

LUCAS BARROS MAGALHÃES

RECONHECIMENTO E CLIVAGEM DE PROTEÍNAS DE
MATRIZ EXTRACELULAR por *Candida haemulonii*



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
Junho/2021

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor André Luis Souza dos Santos e co-orientação da doutora Laura Nunes Silva.

FICHA CATALOGRÁFICA

Magalhães, Lucas Barros

RECONHECIMENTO E CLIVAGEM DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR por *Candida haemulonii*/ Lucas Barros Magalhães. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2021.

xi; 64f. : il ; 30cm

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Co-orientadora: Laura Nunes Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2021.

Bibliografia: f.57-64

1. *Candida haemulonii* 2. Adesão 3. Biofilme 4. Proteínas de matriz extracelular. 5. Superfície celular. 6. Proteases I. Dos Santos, André Luis Souza II. Silva, Laura Nunes III. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. IV. Reconhecimento e clivagem de proteínas de matriz extracelular por *Candida haemulonii*.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NORCSDE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Lucas Barros Magalhães
DRE: 117083971

BANCA EXAMINADORA: Prof. Leonardo Nimrichter(Presidente)
Profa. Livia Cristina Liporagi Lopes
Dra. Thais Pereira de Mello
Profa. Dirlei Nico(Suplente)

Título da Monografia: **“Reconhecimento e clivagem de proteínas de matriz
extracelular por *Candida haemulonii*”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/hbp-djqf-iwj>

Data e hora de início: 02 de junho de 2021 às 10:30h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 02 de junho de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
8,0 _____	Prof. Leonardo Nimrichter
9,0 _____	Profa. Livia Cristina Liporagi Lopes
8,5 _____	Dra. Thais Pereira de Mello
_____	Profa. Dirlei Nico

Leonardo Nimrichter

Presidente da banca

Prof. Leonardo Nimrichter

Aluno

Lucas Barros Magalhães

Lucas Barros Magalhães

Orientador:

André Luis Souza dos Santos

Prof. André Luis Souza dos Santos/ Coorientador: Dra. Laura Nunes Silva

Coordenador de
TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Eu, Lucas Barros Magalhães, dedico este trabalho a todas as pessoas, que de alguma forma, acreditaram em mim e em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais por nunca terem poupado esforços para me proporcionar as melhores oportunidades de educação. Por sempre terem me apoiado e nunca duvidado de minhas escolhas, mesmo quando uma delas foi fazer um curso relativamente novo como Microbiologia e Imunologia. Gostaria de agradecer também ao meu irmão, que mesmo sendo completamente o oposto de mim e com uma convivência difícil quando éramos pequenos, se tornou um grande amigo e um porto seguro para todas as situações.

Ao André e Marta, que de forma sensacional, abriram as portas do laboratório, me aceitando e acolhendo. Além de terem me apresentado, guiado e proporcionado uma primeira experiência científica e profissional incrível. Que sorte poder ter sido orientado por dois grandes profissionais que sempre estão dispostos a tirar dúvidas, dar conselhos e a se doarem pelos alunos.

A Laura, minha co-orientadora. Obrigado por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação, tirar minhas dúvidas e sempre estar presente. Por sempre me incentivar e acreditar em mim. Por não só me elogiar e passar mão na cabeça, mas sim, sempre ser sincera, clara e mais ainda, por sempre se preocupar comigo e querer meu melhor. Obrigado por todos os conselhos, críticas e momentos, foi um prazer ser orientado por você.

A Júlia, que antes de ser minha namorada, é uma grande parceira. Obrigado por sempre acreditar em mim e no meu potencial e principalmente por nunca me deixar desistir, mesmo quando tudo o que eu queria era isso. Agradeço por sempre estar presente ao meu lado e sempre me escutar.

A Thaís, Lívia, Simone, Leandro por sempre estarem dispostos a orientar, auxiliar e dar conselhos aos alunos mais novos. Obrigado por toda ajuda durante a realização desse trabalho, principalmente Simone, por doar um pouco do seu tempo e paciência para me ajudar nas montagens dos géis, na revelação dos mesmos e nos experimentos envolvendo citometria de fluxo. Gostaria de agradecer também aos outros companheiros de laboratório, Luciere, Lucas, Heloísa, Rafaela, Iuri, Joyce, Samuel, Nayhara, Claudyane, Glauber e Denise, por tornarem o dia a dia mais fácil, leve e repleto de risadas e companheirismo. Obrigado por todos os momentos, festas e seminários/simpósios, carrego um pouquinho de cada um comigo.

Aos meus amigos de faculdade, primeiramente gostaria de agradecer aos meus veteranos Úrsula e Michel por, desde o primeiro dia de faculdade, se preocupar comigo e estarem sempre dispostos a ajudar. Gostaria de agradecer também ao meu grupo desde o primeiro período Gustavo, Luis, Ariane, Giulia, Manoel e Letícia por tornarem a experiência de adaptação a uma faculdade mais fácil e prazerosa. Obrigado por todo companheirismo, surtos antes de provas e noites viradas para realização de trabalhos. Com toda certeza sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui, muito obrigado. A Isabelle, Mariana, Anna Luiza e Thais, obrigado por serem um dos meus pilares de sustentação e abrigo durante a faculdade, sou eternamente grato por todas as risadas, estresses sobre organização da semana de microbiologia e por todos os momentos que vivemos. Vocês foram/são fundamentais e uma das melhores e maiores surpresas dessa faculdade, obrigado por todo carinho e por terem me recebido de braços abertos.

Ao Felipe, Mychel, Breno e Filipe Tadeu por serem meu alívio e válvula de escape. Obrigado por todas as sextas-feiras de ensaio, por todos os Mc Donald's, por todas as brigas e conversas sem sentido e por a gente ser a melhor e pior banda do mundo.

Aos meus irmãos que a vida me deu André, Morales, Coli, Evans, Bruno, Costa, Pellizzaro, Leozinho, Leonan, Manso, Salles, obrigado por todo apoio que vocês sempre me dão e por sempre acreditarem em mim. Agradeço também por esses mais de 10 anos de amizade, por me mostrar que nós somos capazes de manter amizades após o final do colégio e por me aturarem. Obrigado por todas as viagens, festas e momentos, vocês são minha família.

Esse espaço nunca será o suficiente para demonstrar o quão sortudo e grato eu sou por ter, poder e dividir meus dias com todas essas pessoas. Do fundo do meu coração, muito obrigado a todos.

Ao CNPq, Faperj e Capes pelo auxílio financeiro e possibilitar o funcionamento científico no Brasil. Mesmo em tempos tão tenebrosos com cortes de verbas e tentativas de desmonte da ciência e educação, seguimos fazendo muito com tão pouco.

“Strength will find you sooner
then you ever thought it would.”
John O’callaghan - The Maine

RESUMO**LUCAS BARROS MAGALHÃES****RECONHECIMENTO E CLIVAGEM DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR POR *Candida haemulonii*****Orientador: André Luis Souza dos Santos****Co-orientação: Laura Nunes Silva**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O complexo *Candida haemulonii* compreende 3 espécies, sendo elas: *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* e *Candida haemulonii* var. *vulnera*. Essas espécies emergiram como notórias leveduras associadas a infecções invasivas com altas taxas de falhas na terapêutica clínica. O processo de adesão às proteínas de matriz extracelular (PMEs) constitui uma etapa importante na colonização microbiana aos tecidos do hospedeiro. Essa adesão é mediada por diversas moléculas conhecidas genericamente como adesinas. Os mecanismos de adesão também são importantes para a formação de biofilme, visto que boa parte das infecções humanas está associada a essa forma de organização celular. As PMEs têm como principal função formar uma rede estrutural de suporte para as células do tecido do hospedeiro. O objetivo do presente estudo foi examinar a capacidade de reconhecimento de PMEs (laminina e fibronectina) pela espécie *C. haemulonii* bem como avaliar a influência dessas macromoléculas no processo de adesão e formação de biofilme, além de avaliar o papel de proteases secretadas na degradação dessas proteínas. Os resultados demonstraram que ambas as proteínas foram capazes de se ligar à superfície de diferentes isolados clínicos pertencentes à espécie *C. haemulonii*, como evidenciado através de citometria de fluxo. O percentual de células fúngicas capazes de se ligar à fibronectina e laminina foi de, respectivamente, $36,5 \pm 4,5$ e $42,4 \pm 3,6$ para o isolado *Ch3* (*C.haemulonii*) $34,8 \pm 4,5$ e $57,4 \pm 5,7$ para o isolado *Ch4* (*C.haemulonii*); e $29,9 \pm 4,5$ e $48,8 \pm 5,6$ para o isolado *Ch7* (*C.haemulonii*). As imagens de microscopia confocal corroboraram os dados de citometria, demonstrando a ligação das proteínas na superfície celular dos isolados fúngicos. A adesão (4 h) e a formação de biofilme (48 h) foram avaliadas na presença de fibronectina e laminina imobilizadas em uma superfície de poliestireno. A adesão inicial foi avaliada por contagem em microscópio invertido e a formação de biofilme evidenciada pelas colorações de cristal violeta e safranina (revelando biomassa e matriz polimérica extracelular, respectivamente). No resultado da adesão foi observado um aumento significativo no número de células aderidas em ambas às proteínas testadas, a saber: $48,1 \pm 6,0$ e $48,8 \pm 5,4$ fungos/campo microscópico para o isolado *Ch4*, respectivamente, para poliestireno recoberto com fibronectina e laminina em relação aos controles de poliestireno não revestido ($28,7 \pm 5,3$) e poliestireno recoberto com albumina ($28,4 \pm 7,5$). Já na formação do biofilme, não se observou nenhuma alteração significativa levando-se em consideração os dois parâmetros analisados (biomassa e matriz polimérica extracelular). A capacidade de degradação dos substratos protéicos por proteases secretadas durante a formação de biofilme foi avaliada por *Western*

Blotting, utilizando-se anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina. Como resultado do experimento de clivagem, foi possível observar uma degradação das duas proteínas testadas por proteases presentes no sobrenadante recuperado do biofilme fúngico. Essa degradação, por sua vez, foi analisada durante os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, sendo o último tempo o ápice dessa degradação. Por fim, foi avaliada a classe enzimática responsável pela degradação de PMEs por Western Blotting utilizando-se inibidores específicos para essas diferentes classes enzimáticas. Como resultado desse experimento, foi possível observar uma inibição parcial da degradação de fibronectina, principalmente pelo inibidor PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), um inibidor clássico de serina proteases. Essas interações avaliadas, portanto, podem desempenhar um papel relevante na patogênese de fungos pertencentes ao complexo *C. haemulonii*.

Palavras-Chave: *Candida haemulonii*, adesão, biofilme, proteínas de matriz extracelular, superfície celular.

ABSTRACT

Lucas Barros Magalhães

**RECOGNITION AND CLEAVAGE OF EXTRACELLULAR MATRIX
PROTEINS BY *Candida haemulonii*****Orientador: André Luis Souza dos Santos****Co-orientação: Laura Nunes Silva**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The *Candida haemulonii* complex comprises 3 species, namely: *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* and *Candida haemulonii* var. *vulnera*. These species have emerged as notorious yeasts associated with invasive infections with high rates of failure in clinical therapy. The adhesion process to extracellular matrix proteins (EMP) is an important step in microbial colonization to host tissues. This adhesion is mediated by several molecules known generically as adhesins. Adhesion mechanisms are also important for the formation of biofilm, since most human infections are associated with this form of cellular organization. The main function of EMPs is to form a structural support network for host tissue cells. The aim of the present study was to examine the ability of EMPs (laminin and fibronectin) to be recognized by the *C. haemulonii* complex as well as to evaluate the influence of these macromolecules on the adhesion and biofilm formation process, in addition to assessing the role of secreted proteases in degradation of those proteins. The results showed that both proteins were able to bind to the surface of different clinical isolates belonging to the *C. haemulonii* complex, as evidenced by flow cytometry. The percentage of fungal cells capable of binding fibronectin and laminin were, respectively: 36.5 ± 4.5 and 42.4 ± 3.6 for the Ch3 (*Candida haemulonii*) isolate; 34.8 ± 4.5 and 57.4 ± 5.7 for the Ch4 (*Candida haemulonii*) isolate; and 29.9 ± 4.5 and 48.8 ± 5.6 for the Ch7 (*Candida haemulonii*) isolate. The confocal microscopy images corroborated the cytometry data, demonstrating the binding of proteins on the cell surface of fungal isolates. Adhesion (4 h) and biofilm formation (48h) were evaluated in the presence of immobilized fibronectin and laminin and on an inert polystyrene surface. Initial adhesion was assessed by counting under an inverted microscope and the formation of biofilm by staining crystal violet and safranin (revealing biomass and extracellular polymer matrix, respectively). The adhesion result was observed a significant increase in the number of cells adhered to both proteins tested, namely: 48.1 ± 6.0 and 48.8 ± 5.4 fungi/microscopic field for the Ch4 isolate, respectively, for polystyrene coated with fibronectin and laminin in relation to the controls uncoated polystyrene (28.7 ± 5.3) and polystyrene covered with albumin (28.4 ± 7.5). In the formation of the biofilm, however, no significant changes were observed considering the two parameters analyzed (biomass and extracellular polymer matrix). The degradation capacity of protein substrates by protease release during fungal biofilm formation was evaluated by

Western blotting using anti-fibronectin and anti-laminin antibodies. As a result of the cleavage experiment, it was possible to observe a degradation of both proteins (Fibronectin and Laminin) by proteases present in the supernatant from fungal biofilm. This degradation, in turn, was analyzed during the periods of 24, 48, 72 and 96 hours, the last time being the apex of this degradation. Finally, the enzymatic class responsible for the degradation of EMPs by Western blotting was evaluated using specific inhibitors for these different classes. As a result of this experiment, it was possible to observe an inhibition of the degradation of Fibronectin mainly by inhibitor PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*), classic inhibitor of the classes of Serine-protease. These evaluated interactions, therefore, may play a relevant role in the pathogenesis of fungi belonging to the *C. haemulonii* complex.

Keywords: *Candida haemulonii*, adhesion, biofilm, extracellular matrix proteins, cell surface.

RESUMO EM LINGUAGEM ADEQUADA PARA PESSOAS LEIGAS

Lucas Barros Magalhães

**RECONHECIMENTO E CLIVAGEM DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR POR *CANDIDA HAEMULONII*****Orientador: André Luis Souza dos Santos****Co-orientação: Laura Nunes Silva**

Resumo em linguagem adequada para pessoas leigas da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os fungos são seres vivos que constituem o reino Fungi e que estão amplamente presentes e espalhados em diversos ambientes. Muitas espécies possuem grandes aplicabilidades em diversas funções como na culinária/gastronomia (Champignon, Shiitake), fabricação de pães e cervejas (fermentação) e produção de antibióticos (penicilina). Contudo, existem também fungos patogênicos, ou seja, aqueles que são capazes de causar doenças como as dermatofitoses (micoses de pele), candidíases e muitas outras infecções fúngicas. O fungo *Candida haemulonii*, objeto deste estudo, é uma levedura que nos últimos anos vem ganhando relativa importância clínica/médica, uma vez que esta espécie possui dificuldade de identificação e um perfil de multirresistência aos muitos antifúngicos utilizados em hospitais. A capacidade de causar doença depende diretamente de diversos fatores como primeiramente sobreviver à temperatura corporal hospedeira, evadir as respostas e defesas do sistema imune, se ligar e aderir a diferentes estruturas como proteínas e células, formar biofilme (forma de vida muito comum entre microrganismos) e produzir/secretar diferentes tipos de enzimas. A matriz extracelular é definida como uma rede organizada e dinâmica compostas por diferentes proteínas e células que constituem todos os tecidos humanos, sendo importante na função estrutural e de sustentação. É importante enfatizar que essas diferentes estruturas que compõem a chamada matriz extracelular podem ser utilizadas pelos microrganismos durante o processo de adesão, sendo assim, essas proteínas, por exemplo, podem ser importantes alvos para o início da colonização microbiana aos tecidos do hospedeiro. O objetivo deste trabalho então foi avaliar se a levedura *Candida haemulonii* conseguiria se ligar a diferentes proteínas (Fibronectina e Laminina) que constituem essa matriz extracelular como também analisar se essas mesmas proteínas conseguiriam influenciar, de alguma forma, os processos de adesão, formação de biofilme e secreção de proteases. A avaliação destas interações iniciais entre fungo/proteínas das células mamíferas podem nos ajudar a entender como ocorre o processo do desenvolvimento da doença causada pelo fungo *Candida haemulonii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da incidência global/anual das principais infecções fúngicas (adaptado de Bongomin *et al.*, 2017). 2
- Figura 2.** Diversidade do gênero fúngico *Candida*. Árvore filogenética do gênero fúngico *Candida* obtida através da análise e sequenciamento da região ITS (adaptado de Merseguel, 2015). 6
- Figura 3.** Demonstração do aumento do número de isolados ao longo dos anos. Aumento da prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* em relação à diminuição da espécie *Candida albicans* de pacientes/por dia (adaptado de Oberoi, 2012). 7
- Figura 4.** Esquema do complexo fúngico *Candida haemulonii* (*Lato Sensu*). 8
- Figura 5.** Exemplificação da fluidez e interação das PMEs constituintes da matriz extracelular (adaptado de Meguid, 2014). 11
- Figura 6.** Estrutura da glicoproteína fibronectina composta por 3 módulos repetidos e reorganizados em diversas combinações. Módulos representados por hexágonos (tipo 1), quadrados (tipo 2) e cilindros (tipo 3) (adaptado de Singh, 2010). 12
- Figura 7.** Estrutura da glicoproteína laminina. Representação das cadeias α , β e γ (adaptado de Singh, 2011). 13
- Figura 8.** Etapas da formação de biofilme (adaptado de Lohse *et al.*, 2017). 15
- Figura 9.** Interação de isolados (Ch3, Ch4 e Ch7) pertencentes ao complexo *C. haemulonii* com proteína de matriz extracelular Fibronectina. 25
- Figura 10.** Interação de isolados (Ch3, Ch4 e Ch7) pertencentes ao complexo *C. haemulonii* com proteína de matriz extracelular Laminina. 26
- Figura 11.** Capacidade de adesão da espécie *Candida haemulonii* (ch4) as proteínas de matriz extracelular Laminina e Fibronectina em placas de 96 poços. 26
- Figura 12.** Quantificação da formação de biofilme por *C. haemulonii* ao longo de 96 horas de incubação sob superfície recoberta por PMEs. 27
- Figura 13.** Microscopia confocal da espécie *C. haemulonii* em interação com a proteína de matriz extracelular Laminina. 28

Figura 14. Microscopia confocal da espécie *C. haemulonii* em interação com a proteína de matriz extracelular Fibronectina. 29

Figura 15. Clivagem das proteínas de matriz extracelular Fibronectina (A) e Laminina (B) pelo sobrenadante do biofilme de *C. haemulonii*. 29

Figura 16. Clivagem da proteína de matriz extracelular Fibronectina pelo sobrenadante do biofilme de *C. haemulonii* em interação com diferentes inibidores proteolíticos. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Infecções fúngicas invasivas mais prevalentes (adaptado de Brown, 2012). 3

Tabela 2. Metodologias de identificação e classificações errôneas da espécie *C.auris* (CDC, 2020). 8

Tabela 3. Amostras utilizadas neste estudo. 20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALS	- Sequência Similar de Aglutinina (<i>Agglutinin Like-Sequence</i>)
AMB	- Anfotericina B
ABS/BSA	- Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAS	- Caspofungina
CW	- Branco de Calcoflúor (<i>Calcofluor White</i>)
FITC	- Isotiocianato de Fluoresceína
FLC	- Fluconazol
H	- Horas
HgB	- Hemoglobina
VIH/HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HSA	- Albumina Sérica Humana (<i>Human Serum Albumin</i>)
HWP	- Proteína de Parede de Hifa (<i>Hyphal Wall Protein</i>)
IFM	- Intensidade de Fluorescência Média
IgG	- Imunoglobulina G
ITC	- Itraconazol
ITS	- Espaço Interno Transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
KDa	- Kilodalton
LEAMER	- Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes
Min	- Minutos
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar
mW	- Miliwatts
nM	- Nanometros
RGD	- Arginina, Glicina e Ácido Aspártico
RPM	- Rotações por minuto
PI	- Iodeto de propídio (<i>Propidium Iodide</i>)
PME	- Proteína de Matriz Extracelular
PMSF	- Do inglês: <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
SAP	- Aspártico-protease secretada (<i>Secreted Aspartyl Protease</i>)
SDS-PAGE	- <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TF/PBS	- Tampão Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
VRC	- Voriconazol
WB	- <i>Western Blotting</i>
YCB	- Meio à base de Carbono/Levedura (<i>Yeast Carbon Base</i>)
%CF	- Porcentagem de Células Fluorescentes
%	- Porcentagem
°C	- Grau Celsius
µG	- Microgramas
µL	- Microlitros
µM	- Micromolar

SUMÁRIO

RESUMO	viiviii
ABSTRACT	x
RESUMO ADEQUADO PARA PESSOAS LEIGAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELA	xv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi
SUMÁRIO	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções Fúngicas	1
1.2. Gênero <i>Candida</i>	5
1.3. Complexo <i>Candida haemulonii</i>	7
1.4. Interação fungo-hospedeiro	9
1.4.1. Adesão fúngica	9
1.4.2. Proteínas de Matrizes Extracelulares (PMEs)	9
1.4.3. Reconhecimento das Proteínas de Matrizes Extracelulares (PMEs)	12
1.5. Biofilme Fúngico	13
1.6. Proteases no âmbito patógeno-hospedeiro	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivos Específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Amostras fúngicas de <i>C. haemulonii</i> e condições de cultivo	20
4.2. Interação com PMEs	21
4.3. Adesão e formação de biofilme sobre superfície revestida com PMEs	21
4.4. Microscopia Confocal	22
4.5. Avaliação da degradação de PMEs imobilizadas pelo sobrenadante de biofilme	23
4.6. Análise da classe enzimática responsável pela degradação de PMEs em solução pelo sobrenadante do biofilme	24
4.7. Análises estatísticas	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Interação com PMEs	25
5.2. Adesão e formação de biofilme sobre superfície revestida com PMEs	29
5.3. Microscopia Confocal	28
5.4. Avaliação da degradação de PMEs imobilizadas pelo sobrenadante de biofilme	31
5.5. Análise da classe enzimática responsável pela degradação de fibronectina em solução pelo sobrenadante do biofilme	33
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções Fúngicas

Composto por um grupo diversificado os fungos possuem grande influência tanto na vida animal quanto em plantas. Comumente subestimados e amplamente negligenciados por políticas de saúde pública, nas últimas décadas a incidência do número de casos de infecções fúngicas teve um elevado crescimento, principalmente se referindo aos números de infecções fúngicas invasivas (Santos, Branquinha e Kneipp, 2017; Almeida, Rodrigues e Coelho, 2019). O uso exacerbado de antimicrobianos juntamente com o pouco investimento e desenvolvimento de novas drogas e metodologias de identificação estão diretamente ligados a esse aumento (Vallabhaneni *et al.*, 2016; Von Lilienfeld-Toal *et al.*, 2019).

Segundo o panorama mundial, aproximadamente 1 bilhão de pessoas possuem algum tipo de condição causada por patógenos fúngicos. Destacando-se deste número, há 150 milhões de pessoas associadas a formas graves de infecções fúngicas invasivas como, por exemplo, candidemia, criptococose, aspergilose e histoplasmoze (Almeida, Rodrigues e Coelho, 2019). Por sua vez, em números globais de incidência de infecções fúngicas, tem-se por destaque as infecções que atingem sítios como pele, cabelo e unha, como as dermatofitoses dando ênfase também para infecções como candidíase vulvovaginal recorrente e a rinossinusite fúngica (Bongomin *et al.*, 2017) (**Figura 1**).

A prevalência e a crescente incidência de infecções fúngicas ao redor do mundo estão relacionadas a diversos fatores, dentre estes se destacam três: região demográfica, condição socioeconômica e hábitos culturais. Além disso, a mortalidade e morbidade de doenças causadas por patógenos fúngicos são equivalentes à de doenças como tuberculose, enquanto que comparada a outras doenças negligenciadas, como malária, esse número é três vezes maior (Brown *et al.*, 2012; Bongomin *et al.*, 2017).

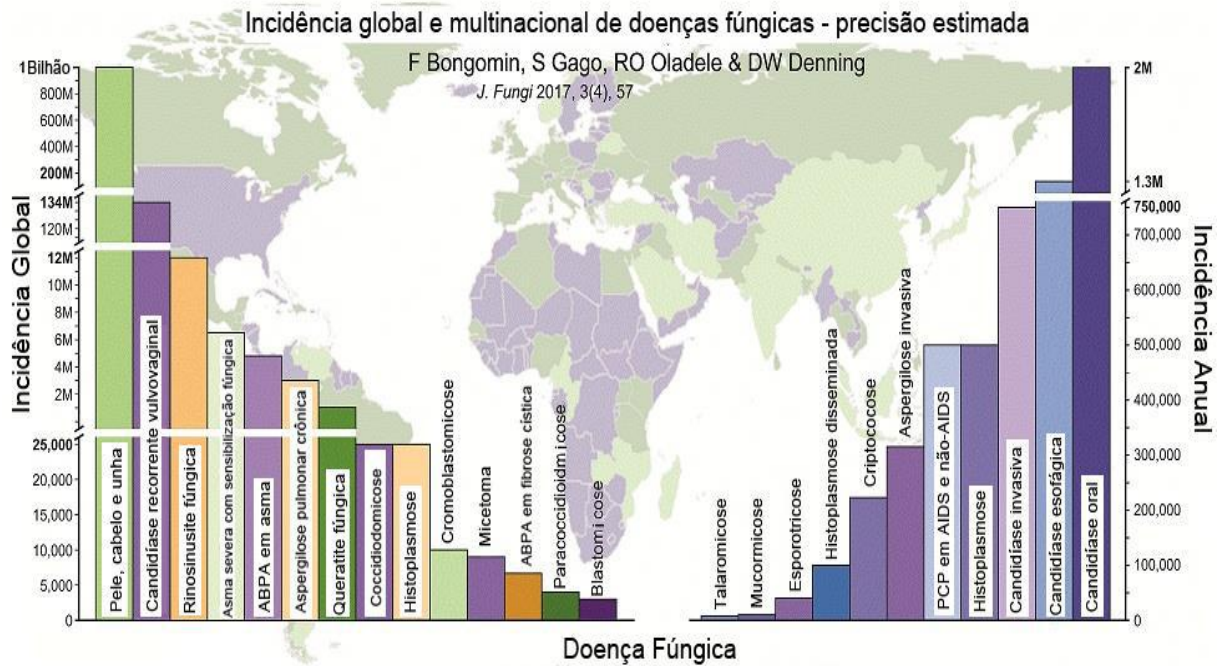


Figura 1. Mapa da incidência global/anual das principais infecções fúngicas (adaptado de Bongomin *et al.*, 2017).

Dentre os agentes causadores de doenças fúngicas, que destacam se pelas altas taxas de mortalidade e altos números de infectados por ano, estão os gêneros: *Aspergillus* spp. causadores da aspergiloze invasiva com mais de 200.000 casos/ano, *Candida* spp., causadores da candidíase invasiva com cerca de 400.000 casos/ano, *Cryptococcus* spp. relacionados à meningite criptocócica muitas vezes agravada e associada com pacientes soropositivos para o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) acometendo mais de 200.000 casos/ano e *Pneumocystis jiroveci* com mais de 400.000 casos/ano (**Tabela 1**) (Bongomin *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2012; Puerta-Alcalde *et al.*, 2018). É importante relacionar o crescimento da prevalência e incidência de patógenos e doenças fúngicas graves com o aumento do número de pessoas em grupos de risco associadas a essas infecções nos últimos anos, como por exemplo: transplantados, imunocomprometidos soropositivos para HIV, pessoas idosas, diabéticos, neutropênicos e pacientes em tratamento para câncer (em processo de quimioterapia) (GAFFI, 2019).

Tabela 1. Infecções fúngicas invasivas mais prevalentes no mundo (adaptado de Brown, 2012).

Infecções fúngicas e seus agentes etiológicos	Localização/Região	Infecções com risco de vida por ano	Taxa de mortalidade (%)
Micoses invasivas oportunistas			
Aspergilose (ex: <i>Aspergillusfumigatus</i>)	Mundial	>200.000	30-95
Candidíase (ex: <i>Candidaalbicans</i>)	Mundial	>400.000	46-75
Criptococose (ex: <i>Cryptococcusneoformans</i>)	Mundial	>1.000.000	20-70
Mucormicose (ex: <i>Rhizopusoryzae</i>)	Mundial	>10.000	30-90
Pneumocistose (ex: <i>Pneumocystis jirovecii</i>)	Mundial	>400.000	20-80
Micoses dimórficas endêmicas			
Blastomicose (ex: <i>Blastomycesdermatitidis</i>)	Centro-oeste e atlântico dos EUA	~3000	<2-68
Coccidioidomicose (ex: <i>Coccidioidesimmitis</i>)	Sudoeste dos EUA	~25.000	<1-70
Histoplasmose (ex: <i>Histoplasma capsulatum</i>)	Centro-oeste dos EUA	~25.000	28-50
Paracoccidioidomicose (ex: <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Brasil	~4000	5-27
Peniciliose (ex: <i>Penicilliummarneffeii</i>)	Sudoeste Asiático	~4000	2-75

A situação do Brasil no âmbito de infecções fúngicas é tão preocupante quanto no panorama global, visto que para a maioria das infecções fúngicas poucas informações epidemiológicas estão disponíveis, uma vez que a maioria das doenças fúngicas não possui notificação compulsória. Além disso, o estudo de Giacomazzi e colaboradores (2016) demonstrou grande discrepância dos dados computados oficialmente frente ao Ministério da Saúde em comparação com dados extrapolados pelo tamanho total da população brasileira. Em dados oficiais, há apenas registros de micoses endêmicas invasivas como coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose. Outras infecções oportunistas como candidíase (incluindo manifestações de candidíase esofágica, vulvovaginais e invasivas) e aspergilose (destacando-se a forma invasiva, asmática e broncopulmonar alérgica) têm sua incidência de número de casos apenas estimada em cerca de aproximadamente 2.800.000 e 1.000.000 ano, respectivamente. Por sua vez, no Brasil, estima-se que mais de 3,8 milhões de pessoas sofram com alguma condição grave associada a doenças fúngicas. Sendo grande parte deste número de pacientes imunocomprometidos e transplantados (Giacomazzi *et al.*, 2016). Tanto *Histoplasma* quanto *Paracoccidioides* são gêneros fúngicos que compartilham duas características principais: são doenças endêmicas e negligenciadas no Brasil e na América Latina e, além disso, são micoses sistêmicas, agravando assim ainda mais o quadro de pacientes acometidos por uma dessas doenças, seja tanto pela dificuldade e tempo de tratamento como também ausência de testes rápidos de identificação (Queiroz-Telles *et al.*, 2017).

Outra infecção com alta incidência no Brasil é a candidíase invasiva que está no topo das infecções sanguíneas com maior índice de mortalidade e morbidade. No Brasil, 4% das infecções hospitalares são causadas por alguma espécie pertencente ao gênero *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* a mais frequentemente isolada (Sifuentes-Osornio, Corzo-León e Ponce-de-León, 2012). De uma forma geral, na América Latina a prevalência destas infecções varia de 0,2-0,5 casos por 1000 pacientes/dia, apresentando uma porcentagem de mortalidade associada que varia entre 20%-65% (Queiroz-Telles *et al.*, 2017). Além da forma invasiva, esta espécie é a principal responsável pela candidíase vulvovaginal em mulheres, além das candidíases orais e esofágicas (Sardi *et al.*, 2013).

1.2. Gênero *Candida*

O gênero *Candida* destaca pela diversidade de espécies relevantes no âmbito científico, hospitalar e biotecnológico (**Figura 2**) (Buerth *et al.*, 2016; Dadar *et al.*, 2018). O agente mais conhecido deste gênero é *C. albicans*. Este agente é um fungo dimórfico, que varia sua forma entre levedura, pseudohifa e hifa, participando de maneira comensal da microbiota humana, principalmente fazendo parte do trato urogenital, gastrointestinal e pele (Gulati e Nobile, 2016; Dadar *et al.*, 2018). Este microrganismo é também um patógeno oportunista clássico e um dos mais comumente isolados causadores de infecções fúngicas invasivas no mundo (Enoch *et al.*, 2016). Desta forma, *C. albicans* pode causar problemas caso haja uma desregulação da proliferação desse microrganismo dentro da microbiota humana, seja ela por alterações no sistema imune, uso exacerbado de antimicrobianos e variações nutricionais/químicas no sítio anatômico em que se encontra (Tronchin *et al.*, 1991; Gulati e Nobile, 2016; Braga-Silva *et al.*, 2018).

É importante citar que outras espécies do gênero *Candida* são também bastantes relevantes na clínica, como é o caso da *C. tropicalis*, isolada frequentemente de pacientes imunocomprometidos e que fazem uso profilático de fluconazol; *C. parapsilosis*, frequentemente associada à formação de biofilmes em cateteres intravenosos; e *C. krusei*, muitas vezes relatada com alta resistência a drogas azólicas (Sifuentes-Osornio, Corzo-León e Ponce-de-León, 2012; Giacomazzi *et al.*, 2015). Ao decorrer dos anos, uma alternância de prevalência vem se mostrando cada vez mais comum frente às espécies isoladas de candidemias (**Figura 3**). As leveduras pertencentes ao grupo denominado de *Candida* não-*albicans* emergiram como patógenos hospitalares que possuem como principais características sua multirresistência a diversos antifúngicos utilizados na clínica e sua difícil identificação, necessitando de métodos biomoleculares avançados para diferenciação em nível de espécie (Ramos *et al.*, 2015; Fisher *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Gade *et al.*, 2020). Além disso, o uso desenfreado de antimicrobianos como métodos profiláticos para pacientes imunocomprometidos, transplantados, imunocomprometidos soropositivos para o HIV e pessoas em tratamento para câncer, tornam estes possíveis alvos dessas infecções fúngicas graves (Deorukhkar *et al.*, 2014; Friendmand e Schwartz, 2019).

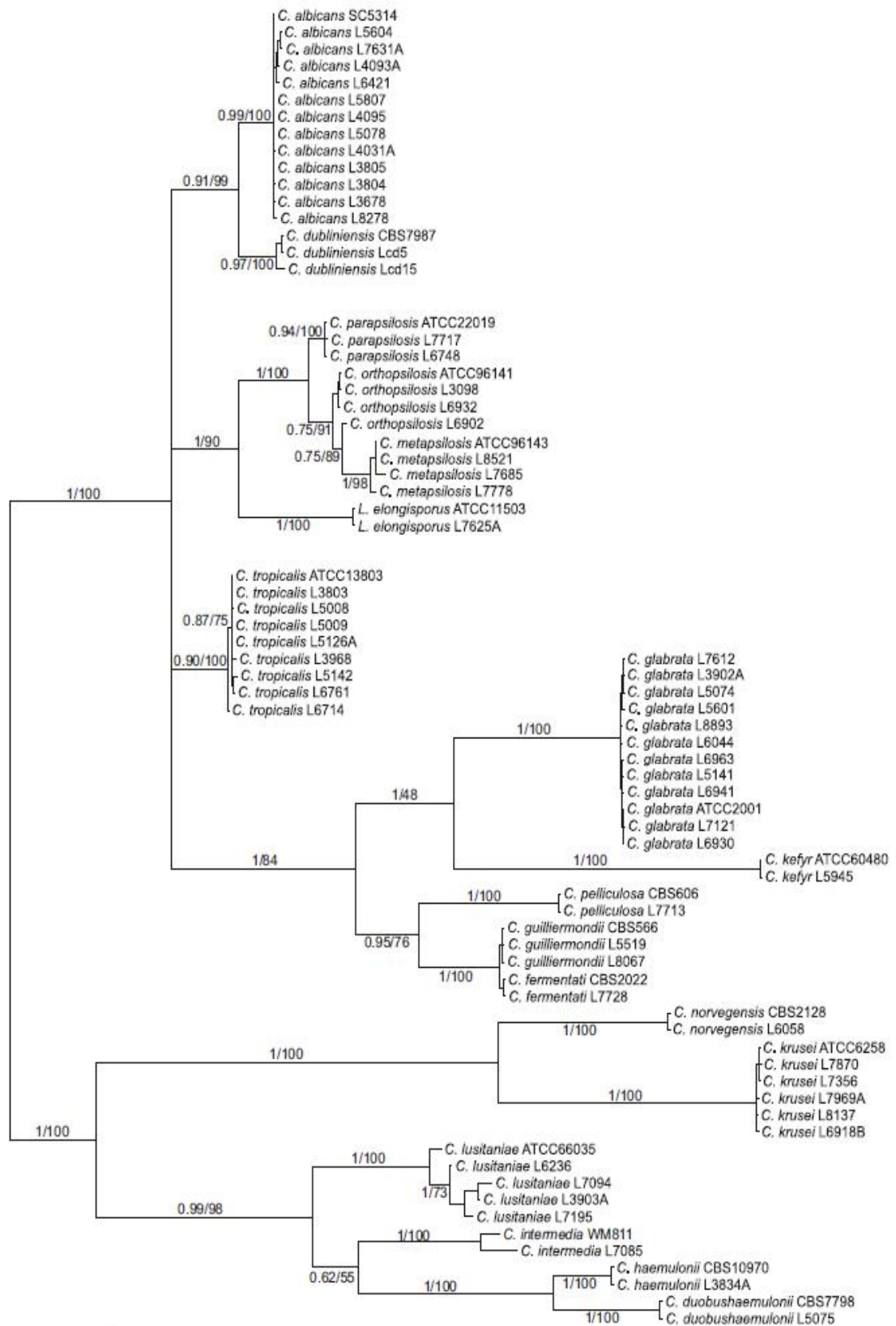


Figura 2. Diversidade do gênero fúngico *Candida*. Árvore filogenética do gênero fúngico *Candida* obtida através da análise e sequenciamento da região ITS (adaptado de Merseguel, 2015).

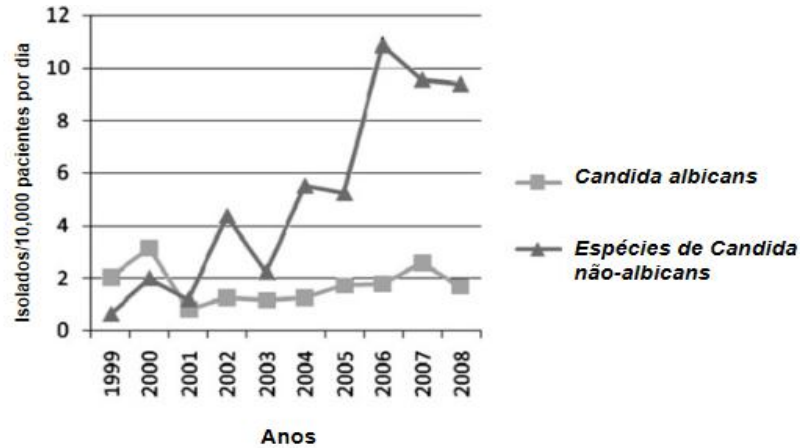


Figura 3. Demonstração do aumento do número de isolados ao longo dos anos. Aumento da prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* em relação à diminuição da espécie *Candida albicans* de pacientes/por dia (adaptado de Oberoi, 2012).

1.3. Complexo *Candida haemulonii*

Em 1962, a espécie fúngica *Candida haemulonii* teve sua primeira descrição e isolamento do intestino do peixe *Haemulons cirus* encontrado nas Bahamas (Van Uden e Kolipinski, 1962). Por sua vez, em 1984 esta espécie teve seu primeiro isolado clínico descrito e coletado da corrente sanguínea de um paciente com falência renal (Revich e Iu Saet., 1989; Gade *et al.*, 2020). Devido a sua dificuldade de identificação por métodos bioquímicos clássicos, a espécie fúngica *C. haemulonii* era constantemente identificada e classificada de maneira errônea. Desta forma, em 2012, foi proposta uma reclassificação da espécie *C. haemulonii* em um complexo fúngico de três espécies: *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* e *C. haemulonii* var *vulnera* (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012) (**Figura 4**). Esta reclassificação foi baseada nos avanços dos estudos de identificação molecular através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), uma região altamente conservada em fungos.

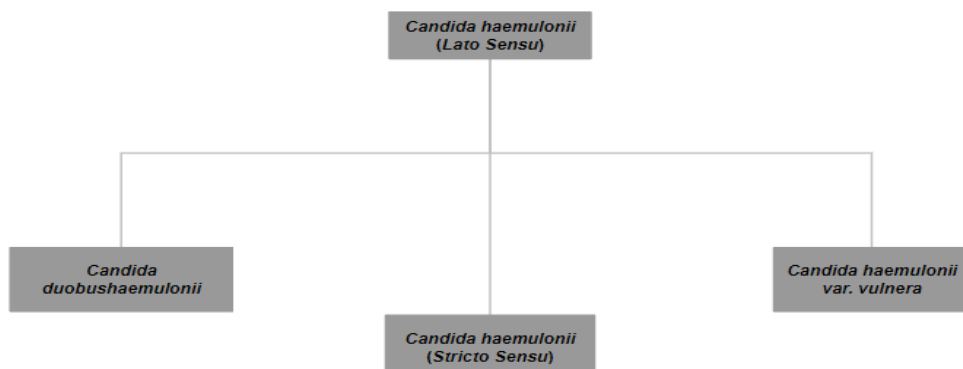


Figura 4. Esquema do complexo fúngico *Candida haemulonii* (*Lato Sensu*).

No Brasil, o primeiro relato de uma infecção fúngica causada por uma espécie do complexo *C. haemulonii* se referiu a uma paciente de 26 anos diagnosticada com carcinoma ovariano na cidade de São Paulo (Almeida Jr *et al.*, 2012). Outros países como Kuwait (Mokkadas, Al Sweih e Khan., 2007), Israel (Ben-Ami *et al.*, 2017) e Panamá (Araúzet *al.*, 2017) sofreram com surtos fúngicos relacionados a este complexo fúngico bem como com outras espécies fúngicas, como *C. auris* (Satoh *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2019). O complexo *C. haemulonii* e a espécie *C. auris* são microrganismos altamente relacionados por suas similaridades genéticas, bioquímicas e fisiológicas, sendo amplamente confundidas quanto à sua identificação (**Tabela 2**) (Forsberg *et al.*, 2018; Gade *et al.*, 2020).

Tabela 2. Problemas na identificação do complexo *C. haemulonii* e *C. auris* (CDC, 2020).

Métodos de identificação	Espécies que podem ser identificadas erroneamente
Vitek 2 YST [®]	<i>Candida haemulonii</i> , <i>Candida duobushaemulonii</i>
Api 20C [®]	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Candida sake</i>
Api ID 32C [®]	<i>Candida intermedia</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Saccharomyces kluyveri</i>
BD Phoenix Yeast Identification System [®]	<i>Candida haemulonii</i> , <i>Candida catenulata</i>
MicroScan [®]	<i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida famata</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Candida parapsilosis</i>
RapIDYeast Plus [®]	<i>Candida parapsilosis</i>

O complexo fúngico *C. haemulonii* e a espécie *C. auris* dividem como principal característica em comum a multirresistência a diversas classes de antifúngicos, como azóis e poliênos. Esta característica de multirresistência torna estas leveduras emergentes um grande risco à população mundial (Muñoz *et al.*, 2020). Além disso, essas leveduras são assiduamente relacionadas a infecções invasivas graves e grandes surtos hospitalares espalhados pelo mundo (Gade *et al.*, 2020).

1.4. Interação fungo-hospedeiro

1.4.1 Adesão fúngica

A adesão é definida como a capacidade de um microrganismo de se ligar a uma célula ou superfície. Os microrganismos que possuem a capacidade de iniciar uma infecção, frequentemente têm como primeiro passo a adesão a células hospedeiras, por meio de interações específicas entre moléculas conhecidas genericamente como adesinas. Além disso, o processo de adesão é comumente relacionado à primeira etapa de formação de biofilme por patógenos (Tronchin *et al.*, 1991; Sturtevant e Calderone, 1997; Vaca *et al.*, 2020).

Desta forma, o processo de adesão às células hospedeiras ou às proteínas de matriz extracelular (PME) constitui uma importante etapa na colonização microbiana aos tecidos do hospedeiro, sendo assim considerado fator facilitador da invasão, replicação e internalização de patógenos às células hospedeiras (Joh *et al.*, 1999; Chagnot *et al.*, 2012; Vaca *et al.*, 2020).

1.4.2. Proteínas de Matrizes Extracelulares (PMEs)

A matriz extracelular é definida como uma organizada e extremamente dinâmica rede acelular de macromoléculas que constituem todos os órgãos e tecidos humanos de uma maneira única e específica, sendo desta forma essencial para a manutenção da vida. Além disso, essa estrutura primordial possui diferentes funções, destacando-se como as principais: formar uma rede estrutural para as células do tecido do hospedeiro, participar na comunicação, diferenciação, migração celular e sendo também importante no processo de regulação fisiológica, bioquímica e de manutenção da homeostase celular (Bonnans, Chou e Werb., 2014; Taha e Naba, 2019; Sainio e Järveläinen, 2020).

A matriz extracelular é composta de macromoléculas secretadas por células que compõem determinado tecido e que se organizam em uma rede estruturada (**Figura 5**). Dentro deste grupo de macromoléculas, se destacam as famílias de glicoproteínas que têm como características principais possuírem múltiplos domínios de ligação, além de uma estrutura proteica complexa, tendo como exemplos as lamininas e fibronectinas (Jordan *et al.*, 2014; Vaca *et al.*, 2020).

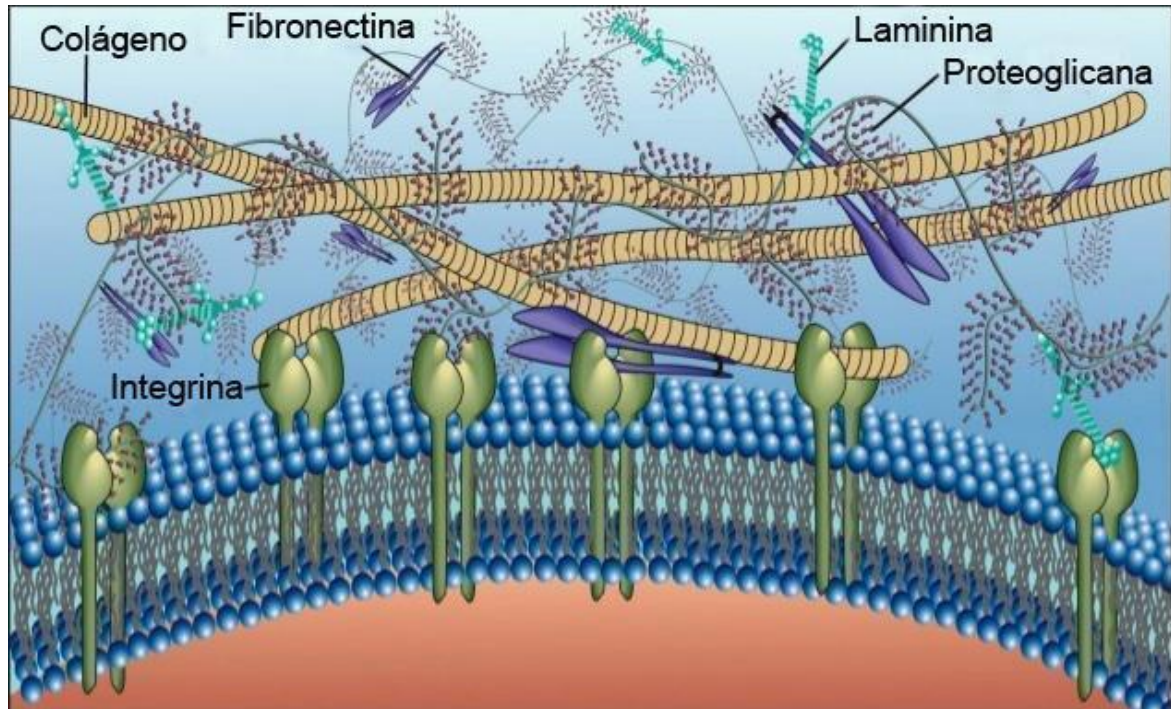


Figura 5. Exemplificação da interação das PME's constituintes da matriz extracelular (adaptado de Meguid, 2007).

A fibronectina faz parte de uma família de glicoproteínas amplamente distribuída e ubíqua na matriz extracelular presentes em diversos tecidos. Como características, possuem uma alta massa molecular e são heterodiméricas, ou seja, são compostas por duas subunidades de massas moleculares variando entre 230-270 kDa. Nas subunidades da fibronectina estão presentes as sequências do tripeptídeo RGD (sendo R representando Arginina, G representando Glicina e D representando ácido aspártico) que são sítios de reconhecimento para as integrinas (proteínas receptores da superfície celular), permitindo a ligação direta entre a célula e a matriz extracelular (Morra, 2006). Esta proteína é basicamente composta por 3 tipos gerais de unidades ou módulos homólogos repetidos, chamados de tipo 1, 2 e 3 (**Figura 6**). (Lenselink, 2013; Maurer *et al.*, 2016).

A fibronectina é formada predominantemente por três diferentes módulos, arranjados de forma sequencial e repetidos ao longo da cadeia principal. Este grupo apresenta também múltiplos domínios de ligação, ou seja, diversas regiões que proporcionam a interação/ligação da proteína com diversas moléculas. Ademais, possui também duas formas presentes no corpo, a plasmática produzida por hepatócitos e a celular, produzida por fibroblastos. Essa família de proteína possui função adesiva crucial na interação célula/matriz, tendo também papel importante na migração, diferenciação e crescimento celular (Hynes, 2009; Vaca *et al.*, 2019).

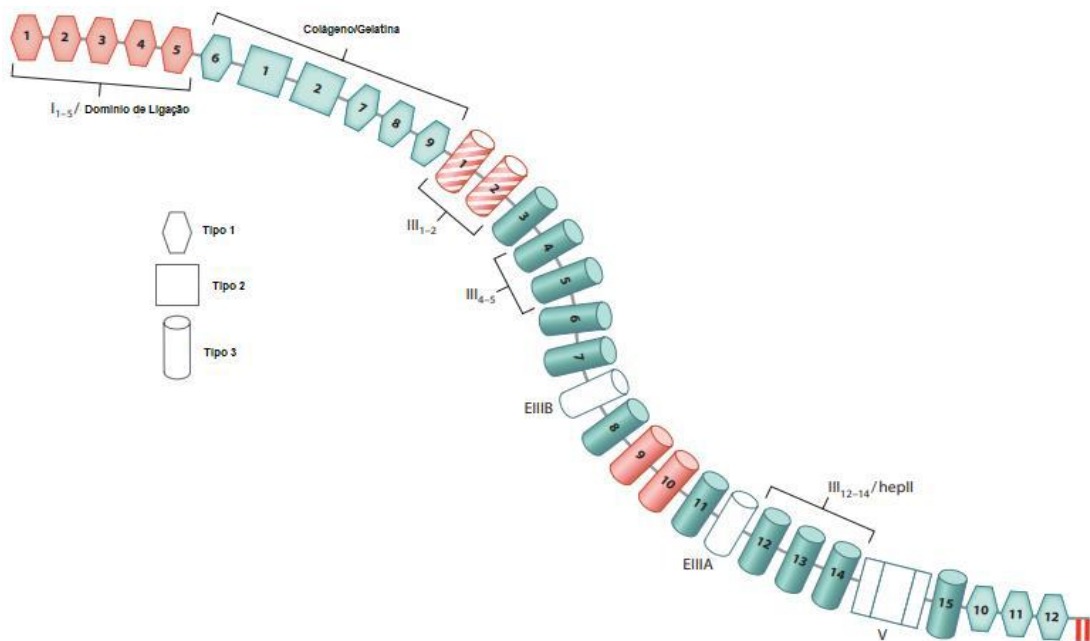


Figura 6. Estrutura da glicoproteína fibronectina composta por 3 módulos repetidos e reorganizados em diversas combinações. Módulos representados por hexágonos (tipo 1), quadrados (tipo 2) e cilindros (tipo 3) (adaptado de Singh, 2012).

A laminina pertence a uma família de glicoproteínas multifuncionais e de alta massa molecular. Essa proteína possui uma estrutura heterotrimérica constituída, em sua maioria, por três cadeias: cadeia α (~400 kDa), cadeia β (~200 kDa) e cadeia γ (~200 kDa). Em número de tipos de cadeia, existem, respectivamente, 5 α , 3 β e 3 γ , que através de diversas recombinações dão origem a 15 isoformas diferentes desse grupo proteico (**Figura 7**). Esta proteína faz parte da membrana basal e possui grande importância no suporte e sustentação da estrutura da matriz extracelular, possuindo também outras funções atuando também na morfogênese e homeostase dos tecidos (Singh *et al.*, 2012).

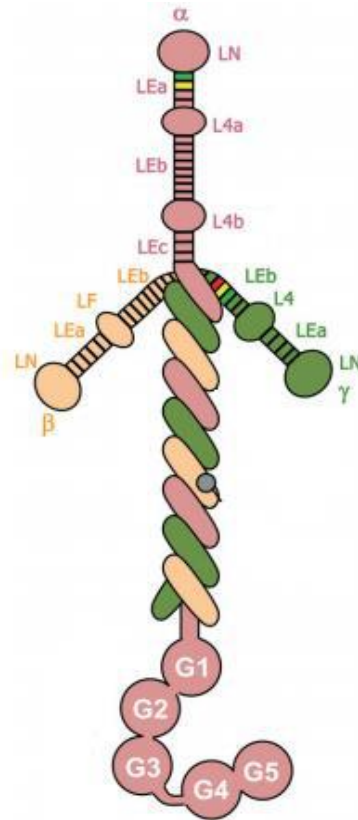


Figura 7. Estrutura da glicoproteína laminina. Representação das cadeias α , β e γ (adaptado de Singh, 2011).

1.4.3. Reconhecimento das Proteínas de Matrizes Extracelulares (PMEs)

A parede celular fúngica consiste em uma estrutura dinâmica, que possui como principais funções a manutenção da integridade celular e possibilitar a interação patógeno-hospedeiro mediada por receptores específicos. Estas interações podem ocorrer entre proteínas ou entre proteínas e açúcares, sendo sempre mediadas e associadas por moléculas denominadas adesinas (De Groot *et al.*, 2013; Willaert, 2018). Diversos gêneros fúngicos já foram reportados contendo estas glicoproteínas chamadas adesinas em sua parede celular. Em *C. albicans*, já foram descritas adesinas específicas para proteínas presentes na matriz extracelular hospedeira como laminina e fibronectina. Além disso, também nessa espécie já foram descritas diversas outras adesinas promíscuas, ou seja, que são capazes de interagir com mais de um ligante (Chaffin, 2008; De Groot *et al.*, 2013; Willaert, 2018).

Uma importante característica do gênero *Candida* consiste na capacidade de aderir fortemente a diferentes superfícies. Desta forma, um repertório complexo e repleto de diferentes adesinas faz-se necessário na superfície celular fúngica. Como exemplo de adesinas presentes em espécies de *Candida* se destacam a família ALS (*agglutinin-like sequence*) que

consiste em 8 grandes glicoproteínas presentes na superfície celular com alta grau de similaridade. Destacam-se as adesinas ALS1, ALS3 e ALS9, que possuem a capacidade de reconhecer e se ligar à família de proteínas laminina presente na matriz extracelular hospedeira, tendo importância também na adesão e formação de biofilme (Chaffin, 2008; Singh *et al.*, 2012; Araújo, Henriques e Silver, 2017; Ciurea *et al.*, 2020). Outra família de adesinas que possui grande importância é a HWP (*hyphal wall protein*), esta família possui a capacidade de reconhecer e se ligar a glicoproteína fibronectina, além de novamente influenciar nos processos de adesão, formação de biofilme e agregação célula-célula (Chaffin, 2008; Hofs, Mogavero e Hube, 2016).

1.5. Biofilme Fúngico

No século XVII, Anton Von Leeuwenhoek, ao observar o material retirado de seus dentes com seu microscópio, o descreveu como “animalículos se movimentando”. Estava ali composta a primeira definição de microrganismo. Já no ano de 1978, por Costerton, o importante termo biológico biofilme foi oficialmente e cientificamente descrito, sofrendo modificações constantes na sua definição até os dias de hoje (Costerton, Geesey e Cheng., 1978; Costerton, 1999; Slavkin, 1997). Caracterizado como o modelo de vida predominante de diversos microrganismos como bactérias e fungos, incluindo os patogênicos, a definição mais atual de biofilme é a de microrganismos ou células aderidas a uma superfície biótica ou abiótica embebida em uma matriz extracelular polimérica produzida pelos próprios microrganismos (Chandra *et al.*, 2001; Donlan e Costerton, 2002; Mykатыn, Cohen e Chole., 2016; Ramos *et al.*, 2020).

A formação dos biofilmes microbianos seguem as mesmas 4 etapas: (i) adesão das células à uma superfície abiótica ou biótica; (ii) produção e secreção da matriz extracelular polimérica pelos microrganismos formadores do biofilme; essa etapa tem como função fornecer um ambiente mais estável e propício para adesão irreversível do microrganismo à superfície; (iii) caracterizada pela formação e estabilização da arquitetura primária do biofilme, refere-se a maturação do biofilme propriamente dito; por último, (iv) resume a desestruturação e dispersão das células microbianas componentes do biofilme (**Figura 8**) (Stoodley *et al.*, 2002; Kokare *et al.*, 2009; Rabin *et al.*, 2015; Lohse *et al.*, 2017).

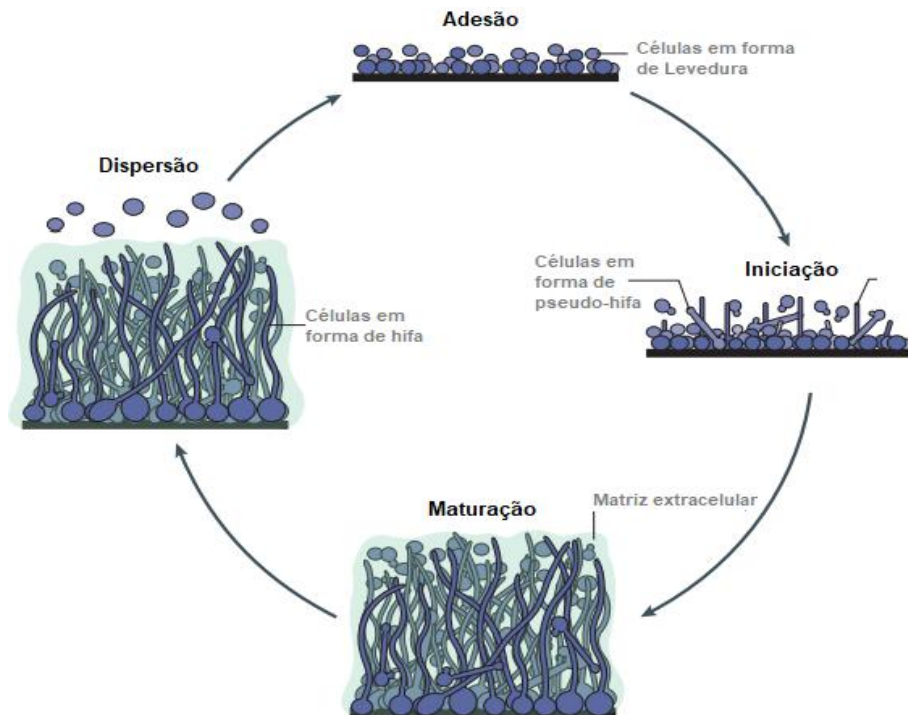


Figura 8. Etapas da formação de biofilme (adaptado de Lohse *et al.*, 2017).

Biofilmes possuem uma grande importância dentro do âmbito científico e de saúde, visto que esse modelo de vida é ligado a diversas funções de patogênese de microrganismos. Dentre todas as funções já descritas, destaca-se a de que essa matriz extracelular está intrinsecamente relacionada a mecanismos de resistência a antimicrobianos. Além disso, ela é também responsável pela evasão da resposta do sistema imune hospedeiro, manutenção da arquitetura e dinâmica do biofilme sob estresses ambientais (Blankenship e Mitchell, 2006; Dominguez *et al.*, 2019; Kean e Ramage., 2019; Ramos *et al.*, 2020). Estima-se atualmente que 65% de todas as infecções tratadas pelo mundo estejam associadas de alguma forma com a formação de biofilmes microbianos, seja ela em superfícies de tecidos e órgãos ou dispositivos médicos. Por sua vez, não há dúvida que a introdução destes biomateriais na medicina clínica como próteses, implantes e diferentes tipos de cateteres acompanhados da alta capacidade de microrganismos se organizarem em um modo de vida de biofilme estão intrinsecamente ligados a essa alta porcentagem (Uppuluri, Pierce e López-Ribot, 2009; Ramage, Martínez e López-Ribot., 2006; Tolker-Nielsen, 2015).

A capacidade de espécies que compõem o gênero fúngico *Candida* de formar e se manter em uma estrutura de biofilme altamente estruturada e dinâmica consistem em um importante fator de virulência (Mayer, Wilson e Hube., 2013; Polke, Hube e Jacobsen., 2015; Lohse *et al.*, 2017). Além disso, representa também implicações importantes à clínica, seja

pelo aumento da resistência ao tratamento com antifúngicos, como também pela habilidade de evasão do sistema imune por células fúngicas estruturadas nesse modo de vida (Desai, Mitchell e Andes, 2014; Del Pozo, 2018). Embora a espécie *C. albicans* seja a mais comumente estudada e associada à formação de biofilme em dispositivos médicos, bem como frequentemente isolada de infecções invasivas humanas sanguíneas com maior índice de mortalidade dentre infecções hospitalares, outras espécies desse grupo fúngico possuem destaque (Douglas, 2003; Nobile e Jonhson, 2015). Dentre estas espécies estão incluídas *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. glabrata*. É importante enfatizar que muitas vezes, estas espécies fúngicas citadas anteriormente estão associadas a um mesmo biofilme, formando assim um biofilme polimicrobiano (Araújo, Henriques e Silva, 2017).

Por sua vez, em espécies do complexo *C. haemulonii*, foi avaliada por Ramos e colaboradores (2020) a capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas. Foram utilizados na avaliação diversos materiais como poliestireno e diferentes tipos de cateteres, como o cateter feito de látex siliconizado, poliuretano (nasoentérico) e cloreto de polivinila (nasogástrico). Como resultado foi comprovado que as espécies do complexo fúngico foram capazes de formar biofilme em todos os tipos de materiais, sendo o tempo de 48 horas o ápice de maturação do biofilme. Além disso, foi observada uma capacidade de formação de biofilme maior nos diferentes materiais que compõem os cateteres utilizados na clínica em comparação ao material de poliestireno, demonstrando assim um grande risco aos pacientes que dependem da utilização destes dispositivos médicos (Ramos *et al.*, 2020).

1.6. Proteases no âmbito patógeno-hospedeiro

Proteases são enzimas que clivam de forma irreversível ligações peptídicas em proteínas (Naglik, Challacombe e Hube, 2003; Schaller *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2013). Estas enzimas proteolíticas, por sua vez, estão ligadas a múltiplas funções essenciais aos microrganismos como nutrição, crescimento e diferenciação, evasão e imunomodulação da resposta do sistema imune hospedeiro, como também apresenta importância no processo de adesão à superfícies bióticas e abióticas (Ramos, Branquinha e Santos, 2016; Rapala-Kozik *et al.*, 2018; Souto *et al.*, 2018).

No gênero *Candida*, além de outros fatores de virulência cruciais na interação patógeno-hospedeiro, destaca-se também a presença de secreções de enzimas hidrolíticas no

meio celular. Estas enzimas favorecem processos como o de adesão de microrganismos a formação de seu biofilme. Desta forma, a secreção destas proteases realiza um papel de grande importância na patogenicidade dessas espécies (Ramos, Branquinha e Santos, 2016). A classe enzimática aspártico-protease (SAPs) é descrita e caracterizada pela habilidade de utilizar dois domínios aspárticos altamente conservados como sítios catalíticos de substratos proteicos. Codificadas pela família de genes SAP, as enzimas SAPs são bem caracterizadas como importantes fatores de virulência do gênero *Candida*. Esta classe de enzimas participa de diversos estágios de estabelecimento da infecção fúngica como adesão e formação de biofilme, degradação de substratos proteicos, bem como outros processos, como evasão do sistema imune hospedeiro (Ramos *et al.*, 2020). No complexo fúngico *C. haemulonii*, já foi descrito por Ramos e colaboradores (2020) a capacidade destas espécies de produzir e secretar aspártico-proteases. Esta habilidade, por sua vez, foi comprovada pela capacidade dessas espécies de hidrolisar BSA (*Bovine Serum Albumin*) incorporado em meio sólido YCB (*Yeast Carbon Base*). A confirmação de que de fato a degradação do substrato BSA estaria sendo realizada por enzimas da classe aspártico-protease foi feita pela utilização de pepstatina A, um inibidor clássico desta classe enzimática. Além disso, uma análise mais específica de cada espécie que compreende o grupo fúngico demonstrou uma maior capacidade de produção e secreção de aspártico-proteases pela espécie *C. duobushaemulonii* (Ramos *et al.*, 2020).

Outra classe enzimática de destaque no arsenal de virulência do gênero *Candida* são as serino-proteases. Esta classe enzimática é caracterizada pela presença da tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e aspártico, como também pela capacidade hidrolisar ligações peptídicas através de um resíduo de serina nucleofílico no sítio ativo (Muszewska *et al.*, 2017; Souto *et al.*, 2018). As serino-proteases podem ser ativas em ambientes intra ou extracelulares, e essa alternância, por sua vez, implica diretamente nas funções exercidas por estas enzimas em diferentes processos. Essa classe enzimática exerce papel fundamental e similar à da classe aspártico-protease, atuando em processos de degradação de substratos proteicos, clivagem do sistema complemento e evasão do sistema imune hospedeiro, como novamente na mediação dos processos de adesão e formação de biofilme (Souto *et al.*, 2018; Gandra *et al.*, 2019). A atividade de serino-proteases em espécies do complexo fúngico *C. haemulonii* foi observada e comprovada por ensaios realizados por Souto e colaboradores (2018). Tanto no extrato celular quanto no sobrenadante fúngico livre de células foi descrita a capacidade hidrolítica das enzimas secretadas por essas espécies frente a substratos como caseína, BSA, HSA (*Human Serum Albumin*), IgG (Imunoglobulina G) e HgB (Hemoglobina). Para confirmação da classe enzimática como serino-protease, foi

utilizado PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), um inibidor clássico desta classe. Foram avaliados também neste experimento a influência de fatores como pH e temperatura, onde o pH 7,0 junto com a variação de temperatura entre 37 a 42 °C demonstraram a maior capacidade de clivagem das enzimas avaliadas frente aos substratos analisados (Souto *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, a incidência de isolados e infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* vem sofrendo um aumento drástico. A elucidação de processos cruciais a patogênese, como secreção de proteases juntamente com adesão e formação de biofilme, nestas espécies negligenciadas é de enorme importância para o entendimento de mecanismos como mediação da fixação do fungo à matriz extracelular de tecidos hospedeiros. Desta forma, é importante compreender a influência das PMEs frente o funcionamento e características dos processos de adesão, formação de biofilme e secreção de proteases da espécie fúngica *C. haemulonii*.

3. OBJETIVOS

O projeto avaliou a capacidade da espécie *Candida haemulonii* em reconhecer proteínas componentes de matrizes extracelulares, especificamente fibronectina e laminina, tal como analisou a influência dessas PMEs frente a processos de adesão e formação de biofilme. Além de, por fim, avaliar também o papel de proteases secretadas e presente no biofilme fúngico na degradação dessas proteínas.

3.1. Objetivos Específicos

- a. Analisar e visualizar a capacidade da espécie *C. haemulonii* em interagir com proteínas de matrizes extracelulares, especificamente laminina e fibronectina;
- b. Avaliar a influência das PMEs no processo de adesão inicial;
- c. Investigar a influência das PMEs (laminina e fibronectina) no processo de formação de biofilme;
- d. Avaliar degradação das PMEs imobilizadas pelo sobrenadante do biofilme fúngico de *C. haemulonii*;
- e. Desvendar a classe proteolítica responsável pela degradação das PMEs pelo sobrenadante do biofilme do fungo *C. haemulonii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras fúngicas de *C. haemulonii* e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas três cepas da espécie fúngica *C. haemulonii*, que fazem parte da coleção de cepas do Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER). Estas cepas já haviam sido descritas previamente no trabalho de Ramos e colaboradores (2015), sendo denominadas Ch3, Ch4 e Ch7 (**Tabela 2**). As amostras foram obtidas entre os anos de 2005 a 2013 de onicomicoses de pacientes humanos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Todos os isolados fúngicos foram previamente caracterizados quanto à sua identificação fenotípica através de meio seletivo-indicador CHROMAGAR[®] e sistema automatizado VITEK[®], além do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para a confirmação da identificação de espécie. Para todos os seguintes experimentos, as leveduras foram crescidas em meio de cultivo *Sabouraud-glucose*, por 24 h a 37°C sob agitação. Para cada experimento, o inóculo foi ajustado utilizando tampão fosfato e as células foram enumeradas por contagem em câmara de Neubauer.

Tabela 3. Amostras utilizadas neste estudo.

Amostra	Ano de isolamento	Material clínico	Perfil de Susceptibilidade				
			AMB ¹	FLC	ITC	VRC	CAS
CH3	2009	Unha do pé	R	R	R	R	S
CH4	2009	Unha da mão	R	R	R	R	S
CH7	2009	Unha do pé	R	R	R	R	S

¹AMB: Anfotericina B; FLC: Fluconazol; ITC: Itraconazol; VRC: Voriconazol; CAS: Caspofungina; R: resistente; S: sensível. Dados extraídos de Ramos *et al.*, 2015.

4.2. Interação com PMEs

O primeiro experimento foi realizado na tentativa de avaliar se o complexo fúngico *C. haemulonii* possuía a capacidade de se ligar às proteínas de matriz extracelular, especificamente, fibronectina e laminina. Células leveduriformes da espécie fúngica *C. haemulonii* foram crescidas por 2 dias à 37°C em meio líquido Sabouraud-glucose. Os inóculos (10^7 células/ mL) foram centrifugados a uma rotação de 12000 RPM por 4 min e as células foram lavadas com tampão fosfato e deixadas sob interação com uma solução de PMEs laminina e fibronectina a uma concentração de 100 µg/mL por 3 h. Após a interação, as células foram, novamente, lavadas com tampão fosfato pH 7,0. Foi utilizado, primeiramente, um anticorpo específico para as proteínas fibronectina de plasma humano e laminina de sarcoma murino de *Engelbreth-Holm-Swarm* (*Sigma-Aldrich*, Anticorpos policlonais anti-fibronectina e anti-laminina produzidos em coelho) em uma diluição de 1:100, e foram deixados sob interação por 1 h. Novamente, após a interação, as células foram lavadas com tampão fosfato, pH 7,0. Em seguida, as células foram deixadas sob uma nova interação por 1 h com um anticorpo secundário conjugado a uma molécula de isotiocianato de fluoresceína em diluição 1:100 (FITC, *Sigma aldrich*, anticorpo associado à FITC anti-coelho IgG produzido em cabra). Finalmente, as células foram lavadas em tampão fosfato e observadas em um citômetro de fluxo (*FACSCalibur*; *Becton Dickinson Bioscience*, San Jose, CA, EUA) equipado com um laser de argônio de 15 mW, emitindo a 519 nm. A população mapeada (10.000 eventos) foi analisada para log de fluorescência usando um histograma de parâmetro único. Os resultados foram expressos como porcentagem de células fluorescentes (% CF) e como a intensidade de fluorescência média (IFM) (Bouchara *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2005).

4.3. Adesão e formação de biofilme sobre superfície revestida com PMEs

A adesão e a formação de biofilme na presença de proteínas da matriz extracelular foram analisadas com a finalidade de avaliar se as PMEs possuíam alguma influência sobre esses mecanismos de interação inicial das células. A partir desse experimento foi somente utilizada à cepa Ch4. Primeiramente, as placas de 96 poços, tanto no experimento de adesão quanto no de biofilme, foram previamente recobertas na presença de uma solução (100 µg/mL) de fibronectina ou laminina, e deixadas sob baixa temperatura e *overnight* para fixação ao substrato. Poços recobertos com tampão fosfato pH 7,0 e BSA (*Sigma-Aldrich*)

foram utilizados como controle. Na placa de adesão, 10^4 células fúngicas foram inoculadas nos poços recobertos com as PMEs para uma interação por 3 h a fim de avaliar a adesão inicial do fungo. Os poços foram então lavados com tampão fosfato e as células contadas em um microscópio ótico invertido. Na placa de biofilme, a quantidade de 10^6 células fúngicas foi incubada juntamente aos poços recobertos pelas PMEs e a formação de biofilme foi avaliada durante 24, 48, 72 e 96 h.

Por último, foi quantificado o biofilme do material aderido à placa. A fim de se quantificar a biomassa do biofilme, foi adicionado aos poços, 200 μ L metanol 99% por 15 min. O metanol foi retirado e a placa deixada secar a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado aos poços 200 μ L de cristal violeta 0,3% por 20 min. Após isto, o cristal violeta foi retirado dos poços da placa que foram lavados com água destilada até o excesso de corante ser retirado. Por fim, foi adicionado por 5 min ácido acético 30% aos poços. Parte do volume do poço da placa foi transferido para uma nova placa de 96 poços que foi lida a um comprimento de onda 590 nm em um fotoespectrômetro. Já para revelação da matriz extracelular, foi adicionado 200 μ L de safranina 0,1% por 5 min. Os poços da placa foram lavados com água destilada para retirada do excesso do corante e logo em seguida foram adicionados 200 μ L de ácido acético 30% por 5 minutos. Parte do volume dos poços também foi transferido novamente para uma nova placa e foram lidos a um comprimento de onda de 530 nm (Mello *et al.*, 2018).

4.4. Microscopia Confocal

Com intuito de visualizar a possível localização da interação das PMEs com as células fúngicas de *C. haemulonii*, foi realizada uma microscopia confocal. Células leveduriformes da espécie fúngica *C. haemulonii* (isolado Ch4) foram crescidas por dois dias a 37°C em meio líquido Sabouraud-Glucose. Após isto, foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e o inóculo inicial foi ajustado para 10^7 células e deixado sob interação com as PMEs laminina e fibronectina durante 3h. As células previamente em interação foram lavadas e centrifugadas. Este inóculo foi fixado por 30 min em formaldeído a 4%, fazendo assim a células permeáveis a marcações utilizadas no experimento. Ao fim de 30 min, o inóculo foi centrifugado e as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato. Como próximo passo após a permeabilização, as células foram incubadas com *Calcofluor White* (CW 10 μ g/mL) por 30 min. As células foram então lavadas e centrifugadas. Após a lavagem, as células foram incubadas com uma solução de iodeto de propídio (PI) a 5 μ g/mL por 10 min, novamente

acompanhada de lavagem e centrifugação para retirada do corante excedente. Por fim, as células foram incubadas com uma solução de diluição 1:100 contendo anticorpo associado à molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma aldrich*, anticorpo associado à FITC anti-coelho IgG produzido em cabra) por 30 min, sendo esta solução lavada com tampão fosfato e centrifugada após incubação. Por fim, lâminas para microscopia foram limpas com uma solução de isopropanol e as amostras preparadas. As imagens foram obtidas no microscópio confocal espectral Leica TCS SP5 e foram processadas e sobrepostas utilizando software ImageJ v1.53 (Welzel, Kastle e Sattler., 2016).

4.5. Avaliação da degradação de PMEs imobilizadas pelo sobrenadante de biofilme

A capacidade do sobrenadante do biofilme do fungo *C. haemulonii* em degradar PMEs imobilizadas foi avaliada através da técnica de imunodeteção por *Western blotting* (WB). O sobrenadante do fungo em interação com proteínas fibronectina e laminina previamente aderidas a uma placa de 96 poços foi recolhido, filtrado utilizando filtro 0,22 µm e concentrado em *SpeedVac*[®]. O concentrado então foi separado por SDS-PAGE (*Sodium DodecylSulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e transferido para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se de protocolos padrões (Ausubel, 1992). Como controle para avaliação da degradação das PMEs foi utilizado uma alíquota das proteínas intactas fibronectina e laminina. A membrana com as proteínas transferidas foi então bloqueada com uma solução de PBS contendo leite desnatado 5% e 0,5% *Tween*. Após bloqueio, as membranas foram incubadas por 2 h a 37°C com anticorpo anti-fibronectina e anti-laminina produzidos em coelho, seguida de lavagem com solução *PBS-Tween* 0.1%. A membrana novamente foi incubada por 1 h a 37 °C na presença de um anticorpo anti-coelho associado à peroxidase. Por fim, a membrana foi exposta ao kit reagente Luminol (*Sigma-Aldrich*) e foi então realizada a imunodeteção por quimioluminescência utilizando equipamento *ImageQuant LAS 4000*.

4.6. Análise da classe enzimática responsável pela degradação de PMEs em solução pelo sobrenadante do biofilme

As células leveduriformes de *C. haemulonii* foram crescidas em meio *Sabouraud-glucose* por 48 h a 37 °C. Após formação do biofilme, foi realizada a separação do sobrenadante do biofilme fúngico de seu conteúdo celular por centrifugação seguida de filtração utilizando filtro de tamanho 0,45µm. O sobrenadante então teve seu volume concentrado em 10× utilizando sistema *Amicon*[®] com membrana de 10 kDa. Por fim, o concentrado foi então submetido a uma dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Logo, 20 µL do sobrenadante concentrado foi misturado com as PMEs fibronectina e laminina, todas em concentração 100 µg/mL, e os pHs dos sistemas foram então ajustados para 7,0. As misturas então foram incubadas pelo período de 24 h a 37°C, na ausência (controle) e na presença de inibidores referentes a diferentes classes de proteases, sendo esses, pepstatina A 10 µM (aspártico protease), E-64 10 µM (cisteína protease), PMSF 1 mM (serina protease), 1,10-fenantrolina 2 mM (metaloprotease). Após o período de incubação, as amostras foram corridas e separadas em gel de SDS-PAGE 10% e foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose utilizando protocolos padrões citados no item 4.5. O mesmo procedimento pós-corrída descrito no tópico 4.5 foi adotado e seguido neste experimento. Por fim, a membrana foi exposta ao kit reagente Luminol (*Sigma-aldrich*) e foi então realizada a imunodeteção por quimioluminescência utilizando equipamento ImageQuant LAS 4000 (Rodrigues *et al.*, 2003).

4.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram repetidos três vezes em conjuntos experimentais independentes. Todas as análises e gráficos construídos foram realizados e produzidos utilizando o programa Graphpad Prism v8. Em todas as análises, o *p*-valor de 0,05 ou inferior foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Interação com PMEs

Inicialmente, foi avaliado se o complexo fúngico *C. haemulonii* possuía a capacidade de reconhecer as proteínas de matriz extracelular, especificamente, fibronectina e laminina. Primeiramente dois parâmetros foram observados durante a realização deste experimento, a % de células fluorescente/marcadas que se refere ao número de células fúngicas que foram capazes de se ligarem aos anticorpos primários e secundários específicos, tal como a intensidade de fluorescência média, que se refere a quanto essas células fúngicas conseguiram fluorescer/ brilhar. Os resultados demonstraram que ambas as proteínas foram reconhecidas e ligadas à superfície de diferentes isolados clínicos pertencentes ao complexo *C. haemulonii*, como evidenciado através de citometria de fluxo. O porcentual de células fúngicas capazes de reconhecer as PMEs, fibronectina e laminina, foi de, respectivamente: $36,5 \pm 4,5$ e $42,4 \pm 3,6$ para o isolado Ch3; $34,8 \pm 4,5$ e $57,4 \pm 5,7$ para o isolado Ch4; e $29,9 \pm 4,5$ e $48,8 \pm 5,6$ para o isolado Ch7 (**Figura 9A e 10A**). Em outro aspecto analisado durante a realização do experimento, a intensidade de fluorescência média (IFM), obteve variação de aproximadamente 50 (mínimo) a 250 (máximo) unidades de fluorescência (**Figura 9B e 10B**).

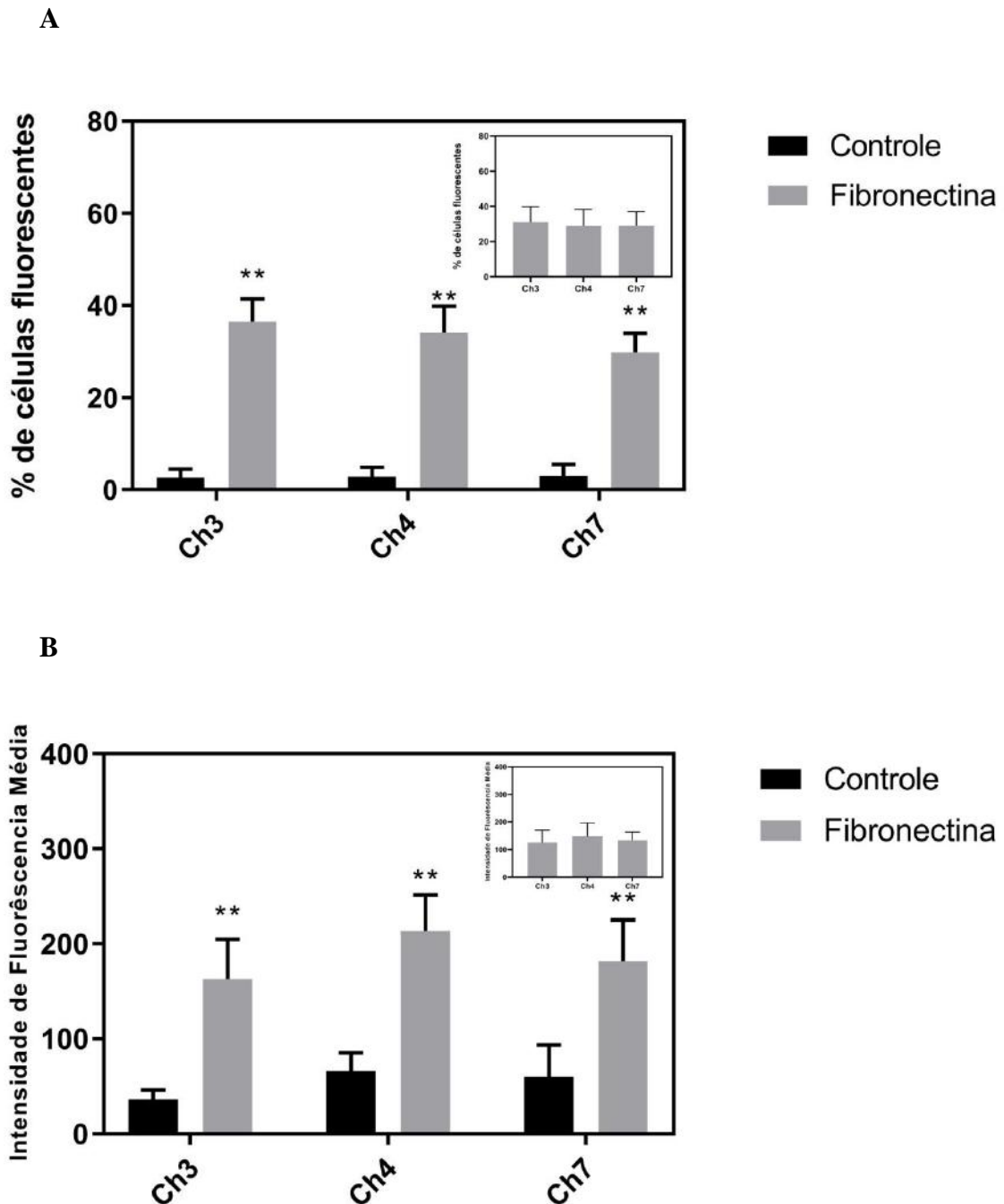
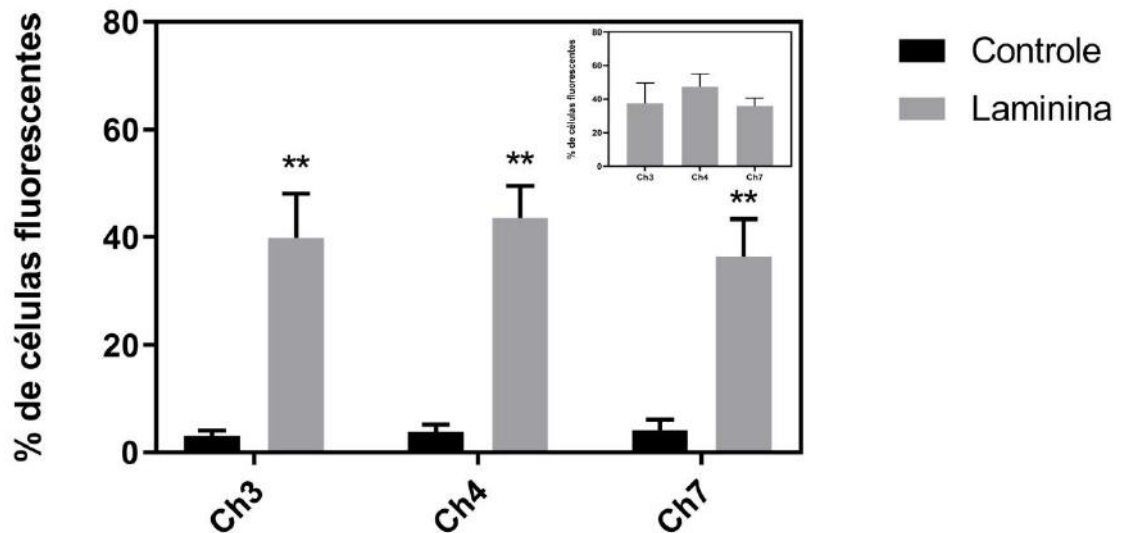


Figura 9. Interação de isolados (Ch3, Ch4 e Ch7) pertencentes ao complexo *C. haemulonii* com proteína de matriz extracelular Fibronectina. Gráfico referente à % de células fluorescentes é representado por (A) enquanto Intensidade de fluorescência média (IFM) por (B). O controle de ambos os gráficos se refere ao tratamento das células fúngicas com o anticorpo primário e secundário na ausência de Fibronectina. A capacidade de interação foi analisada pela metodologia de citometria de fluxo. 10^7 foram deixadas sob interação com a PME Fibronectina pelo tempo de 3 horas a 37°C . A marcação das células foi mediada pela utilização de anticorpo primário anti-fibronectina e anticorpo secundário conjugado a uma molécula de FITC. (**) indica p-values $< 0,0001$ (2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test) e determina a significância do resultado de reconhecimento da proteína Fibronectina, em comparação ao controle, pelas células fúngicas de *C. haemulonii*. Inset do gráfico (A e B) referente à subtração da % de células marcadas do controle e da % de células marcadas para fibronectina.

A



B

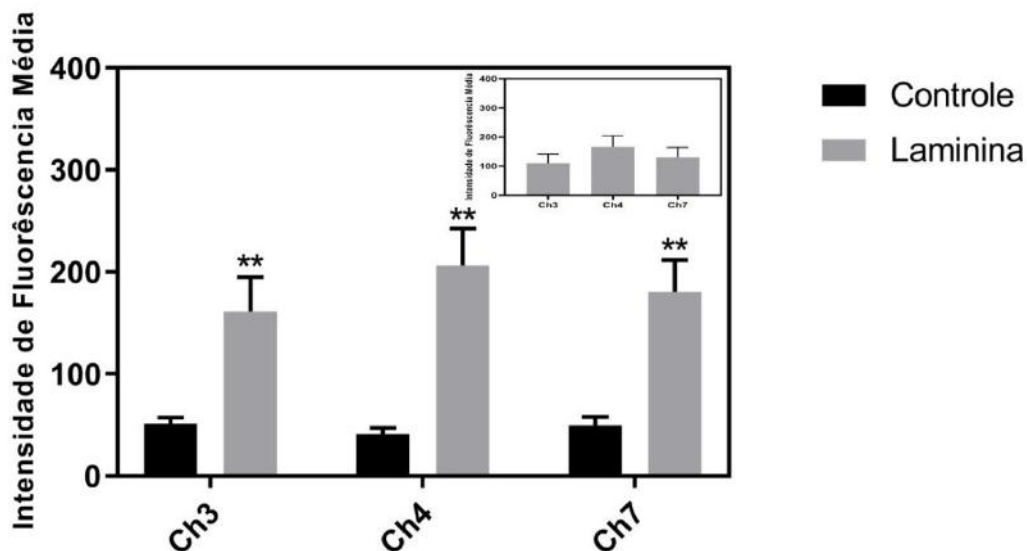


Figura 10. Interação de isolados (Ch3, Ch4 e Ch7) pertencentes ao complexo *C. haemulonii* com proteína de matriz extracelular Laminina. Gráfico referente à % de células marcadas é representado por (A) enquanto intensidade de fluorescência média (IFM) por (B). O controle de ambos os gráficos se refere ao tratamento das células fúngicas com o anticorpo primário e secundário na ausência de Laminina. A capacidade de interação foi analisada pela metodologia de citometria de fluxo. 10^7 foram deixadas sob interação com a PME Laminina pelo tempo de 3 horas a 37°C . A marcação das células foi mediada pela utilização de anticorpo primário anti-laminina e anticorpo secundário conjugado a uma molécula de FITC. (**) indica p-values < 0,0001 (2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test) determina a significância do resultado de reconhecimento da proteína Laminina, em comparação ao controle, pelas células fúngicas de *C. haemulonii*. Inset do gráfico (A) referente à subtração da % de células marcadas do controle e da % de células marcadas para Laminina.

5.2. Microscopia Confocal

Com intuito de visualizar a possível interação das PMEs Laminina e Fibronectina com as células de *C. haemulonii*, foi realizada a metodologia de microscopia confocal. Para esse experimento, foram utilizadas as marcações de *Calcofluor White* (**Figura 13A e 14A**), Iodeto de propídio (**Figura 13B e 14B**) e anticorpo conjugado a uma molécula de FITC (**Figura 13C e 14C**). Respectivamente, as marcações destacam a parede celular fúngica, núcleo e a proteína em questão. Além de corroborar os resultados obtidos durante o experimento 5.1, as imagens obtidas pela microscopia confocal permitiram visualizar a interação das PMEs com a superfície celular do isolado *C. haemulonii*, interação essa destacada pela coloração arroxeada obtida pela sobreposição das imagens A, B e C.

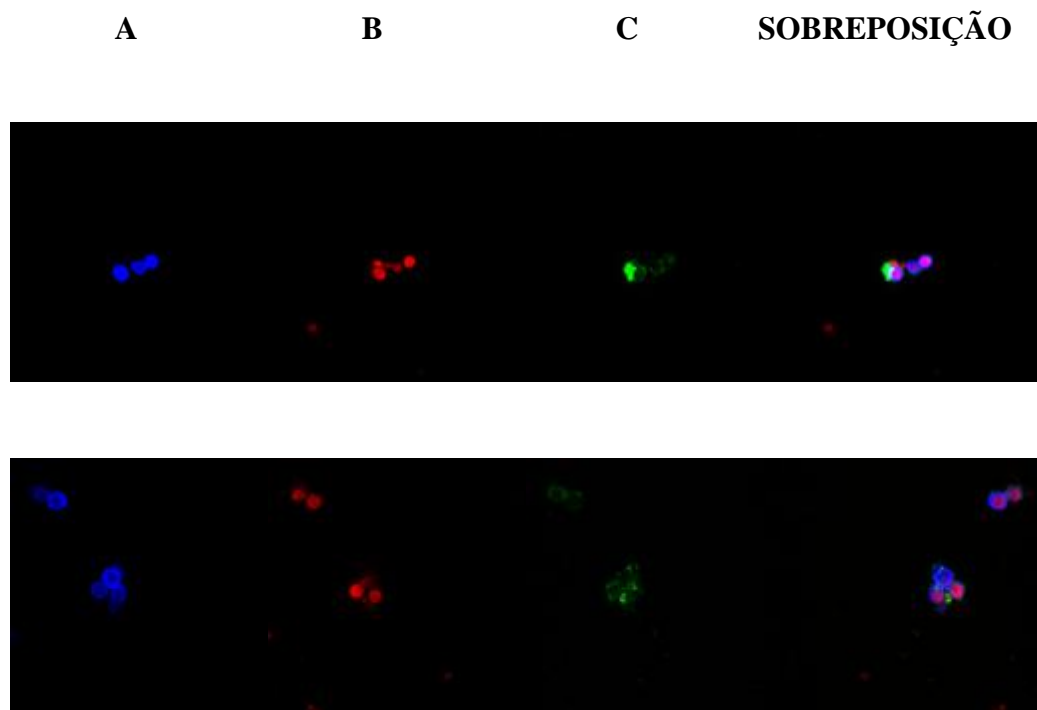


Figura 13. Microscopia confocal da espécie *C. haemulonii* em interação com a proteína de matriz extracelular Laminina. 10^7 células foram deixadas sob interação com uma solução de $100\mu\text{g}$ de Laminina pelo tempo de 3 horas a 37°C . Para marcação foram utilizados *Calcofluor White* (A), Iodeto de propídio (B) e anticorpo conjugado a FITC (C). A sobreposição das imagens obtidas pela utilização das três diferentes marcações se refere às últimas imagens da coluna. As imagens foram obtidas no microscópio confocal espectral Leica TCS SP5 e foram processadas e sobrepostas utilizando software ImageJ v 1.53.

A B C **SOBREPOSIÇÃO**

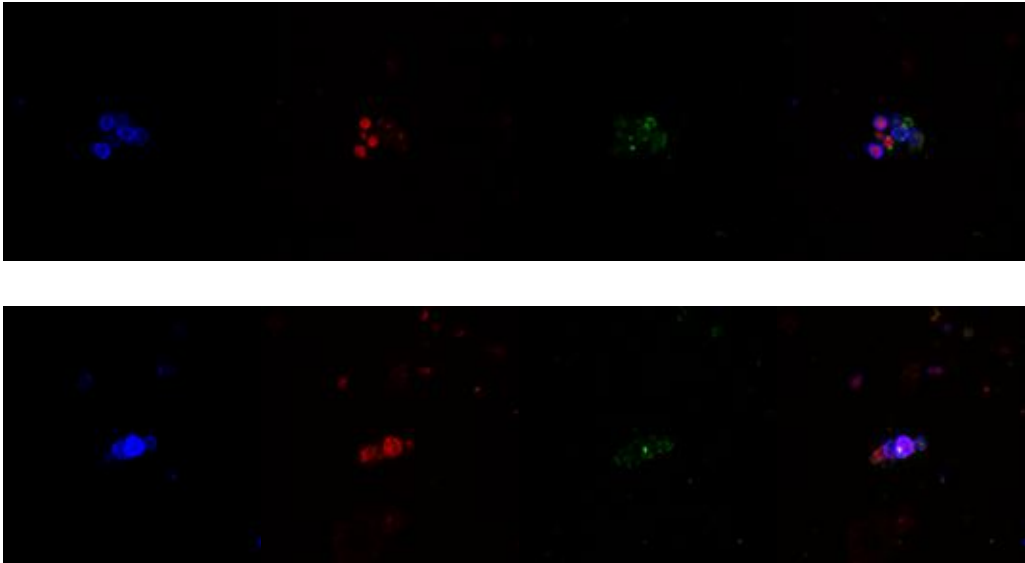


Figura 14. Microscopia confocal da espécie *C. haemulonii* em interação com a proteína de matriz extracelular Fibronectina. 10^7 células foram deixadas sob interação com uma solução de $100\mu\text{g}$ de Fibronectina pelo tempo de 3 horas a 37°C . Para marcação foram utilizados *Calcofluor White* (A), Iodeto de propídio (B) e anticorpo conjugado a FITC (C). A sobreposição das imagens obtidas pela utilização das três diferentes marcações se refere às últimas imagens da coluna. As imagens foram obtidas no microscópio confocal espectral Leica TCS SP5 e foram processadas e sobrepostas utilizando software ImageJ v1.53.

5.3. Adesão e formação de biofilme sobre superfície revestida com PMEs

A adesão e a formação de biofilme na presença de proteínas da matriz extracelular foram analisadas com a finalidade de avaliar se essas proteínas possuíam alguma influência sobre esses processos. Como controles desse experimento foram utilizados poços recobertos com PBS e BSA (uma proteína inerte e que não constitui a matriz extracelular). No resultado da adesão (**Figura 11**) foi observado um aumento significativo no número de células aderidas para as duas proteínas testadas, a saber: $48,1 \pm 6,0$ e $48,8 \pm 5,4$ fungos/campo microscópico para o isolado Ch4, respectivamente, para poliestireno recoberto com fibronectina e laminina em relação aos controles poliestireno sem recobrimento ($28,7 \pm 5,3$) e poliestireno recobertas com albumina ($28,4 \pm 7,5$). Já na formação do biofilme (**Figura 12**), não se observou nenhuma alteração significativa levando-se em consideração os dois parâmetros analisados (biomassa e matriz polimérica extracelular) em relação ao substrato poliestireno recoberto ou não recoberto com as PMEs.

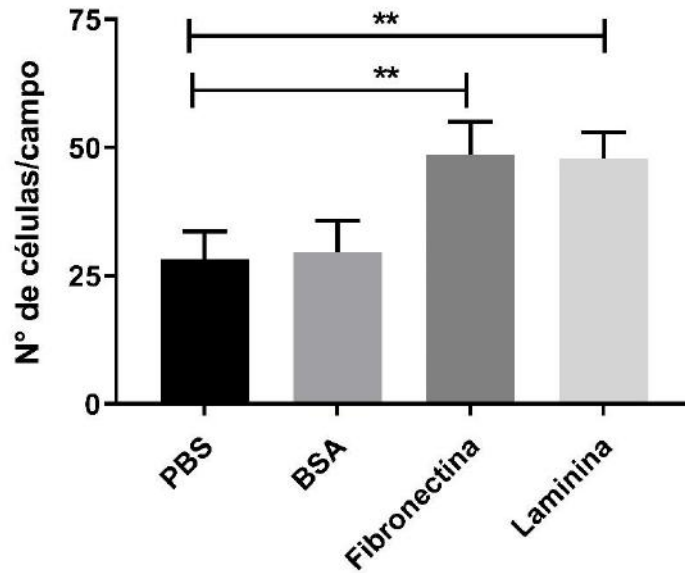


Figura 11. Capacidade de adesão da espécie *Candida haemulonii* (ch4) as proteínas de matriz extracelular Laminina e Fibronectina em placas de 96 poços. 10^4 células foram deixadas sob interação por 3 horas e 37°C com PMEs que previamente recobriam as placas de 96 poços. Foram utilizados PBS e BSA (uma proteína inerte e que não constitui a matriz extracelular) como controle do referido experimento. A quantificação do sistema foi feita por contagem em microscópio invertido e os resultados expressos pelo número de células por campo microscópico. (**) indica p-values $< 0,0001$ (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) e determina a significância do resultado de adesão das proteínas Laminina e Fibronectina em comparação com os controles PBS e BSA. O resultado é demonstrado pela média \pm desvio padrão de três experimentos distintos.

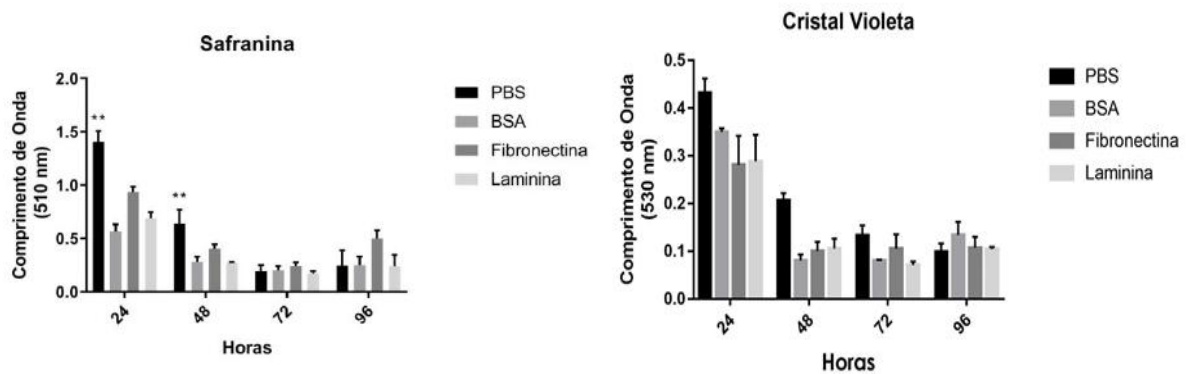


Figura 12. Quantificação da formação de biofilme por *C. haemulonii* ao longo de 96 horas de incubação em superfície recoberta por PMEs. 10^6 foram deixadas em interação pelo período de 96h e temperatura de 37°C com superfície previamente recoberta com Laminina e Fibronectina. Foram utilizados PBS e BSA (uma proteína que não constitui a matriz extracelular) como controle do referido experimento. A detecção da matriz extracelular foi realizada pela marcação de safranina e leitura a 530 nm enquanto a biomassa fúngica foi corada por cristal violeta e lida a 590 nm. (**) indica p-values < 0,0001 (one-way ANOVA, Dunnett's multiplecomparisons test) e determina a significância do resultado de quantificação do biofilme por safranina na comparação do controle PBS com as demais proteínas utilizadas. O resultado é demonstrado pela média \pm desvio padrão de três experimentos distintos.

5.4. Avaliação da degradação de PMEs imobilizadas pelo sobrenadante de biofilme

A capacidade de degradação do sobrenadante do biofilme do fungo *C. haemulonii*, que previamente foi deixado sob interação com PMEs imobilizadas em placas de 96 poços, foi avaliada através da técnica de imunodeteção por *Western blotting* (Rodrigues *et al.*, 2003). Os resultados demonstraram que no período de 24 h, foi possível observar no sobrenadante recolhido a fragmentação tanto da proteína fibronectina (**Figura 15A**) quanto laminina (**Figura 15B**) evidenciada pelo arraste na membrana em comparação com o controle (proteína intacta), que permaneceu ao topo da membrana. O mesmo perfil se repetiu para os tempos 48 e 72 h. Já no tempo de 96 horas, para ambas as proteínas, não foram possíveis observar nenhum arraste na membrana, indicando uma possível degradação total do substrato protéico.

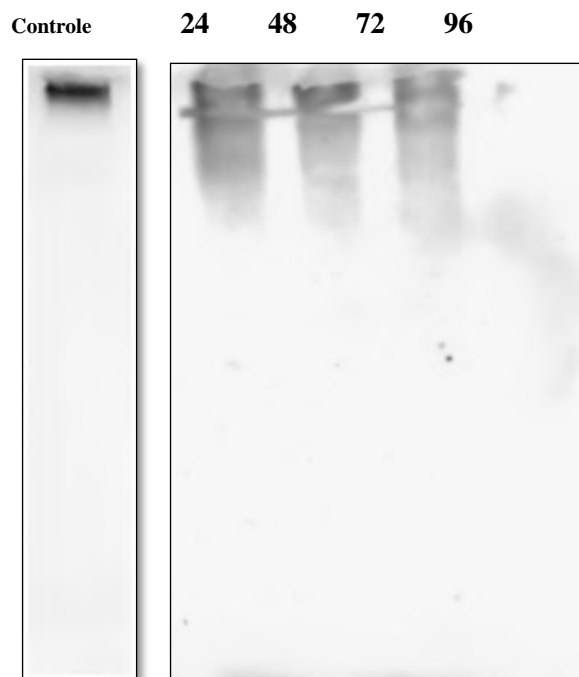
A**B**

Figura 15. Clivagem das proteínas de matriz extracelular Fibronectina (A) e Laminina (B) pelo sobrenadante do biofilme de *C.haemulonii*. 10^6 foram deixadas sob interação durante o período de 96h e temperatura de 37°C com superfície previamente recoberta com Laminina e Fibronectina. O sobrenadante do biofilme fúngico foi filtrado para obtenção de um sobrenadante livre de células. O padrão de degradação foi analisado pela metodologia de *Western Blotting* descrita nos materiais e métodos. O controle de ambos os experimentos, (A) e (B) são referentes às proteínas Fibronectina e Laminina intactas.

5.5. Análise da classe enzimática responsável pela degradação de fibronectina em solução pelo sobrenadante do biofilme

Por fim, com o intuito de analisar a classe enzimática que estaria sendo responsável pela degradação da fibronectina, foi realizado outro ensaio de *Western blotting* (Rodrigues *et al.*, 2003). Para esse experimento, além do sobrenadante do biofilme fúngico sem prévia interação com fibronectina, foram utilizados também inibidores específicos para diferentes classes enzimáticas analisadas, representadas pela nomenclatura S (serino-protease), A (aspártico-protease), M (metalo-protease) e CP (cisteíno-protease) além do C (controle) e F (degradação da proteína sem presença de inibidores). Como resultado desse experimento, foi possível observar uma inibição parcial da degradação da fibronectina, principalmente pela presença do inibidor PMSF, inibidor clássico da classe das serino-proteases, em comparação com controle (proteína intacta) e com o poço referente à degradação da PME sem a presença de qualquer inibidor (**Figura 16**). Essa inibição parcial, por sua vez, sugere que a classe das serino-proteases está estreitamente interligada à fragmentação dessa proteína.

F S A M CP C



Figura 16. Clivagem da proteína de matriz extracelular Fibronectina pelo sobrenadante do biofilme de *C.haemulonii* em interação com diferentes inibidores proteolíticos. O padrão de degradação foi analisado pela metodologia de *Western Blotting* descrita nos materiais e métodos. O sobrenadante do biofilme fúngico foi obtido a partir do meio *Sabouraud-glucose* e foi incubado por 24h a 37°C e pH 7.0 com o substrato protéico na presença e ausência de diferentes inibidores de proteases. As siglas têm significado por F: Fibronectina; S: PMSF e Fibronectina; A: Pepstatin A e Fibronectina; M: 1,10 Fenantrolina e Fibronectina; CP: E-64 e Fibronectina; C: Controle (Proteína Intacta).

6. DISCUSSÃO

Fungos pertencentes ao gênero *Candida* são espécies dispersas nos mais diferentes ambientes, estando presentes tanto no solo quanto em ambientes aquáticos quanto também exercendo grande influência no microbioma animal (Zuza-Alves *et al.*, 2019). Na última década, o complexo fúngico *C. haemulonii*, que compreende três espécies, emergiu como notória levedura associada a infecções invasivas com altas taxas de falhas na clínica (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2015). Paralelamente a isto, esse crescimento do número de casos está amplamente associado ao significativo aumento de indivíduos imunocomprometidos como transplantados e pessoas em tratamento de quimioterapia (Silva *et al.*, 2011; Lockhart e Guarner, 2019; Yamin, Husin e Harun, 2020). Como principal característica deste complexo fúngico, o amplo espectro de resistência às diferentes classes de antifúngicos utilizados na clínica como os azóis e polienos é algo que gerou bastante preocupação e alertou os principais órgãos de saúde mundiais (Colombo, Almeida Jr e Guinea, 2017; Silva *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Além disso, a dificuldade de identificação e por muitas vezes a classificação errônea dessas espécies por metodologias tradicionais é outro aspecto bastante preocupante por parte deste complexo fúngico (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012; Coles, Cox e Chao, 2020).

Apesar das altas taxas de mortalidade causadas por este complexo fúngico e de suas preocupantes características de multirresistência e dificuldade de identificação, pouco se sabe a respeito de aspectos como sua bioquímica celular e processos como o de adesão, formação de biofilme e secreção de proteases. Sendo assim, as interações avaliadas durante este estudo, portanto, se mostram possibilitar compreender de maneira ampla o papel relevante desses processos no entendimento da patogênese dos fungos pertencentes ao complexo *C. haemulonii*.

Neste estudo, buscamos avaliar se o complexo fúngico *C. haemulonii* possuía a capacidade de reconhecer e interagir com diferentes proteínas de matriz extracelular. Nesse sentido, fomos capazes de demonstrar a total capacidade desse complexo fúngico de reconhecimento e interação com as PMEs laminina e fibronectina. Por sua vez, em diversos outros trabalhos, a capacidade de reconhecimento e interação de diferentes gêneros fúngicos com moléculas que constituem a matriz extracelular hospedeira foi amplamente estudada e descrita. A exemplo disso, utilizando a mesma metodologia de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta, a capacidade de reconhecimento das proteínas laminina e fibronectina foi analisada na espécie fúngica *Sporothrix schenckii*, causadora da doença

esporotricose. O resultado deste estudo demonstrou que ambas as formas de vida, levedura e conídio, foram capazes de reconhecer as duas proteínas em questão. Além disso, foi demonstrada uma significativa maior capacidade da forma leveduriforme em reconhecer essas proteínas (Lima *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2004). Por sua vez, em estudos envolvendo a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*, também foi demonstrada a capacidade de interação com proteínas de matriz extracelular laminina, fibronectina e fibrinogênio. Neste estudo em questão, também foram demonstradas a presença de proteínas de 19 kDa e 32 kDa na parede celular fúngica que possuíam a capacidade de interagir e se ligar às diferentes PMEs analisadas, desta forma, podendo exercer um papel crucial na mediação da adesão a tecidos hospedeiros (Gonzalez *et al.*, 2005). Por fim, na superfície de células de *C. albicans*, foram descritos receptores tanto para laminina quanto para fibrinogênio, por sua vez, esses receptores foram denominados P37 e MP58, respectivamente (López-ribo *et al.*, 1996). Portanto, com uma massiva literatura envolvendo diferentes espécies, porém o mesmo processo de reconhecimento e interação a diferentes componentes pertencentes à matriz extracelular hospedeira torna claro o quão importante este processo é para aspectos ligados à interação fúngica com moléculas hospedeiras.

A aplicação da metodologia de microscopia confocal durante a realização de experimentos de observação e análise permite a obtenção de imagens de alta resolução através da realização de diversos cortes ópticos (Nwaneshiudu *et al.*, 2012). Desta forma, a microscopia confocal neste estudo permitiu a obtenção e visualização da interação fungo-proteínas de matriz extracelular. Em diferentes estudos envolvendo outras espécies de fungos como *S. schenckii*, a metodologia de microscopia confocal foi utilizada com o enfoque de confirmação da co-localização da proteína fibronectina com o anticorpo denominado mAb P6E7 na superfície celular fúngica (Teixeira *et al.*, 2009). Além disso, em estudos envolvendo *C. albicans*, foram demonstrados tanto a interação da proteína de superfície Gpm1 com células endoteliais como também a composição polissacarídica do biofilme dessa espécie em próteses dentárias (Lopez *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2015).

A presença de diversos fatores de virulência no arsenal do gênero *Candida*, incluindo a capacidade de adesão e formação de biofilme em dispositivos médicos e componentes do ambiente hospedeiro, são artifícios facilitadores dos processos de patogênese desses fungos (Silva *et al.*, 2011). Nesse contexto, este estudo demonstrou que as PMEs são capazes de exercer positivamente influência sob o processo de adesão, mas não ao processo de formação de biofilme. Por sua vez, em estudo envolvendo *C. dubliniensis* e *C. albicans*, duas espécies geneticamente relacionadas, foi observada a capacidade de interação e reconhecimento de

diferentes componentes da matriz extracelular. Apesar de ter sido demonstrado que ambas as espécies possuem boa capacidade adesiva, *C. dubliniensis* obteve destaque, principalmente em relação à adesão à laminina. Entretanto, em outro estudo envolvendo as duas espécies foi demonstrado que a capacidade de formação de biofilme foi significativamente maior em *C. albicans*. (Villar-Vidal *et al.*, 2011; Jordan *et al.*, 2014). Por sua vez, em *C. tropicalis* foi realizada uma comparação sobre a capacidade de adesão a uma superfície biótica (linhagem de células epiteliais) e abiótica (poliestireno). Em relação a isso, nesse estudo foi possível observar uma maior capacidade de adesão à superfície de poliestireno do que em linhagem de células Hela e Vero (De Souza *et al.*, 2020). Já em estudos envolvendo espécies pertencentes ao complexo *C. haemulonii*, foi demonstrado a capacidade de adesão desses fungos sob diferentes superfícies abióticas. Utilizando a mesma unidade de fungos aderidos/campo microscópico, as 3 espécies que compõem o complexo fúngico apresentaram maior capacidade de adesão à superfície composta de plástico seguida pelo material de poli-L-lisina e por último vidro (Ramos *et al.*, 2020). Além disso, em outro estudo envolvendo o complexo *C. haemulonii*, foi avaliada a propriedade de formação de biofilme em diversos tipos de dispositivos médicos composto por diferentes materiais. Por sua vez, foi demonstrado que a formação de biofilme nos cateteres compostos por poliuretano, cloridrato de polivinila e látex siliconizado foi significativamente maior em comparação ao controle de poliestireno utilizado no experimento (Ramos *et al.*, 2020). Desta forma, fica claro que as superfícies em que os microrganismos se aderem e formam biofilme podem influenciar diretamente nesses processos. Apesar disso, as PMEs utilizadas durante esse estudo não exerceram nenhuma alteração em relação à formação de biofilme do complexo fúngico *C. haemulonii*, isso pode ser explicado pela possível utilização desses substratos protéicos para outros processos importantes como nutrição.

Os fatores de virulência são descritos como mecanismos e estruturas que influenciam em diferentes processos relacionados à patogênese microbiana como a evasão da defesa do sistema imune hospedeiro e colonização, além de processos como nutrição e crescimento. Como exemplos desses fatores destacam-se o reconhecimento e adesão a diferentes superfícies e estruturas tal como a formação de biofilme (Brunke *et al.*, 2016; Leitão, 2020; Pontes *et al.*, 2020). Além disso, a secreção de diferentes tipos e classes de enzimas no meio celular tem papel crucial na interação patógeno-hospedeiro (Naglik *et al.*, 2004; Staniszevska, 2020). Nesse sentido, nossos resultados apontam para a presença de serino-proteases capazes de degradar proteínas de matriz extracelular. Por sua vez, a presença de

inúmeros trabalhos envolvendo a caracterização de diferentes classes de proteases como também sua relativa capacidade de clivagem de um amplo espectro de substratos protéicos somente enfatiza o papel crucial que este fator de virulência desempenha na patogênese de diversos gêneros fúngicos. Nesse contexto, em estudo envolvendo a espécie *C. albicans*, uma serino-protease de massa molecular de 50 kDa que havia sido caracterizada e confirmada anteriormente por sua atividade em gel de gelatina e inibição por PSMF, teve sua capacidade de hidrólise analisada frente diferentes componentes da matriz extracelular. Desta maneira, foi demonstrado que essa enzima foi capaz de degradar componentes da matriz extracelular como fibronectina e laminina como também diferentes outros substratos protéicos como HSA e HgB. Um importante aspecto deste trabalho é que foi o primeiro a caracterizar uma classe de protease que fosse capaz de hidrolisar diferentes componentes protéicos da matriz extracelular e que não fosse referente à classe aspártico-protease. Além disso, neste estudo foi descrito que diferentes meios de cultura poderiam induzir a secreção de diferentes classes de proteases no gênero *Candida* (Dos Santos *et al.*, 2006). Por sua vez, em estudo envolvendo espécies do grupo *Candida não-albicans*, como *C. guilliermondii*, novamente a capacidade de hidrólise de diferentes substratos protéicos foi analisada. Mais uma vez, uma protease da classe serino-protease foi identificada e teve seu potencial demonstrado ao clivar tanto laminina quanto fibronectina como também diferentes proteínas séricas (Santos e Soares, 2005).

Apesar de poucas informações a respeito dos mecanismos de virulência e patogênese envolvendo a interação patógeno-hospedeiro do complexo *C. haemulonii*, alguns desses processos já foram estudados e descritos. Nesse sentido, em estudo envolvendo as três espécies que compõem o complexo, foram descritas diversas proteases de tamanho variável entre 35 e 85 kDa que possuíam a capacidade de hidrolisar diferentes substratos como gelatina, caseína e albumina. Além disso, foi avaliado que essas proteases atuavam melhor em pH fisiológico e em variação de temperatura de 37°C a 42°C. Ainda no estudo em questão, as proteases descritas foram inibidas na presença de PMSF e classificadas como pertencentes à classe de serina proteases (Souto *et al.*, 2018). Por fim, diferentes estudos envolvendo outras espécies fúngicas como *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus* descreveram a atividade proteolítica e a clivagem de componentes associadas à matriz extracelular por enzimas pertencentes à classe de serino-proteases (Iadarola *et al.*, 1998; Puccia *et al.*, 1998).

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos e dos assuntos discutidos, podemos concluir que os estudos realizados referentes a complexo *Candida haemulonii* sobre a capacidade de reconhecimento e ligação das proteínas de matriz extracelular Laminina e Fibronectina, tal como sua influência nos processos de adesão podem desempenhar um papel crucial na elucidação dos processos de interação patógeno-hospedeiro, bem como no entendimento dos mecanismos de patogênese relacionados a essa espécie fúngica.

- A espécie fúngica *Candida haemulonii* foi capaz de se ligar e interagir com proteínas de matriz extracelular Laminina e Fibronectina. Os resultados apresentados pela citometria de fluxo foram corroborados e visualizados pela metodologia de microscopia confocal;
- Os poços recobertos pelas proteínas Laminina e Fibronectina apresentaram um maior número de células aderidas por campo em comparação aos controles de poliestireno e BSA;
- Não foi constatada nenhuma alteração significativa na formação de biofilme em presença de ambas as proteínas, levando em consideração os parâmetros de biomassa fúngica e matriz extracelular;
- O sobrenadante do biofilme de *Candida haemulonii* demonstrou capacidade de degradação de ambas as proteínas (Fibronectina e Laminina) em todos os períodos avaliados (24, 48, 72 e 96h), sendo o último, respectivamente, o ápice dessa degradação;
- Foi evidenciado por meio da utilização do inibidor PMSF que a classe enzimática responsável pela degradação da PME Fibronectina era uma serino-protease.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida Jr., J. N. D., Motta, A. L., Rossi, F., Abdala, E., Pierrotti, L. C., Kono, A. S. G., Diz, M. D. P. E., Benard, G. e Del Negro, G. M. B. (2012). First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics*. 67, 1229-1231.
- Almeida, F., Rodrigues, M. L. e Coelho, C. (2019). The still underestimated problem of fungal diseases Worldwide. *Front. Microbiol.* 10, 1-5.
- Araújo, D., Henriques, M. e Silva, S. (2017). Portrait of *candida* species biofilm regulatory network genes. *Trends Microbiol.* 25, 62–75.
- Araúz, A. B., Caceres, D. H., Santiago, E., Armstrong, P., Arosemena, S., Ramos, C. e Chiller, T. (2018). Isolation of *Candida auris* from 9 patients in Central America: importance of accurate diagnosis and susceptibility testing. *Mycoses*. 61, 44-47.
- Ausubel, F. M. (1992). Short protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley; p. 10–27.
- Ben-Ami, R., Berman, J., Novikov, A., Bash, E., Shachor-Meyouhas, Y. e Zakin, Finn, T. (2017). Multidrug-resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerg. Infect. Dise.* 23, 195-203.
- Blankenship, J. R. e Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 588–594.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. e Denning, D. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—Estimate Precision. *J. Fungi.* 3, 57.
- Bonnans, C., Chou, J. e Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.
- Bouchara, J. P., Sanchez, M., Chevailler, A., Marot-Leblond, A., Lissitzky, J. C., Tronchin, G. e Chabasse, D. (1997). Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus conidia*. *Infect. Immun.* 65, 2717-2724.
- Braga-Silva, L. A., Mogami, S. S., Valle, R. S., Silva-Neto, I. D. e Santos, A. L. S. (2010). Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 10, 221–224.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G. e White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13.
- Brunke, S., Mogavero S., Kasper, L. e Hube, B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol.* 32, 89-95.
- Buerth, C., Tielker, D. e Ernst, J. F. (2016). *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *App. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6981-6990.
- CDC. (2020). Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Identification of *Candida auris*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>>. Acesso em: 24/05/2020

- Cendejas-Bueno, E., Kolecka, A., Alastruey-Izquierdo, A., Theelen, B., Groenewald, M., Kostrzewa, M., Cuenca-Estrella, M., Gómez-López, A. e Boekhout, T. (2012). Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3641-3651.
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 495–544.
- Chagnot, C., Listrat, A., Astruc, T. eDesvaux, M. (2012). Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cell Microbiol.* 14, 1687-96.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T. eGhannoum, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385-94
- Ciurea, C.N., Kosovski, I.B., Mare, A.D., Toma, F., Pinteá-Simon, I.A. e Man, A. (2020). *Candida* and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms.* 8, 857.
- Coles, M., Cox, K. e Chao, A. (2020). *Candida haemulonii*: An emerging opportunistic pathogen in the United States? *IDCases.* 21, e00900.
- Colombo, A. L., Júnior, J. N. de A. e Guinea, J. (2017). Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 30, 528–538.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. e Cheng, K.-J. (1978). How bacteria stick. *stii. Am.* 238, 86–95.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318–1322.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y.eDhama, K. (2018). *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control–An update. *Micro. Pathog.* 117, 128-138.
- De Groot, P. W. J., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M. e Chauhan, N. (2013). Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. *Eukaryot. Cell.* 12, 470–481.
- De Souza, C. M., Perini, H. F., Caloni, C., Furlaneto-Maia, L.eFurlaneto, M. C. (2020). Adhesion of *Candida tropicalis* to polystyrene and epithelial cell lines: insights of correlation of the extent of adherent yeast cells among distinct surfaces. *J. Mycol. Med.* 30, 101043.
- Del Pozo, J.L. (2018) .Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 16, 51-65.
- Deorukhkar, S. C., Saini, S. e Mathew, S. (2014). Non-albicans *Candida* infection: an emerging threat. interdisciplinary perspectives on infectious diseases. 2014, 1–7.
- Desai JV, Mitchell AP, Andes DR. (2014) Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring HarbPerspect Med.* Oct 1;4(10)
- Dominguez, E.G., Zarnowski, R., Choy, H.L., Zhao, M., Sanchez, H., Nett, J.E. e Andes, D.R. (2019). Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. *mSphere.* 4, e00680-18.
- Donlan, R. M. e Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.

- Dos Santos, A. L. S., Carvalho, I. M., Silva, B. A., Portela, M. B., Alviano, C. S. e Araújo Soares, R. M. (2006). Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 209–220.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11, 30–36.
- Enoch, D. A., Yang, H., Aliyu, S. H. e Micallef, C. (2016). The changing epidemiology of invasive fungal infections. In *Human Fungal Pathogen Identification* . Volume, 17–65.
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D. e Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science.* 360, 739–742.
- Friedman, D. Z. P. e Schwartz, I. S. (2019). Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J. Fungi.* 5, 67.
- Forsberg, K., Woodworth, K., Walters, M., Berkow, E. L., Jackson, B., Chiller, T. e Vallabhaneni, S. (2018). *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Medical Mycology.*
- Gade, L., Muñoz, J. F., Sheth, M., Wagner, D., Berkow, E. L., Forsberg, K. e Litvintseva, A. P. (2020). Understanding the emergence of multidrug-resistant *Candida*: using whole-genome sequencing to describe the population structure of *Candida haemulonii* Species Complex. *Front. Genet.* 11, 554.
- GAFFI. (2019). Fungal disease frequency. Global action fund for fungal infections. Disponível em: <<https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>>. Acesso em: 10/07/2020.
- Gandra, R. M., Silva, L. N., Souto, X. M., Sengenito, L. S., Cruz, L. P. S., Braga-Silva, L. A. e Santos, A. L. S. (2019). The serine peptidase inhibitor TPCCK induces several morphophysiological changes in the opportunistic fungal pathogen *Candida parapsilosis sensu stricto*. *Med. Mycol.* 57, 1024-1037.
- Giacomazzi, J., Baethgen, L., Carneiro, L. C., Millington, M. A., Denning, D. W., Colombo, A. L. e Pasqualotto, A.C. e in association with the LIFE program. (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses.* 59, 145-150.
- Gonçalves, L.M., Del Bel Cury, A.A., de Vasconcellos, A.A., Cury, J.A., e da Silva, W.J. (2015). Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *J. Investig. Clin. Dent.* 6, 179-85.
- Gonzalez, A., Gomez, B. L., Restrepo, A., Hamilton, A. J. e Cano, L. E. (2005). Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med. Mycol.* 43, 637–645.
- Gulati, M. e Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 18, 310–321.
- Höfs, S., Mogavero, S. e Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol.* 54, 149-69.
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 326, 1216-1219.
- Iadarola, P., Lungarella, G., Martorana, P. A., Viglio, S., Guglielminetti, M., Korzus, E. e Luisetti, M. (1998). Lung Injury and Degradation of Extracellular Matrix Components by *Aspergillus Fumigatus* Serine Proteinase. *Experimental Lung Research,* 24, 233–251

Jackson, B. R., Chow, N., Forsberg, K., Litvintseva, A. P., Lockhart, S. R., Welsh, R. e Chiller, T. (2019). On the origins of a species: what might explain the rise of *Candida auris*? *Journal of Fungi*, 5, 58.

Joh, D., Wann, E. R., Kreikemeyer, B., Speziale, P. e Höök, M. (1999). Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol.* 18, 211–223.

Jordan, R. P. C., Williams, D. W., Moran, G. P., Coleman, D. C. e Sullivan, D. J. (2014). Comparative adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Med. Mycol. J.* 52, 254–263.

Kean, R. e Ramage, G. (2019) Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. *mSphere*. 4, e00458-19.

Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N. e Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: importance and applications. *Indian J. Biotechnol.* 8, 159-168.

Leitão, J.H. (2020). Microbial Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 27;21:5320.

Lenselink, E. A. (2013). Role of fibronectin in normal wound healing. *Int. Wound J.* 12, 313–316.

Lima, O. C., Figueiredo, C. C., Pereira, B. A., Coelho, M. G., Morandi, V. e Lopes-Berreza, L.M. (1999). Adhesion of the human pathogen *Sporothrixschenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 651-7.

Lima, O. C., Bouchara, J.-P., Renier, G., Marot-Leblond, A., Chabasse, D. e Lopes-Bezerra, L. M. (2004). Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrixschenckii* yeast cells and conidia. *Microb. Pathog.* 37, 131–140.

Lockhart, S.R. e Guarner, J. (2019). Emerging and reemerging fungal infections. *Semin. Diagn. Pathol.* 36, 177-181.

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. e Nobile, C. J. (2017). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 19–31.

Lopez, C.M., Wallich, R., Riesbeck, K., Skerka, C. e Zipfel, P.F. (2014). *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. *PLoSOne*. 9, e90796.

López-ribo, J., Monteagudo, C., Sepúlveda, P., Casanova, M., Martínez, J. e Chaffin, W. L. (1996). Expression of the fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans* in vitro and in infected tissues. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 117–122.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*; 193(1)

Maurer, L. M., Ma, W. e Mosher, D. F. (2016). Dynamic structure of plasma fibronectin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 213–227.

Mayer, F.L., Wilson, D. e Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119-128.

- Meguid, K. S. A., El-Wakd, M. M., Kamel, A. I., Adel, L. e Niazi, M. (2007). Elevated serum laminin level in postmenopausal osteoporosis; A Novel finding. *Egypt. Reumatol.* 29, 1441-1154.
- Mello, T. P., Oliveira, S. S. C., Frases, S., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. S. (2018). Surface properties, adhesion and biofilm formation on different surfaces by *Scedosporium* spp. and *Lomentosporaprolificans*. *Biofouling*, 34, 800-814.
- Merseguel, K. B., Nishikaku, A. S., Rodrigues, A. M., Padovan, A. C., Ferreira, R. C., de Azevedo Melo, A. S., Briones, M.R.S. e Colombo, A. L. (2015). Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infect. Dis.* 15, 1-11.
- Mokaddas, E. M., Al-Sweih, N. A. e Khan, Z. U. (2007). Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *J. Med. Microbiol.* 56, 255–259.
- Morra M. (2006). Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *EurCell Mater.* 24;12:1-15.
- Muñoz, J. E., Ramirez, L. M., Dias, L. dos S., Rivas, L. A., Ramos, L. S., Santos, A. L. S. e Parra-Giraldo, C. M. (2020). Pathogenicity levels of colombian strains of *Candida auris* and brazilian Strains of *Candida haemulonii* species complex in both murine and *Galleria mellonella* experimental models. *J. Fungi.* 6, 104.
- Muszevska, A., Stepniewska-Dziubinska, M.M., Steczkiewicz, K. . (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Sci Rep* 7, 9147.
- Myckatyn, T. M., Cohen, J. e Chole, R. A. (2016). Clarification of the definition of a “biofilm.” *Plast. Reconstr.Surg.* 137, 237–238.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. e Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol.Biol.Rev.* 67, 400-428.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. e Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell.Microbiol.* 6, 915-926.
- Nobile, C. J. e Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 71-92.
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F.H., Anderson, R.R., Schwarzenberger, K. e Young, R.C.. (2012). Introduction to confocal microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 132, (12).
- Oberoi, J. K., Wattal, C., Goel, N., Raveendran, R., Datta, S. e Prasad, K. (2012). Non-*albicans Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J. Med. Res.* 136, 997-1003.
- Polke, M., Hube, B. e Jacobsen, I.D. (2015). *Candida* survival strategies. *Adv. Appl. Microbiol.* 91, 139-235.
- Pontes, J.G.M., Fernandes, L.S., Dos Santos, R.V., Tasic, L. e Fill, T.P. (2020). Virulence Factors in the Phytopathogen-Host Interactions: An Overview. *J. Agric. Food Chem.* 68, 7555-7570.
- Puccia, R., Carmona, A.K., Gesztesi, J.L., Juliano, L. e Travassos, L.R. (1998). Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med. Mycol.* 36, 345-348.

- Puerta-Alcalde P, Cardozo C, Soriano A. e García-Vidal C. (2018). Top-ten papers in fungal infection. Rev. Esp. Quimioter. 31, 32-34.
- Queiroz-Telles, F., Fahal, A. H., Falci, D. R., Caceres, D. H., Chiller, T. e Pasqualotto, A. C. (2017). Neglected endemic mycoses. Lancet Infect. Dis.17, 367–377.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E. e Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med. Chem. 7, 493–512.
- Ramage, G., Martínez, J. P. e López-Ribot, J. L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 6, 979–986.
- Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Barbedo, L. S., Ziccardi, M., Chaves, A. L., Zancopé-Oliveira, R. M., Pinto, M. R., Sgarbi, D. B. G., Dornelas-Ribeiro, M., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. (2015). *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. JAC. 70, 111-115.
- Ramos, L. S., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. S. (2016). Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex. Med. Mycol. 55, 228–232.
- Ramos, L.S., Oliveira, S.S.C., Silva, L.N., Granato, M.Q., Gonçalves, D.S., Frases, S., Seabra, S.H., Macedo, A.J., Kneipp, L.F., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S. (2020). Surface, adhesiveness and virulence aspects of *Candida haemulonii* species complex. Med. Mycol. 58, 973-986.
- Ramos, L. S., Mello, T. P., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. (2020). Biofilm formed by *Candida haemulonii* species complex: structural analysis and extracellular matrix composition. J. Fungi. 6, 46.
- Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Braga-Silva, L. A., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. S. (2020). Secreted aspartyl peptidases by the emerging, opportunistic and multidrug-resistant fungal pathogens comprising the *Candida haemulonii* complex. Fungal Biol. 124, 700-707.
- Rapala-Kozik, M., Bochenska, O., Zajac, D., Karkowska-Kuleta, J., Gogol, M., Zawrotniak, M. e Kozik, A. (2018). Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. Mol. Oral Microbiol. 33, 113-124.
- Revich, B. A. e IuE, S. (1989). Health status of children from industrial cities with different regional geochemical structures. Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR. 14-18.
- Rodrigues, M. L., dos Reis, F. C., Puccia, R., Travassos, L. R. e Alviano, C. S. (2003). Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. Microb. Pathog. 34, 65–71.
- Sainio, A. e Järveläinen, H. (2020). Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. Cell. Signal. 66, 109487.
- Santos, A. L. S. e Soares, R. M. de A. (2005). *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43, 13–20.
- Santos, A., Sodre, C., Branquinha, M. e d' Avila-Levy, C. (2013). Editorial (Hot Topic: Proteolytic Inhibitors: Implications on Microorganisms Development, Virulence and Pathogenesis). Current Medicinal Chemistry, 20, 3035–3040.

- Santos, A.L.S, Branquinha, M.H. e Kneipp, L.F. (2017). Fungal infections: a veritable worldwide problem. *J. Infect. Dis. Med Microbiol.* 1, 1-2.
- Sardi, J. C. O., Mendes Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L. e Fusco-Almeida, A. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 62, 10-24.
- Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K. e Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53, 41–44.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C. e Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 48, 365-77.
- Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D. E. e Ponce-de-León, L. A. (2012). Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 6, 23–34.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. (2011). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 288-305.
- Silva, L.N., Oliveira, S.S.C., Magalhães, L.B., Andrade Neto, V.V., Torres-Santos, E.C., Carvalho, M.D.C., Pereira, M.D., Branquinha, M.H. e Santos, A.L.S. (2020). Unmasking the Amphotericin B Resistance Mechanisms in *Candida haemulonii* Species Complex. *ACS Infect. Dis.* 6, 1273-1282.
- Silva, L.N., Ramos, L.S., Oliveira, S.S.C., Magalhães, L.B., Squizani, E.D., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Branquinha, M.H. e Santos, A.L.S.D. (2020). Insights into the Multi-Azole Resistance Profile in *Candida haemulonii* Species Complex. *J. Fungi.* 6, 215.
- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26:397-419.
- Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F. e Riesbeck, K. (2012). Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1122–1180.
- Slavkin, H. C. (1997). Biofilms, microbial ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. *J. Am. Dent. Assoc.* 128, 492–495.
- Souto, X. M., Ramos, L. S., Branquinha, M. H. e Santos, A. L. S. (2018). Identification of cell-associated and secreted serine-type peptidases in multidrug-resistant emergent pathogens belonging to the *Candida haemulonii* complex. *Folia Microbiol.* 64, 245-255.
- Staniszewska, M. (2020). Virulence Factors in *Candida* species. *Curr Protein Pept Sci.* 21, 313-323
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. e Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Sturtevant, J. e Calderone, R. (1997). *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol.* 14, 90-7
- Taha, I.N., e Naba, A. (2019). Exploring the extracellular matrix in health and disease using proteomics. *Essays Biochem.* 63, 417-432.

- Teixeira, P.A.C., de Castro, R.A., Nascimento, R.C., Tronchin, G., Pérez Torres, A., Lazéra, M., de Almeida, S.R., Bouchara, J.P., Loureiro, Y., Penha, C.V. e Lopes-Bezerra, L.M. (2009). Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrixschenckii*. *Microbiol.* 155, 3730-3738.
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 3, MB-0001-2014
- Tronchin, G., Bouchara, J. P., Annaix, V., Robert, R. e Senet, J. M. (1991). Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. *Eur. J. Epidemiol.* 7, 23-33.
- Uppuluri, P., Pierce, C. G. e López-Ribot, J. L. (2009). *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol.* 4, 1235–1237.
- Vaca, D. J., Thibau, A., Schütz, M., Kraiczy, P., Happonen, L., Malmström, J. e Kempf, V. A. (2020). Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* 209. 277-299.
- Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T. e Chiller, T. (2016). The global burden of fungal diseases. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 30, 1–11.
- Van Uden, N. e Kolipinski, M. C. (1962). *Torulopsishaemulonii* nov. spec. a yeast from the Atlantic Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek.* 28, 78–80.
- Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G. (2011). Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *EnfermInfecc Microbiol Clin.*;29(9):660-5
- Von Lilienfeld-Toal, M., Wagener, J., Einsele, H., Cornely, O. A. e Kurzai, O. (2019). Invasive fungal infection—new treatments to meet new challenges. *Dtsch. Arztebl. Int.* 116, 271–278.
- Welzel, J., Kästle, R. e Sattler, E. C. (2016). Fluorescence (Multiwave) confocal microscopy. *Dermatol. Clin.* 34, 527–533.
- Willaert, R. (2018). Adhesins of yeasts: protein structure and interactions. *J. Fungi.* 4, 119.
- Yamin, D., Husin, A. e Harun, A. (2020). Distribution of candidemia in Malaysian tertiary care hospital revealed predominance of *Candida parapsilosis*. *Trop Biomed.* 37, 903-910.
- Zhang, H., Niu, Y., Tan, J., Liu, W., Sun, M. A., Yang, E., Wang, Q., Li, R., Wang, Y. e Liu, W. (2019). Global screening of genomic and transcriptomic factors associated with phenotype differences between multidrug-resistant and-susceptible *Candida haemulonii* strains. *Msystems*, 4, e00459-19.
- Zuza-Alves, D.L., Silva-Rocha, W.P., Francisco, E.C., de Araújo, M.C.B., de Azevedo Melo, A.S. e Chaves, G.M. (2019). *Candida tropicalis* geographic population structure maintenance and dispersion in the coastal environment may be influenced by the climatic season and anthropogenic action. *MicrobPathog.* 128, 63-68.