e formação de biofilme.

O efeito do bloqueio do TNF (mTNF e hTNF) pelo N, N'-diacetilquitobiose foi mostrado por meio de ensaios de redução do sal de XTT (Figura 18) e análise morfológica do biofilme em formação (Figuras 20a - d). Na Figura 18a, há os resultados da formação de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) sob hTNF e N, N'-diacetilquitobiose associados ou isolados avaliados por meio da técnica de XTT. Os ensaios de redução de sal de XTT mostraram que o hTNF, na concentração de 20 ng/mL, inibiu a formação de biofilme em aproximadamente 20%, em comparação ao controle. Quando realizada, entretanto, uma prévia incubação com o dissacarídeo N, N'-diacetilquitobiose ou quando adicionado apenas esse carboidrato, foi observado um nível de atividade metabólica das células semelhante ao controle não tratado, amostras de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) forte formadora de biofilme crescidas em RPMI 1640 sem suplementação ($P < 0,001$).

O mesmo comportamento foi observado quando a cepa de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) foi cultivada na presença de mTNF isolado ou pré-incubado com N,N'-diacetilquitobiose. Assim, foi verificado que o mTNF isolado na concentração de 20 ng/mL continua inibindo a formação de biofilme, mas quando incubado em qualquer concentração de N, N'-diacetilquitobiose (100 e 1000 µg/ mL) não há

efeito algum sobre o desenvolvimento do biofilme, conforme expresso pelo gráfico da Figura 18b ($P < 0,001$).

Figura 18- N, N'-diacetilquitobiose bloqueia o efeito do TNF na formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) (a, b). N, N'-diacetilquitobiose (Chi $\mu\text{g} / \text{mL}$) isolado ou combinado com hTNF (a) ou mTNF (b) (ng / mL) ou meio (-). Avaliação da atividade por XTT do biofilme de *Candida albicans* em meio suplementado com hTNF ou mTNF e/ou celobiose (Cel) (c), manose (Man) (d) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc)(d), xilose (Xi) (e), glicose (Gli)(e) e arabiose(Ara) (e). Os dados representam a média \pm SEM . *Dados diferem significativamente do controle(-), $P < 0,001$.



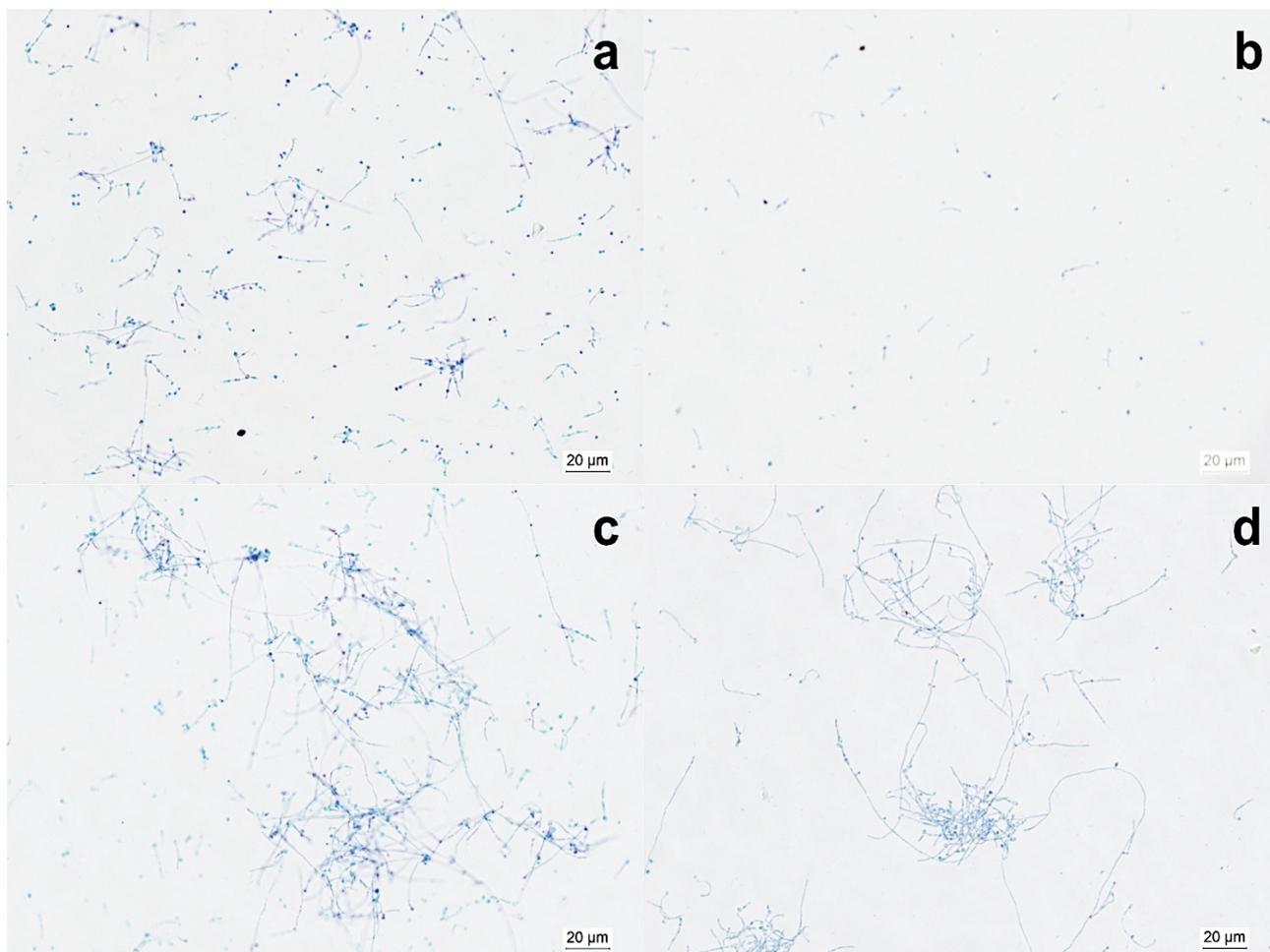
Os efeitos bloqueadores observados na N, N'-diacetilquitobiose com o TNF não foram observados quando realizada uma pré-incubação com outros carboidratos (dissacarídeos e polissacarídeos). Foram avaliados o efeito da celobiose (Cel)(10 e 100 ng/mL), manose (50mM), N-acetilglucosamina (GlcNAc) (50 mM), xilose (Xi) (50 mM), arabinose (Ara) (50 mM) e glicose (Gli) (50 mM).

A Figura 18c expressa o efeito do hTNF (20 ng/mL) e celobiose (10 e 100 ng/mL) isolados ou associados sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31). A adição de celobiose (Cel) nas concentrações de 10 e 100 ng/mL não foi capaz de inibir o efeito do TNF sobre o biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), de tal modo que o hTNF promove a inibição da formação do biofilme mesmo após a incubação com celobiose ($P < 0,001$). Esse dado indica que a celobiose, mesmo sendo quimicamente semelhante ao N, N'-diacetilquitobiose, não é capaz de bloquear o efeito do hTNF, provavelmente, por não se ligar ao sítio específico e efector desta citocina. Resultados semelhantes são observados com a pré-incubação de TNF (20ng/mL) com manose (Man) ou N-Acetilglucosamina (GlcNAc) nas concentrações de 50 mM, outros dois componentes da parede celular de *Candida albicans*; também não alterou a atividade do hTNF ($P < 0,001$) (Figura 18d). De igual modo, a incubação com outros polissacarídeos testados, xilose, arabinose e glucose, não prejudicou a atividade do TNF sobre crescimento do biofilme ($P < 0,001$) (Figura 18 e).

Nas imagens obtidas pela microscopia óptica das amostras de células isoladas de biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) e coradas com azul de lactofenol, é possível observar o mesmo comportamento dos dados da avaliação por XTT. Nas amostras do controle positivo (RPMI 1640 sem suplementação), foram observadas leveduras, pseudo-hifas e hifas após 48 h de cultivo, com o predomínio de formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas) (Figura 19a).

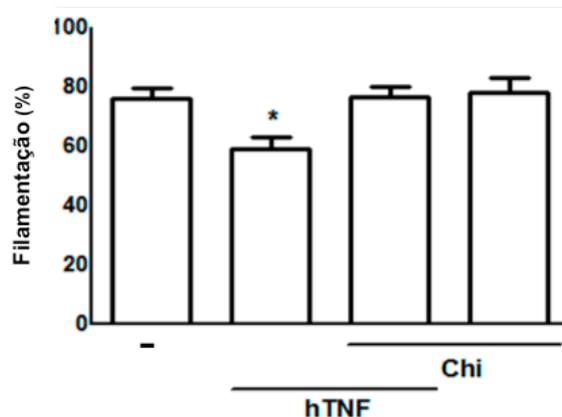
O cultivo do biofilme havendo 20 ng/mL de hTNF inibiu a transição de leveduras para hifas, conseqüentemente, não há hifas verdadeiras e se registra o predomínio de leveduras, como ilustra a Figura 19b. O mesmo padrão do controle positivo é observado nas amostras provenientes de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) cultivados com hTNF previamente incubado com N, N'-diacetilquitobiose por 1h ou cultivadas em N, N'-diacetilquitobiose isolado, indicando o bloqueio do efeito inibitório do hTNF sobre a filamentação da cepa de *Candida albicans* estudada (ATCC 10.2.31). Além disso, o N, N'-diacetilquitobiose isolado ter um comportamento de filamentação semelhante ao controle indica que esse dissacarídeo não interfere na filamentação de *Candida albicans*.

Figura 19- Microscopia óptica de células isoladas de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 10.2.31 cultivados com RPMI 1640 sem suplementação (controle) (a), hTNF 20ng/mL (b), hTNF (20 ng/mL) associado com N, N'-diacetilquitobiose (100 µg /mL) (c), e N, N'-diacetilquitobiose (100 µg /mL) (d) por 48 h. Aumento: 200 x. Barra= 20 µm.



A quantificação do efeito do hTNF e N, N'-diacetilquitobiose isolados ou associados foi feita pelo cálculo do índice de filamentação dos biofilmes em formação após 48 h de crescimento. O índice de filamentação representa o percentual de hifas / blastoconídios e hifas em dez campos avaliados por amostra. O cálculo do índice de filamentação permitiu confirmar o resultado da análise morfológica descritiva, no qual o hTNF sozinho reduz a filamentação das células de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) nas etapas de formação de biofilme, enquanto esta citocina associada a N, N'-diacetilquitobiose ou o uso do dissacarídeo isolado a média dos percentuais de filamentação semelhante à observada no controle positivo (não tratado) ($P < 0,001$).

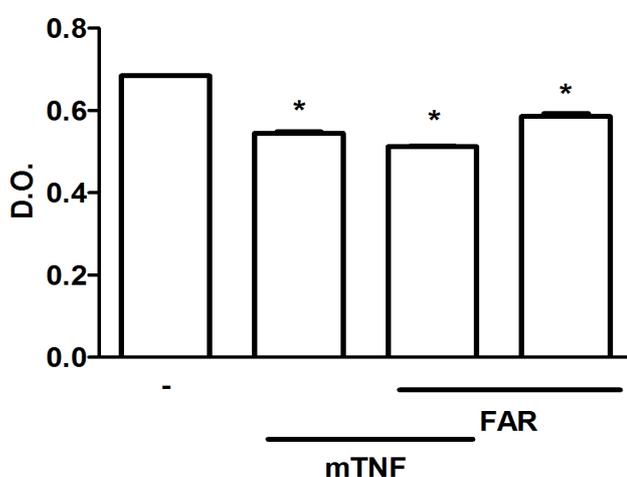
Figura 20- O índice de filamentação dos da células de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em biofilme em formação após 48 h de crescimento com RPMI 1640 sem suplementação (controle positivo) (-), hTNF (20ng/mL), hTNF (20 ng/mL) associado com N,N'-diacetilquitobiose (Chi) (100 µg /mL) e N,N'-diacetilquitobiose (Chi) (100 µg /mL). Os dados representam média \pm SEM do índice de filamentação (proporção de hifa/hifa e blastoconídio) contabilizados em dez campos analisados em um aumento de 200x, com auxílio de um microscópio óptico de campo claro. * - Diferença significativa em relação ao controle (P<0,001).



7.11 Papel do farnesol na via do mTNF no biofilme de *Candida albicans*

Considerando que o efeito do mTNF na morfologia da *Candida albicans* é o de bloquear a transição de blastoconídios para hifas semelhante ao efeito do farnesol (FAR), tentou-se avaliar se havia interferência desta citocina no papel desta molécula *quorum-sensing*. O biofilme em formação de *Candida albicans* crescido com mTNF (20 ng/mL) e farnesol (50 µM) isolados ou associados mostrou uma redução da atividade metabólica das células mensuradas pela redução do sal de XTT (P < 0.001). Na Figura 18, pode-se observar esse comportamento inibitório de ambas as substâncias como já dividido em estudos prévios, mas também que a associação promove aumento na inibição do biofilme (P < 0.001).

Figura 21- Efeito do farnesol (FAR) e/ou TNF murino (mTNF) em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação. *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) de biofilme em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-), mTNF (20 ng/mL) isolado ou combinado com farnesol (50 μ M) ou farnesol isolado. A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorbância de 492nm. Os dados representam a média \pm SEM da densidade óptica (D.O.)*P <0,001 quando comparado ao controle.



7.12 Efeito da IL-1 e IL-17

Quando avaliada a curva dose-resposta da IL-1 (0,5; 1; 10 e 20 ng/mL) na formação do biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), pode-se ver que a dose de 20 ng/mL inibiu o desenvolvimento deste biofilme de maneira estatisticamente significativa ($P < 0.001$). Ao contrário do TNF (humano e murino) em que foi observada apenas uma perda de efeito nas menores doses, as concentrações de IL-1 de 1 e 0,5 ng/mL estimularam a produção de biofilme, como pode ser verificado pela técnica de XTT ($P < 0.001$) (Figura 22).

A IL-17 teve o resultado oposto a IL-1 e ao TNF (murino e humano), todas as concentrações estudadas desta citocina (1; 2,5; 5; 10 e 50 ng/mL) adicionadas a cultivo do biofilme em formação de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), exceto a concentração de 1 ng/mL, promoveram um aumento da formação de biofilme, como expresso no gráfico da Figura 23 ($P < 0.001$).

Figura 22- Efeito de diferentes concentrações de Interleucina 1 (IL-1) sobre biofilme em formação de *Candida albicans*. Biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-) ou diferentes concentrações de IL-1 (0,5; 1; 10 e 20 ng/mL). A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorbância de 492 nm. Os dados representam a média \pm SEM da densidade óptica (D.O.)*P <0,001 quando comparado ao controle. Analisados por meio de ensaio de redução do XTT. Os dados estão apresentados em média \pm SEM com *P < 0.001.

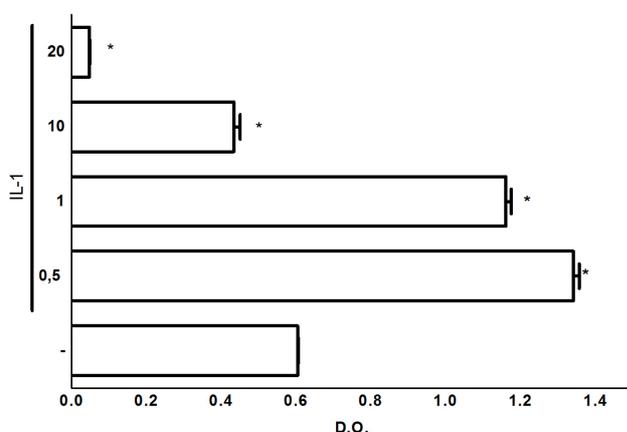
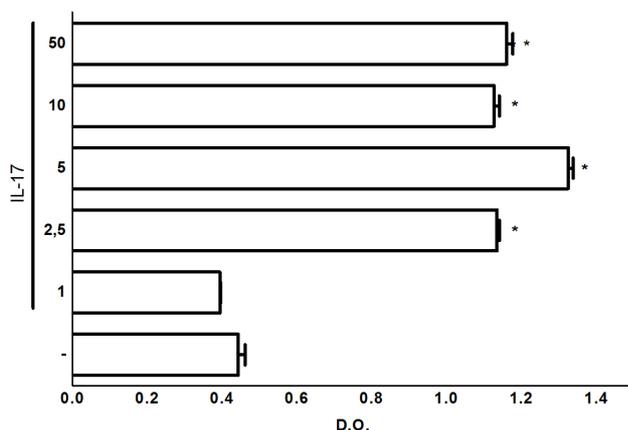


Figura 23- Efeito de concentrações de Interleucina 17 (IL-17) sobre biofilme em formação de *Candida albicans*, com análise procedida por meio de ensaio de redução do XTT. Biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31) em formação foram incubadas com RPMI 1640 (controle) (-) ou diferentes concentrações de IL-17 (1; 2,5; 5; 10 e 50 ng/mL). A avaliação da atividade foi feita pela por meio de ensaio de redução do XTT, em absorbância de 492 nm. Os dados representam a média \pm SEM da densidade óptica (D.O.)*P <0,001 quando comparado ao controle.



8 DISCUSSÃO

O biofilme de *Candida albicans* é resistente a agentes antimicrobianos comparado aos microrganismos na forma planctônica devido a fatores como a matriz extracelular composta por substâncias exopoliméricas (EPS) produzida pelo próprio microorganismo. Esta matriz atua como um revestimento impermeável e protetor do microorganismo, não sendo resistente apenas à ação da maioria das substâncias antifúngicas disponíveis, mas também resiste à ação das células do sistema mononuclear fagocitário (CHANDRA et al., 2001).

Além disso, a formação do biofilme está associada a mudanças fenotípicas e maior expressão de fatores de virulência que ajudam a fortalecer os mecanismos de resistência (AZEVEDO; ACERCA, 2012; GULATI; NOBILE, 2016).

Previamente, foi demonstrado que *Candida albicans* pode estimular a produção de TNF por monócitos e macrófagos (AYBAY ; IMIR, 1996). Nesse contexto, é importante ressaltar que o TNF tem importante papel como membro da resposta imune inata contra infecções fúngicas, promovendo a ativação das células de defesa e fagocitose dos diversos fungos (LOYOLA et al., 2012; CHENG et al., 2012).

O presente trabalho contudo mostra pela primeira vez o efeito inibitório do TNF de modo direto e independente de células mamíferas na formação de biofilme de *Candida albicans*, além de propor um novo mecanismo de acoplamento do TNF a polissacarídeos na parede deste fungo.

Na primeira etapa deste trabalho, foi avaliado o efeito do TNF sobre as células em estado de vida livre, células planctônicas, por meio do teste de sensibilidade *in vitro*. Esta técnica é preconizada para determinar a concentração mínima de uma droga capaz de ensejar a inibição do desenvolvimento de *Candida albicans* (CLSI, 2008).

Foram testadas concentrações de TNF definidas em experimento-piloto, no qual se verificou que concentrações a partir de 10 ng/mL já tinham efeito inibitório sobre a formação de biofilme. Como a vida em biofilme expressa uma resistência a antifúngicos bem maior do que as planctônicas, as concentrações de 0,1; 0,5; 1; 10 e 20 ng/mL foram consideradas confiáveis para avaliar o efeito dessa citocina nas células de vida livre (GULATI; NOBILE, 2016; COSTERTON et al., 1995). Nenhuma das concentrações de TNF, entretanto, alterou o crescimento da *Candida albicans*. Esse resultado pode ser explicado pelas limitações do método, uma vez que a leitura é feita visualmente e não foi realizado plaqueamento do meio de cultivo após o período de 48 h para que fosse verificada a viabilidade das células no meio e sua capacidade de formar colônias novas (AMARAL et al., 2010). O TNF pode ter atuado tardiamente, permitindo a multiplicação das leveduras, mas alterando a sua viabilidade sem

permitir a posterior formação de biofilme. Essa hipótese corrobora os dados de microscopia, em que, até 6 h não é significativa a diferença do crescimento de *Candida albicans* havendo ou não mTNF. Além disso, viu-se na microscopia eletrônica de transmissão dano à célula, que seria indicativo de perda de viabilidade. Outra hipótese é que o efeito do TNF só ocorra nas etapas de transição da forma comensal para a patogênica da *Candida albicans*, já que seu efeito só foi evidente em cepas forte formadoras de biofilme e durante as etapas de formação do biofilme.

As etapas de formação do biofilme são adesão inicial, adesão irreversível, crescimento/biofilme maduro e dispersão (AZEVEDO; CERCA, 2012; MATHÉ; DIJCK, 2013). Neste estudo, TNF suprimiu a formação de biofilme de modo dose-dependente, entretanto, não houve efeito significativo de nenhuma das concentrações de TNF quando este foi adicionado ao biofilme maduro. Portanto, infere-se que o TNF não tem efeito sobre a viabilidade de *Candida albicans* quando esta se encontra inserida na matriz extracelular; no entanto, se demonstrou um efeito inibitório do TNF no desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*. Assim, o papel do TNF parece estar associado às etapas iniciais de formação do biofilme, principalmente com a etapa de adesão. Essas etapas se caracterizam pela mudança morfológica da *Candida albicans*, situação *sine qua non*, com a modificação da parede celular e expressão de adesinas. Além disso, nas etapas iniciais, ocorre a ativação dos genes associados a expressão e produção de matriz extracelular (AZEVEDO; ACERCA, 2012; GULATI; NOBILE, 2016).

Neste trabalho, testaram-se concentrações de TNF que já vinham sendo usadas em cultivo de células mamíferas associadas ou não a *Candida albicans*. Na literatura, foram feitos estudos-piloto e determinação da curva. Os ensaios de redução de sal de XTT, além de mostrar o efeito do TNF sobre o metabolismo das células em biofilme, serviu como teste de triagem para escolha das cepas e concentrações de drogas a serem testadas nas outras técnicas subsequentes. O ensaio de XTT é uma técnica usada rotineiramente para avaliar o biofilme de *Candida albicans* (ROEHM et al., 1991; RAMAGE et al., 2001). Uma das limitações desta técnica está em só analisar a atividade metabólica das células vivas que pode ser afetada por fatores como maior disponibilidade de nutrientes, promovendo variação dos dados (XIE et al., 2011; BRIGHENTI et al., 2014).

Em virtude dos resultados semelhantes entre as concentrações de 20 e de 40 ng/mL de mTNF, a concentração de 20 ng/mL foi a de escolha para as técnicas de microscopia ou como dose máxima na curva do hTNF (SONG et al., 2008; MORICONI et al., 2011; SUGITA et al., 2013). Já em relação as cepas, as forte formadoras de biofilme indicaram um resultado mais evidente do que as fraca formadoras de biofilme, confirmando a relação entre o efeito do TNF e a capacidade da *Candida albicans* formar biofilme. As cepas fraca formadoras de biofilme mostraram dados erráticos, sem uma definição de dose-efeito como ocorreu nas forte formadoras de biofilme. Dentre as forte formadoras de biofilme, o critério

de seleção foi a padronização e reconhecimento a nível mundial do The American Type Culture Collection (ATCC), sendo mais fácil o acesso à cepa e possibilidade da repetibilidade destes resultados pela comunidade acadêmica, considerando que a ATCC é uma organização privada sem fins lucrativos fundada em 1925 para servir como uma autoridade depositária internacional e centro de distribuição de culturas de microrganismos. A ATCC tornou-se o líder global em pesquisa e desenvolvimento especializado para identificar, caracterizar, preservar e distribuir microrganismos com padrão-referência, linhagens celulares e outros materiais para pesquisa (CLARK; GEARY, 1974).

Os dados de microscopia óptica de campo claro, microscopia confocal e microscopia eletrônica demonstraram que a adição de TNF ao biofilme de *Candida albicans* suprimiu aparentemente a transição morfológica da forma de levedura à de hifa e promoveu alterações ultraestruturais. Além das imagens, os cálculos dos índices de filamentação nos comprovaram uma diferença estatística entre os tratamentos com TNF murino e humano comparado ao controle (RPMI 1640 sem suplementação) e a inibição promovida por esta citocina.

A transição de levedura para hifa pode ser induzida por muitos fatores ambientais, como a temperatura de crescimento de 37°C, pH neutro, meio de crescimento, déficit de carbono, soro humano, estresse oxidativo e uma ampla gama de produtos químicos, incluindo N-acetilglucosamina, prolina (e outros aminoácidos) e álcoois (SUDBERY, 2011; NADEEM et al., 2013). Além disso, foram identificados fatores de transcrição importantes na capacidade de filamentação, como Hst7, HWP1 e EFG1 (FELDMAN et al., 2014).

A transição morfológica da levedura para hifa é considerada uma peça-chave para a formação de biofilmes (BAILLIE et al., 1999; RAMAGE et al., 2002). As hifas são elementos essenciais para proporcionar integridade estrutural e a arquitetura de multicamadas característica dos biofilmes maduros (BAILLIE et al., 1999). Além disso, Ramage et al. (2002) demonstraram que *Candida albicans* mutante para o gene Efg1, incapaz de formar hifas, forma biofilmes pobres e que não constitui uma estrutura tridimensional, sendo composta, principalmente, por uma monocamada com células esparsadas.

A forma de hifa é considerada a mais patogênica, indicando maior capacidade de invasão por ação mecânica, pela liberação de enzimas hidrolíticas e expressão de invasinas. O seu formato alongado também dificulta a sua fagocitose pelas células de defesa do sistema mononuclear fagocitário. Outro fator de virulência predominante nessa forma morfológica coincidem com as adesinas, permitindo uma maior capacidade de adesão e facilitando assim a formação de biofilme (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; SHARECK; BELHUMEUR, 2011). Com efeito, a transição de levedura para hifa é um processo chave na patogênese de *Candida albicans*, inibido pelo TNF de modo dose-dependente (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Outras moléculas, como farnesol, ácidos graxos, rapamicina, inibidores da histonas desacetilases e inibidores do ciclo celular modulam a transição de levedura para hifa em *Candida albicans* por diversas vias e mecanismos. Curiosamente, muitas dessas moléculas atuam em componentes da via de sinalização Ras1p (SHARECK; BELHUMEUR, 2011). Assim, essa é uma provável via ativada pelo TNF, quando promove a inibição da transição de levedura para hifa.

In vivo, resultados semelhantes aos deste ensaio já haviam sido observados, em que os efeitos do TNF foram relatados em um modelo murino de candidíase oral e na transição de blastoconídios para hifas induzida por CO₂. Neste estudo, o TNF suprimiu a formação de hifas diretamente e de modo dose-dependente, enquanto que, *in vivo*, a administração oral de TNF reduziu significativamente as unidades formadoras de colônia (CFU) de *Candida albicans* isoladas de tecidos de camundongos tratados com essa citocina (OHTA et al., 2007). Este trabalho, contudo, é o pioneiro a demonstrar a ação direta do TNF sobre a *Candida albicans* sem o intermédio de qualquer célula mamífera, como ocorre no estudo *in vivo* de Ohta et al., (2007).

A microscopia confocal permite analisar viabilidade celular, a matriz formada e a espessura do biofilme. Na cinética deste experimento, viu-se a diferença de viabilidade apenas após 48 h de cultura, com maior marcação de iodeto de propídeo nas células tratadas com mTNF. Essa análise foi realizada com dois marcadores fluorescentes: o SYTO e iodeto de propídeo.

O SYTO®-9 é marcador fluorescente verde e o iodeto de propídeo se mostra com fluorescência vermelha. Esses marcadores diferem na habilidade de penetrar microrganismos vivos. Assim, o corante SYTO®-9 consegue adentrar tanto microrganismos que possuem uma membrana citoplasmática intacta (viáveis), como aqueles com membranas danificadas (inviáveis). Já o iodeto de propídeo consegue penetrar, apenas, microrganismos que possuem membranas comprometidas. Assim, as células viáveis adquirem a coloração verde-fluorescente e as células inviáveis, a coloração amarelo-avermelhada decorrente da influência tanto do SYTO®-9 como do iodeto de propídeo (SAINI; CHHIBBER; HARJAI, 2014).

Do mesmo modo que foi observado nas outras técnicas de microscopia, não houve a formação de biofilme havendo TNF, não sendo possível avaliar sua espessura. Bem assim, não foram utilizados marcadores específicos para a matriz extracelular, o que abre perspectivas para novos trabalhos, estudando especificamente a matriz extracelular. Dados como densidade e composição de matriz podem complementar as informações sobre a ação do TNF acerca da formação do biofilme de *Candida albicans*.

Na microscopia eletrônica de transmissão, apenas leveduras foram observadas nas amostras de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10.2.31), e hifas nas amostras-controle (RPMI 1640 sem

suplementação). A técnica de microscopia eletrônica de transmissão, decorreu do processamento oneroso e demorado, o que permitiu que apenas uma concentração de mTNF fosse analisada. Ela permite avaliar, no entanto, características como eletrodensidade do citoplasma, integridade de membradas e parede celular (BASMA; ZURAINI; SASIDHARAN, 2011). Assim, foi possível observar nas células tratadas com 40 ng/mL de mTNF danos ultraestruturais com perda de integridade de parede e mudança de eletrodensidade do citoplasma. Noutro estudo, resultado semelhante foi observado, quando *Candida albicans* foi cultivada com uma subfração da “barbatimão” (*Stryphnodendron adstringens*), uma planta medicinal do cerrado brasileiro, rica em taninos. A parede das células mostrou uma perda da integridade ultraestrutural e baixa eletrodensidade (ISHIDA et al., 2006). Consequentemente, isso pode induzir modificações na permeabilidade do plasmalema e no conteúdo do citoplasma, como demonstrado pela diferença de eletrodensidade das células tratadas, em comparação ao controle (ISHIDA et al., 2006; ISHIDA et al., 2009). A MET indica a permeabilização da parede celular e subsequente ruptura das camadas estruturais da parede celular fúngica, sendo esse um achado compatível com a não formação do biofilme em virtude da ruptura da parede celular (LARA et al., 2015).

A microscopia eletrônica de varredura permite avaliar o biofilme em sua estrutura *in situ*. O crescimento em lamínula para posterior avaliação ao microscópio eletrônico permite observar como o biofilme se organiza, todavia o processamento, principalmente a desidratação, não permite que a matriz se mantenha íntegra (PANTANELLA et al., 2013); mTNF inibiu a formação de hifas verdadeiras, confirmando os dados de microscopia óptica. As células de *Candida albicans* cultivadas com mTNF foram observadas esparsadas, sem a formação de uma estrutura tridimensional em extratos, como foi verificado no Grupo-controle. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos prévios (RAMAGE et al. 2002; LARA et al., 2015). A incubação de *Candida albicans* com várias concentrações de farnesol (3, 30 e 300 μM), molécula inibidora da transição de levedura para hifa, mostrou que houve efeito dependente da dose na formação de biofilmes. As células tratadas com farnesol a uma concentração de 300 μM produziram biofilmes escassos, que eram compostos, predominantemente, de células em forma de levedura e pseudo-hifas. As hifas verdadeiras raramente foram observadas, fator que contribuiu para a arquitetura pobre do biofilme. Os biofilmes formados sob farnesol 3 e 30 μM eram mais densos e compostos de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O Grupo-controle foi composto, principalmente, de hifas verdadeiras, apresentando uma estrutura tridimensional exuberante (RAMAGE et al., 2002). O mesmo ocorreu com uso de nanopartículas de prata (AgNPs), que demonstraram um potente efeito inibidor dependente da dose das nanopartículas de prata na formação de biofilmes. As diferenças ultraestruturais da *Candida albicans* observadas por meio de MEV após o tratamento de

nanopartículas de prata foram alterações na aparência superficial da levedura de lisa a rugosa, indicando danos na parede celular. No biofilme, mais uma vez, foi observado que as hifas verdadeiras estavam ausentes em virtude da inibição da filamentação (LARA et al., 2015).

Staniszewska et al. (2016) verificaram, em estudos de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, que as hifas verdadeiras são elementos essenciais para desenvolver e proporcionar a integridade estrutural de biofilme, já que as cepas com mutações nos genes que modulam a morfogênese perdem a capacidades de adesão e agregamento.

Em MET e MEV, alterações na morfologia da parede celular foram observadas no biofilme formado sob TNF. A parede celular é responsável pela hidrofobicidade superficial da célula fúngica, pela formação do tubo germinal, pela adesão a células epiteliais e às proteínas da matriz extracelular e fagocitose (HAZEN; HAZEN, 1992). Assim, os achados morfológicos corroboram os dados de hidrofobicidade e dos níveis de proteína.

O ensaio de hidrofobicidade revelou que o TNF a 10, 20 e 40 ng/mL diminuiu significativamente a hidrofobicidade da superfície celular, quando comparado às células do biofilme não tratadas. O grau de hidrofobicidade da superfície celular de uma cepa de *Candida albicans* estaria relacionada com uma maior ou menor capacidade das leveduras em se aderir ao substrato como às células epiteliais e, conseqüentemente, ao potencial patogênico desse microrganismo (AZEVEDO; CERCA, 2012). Na formação do biofilme, a hidrofobicidade da superfície celular é essencial, uma vez que é o primeiro passo para o desenvolvimento da comunidade (BUJDÁKOVÁ et al., 2013). Assim, o efeito inibitório do TNF na formação do biofilme pode estar correlacionado à redução da hidrofobicidade da superfície celular e diminuição da adesão observada pelo menor índice de hidrofobicidade, resultando na inibição da formação de biofilme.

Durante a formação do biofilme, a adesão pode ser dividida em dois estádios. O primeiro é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas, como as interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de Van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que estão associadas à energia livre de superfície substrato de formação do biofilme (CANNON; CHAFFIN, 1999; KLOTZ; DRUTZ; ZAJIC, 1985; MINAGI et al., 1985). Na adesão, seguinte, há uma mediação molecular entre adesinas específicas expressas na parede celular e o substrato por meio da produção da matriz extracelular. Os componentes da superfície celular promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofilinas) as propriedades hidrofóbicas do fungo, podendo estes coexistirem na parede celular (FELDMAN et al., 2014).

Em contraste, outros estudos mostraram que a hidrofobicidade da superfície celular tem pouco efeito na aderência (HAZEN et al., 1988). Muitos agentes antifúngicos, como anfotericina B, nistatina,

cetoconazol, fluconazol e 5-fluorocitosina, diminuem a adesão às células epiteliais, mas não interferem com a hidrofobicidade das leveduras da superfície celular (HAZEN et al., 2000).

Outro achado foi a redução dos níveis de proteína do biofilme em formação, o que pode ser um indicativo da redução na produção de matriz extracelular e expressão de proteínas, como adesinas relacionadas à forma de vida de biofilme. Nas imagens de MEV e confocal, não se observam uma organização tridimensional do biofilme, o que faz se crer que a não produção de matriz extracelular ou pelo menos a sua síntese é bem inferior ao Grupo-controle. Esses dados corroboram com dados de quantificação dos níveis de proteína uma vez que a matriz extracelular do biofilme de *Candida albicans* é, predominantemente, composta por glicoproteínas, aproximadamente, 55% da matéria seca (ZARNOWSKI et al., 2014; GULATI; NOBILE, 2016; PIERCE et al., 2017). Dentro do comportamento dos dados, notou-se um aumento dose-dependente dos níveis de proteínas, provavelmente pelo fato de o TNF ser uma proteína e sua ligação em concentrações crescentes às células de *Candida albicans*, mesmo após a lavagens das placas. Talvez, tenha sido possível mensurá-lo, juntamente com os componentes do biofilme (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

Os resultados inibitórios do TNF sobre o desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans* foram observados independentemente da origem deste, murino e humano. O TNF é uma molécula conservada em grande parte; todavia, é possível observar diferenças estruturais e dos efeitos obtidos conforme descrito por Olszewski et al., (2007). A diferença é observada na cadeia madura do TNF humano que parece não ser glicosilada, ao contrário do que é observado na citocina murina (OLSZEWSKI et al., 2007). Isso faz com que se creia que a porção efetora da molécula contra a formação do biofilme de *Candida albicans* é uma porção conservada da molécula.

A clínica médica utiliza, no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes, drogas anti-TNF, como etanercept, infliximab e adalimumab. Embora todas essas drogas atuem na interrupção da ligação entre TNF e seus receptores, o mecanismo molecular de ação de etanercept difere do adalimumab e infliximab, apontando efeitos distintos *in vivo* e *in vitro* (HU et al., 2013; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016). O infliximab e o adalimumab ligam-se com o loop E-F do TNF e funciona como bloqueadores de ligação ao receptor de TNF. Já o etanercept é um receptor solúvel que ocupa o local de ligação ao receptor de TNF (HU et al., 2013; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016). Neste trabalho, também foi avaliada a possibilidade de ligações inespecíficas da *Candida albicans* a imunoglobulinas. Para tal, foi usada a IgG humana, que não expressou qualquer efeito sobre o desenvolvimento do biofilme, indicando ação específica do TNF e suas drogas anti-TNF (MOTA et al., 2013).

Estes resultados mostram que o adalimumab pode inibir o efeito do TNF em todas as concentrações testadas (40 e 100 ng/mL), porém não expressam efeito quando adicionado de modo

isolado ao meio de cultivo. Pode-se especular que mudanças conformacionais ou impedimento estérico representam o bloqueio do adalimumab da atividade do TNF, uma vez que este é um anticorpo e sua estrutura bloqueia mecanicamente o sítio de ligação do TNF a *Candida albicans* (HU et al., 2013; ZANG; LUO; ZANG, 2016).

A incubação com etanercept, presumivelmente, bloqueando o acesso do TNF ao seu receptor clássico, não interferiu no biofilme de *Candida albicans*. Esse dado mostra que a ação do TNF na formação do biofilme não ocorre pelo mecanismo clássico conhecido do TNF em células mamíferas; no entanto, a inibição e a melhoria na formação de biofilmes proporcionada por etanercept e adalimumab, respectivamente, são difíceis de explicar. A recente demonstração de que as proteínas terapêuticas, incluindo adalimumab e etanercept, são capazes de ligar carboidratos via ligação a domínio semelhante à lectina abre a possibilidade de tal mecanismo para explicar este aparentemente controverso resultado (ZANG; LUO; ZANG, 2016).

Os seres humanos produzem substâncias efetoras solúveis contra *Candida albicans*, incluindo peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMP são proteínas de baixo peso molecular carregadas positivamente e características anfipáticas que permitem a estes serem solúveis em água e interagir com a membrana lipídica dos microorganismos. Esses podem gerar um dano direto ao fungo ou atuar para ativação do complemento (CHENG et al., 2012). Dentre os AMPs que atuam contra a *Candida albicans*, são bem conhecidos os mecanismos a histatina (Hst 5), defensina 3 (hBD-3) e catelicidina (LL37). Por exemplo, o LL37 tem um importante papel para destruir patógenos oportunistas como *Candida albicans* (DE SMET, CONTRERAS, 2005). LL37 interage com carboidratos da parede da *Candida albicans* e reduz a adesão de *Candida albicans* à bexiga de camundongos (TSAI et al., 2011). Análises enzimáticas mostram que LL37 aumenta a atividade de β -1,3-exoglucanase, enzima metabólica responsável pelos eventos morfogenéticos da parede celular por meio da hidrólise de β -glucana. Vale ressaltar que a parede da *Candida albicans* é composta por β -glucanas (polímeros ramificados de glicose contendo resíduos com ligações do tipo β -1,3 e β -1,6), quitina (polímeros de N-acetil- glucosamina contendo ligações β -1,4), manoproteínas (principal polímero estrutural e proporcionam rigidez à parede celular), pequenas quantidades de outras proteínas e lipídios (LÓPEZ-RIBOT et al., 2004). Os carboidratos da membrana celular e da parede celular são frequentemente receptores ou co-receptores dos AMPs (WU et al., 2004). Como exemplo disso, pode-se mencionar a proteína catiônica eosinofílica que destrói as células mamíferas por meio de através da sua interação com o sulfato de heparano da membrana celular (FAN et al., 2008) e tem efeito bactericida por meio da sua associação com lipopolissacarídeos (LPSs) (TORRENT et al., 2009; TORRENT et al., 2011). Esse mecanismo corrobora com a hipótese deste

trabalho como o TNF possa atuar diretamente sobre *Candida albicans*, uma vez que não há receptor clássico de TNF neste fungo e o bloqueio dos seus receptores por etarcept não interferiu na ação na formação do biofilme de *Candida albicans*.

Os carboidratos da parede celular da *Candida albicans* podem atuar como receptor, consoante observado com os AMPs. Neste contexto, pré-incubou-se o TNF com carboidratos na parede celular e/ou na matriz extracelular, bem como estruturalmente semelhante, tais como: manose, N-acetilglucosamina, manose, xilose, arabiose e glicose. Aparentemente não houve ligações estáveis do TNF a esses carboidratos, o que levaria ao bloqueio da sua ação no biofilme de *Candida albicans*; entretanto, há o bloqueio da ação do TNF, humano e murino, quando este é pré-incubado N,N'-diacetilquitobiose. Isso faz se crer que esse polissacarídeo na parede celular da *Candida albicans* possa atuar como receptor para o TNF. N, N'-diacetilquitobiose, um carboidrato da parede celular da *Candida albicans*, foi previamente mostrado para bloquear atividade tripanosomicidal do TNF (LUCAS et al., 1994; MASUOKA, 2004). Vale resaltar que a pré-incubação com o dímero da celulose, a celobiose, que é um carboidrato com a conformação e estrutura bem semelhantes a N, N'-diacetilquitobiose, não houve efeito bloqueador em nenhum dos TNF testados (humano e murino) (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Esse efeito bloqueador do N, N'-diacetilquitobiose sobre o TNF foi observado tanto pelos ensaios de XTT quanto pela avaliação morfológica por microscopia óptica.

O dissacarídeo N, N'-diacetilquitobiose [N-acetil- β -D-glucosaminil-(1 \rightarrow 4)-N-acetil- β -D-glucosamina] é o dímero considerado a unidade básica da quitina, formado por duas moléculas de N-acetil- β -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose; GlcNAc) (MASUOKA, 2004). A quitina é constituinte estrutural da parede celular de muitos fungos e de algumas algas, do exoesqueleto de insetos, da carapaça de crustáceos, das conchas de moluscos e dos ovos de nematóides (LEHANE et al., 1997; HEGEDUS et al., 2009). Na natureza, este polissacarídeo é o mais abundante depois da celulose, o que conduz a se acreditar que o TNF possa ter sua ação em outras espécies além da *Candida albicans*, como já observado em *Trypanosoma brucei* (LUCAS et al., 1994; LEE et al., 2007; YANG et al., 2008).

As espécies de tripanossomas, que também não têm receptores clássicos de TNF, são susceptíveis à lise após exposição ao TNF. Um domínio semelhante à lectina da citocina está associado à atividade do TNF, que pode ser bloqueada por pré-incubação de TNF com N, N'-diacetilquitobiose. A sequência de aminoácidos que englobam os sítios de ligação são Thr104 a Glu109 do TNF murino (mTNF) ou Thr105 a Glu110 do TNF humano (hTNF)(LUCAS et al., 1994). Além disso, um peptídeo

sintético contendo esta sequência de aminoácidos do TNF, que imita o domínio de lectina, é capaz de reproduzir o efeito tripanolítico do TNF e impediu o dano tecidual em um modelo inflamatório pulmonar *in vivo* (CZIKORA et al., 2014).

Inicialmente, outros possíveis mecanismos foram avaliados, incluindo avaliar se o TNF modularia as moléculas *quorum-sensing*, uma vez que os efeitos do TNF são semelhantes ao do farnesol, que é uma molécula conhecida de *quorum-sensing* do biofilme de *Candida albicans*. De modo similar o observado neste estudo, a densidade e morfologia do biofilme de *Candida albicans* são alteradas drasticamente por altas concentrações de farnesol. À medida que a concentração de farnesol diminui, a morfologia dos biofilmes muda de uma forma dose-dependente para uma morfologia de hifa verdadeira (RAMAGE et al., 2002); entretanto, os testes deste estudo não foram conclusivos sobre a interferência direta do TNF sobre o farnesol, sendo, provavelmente, mecanismos similares presente vias distintas, sendo necessários novos trabalhos com enfoque molecular.

A IL-1 é uma citocina participante da defesa inata e durante a infecção por *Candida albicans* é liberada pelo macrófago estimulado por TNF (CHENG et al., 2012). O tecido infectado com células fúngicas passa a produzir mediadores inflamatórios, citocinas e moléculas de defesa antifúngicas e, juntamente com leucócitos, incluindo neutrófilos e linfócitos, contribui para limitar o crescimento fúngico. Curiosamente, o TNF e a IL-1 apontaram um efeito inibitório na formação do biofilme de *Candida albicans* de forma dose-dependente que pode estar relacionado a todas as citocinas envolvidas na primeira linha de defesa contra esta levedura (CHENG et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que a IL-1 é que coordena a resposta inata contra *Candida albicans* na mucosa oral, promovendo o recrutamento dos neutrófilos e estimulando a liberação de IL-17 (ALTMIEIER et al., 2016). Os dados deste trabalho, no entanto, mostram que essa citocina exprimem um efeito direto sobre o crescimento de *Candida albicans*, independentemente do recrutamento de células de defesa. Então, o seu papel inibitório não necessita de neutrófilos como postulado por Altmeier et al. (2016).

O efeito do soro humano sobre o desenvolvimento da *Candida albicans* já foi muito estudado, sendo verificados dados contrários aos observados nos nestes testes utilizando TNF e IL-1, que são componentes do soro humano. Por exemplo, Samaranayake et al. (2013) verificaram que soro humano estimulou a formação do biofilme e a expressão de genes de virulência da *Candida albicans*. De modo semelhante, o soro humano foi considerado o mais eficiente para induzir a transição de levedura para hifa verdadeira e na co-agregação (STANISZEWSKA et al., 2016). Os dados obtidos podem estar relacionados ao efeito de outro componentes do soro que possam atuar semelhante a IL-17, tendo-se aqui comprovado seus efeitos estimulatórios na formação do biofilme.

O papel da IL-17 é considerado crítico na defesa contra a candidíase mucocutânea (NAGLIK et al., 2011; LANTERNIER et al., 2013), exercendo proteção do hospedeiro ao promover a resposta dos neutrófilos. De fato, a sinalização de IL-17 pode aumentar a expressão de fatores citotóxicos e quimiotáticos de neutrófilos em resposta a *Candida albicans* (CONTI, SHEN, NAYYAR, 2009); no entanto, há dados contraditórios na literatura. A deficiência de IL-17 foi associada com aumento do crescimento da *Candida albicans* em modelos animais, apontando para um papel protetor de IL-17 em seres humanos contra as espécies de fungos (CONTI, GAFFEN, 2015; CONTI, SHEN, NAYYAR, 2009). Assim, há um aumento da incidência de infecções por *Candida albicans* em doentes com espondilite anquilosante tratados com anticorpo anti-IL-17, secukinumab, em comparação com aqueles que receberam placebo (BAETEN et al., 2016). Demonstrou-se recentemente, contudo, que IL-17 estimula o crescimento *in vitro* de planctônicos e biofilmes de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, promovendo assim a sobrevivência da levedura. Ao contrário do observado em outros estudos, essa atividade da IL-17 foi mediada por *downregulation* da via de sinalização de rapamicina, sem ligação a carboidratos fúngicos (ZELANTE et al., 2012).

Os achados, mostrando um mecanismo ainda não conhecido de interferência de TNF com o crescimento de biofilme de *Candida albicans*, são relevantes, tanto para a descrição de um mecanismo fisiológico do TNF independente de receptor na defesa do hospedeiro contra *Candida albicans*, quanto oferece uma estratégia em potencial para prevenir o crescimento *in vivo* do biofilme de *Candida albicans*. A atividade de TNF é comumente ligada a acoplamento de receptores de membrana específicos, desencadeando a ativação de vias celulares, induzindo, assim, a transcrição de genes associados com a resposta inflamatória (KALLIOLIAS, IVASHKIV, 2016). O fato de que a forma planctônica não foi afetada pelo TNF sugeriu que um mecanismo de interferência com a matriz de biofilme extracelular poderia estar acontecendo, associado ao bloqueio da filamentação. Este mecanismo do TNF é particularmente relevante para compreender as barreiras do hospedeiro contra infecções potencialmente fatais, causadas por agentes oportunistas. Além da redução da atividade metabólica de biofilmes em crescimento de *Candida albicans* tratados com TNF, houve uma redução acentuada na formação das hifas (filamentação), interferindo, assim, na divisão celular. As concentrações de TNF utilizadas neste estudo assemelham-se às de outros TNF *in vitro* em células de mamífero, indicando que a relevância clínica é provável (KALLIOLIAS, IVASHKIV, 2016).

O revestimento de materiais de implante com componentes bioativos é usado como uma estratégia profilática para prevenir infecções, em especial, as causadas por biofilme, uma vez que esse tipo de infecção por muitas vezes exige a troca do implante em virtude do insucesso terapêutico no seu controle (LEBEAUX et al., 2014). O desenvolvimento de compostos sintéticos que reproduzem a

atividade do TNF e seu domínio de ligação a lectina pode ser utilizado como material de revestimento para evitar o crescimento de biofilme. Isso poderia representar melhoria na prevenção de comorbidades infecciosas associadas com dispositivos de implante (BESCHIN et al., 2004; CZIKORA et al., 2014).

9 CONCLUSÕES

- O TNF altera o crescimento do biofilme de *Candida albicans* por meio de um mecanismo independente do receptor clássico de TNF, provavelmente, por acoplamento a um carboidrato específico na parede celular desse fungo, N,N'-diacetilquitobiose.
- O TNF inibe a formação do biofilme de *Candida albicans*, modulando a transição de blastoconídios para hifas, adesão e formação de matriz extracelular.
- A ação do TNF é ineficiente na erradicação de biofilmes maduros das cepas testadas de *Candida albicans*.
- O domínio semelhante à lectina do TNF é um excelente candidato a um novo fármaco na prevenção de formação de biofilme de *Candida albicans*, principalmente em dispositivos médicos implantáveis, pelo fato de não possuir citotoxicidade para células humanas.
- O mecanismo de ação do TNF é independente de receptores. Assim, esta citocina produzida por células mamíferas, seja de origem murina ou humana, atua diretamente na célula fúngica, por meio do acoplamento de um domínio de lectina ao dissacarídeo N,N'-diacetilquitobiose da parede da *Candida albicans*.
- Outras citocinas como a IL-1 e Il-17 atua de forma direta, ou seja, na ausência de receptores clássicos e células mamíferas, sobre o desenvolvimento *in vitro* do biofilme de *Candida albicans*

10 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais estão claramente indicados para elucidar os mecanismos envolvidos na inibição da formação de biofilmes pelo TNF, para determinar toda a cascata ativada desde a ligação do TNF à parede celular da *Candida albicans*, levando à supressão da transição morfológica. Além disso, os próximos estudos devem determinar quais genes são modulados pelo TNF e a sua possível aplicação na indústria farmacêutica na prevenção da formação de biofilme de *Candida albicans* e determinar se TNF poderia ser usado como antifúngico. Nesse sentido, estudos moleculares e bioquímicos detalhados são necessários para esclarecer as vias de sinalização do TNF no biofilme de *Candida albicans*.

11 REFERÊNCIAS

- AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS L.J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1884–1887, 2008.
- AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS, L.J. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p.149–157, 2010.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p.999–1008, 2006.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.
- ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A.M.; NIEVES, E.; PAES,H.C.; WILLIAMSON, P.R.; SILVA-PEREIRA, I. CASADEVALLA, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 5, n. 1, p. e00986-13, 2013.
- ALEM, M. A.; OTEEF, M. D.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770-1779, 2006.
- ALFONSO, C. A.; LÓPEZ, M. B.; ARECHAVALA, A. C.; PERRONE, M. C. D.; GUELFAND, L. E.; BIANCHI, M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 90-93, 2010
- ALTMEIER, S.; TOSKA, A.; SPARBER, F.; TEIJEIRA, A.; HALIN, C.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. IL-1 coordinates the neutrophil response to *Candida albicans* in the oral mucosa. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p.e1005882, 2016.
- AMARAL, L. F. B.; CAMILO, N.S; PEREDA, M.C.V; LEVY, C.E; MORIEL, P.; MAZZOLA, P.G. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 5, p. 391-397, 2010.
- AYBAY, C.; IMIR, T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida* species. **Immunobiology**, v.196, n.4, p.363–374., 1996.
- AZEVEDO, N. S.; CERCA, N. **Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria**. 1. ed. Porto: Publindustria, 2012.
- BAETEN, D.; SIEPER, J.; BRAUN, J.; BARALIAKOS, X.; DOUGADOS, M.; EMERY, P.; DEODHAR, A.; PORTER, B.; MARTIN, R.; ANDERSSON, M.; MPOFU, S.; RICHARDS, H.B. MEASURE 1 and MEASURE 2 study groups. Secukinumab, an Interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis. **The New England Journal of Medicine**., v. 373, n. 26, p. 2534-2548, 2016.

BASMA, A.A.; ZURAINI, Z.; SASIDHARAN, S. A transmission electron microscopy study of the diversity of *Candida albicans* cells induced by *Euphorbia hirta* L. leaf extract *in vitro*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 20-22, 2011.

BERGMANN, M.; ZERVAS, L.; SILBERKWEIT, E. Über chitin und chitobiose. **European Journal Inorganic Chemistry**, v. 64, n. 9, p. 2436–2440, 1931.

BESCHIN, A.; BILEJ, M.; MAGEZ, S.; LUCAS, R.; DE BAETSELIER, P. Functional convergence of invertebrate and vertebrate cytokine-like molecules based on a similar lectin-like activity. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 34, n. 1, p.145-63, 2004.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug discovery**, v.12, n.10, p. 791-808, 2013.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398- 403, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-54, 1976.

BRAGADEESWARAN, S.; BALASUBRAMANIAN, S.T.; RAFFI, S.M.; RANI, SOPHIA S. Scanning electron microscopy elemental studies of primary film. **World Applied Sciences Journal**, v. 10, n. 2, p.169-172, 2010.

BRIGHENTI, F. L.; MEDEIROS, A.C.; MATOS, B.M.; RIBEIRO, Z.E.; KOGA-ITO, C.Y. Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 6, p. 484-489, 2014.

BUJDÁKOVÁ, H.; DIDIÁŠOVÁHANA, M.; ČERNÁKOVÁ, D. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. **Central European Journal of Biology**, v.8, n.3, p. 259-262, 2013.

CANNON, R.D.; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.10, n.3, p.359-383, 1999.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v.183, n.18, p. 5385- 5394, 2001.

CHATZIMOSCHOU, A.; KATRAGKOU, S.; SIMITSOPOULOU, M.; ANTACHOPOULOS, C.; GEORGIADOU, E.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Activities of Triazole-Echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1968–1974, 2011.

CHEN, H.; FINK, G.R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, n. 9, p. 1150–1161, 2006.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G.R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5048–5052, 2004.

CHEN, Z.; ZHAN, L.; LU, Z.; MA, Y.; GAO, Z.; GUO, H.; PANG, L.; JIN, Q. Etanercept inhibits pro-inflammatory cytokines expression in titanium particle-stimulated peritoneal macrophages. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 984, 2015.

CHENG, S.C.; Complement plays a central role in *Candida albicans* induced cytokine production by human PBMCs. **European journal of immunology**, v. 42, n. 4, p. 993-1004, 2012.

CHIA, T.W.; FEGAN, N.; MCMEEKIN, T.A.; DYKES G.A. *Salmonella Sofia* differs from other poultry-associated *Salmonella* serovars with respect to cell surface hydrophobicity. **Journal of Food Protection**, v.71, n.12, p. 2421-2428, 2008.

CHIANG, W. C.; NILSSON, M.; JENSEN, P.; HOIBY, N.; NIELSEN, T.E.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2352-2361, 2013.

CLARK, W.A.; GEARY, D. H. The story of the American Type Culture Collection – its history and development (1899-1973). **Advances in Applied Microbiology**, v.17, n.1, p. 295-309, 1974.

Clinical Laboratory National Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standart M27-A3. National Comitte for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2008.

COMPRI-NARDY, M.; STELLA, M.B.; OLIVEIRA, C. **Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n. 1-2, p. 237-245, 2006.

CONTI, H.R.; GAFFEN, S.L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of Immunology**, v.195, n. 3, p.780-788, 2015.

CONTI, H.R.; SHEN, F.; NAYYAR, N. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 299-311, 2009.

CORDEIRO, R. D. A. ; Teixeira, C. E. C. ; BRILHANTE, R. S. N. ; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P. ; DE OLIVEIRA, J. S. ; MONTEIRO, A. J. ; BANDEIRA, T. J. P. G. ; SIDRIM, J. J. C. ; MOREIRA, J. L. B. ; ROCHA, M. F. G. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. fov012, 2015.

CORTEZ, E.V.; PESSOA-JR, A.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Characterization of xylose reductase extracted by CTAB-reversed micelles from *Candida guilliermondii* homogenate. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 251-257, 2006 .

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, R.; LAPPIN- SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n.1, p. 711-745, 1995.

CZIKORA, I.; ALLI, A.; BAO, H.F.; KAFTAN, D.; SRIDHAR, S.; APELL, H.J.; GORSHKOV B.; WHITE, R.; ZIMMERMANN, A.; WENDEL, A. ; PAULY-EVERS, M.; HAMACHER, J.; GARCIA-GABAY, I.; FISCHER, B.; VERIN, A.; BAGI, Z.; PITTET, J.F.; SHABBIR, W.; LEMMENS-GRUBER, R.; CHAKRABORTY, T.; LAZRAK, A.; MATTHAY, M.A.; EATON, D.C.; LUCAS, R. A novel tumor necrosis factor-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.190, n. 5, p. 522-532, 2014.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 1, p.1337–1347 , 2005.

DEVEAU, A.; HOGAN, D. A. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. **Methods in Molecular Biology**, v.692, p. 219-33, 2011.

DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; FIDEL, P.L. JR. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 11, p. 966-977, 2005.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DOUTERELO, I.; BOXALL, J.B.; DEINES, P.; SEKAR, R.; FISH, K.E.; BIGGS, C.A. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. **Water Research**, v. 65, n.1, p. 134-156, 2014.

EL ABED, S.; IBNSOUDA, S. K.; LATRACHE, H.; HAMADI, F. Scanning Electron Microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. In: KAZMIRUK, V. **Scanning Electron Microscopy**. 1. ed. Rejika: In Tech, 2012.

FAN, T. C.; FANG, S. L.; HWANG, C. S.; HSU, C. Y.; LU, X. A.; HUNG, S. C.; LIN, S. C.; CHANG, M. D. Characterization of molecular interactions between eosinophil cationic protein and heparin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n.1, p. 25468–25474, 2008.

FELDMAN, M.; AL-QUNTAR, A.; POLACHECK, I.; FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. Therapeutic potential of thiazolidinedione-8 as an antibiofilm agent against *Candida albicans*. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. e93225, 2014.

FILLER, S.G.; YEAMAN, M.R.; SHEPPARD, D.C. Tumor Necrosis Factor inhibition and invasive fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 3, p. 208-212, 2005.

FLEMING, D.; RUMBAUGH, K.P. Approaches to dispersing medical biofilms. **Microorganisms**, v.5, n.2, p. pii: E15, 2017.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews- Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FOX, E.P.; COWLEY, E.S.; NOBILE, C.J.; HARTOONI, N.; NEWMAN, D.K.; JOHNSON, A.D. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. **Current Biology**, v. 24, n. 20, p. 2411-2416, 2014.

FRANKLIN, M.J.; CHANG, C.; AKIYAMA, T.; BOTHNER, B. New technologies for studying biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, p. MB-0016-2014, 2015.

FRIDAY, S.C.; FOX, D.A. Phospholipase D enzymes facilitate IL-17- and TNF α -induced expression of proinflammatory genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASf). **Immunology Letters**, v.174, n. 1, p. 9–18, 2016.

GHEZZI, M.C.; RAPONI, G.; ANGELETTI, S.; MANCINI, C. Serum-mediated enhancement of TNF-alpha release by human monocytes stimulated with the yeast form of *Candida albicans*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n.6, p.1743-1749, 1998.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n.5, p. 310-321, 2016.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in Microbiology**, v. 19, n.11, p.557-563, 2011.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533–543, 2012.

HAZEN, B.W.; HAZEN, K.C. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 9, p. 2521-5, 1988.

HAZEN, K. C.; HAZEN, B. W. Hydrophobic surface protein masking by the oppotunistic fungal pathogen *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2499-1508, 1992.

HAZEN, K.C.; MANDELL, G.; COLEMAN, E.; WU, G. Influence of fluconazole at inhibitory concentrations on cell surface hydrofobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 89-94, 2000.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

HESSION, C.; DECKER, J.M.; SHERBLOM, A.P.; KUMAR, S.; YUE, C.C.; MATTALIANO, R.J.; TIZARD, R.; KAWASHIMA, E.; SCHMEISSNER, U.; HELETKY, S. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. **Science**, v. 237, p.1479–1484, 1987.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 1, p. 322–332, 2010.

HORNBY, J.M.; JENSEN, E.C.; LISEC, A.D.; TASTO, J.J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K.W. Quorum Sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p.2982-2992, 2001.

HU, S.; LIANG, S.; GUO, H.; ZHANG, D.; LI, H.; WANG, X.; YANG, W.; QIAN, W.; HOU, S.; WANG, H.; GUO, Y.; LOU, Z. Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α -associated diseases from a molecular view. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27059-27067, 2013.

IM, S. Y.; CHOI, J. H.; KO, H. M. A protective role of platelet-activating factor murine candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1321-1326, 1997.

ISHIDA, K.; RODRIGUES, J.; RIBEIRO, M.; VILA, T. V. M. ; DE SOUZA, W. ; URBINA, J. A. ; NAKAMURA, C. ; ROZENTAL, S. Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by Delta 24 (25)-sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. **BMC Microbiology**, v. 9, n.1, p. 74, 2009.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations, 1985.

JOVANOVIC, D.V.; DI BATTISTA, J.A.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOLICOEUR, F.C.; HE, Y.; ZHANG, M.; MINEAU, F.; PELLETIER, J.P. IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by Human Macrophages. **Journal of Immunology**, v.160, n.7, p. 3513-3521, 1998.

JUNDISHAPUR, J. Biofilm formation and susceptibility to amphotericin b and fluconazole in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 7, n.7, p. e17105, 2014.

KALLIOLIAS, G.D.; IVASHKIV, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews- Rheumatology**, v.12, n.1, p. 49-62, 2016.

KLOTZ, S.A.; DRUTZ, D.J.; ZAJIC, J.E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. **Infection Immunology**, v. 50, n. 1, p. 97-101, 1985.

KOLLIAS G, DOUNI, E.; KASSIOTIS, G.; KONTOYIANNIS, D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. **Immunology Reviews**, v.169, p.175–194, 1999.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAFLEUR, M.D.; KUMAMOTO, C.A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p. 3839–3846, 2006.

LANTERNIER, F.; CYPOWYJ, S.; PICARD, C.; BUSTAMANTE, J.; LORTHOLARY, O.; CASANOVA, J.; PUEL, A. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. **Current**

Opinion in Pediatrics, v. 25, n.1, p. 736–747, 2013.

LARA, H.H.; ROMERO-URBINA, D.G.; PIERCE, C.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; ARELLANO-JIMÉNEZ, M.J.; JOSE-YACAMAN, M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. **Journal of Nanobiotechnology**, v.13, n.1, p.91, 2015.

LEBEAUX, D.; FERNÁNDEZ-HIDALGO, N.; CHAUHAN, A.; LEE, S.; GHIGO, J.M.; ALMIRANTE, B.; BELOIN, C. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. **The Lancet-Infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 146-159, 2014.

LEE, Y.S.; PARK, I.H.; YOO, J.S.; CHUNG, S.Y.; LEE, Y.C.; CHO, Y.S.; AHN, A.C.; KIM, C.M.; CHOI, Y-L. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2734-2741, 2007.

LEHANE, M.J.; WU, D.; LEHANE, S.M. Midgut specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. **PNAS**, v. 94, p. 11502–11507, 1997.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.211, n.1, p. 121–133, 2012.

LIM, C. S.; ROSLI, R.; SEOW, H.F.; CHONG, P.P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21- 31, 2012.

LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTÍNEZ, J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n.3, p.187-196, 2004.

LOUIE, A.; BALCH, A.L.; SMITH, R.P.; FRANKE, M.A.; RITZ, W.J.; SINGH, J.K.; GORDON, M.A. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n.7, p. 2761-72, 1994.

LOYOLA, W.; CUSTODIO, L.A.; FELIPE, I.; CONCHON-COSTA, I.; CARVALHO, P.G.; QUIRINO, G.F.; SILVA, L.F.; GAZIRI, L.C. Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. **International Immunopharmacology**, v.12, n.2, p. 378-383, 2012.

LUCAS, R.; MAGEZ, S.; DE LEYS, R.; FRANSEN, L.; SCHEERLINCK, J.P.; RAMPENBERG, M.; SABLON, E.; DE BAETSELIER, P. Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 814-817, 1994.

MAHMOUDABADI, A.Z.; ZARRIN, M.; KIASAT, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.10, n.1, p. 95–105, 2014.

MARINO, M.; W, DUNN, A.; GRAIL, D; INGLESE, M.; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, E.; JUNGBLUTH, A.; WADA, H.; MOORE, M.; WILLIAMSON, B.; BASU, S.; OLD, L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n.15, p. 8093-8098, 1997.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**, v.55, n.1, p. 80–85, 2012.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D.P.; CLEARY, I.A.; HENRIQUES, LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v.169, n.5, p. 323–331, 2010.

MASUOKA, J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.2, p. 281-310, 2004.

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

MATHISELVAM, M.; SRIVASTAVA, A.; VARGHESE, B.; PÉREZ, S.; LOGANATHAN, D. Synthesis and X-ray crystallographic investigation of N-(β -D-glycosyl)butanamides derived from GlcNAc and chitobiose as analogs of the conserved chitobiosylasparagine linkage of N-glycoproteins. **Carbohydrate Research**, v. 380, n. 380, p.37-44, 2013.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MINAGI, S.; MIYAKE, Y.; INAGAKI, K.; TSURU, H.; SUGINAKA, H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. **Infect Immun**, v. 47, n. 1, p. 11-14, 1985.

MITCHELL, K.F.; TAFF, H.T.; CUEVAS, M.A.; REINICKE, E.L.; SANCHEZ, H.; ANDES, D.R. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-albicans *Candida* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.4, p. 1918–1920, 2013.

MORICONI, F.; MALIK, I.A.; AMANZADA, A.; BLASCHKE, M.; RADDATZ, D.; KHAN, S.; RAMADORI, G. The anti-TNF- α antibody infliximab indirectly regulates PECAM-1 gene expression in two models of in vitro blood cell activation. **Laboratory Investigation**, v.92, n.2, p. 166-177, 2012.

MORICONI, F.; MALIK, I.A.; AMANZADA, A.; BLASCHKE, M.; RADDATZ, D.; KHAN, S.; RAMADORI, G. The anti-TNF- α antibody infliximab indirectly regulates PECAM-1 gene expression in two models of in vitro blood cell activation. **Laboratory Investigation**, v.92, n. 2, p. 166-177, 2012.

MOTA, L.M.H.; CRUZI, B.A.; BRENOLI, C.V.; PEREIRAI, I.A.; REZENDE-FRONZAI, L.S.; BERTOLOI, M.B.; FREITAS, M.V.C.; SILVA, N.A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; R GIORGI, R.D.N.; LIMA, R.A.C.; BERNARDO, W.M.; PINHEIRO, G.R.C. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 53, n. 2, p. 158-183, 2013.

MOYES, D.L.; MURCIANO, C.; RUNGLALL, M.; ISLAM, A.; THAVARAJ, S.; NAGLIK, J.R. *Candida albicans* yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. **PloS One**, v.6, n.11, p. e26580, 2011.

MOYES, D.L.; MURCIANO, C.; RUNGLALL, M.; KOHLI, A.; ISLAM, A.; NAGLIK, J.R. Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. **Medical Microbiology and Immunology**, v.201, n.1, p.93-101, 2012.

MOYES, D.L.; RICHARDSON, J.P.; NAGLIK, J.R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. **Virulence**, v.6, n. 4, p. 338–346, 2015.

MOYES, D.L.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; SHEN, C.; NAYAR, D.; THAVARAJ, S.; KOHLI, A.; ISLAM, A.; MORA-MONTES, H.; CHALLACOMBE, S.J, NAGLIK, J.R. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n.3, p. 225-235, 2010.

MURCIANO, C.; MOYES, D.L.; RUNGLALL, M.; TOBOUTI, P.; ISLAM, A.; HOYER, L.L, NAGLIK, J.R. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS One**, v. 7, n.3, p. e33362, 2012.

NADEEM, S.; SHAFIQ, A.; HAKIM, S.; ANJUM, Y.; KAZM, S.U. Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 185-192, 2013.

NADESALINGAM, J.; DODDS, A.W.; REID, K.B.; PALANIYAR, N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. **Journal Immunology**, v. 175, n. 3, p.1785-1794, 2005.

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.L.; WACHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v.13, n.1, p. 963–976, 2011.

NETT, J.; LINCOLN, L.; MARCHILLO, K.; MASSEY, R.; HOLOYDA, K; HOFF, B.; VANHANDEL, M.; ANDES, D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual Review of Microbiology**, v.69, n. 1, p. 71-92, 2015.

OHTA, H.; TANIMOTO, T.; TANIAI, M.; TANIGUCHI, M.; ARIYASU, T.; ARAI, S.; OHTA, T.; FUKUDA, S. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by tumor necrosis factor-alpha and potential for treatment of oral candidiasis. **In Vivo**, v. 21, n.1, p. 25-32, 2007.

OLIVARES FONTT, E.; BESCHIN, A.; VAN DIJCK, E.; VERCRUYSSSE, V.; BILEJ, M.; LUCAS, R.; DE BAETSELIER, P.; VRAY, B. Trypanosoma cruzi is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of *Eisenia foetida foetida*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n.1, p.27-34, 2002.

OLSON, E.J.; STANDING, J.E.; GRIEGO-HARPER, N.; HOFFMAN, O.A.; LIMPER, A.H. Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3548-3554, 1996.

OLSZEWSKI, M.B.; GROOT, A.J.; DASTYCH, J.; KNOL, E.F. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 9, p. 5701-5709,

2007.

OROZCO, A. S.; ZHOU, X.; FILLER, S. G. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1134-1141, 2000.

PAULONE, S.; MALAVASI, G.; ARDIZZONI, A.; ORSI, CF.; PEPPOLONI, S.; NEGLIA, R.G.; BLASI, E. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. **New Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 45-52, 2017.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 1, p. 157–165, 2008.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Vigilância global de In Vitro Atividade de Micafungina contra *Candida*: uma comparação com caspofungina pelos métodos CLSI-recomendados. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3533-3538, 2006.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; RAMASUBRAMANIAN, A.K.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. From biology to drug development: new approaches to combat the threat of fungal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1, 2015.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY, F.L. JR.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PIERCE, C.G.; VILA, T.; ROMO, J.A.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; WALL, G.; RAMASUBRAMANIAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

PUNITHAVATHY, P.M.; NALINA, K.; MENON, T. Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 72–74, 2012.

RAJENDRAN, R.; MAY, A.; SHERRY, L.; MAY, A.; SHERRY, L.; KEAN, R.; WILLIAMS, C.; JONES, B.L.; BURGESS, K.V.; HERINGA, J.; ABELN, S.; BRANDT, B.W.; MUNRO, C.A.; RAMAGE, G. Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35436-35447, 2016.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459, 2002.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.18, n.1, p. 163-170, 2001.

RAMAGE, G.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). **Mycopathologia**, v. 164, n. 6, p.301-306, 2007.

RAPONI, G.; GHEZZI, M.C.; MANCINI, C. The release of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) by interferon gamma (IFN-gamma) induced THP-1 cells stimulated with smooth lipopolysaccharide is inhibited by MAbs against HLA-DR and CD14 receptors on the effector cell. **New Microbiology**, v. 20, n.1, p. 1-6, 1997.

ROEHM, N.W.; RODGERS, G.H.; HATFIELD, S.M.; GLASEBROOK, A.L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunology Methods**, v. 142, n. 1, p. 257-265, 1991.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v.272, n. 6, p.541–561, 2012.

ROSENBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions: Role in bacterial adhesion. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, n. 1, p. 353-393, 1986.

SAINI, H.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Azithromycin and ciprofloxacin: a possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n.4, p. 1–9, 2014.

SAMARANAYAKE, Y.H.; CHEUNG, B.P.; YAU, J.Y.; YEUNG, S.K.; SAMARANAYAKE, L.P. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. **PLoS One**, v. 8, n.1, p. e62902, 2013.

SCHALLER, M.; MAILHAMMER, R.; GRASSL, G.; SANDER, C.A.; HUBE, B.; KORTING, H.C. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. **Journal of Investigative Dermatology**, v.118, n.4, p.652-657, 2002.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 36-42, 2008.

SHARECK, J.; BELHUMEUR, P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. **Eukaryotic Cell**, v.10, n. 8, p. 1004–1012, 2011.

SHERBLOM, A. P.; DECKER, J. M.; MUCHMORE, A. V.. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 5418–5424, 1988.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J.J.; TEIXEIRA, C.E.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.; BANDEIRA, S.P.; ALENCAR, L.P.; OLIVEIRA, J.S.; MONTEIRO, A.J.; MOREIRA, J.L.; BANDEIRA, T.J. β -Lactam antibiotics and vancomycin inhibit the growth of planktonic and biofilm *Candida spp.*: an additional benefit of antibiotic-lock therapy? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 420-423, 2015.

SIDRIM, J.J.C.; MAIA, D.C.B.S.C.; BRILHANTE, R.S.N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G.. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *In vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 324-328, 2010.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilm of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, n.7, p.681-689, 2009.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M.E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n.8, p.1, 2017.

SOLL, D.R.; DANIEL, S.K. J. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 565-595, 2016.

SONG, M. Y.; PARK, S.K.; KIM, C.S.; YOO, T.H.; KIM, B.; KIM, M.S.; KIM, Y.S.; KWAG, W.J.; LEE, B.K.; BAEK, K. Characterization of a novel anti-human TNF- α murine monoclonal antibody with high binding affinity and neutralizing activity. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 40, n. 1, p. 35-42, 2008.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; SWOBODA-KOPEC, E.; SIENNICKA, K.; SYGITOWICZ, G.; KURZATKOWSKI, W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 813–821, 2013.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; WIECZOREK, M.; ESTRADA-MATA, E.; MORA-MONTES, H. M.; OCHAL, Z. Antifungal Effect of novel 2-Bromo-2-Chloro-2-(4-Chlorophenylsulfonyl)-1-Phenylethanone against *Candida* Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1309, 2016.

STEELE, C.; FIDEL, P.L. JR. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v.70, n.2, p. 577-583, 2002.

STOKES, D.J.; DONALD, A.M. In situ mechanical testing of dry and hydrated breadcrumb in the environmental scanning electron microscope (ESEM). **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 3, p.599–607, 2000.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n.1, p.737-748, 2011.

SUGITA, S.; KAWAZOE, Y.; IMAI, A.; KAWAGUCHI, T.; HORIE, S.; KEINO, H.; TAKAHASHI, M.; MOCHIZUKI, M. Role of IL-22- and TNF- α -Producing Th22 Cells in Uveitis Patients with Behçet's Disease. **Journal of immunology**, v.190, n.11, p. 5799-5808, 2013.

TORRENT, M.; DE LA TORRE, B. G.; NOGUES, V. M.; ANDREU, D.; BOIX, E. Bactericidal and membrane disruption activities of the eosinophil cationic protein are largely retained in an N-terminal fragment. **The Biochemical Journal**, v. 421, n. 1, p. 425–434, 2009.

TORRENT, M.; NOGUES, M. V.; BOIX, E. Eosinophil cationic protein (ECP) can bind heparin and other glycosaminoglycans through its RNase active site. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n.1, p. 90–100, 2011.

TRAN, P. L.; HAMMOND, A. A.; MOSLEY, T.; CORTEZ, J.; GRAY, T.; COLMER- HAMOOD, J. A.; SHASHTRI, M.; SPALLHOLZ, J. E.; HAMOOD, A. N.; REID, T. W. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.1, p. 3586–3592, 2009.

TSAI, P. W.; YANG, C. Y.; CHANG, H. T.; LAN, C. Y. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e17755, 2011.

TSUI, C.K.; DANIEL, H.M.; ROBERT, V.; MEYER, W. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. **FEMS Yeast Research**, v.8, n. 4, p. 651–659, 2008.

WALDMAN, R.H.; CRUZ, J.M.; ROWE, D.S. Intravaginal immunization of humans with *Candida albicans*. **Journal of Immunology**, v.109, n.4, p.662-664, 1972

WANG, M.; WANG, F.; YANG, J.; ZHAO, D.; WANG, H.; SHAO, F.; WANG, W.; SUN, R.; LING, M.; ZHAI, J.; SONG, S. Mannan-binding lectin inhibits *Candida albicans*-induced cellular responses in PMA-activated THP-1 cells through Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4. **PLoS One**, v. 8, n.12, e83517, 2013.

WANG, S.; WANG, Q.; YANG, E.; YAN, L.; LI, T.; ZHUANG, H1. Antimicrobial compounds produced by vaginal lactobacillus crispatus are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions. **Frontier Microbiology**, v.8, n.1, p. 564, 2017.

WILLIAMS, D.W.; JORDAN, R.P.C.; WEI, X.Q., ALVES, C.T.; WISE, M.P.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A. Interactions of *Candida albicans* with host cellulose. **Journal Oral Microbiology**, v. 5, n.1, p.1, 2013.

WU, C. M.; CHANG, H. T.; CHANG, M. D. Membrane-bound carboxypeptidase E facilitates the entry of eosinophil cationic protein into neuroendocrine cells. **The Biochemical Journal**, v. 382, n. 1, p. 841–848, 2004.

XIE, Z.; THOMPSON, A.; KASHLEVA, H.; DONGANI-BAGTZOGLU, A. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *Candida albicans* biofilms. **BMC Microbiol**, v.11, n.1, p. 93, 2011

YANG, C.Y.; HO, Y.C.; PANG, J.C.; HUANG, S.S.; TSCHEN, J. S.M. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, 1454-1458, 2008.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95-105, 2014.

YOU, C.; CHEN, H.; MYUNG, S.; SATHITSUKSANO, N.; MA, H.; ZHANG, X.Z.; LI, J.; ZHANG, Y.H. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, n. 18, p.7182-7187, 2013.

YU, L. H.; WEI, X.; MA, M.; CHEN, X.J.; XU, S.B. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 770-775, 2012.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W.M.; LACMBOUH, G.A.; MARITA, J.M.; BOTHE, J.R.; BERNHARDT, J.; SAHRAOUI, L-HA.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIELD, R.D.; NTAMBI, J.M.; NETT, J.E.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**. v.5, n.4, p. E01333-14, 2014.

ZECHMEISTER, L.; GRASSMANN, W.; TÖTH, G.; BENDCR, R. Zur Kenntnis der Hydrolyse von Chitin mit Salzsäure (II. Mitteil.). **European Journal Inorganic Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 1706-1708, 1932.

ZELANTE, T.; IANNITTI, R.G.; DE LUCA, A.; ARROYO, J.; BLANCO, N.; SERVILLO, G.; SANGIARD, D.; REICHARD, U.; PALMER, G.E.; LATGÈ, J.P.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Sensing of mammalian IL-17^A regulates fungal adaptation and virulence. **Nature Communication**, v.3, n.1, p.683-692, 2012.

ZHANG, L.; LUO, S.; ZHANG, B. The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. **Monoclonal Antibodies**, v.8, n.3, p.524-535, 2016.

ZHANG, Y. H., HIMMEL, M.E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.1, p. 452-481, 2006.

ZHAO, X.; OH, S.H.; CHENG, G.; GREEN, C.B.; NUESSEN, J.A.; YEATER, K.; LENG, R.P, BROWN, A.J.; HOYER, L.L. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v.150, n.7, p.2415-2428, 2004.

ANEXO A – PULICAÇÃO ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO**Tumor necrosis factor prevents *Candida albicans* biofilm formation**

Francisco Airton Castro Rocha^{a*}, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves^b, Marcos Fábio Gadelha Rocha^b, Rossana de Aguiar Cordeiro^b, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^b, Ana Carolina Matias Dinelly Pinto^a, Rodolfo de Melo Nunes^a, Virgínia Cláudia Carneiro Girão^c, José Julio Costa Sidrim^b.

^aDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

^bSpecialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^cDepartment of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

* Corresponding author (Lead contact):

Francisco Airton Castro Rocha

Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, 1º. Andar, 60430-270, Fortaleza, CE, Brasil.

Phone: +55 85 3366 8243; FAX: +55 85 3244 6215.

E-mail address: arocha@ufc.br (F.A.C. Rocha)

Summary

Candida species develop biofilms in prosthetic materials and host surfaces, particularly in immunosuppressed patients, causing life-threatening infections. Tumor necrosis factor (TNF) exhibits a plethora of functions in host defense mechanisms and an inflammatory milieu is expected to decrease the growth of microorganisms. In protozoa, TNF may affect growth via its lectin domains that are spatially distinct from TNF receptors. To our knowledge, a direct TNF effect on yeasts, which lack TNF receptors, has never been reported.

Objective. Demonstrate that TNF affects *C. albicans* in vitro growth through a TNF receptor independent mechanism.

Methods. Two strong biofilm producer *C. albicans* strains were grown in the presence or absence of TNF solutions. Susceptibility to TNF was evaluated using the broth microdilution method. Biofilms were grown on 96-well microtitre plates and evaluated using XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay, optical and scanning electron microscopy.

Results. TNF did not alter *C. albicans* planktonic growth. However, TNF dose-dependently inhibited growing but not established biofilm development, virtually halting yeast filamentation. Preincubation with the TNF antibody adalimumab but not with the immunoglobulin G coupled TNF soluble receptor etanercept blocked TNF activity. Preincubation with the carbohydrate N,N'-diacetylchitobiose, a major component of the yeast cell wall, that binds to TNF lectin domain, abrogated TNF effect against *C. albicans* growing biofilm.

Conclusion. This is the first demonstration of a receptor independent TNF activity against *C. albicans* biofilm growth. Blockade of TNF effect by N,N'-diacetylchitobiose suggests that it is mediated via the lectin domain of the cytokine.

Keywords: *Candida*; Biofilm; TNF; Diacetylchitobiose; Fungi; Carbohydrates

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Tumor necrosis factor prevents *Candida albicans* biofilm formation

Francisco Ailton Castro Rocha¹, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves², Marcos Fábio Gadelha Rocha³, Rossana de Aguiar Cordeiro², Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante², Ana Carolina Matias Dinelly Pinto¹, Rodovalho de Melo Nunes¹, Virginia Cláudia Carneiro Girão³ & José Julio Costa Sidrim²

Received: 22 December 2016

Accepted: 29 March 2017

Published online: 26 April 2017

Candida species are commensals but some develop biofilms in prosthetic materials and host surfaces that may represent up to 30% of deaths related to infections, particularly in immunosuppressed patients. Tumor necrosis factor (TNF) exhibits a plethora of functions in host defense mechanisms whereas excessive release of TNF in inflammation promotes tissue damage. Cytokines released in an inflammatory milieu may influence the development of microorganisms either by promoting their growth or displaying antimicrobial activity. In protozoa, TNF may effect growth by coupling through a lectin-like domain, distinct from TNF receptors. TNF was also shown to interact with bacteria via a mechanism that does not involve classical TNF receptors. Using an in vitro *C. albicans* biofilm model, we show that TNF dose-dependently prevents biofilm development that is blocked by incubating TNF with *N,N'*-diacetylchitosane, a major carbohydrate component of *C. albicans* cell wall. This finding represents a relevant and hitherto unknown mechanism that adds to the understanding of why TNF blockade is associated with opportunistic *C. albicans* infections.

Biofilms are the major state that microorganisms utilize in their struggle to thrive since antimicrobials act against their planktonic, free-floating, state. Development of aggregates formed by the microorganism and an extracellular coat of secreted components and even host parts leads to biofilm formation¹. In biofilm development, features related to the microorganisms and to the extracellular polymeric substances that compose its environment are relevant².

Patients subjected to immunosuppression as well as those exposed to implanted devices and indwelling catheters are particularly affected by life-threatening systemic infections. Organization in biofilms after adherence to these devices offers to microorganisms an alternative to evade host defense. *Candida albicans* account for a major part of those opportunistic infections with a mortality rate that can reach 45% of affected individuals, with obvious health and economic impacts³.

There is extensive knowledge on the role of cytokines in human defense against microbes. Usually, cytokines are synthesized and released by host cells after being triggered by diverse stimuli. Analogous to other cytokines, TNF acts on mammalian cells via coupling to specific membrane or soluble receptors, leading to cell activation. Excessive TNF release during inflammation is associated to pain development, cell infiltration, hypotension, hepatotoxicity, and structural damage to tissues^{4,5}. Thus, targeting TNF has become an alternative to treat autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. Considering that TNF has a major protective role against microorganisms, anti-TNF treatment would render patients prone to develop life-threatening infections⁶.

To the best of our knowledge, TNF was never shown to directly provoke changes in fungal development without the participation of mammalian cells. However, there is evidence that TNF induces trypanosome lysis through a TNF receptor independent mechanism⁷. We investigated whether TNF could alter *C. albicans* in vitro growth. Our data, showing a previously unrecognized TNF interference with *C. albicans* biofilm formation, unravels a protective role of TNF against systemic, life-threatening opportunistic infections. In addition to the importance in the pathogenesis of *Candida* infections, this finding does also offer an alternative to prevent yeast biofilm formation.

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. ²Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. ³Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.A.C.R. (email: erocha@ufc.br)