

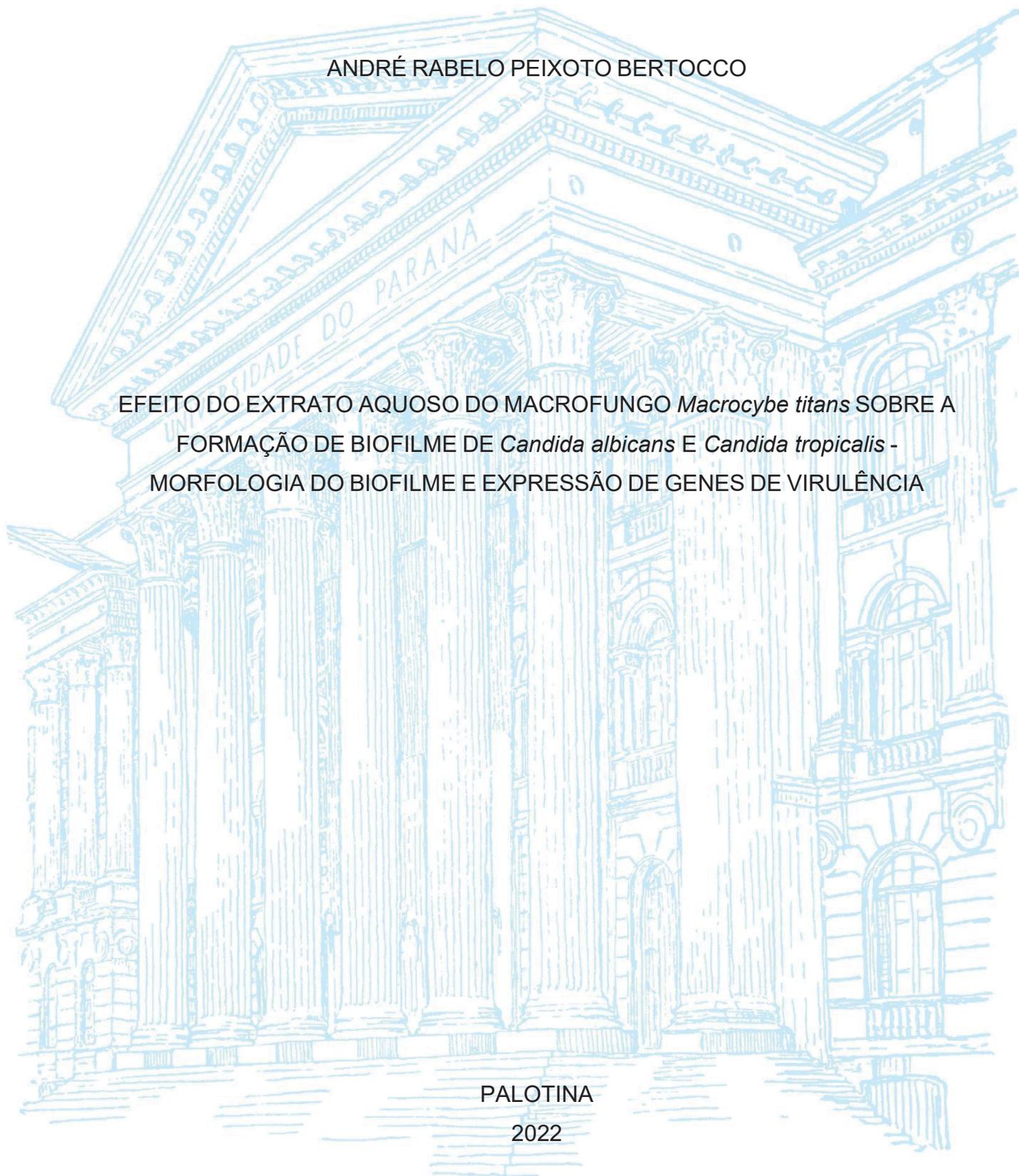
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ RABELO PEIXOTO BERTOCCO

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DO MACROFUNGO *Macrocybe titans* SOBRE A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans* E *Candida tropicalis* -  
MORFOLOGIA DO BIOFILME E EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

PALOTINA

2022



ANDRÉ RABELO PEIXOTO BERTOCCO

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DO MACROFUNGO *Macrocybe titans* SOBRE A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans* E *Candida tropicalis* -  
MORFOLOGIA DO BIOFILME E EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

B545 Bertocco, André Rabelo Peixoto  
Efeito do extrato aquoso do macrofungo *Microcybe titans* sobre a formação de biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* - morfologia do biofilme e expressão de genes de virulência / André Rabelo Peixoto Bertocco. – Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Fiorini Rosado.

1. Genes de virulência. 2. Biofilme. 3. *Microcybe titans*.  
I. Rosado, Adriana Fiorini. II. Universidade Federal do Paraná.  
III. Título.

CDU 577

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRÉ RABELO PEIXOTO BERTOCCO** intitulada: **Efeito do extrato aquoso do macrofungo *Macrocybe titans* sobre a formação de biofilme de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* - morfologia do biofilme e expressão de genes de virulência**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FIORINI ROSADO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 14 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/02/2022 15:11:04.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 14:04:22.0

EDIVAN RODRIGO DE PAULA RAMOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/02/2022 15:16:03.0

MABEL KARINA ARANTES ALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

A minha mãe, Sônia  
a meu pai, Márcio  
a minha irmã e amiga, Maria Paula

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A execução e conclusão deste trabalho somente foi possível devido a todo apoio, infraestrutura e conhecimento que uma equipe multidisciplinar pode oferecer, e por isso serei eternamente grato:

À Universidade Federal do Paraná, instituição de ensino superior público e de qualidade, que me aceitou como seu humilde aluno.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em parceria com a Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, que propiciou a base da pesquisa científica aqui realizada.

Ao Departamento de Biociências, em especial ao Laboratório de Microbiologia, que manteve suas portas abertas para usufruir de toda infraestrutura, e às servidoras técnicas do bloco Multidisciplinar, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal e aos professores Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange e Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, que me receberam sem reticências.

Ao Núcleo Experimental de Micologia Aplicada, NEMA para os íntimos, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, onde fui recebido de braços abertos por toda a equipe, que vi crescer e a batalha diária para sua melhoria contínua, e onde desenvolvi todo o cerne deste estudo.

Ao Laboratório Multiusuário - LABCA do Campus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela parceria e pelas análises realizadas.

A cada professor do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do setor Palotina da UFPR, que dispôs do seu tempo para me atender, sanar minhas dúvidas e discutirmos conhecimento científico.

À orientação dupla que tive a oportunidade de receber dos fantásticos Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fiorini Rosado e Prof. Dr. Fábio Rogério Rosado, sem os quais esse trabalho nunca poderia ter sido possível. Obrigado por todas as oportunidades, e por compartilharem comigo seu precioso conhecimento, para além desta relação acadêmica, levarei para sempre nossa amizade.

Aos meus colegas de programa, que juntos tanto sofremos, mas passo a passo estamos conseguindo construir um grupo forte de conhecimento científico.

Agradeço à Flávia Hendges e à Fernanda Buraslan por todos os extratos, meios de cultura e pesquisa prévia disponibilizados. Às queridas Vivian Mamede, Gabriela Huff e Andressa Betti por cada solução, meio de cultura e repique feito no dia anterior.

À Gabrielle Peiter, minha amiga desde o primeiro dia de prova do mestrado, com quem dividi incontáveis caronas, frustrações e sucessos e que me ajudou na obtenção de diversos resultados aqui apresentados, e cuja parceria espero que se estenda por mais diversos anos.

À Herivelto Beck, meu companheiro, que me apoiou e me aguentou falar por horas sobre essa pesquisa.

Por fim, agradeço a minha família, Sônia, Márcio e Maria Paula por sempre estar ao meu lado.

*“Sua busca começou como começam todas as buscas, com um pequeno passo em uma direção inesperada.”*

*(Impulso Aventureiro, Magic: The Gathering)*

## RESUMO

Extratos de macrofungos têm sido estudados devido à grande variedade de seus bioprodutos. Para o cogumelo basidiomiceto *Macrocybe titans* existem poucos registros na literatura sobre o seu potencial antimicrobiano. Biofilmes são importantes fatores de virulência e resistência de micro-organismos, e a busca por novos agentes terapêuticos eficazes tem se tornado uma alternativa favorável ao combate às doenças infecciosas. As leveduras do gênero *Candida* são as principais causadoras de infecções oportunistas e nosocomiais, dentre suas espécies as mais incidentes são *C. albicans* e *C. tropicalis*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos elucidar o efeito do extrato aquoso de *M. titans* sobre a formação de biofilmes produzido por essas leveduras. O extrato aquoso foi preparado através da maceração do pó de basidiomas de *M. titans* em água purificada ( $1 \text{ g.mL}^{-1}$ ). A atividade anti-biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta, microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de fluorescência (coloração por *Calcofluor White*), para biofilmes em formação e biofilmes pré-formados. A expressão de genes de virulência das leveduras nos biofilmes foi avaliada por qRT-PCR. Os *primers* utilizados foram, para *C. albicans*: *UME6*, *CHT2* e *ACT1b*; e para *C. tropicalis* foram utilizados *ALS1* e *ACT1*. Observou-se que foi necessária a concentração de  $32 \text{ mg.mL}^{-1}$  para a inibição da formação de biofilmes em *C. albicans*, e de  $16 \text{ mg.mL}^{-1}$  para inibição de *C. tropicalis*. Os biofilmes formados de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram desestruturados a partir das concentrações de  $63 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente. A análise das imagens corroborou os resultados do ensaio de cristal violeta, com a escassez de células nos biofilmes tratados em formação, e o aparecimento de espaços vazios entre os biofilmes pré-formados tratados, além de demonstrar a desconfiguração da parede celular das leveduras, com a formação de cicatrizes e rugosidades não características. Pôde-se observar a inibição da expressão dos genes *UME6* e *CHT2* nas células planctônicas tratadas tanto em formação, quanto pré-incubadas, bem como nas células sésseis de biofilme pré-formado, contudo, observou-se um pequeno aumento ( $\sim 20\%$ ) na expressão gênica em biofilme em formação tratadas. Os resultados para o gene *ALS1* se mostraram diminuídos para células planctônicas ( $\sim 4$  vezes menos expresso) e aumentados para células sésseis (de 1,5 a 2,5 vezes mais expresso). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *t* de Student utilizando-se a média e desvio padrão.

Palavras-chave: *Macrocybe titans*; *Candida tropicalis*; *Candida albicans*; biofilme; genes de virulência

## ABSTRACT

Macrofungi extract has been studied because of its great bioproducts variability. There are few studies about the antimicrobial potential of the mushroom *Macrocybe titans*. Microbial biofilm is the main virulence and resistance factor, and the research for new efficient therapeutic agents is an alternative against infectious disease. *Candida* species are the major causes of opportunistic and hospital infections, the most incident species are *C. albicans* and *C. tropicalis*. Thus, this work aims to elucidate the *M. titans* aqueous extract inhibition capacity over the yeast's biofilm formation. The aqueous extract was prepared through the powder maceration of basidiomes in purified water (1 g.mL<sup>-1</sup>). The antibiofilm activity through the violet crystal method, microscopic electronic array and the fluorescence microscopy (calcofluor white dye) were analyzed to investigate the cells and biofilm structural modifications after treatment, for biofilm formation and preformed biofilms. The virulence gene expression was evaluated through qRT-PCR. The primers used were *C. albicans*: *UME6*, *CHT2* and *ACT-1b*; and *C. tropicalis* *ALS1* and *ACT1*. The *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilm formation was inhibited at 32 mg.mL<sup>-1</sup> and 16 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively, and preformed biofilms were inhibited at 63 mg.mL<sup>-1</sup> and 8 mg.mL<sup>-1</sup>. The images showed scarcity of biofilm cells in the biofilm formation treatment, and voids appearance in the pre-formed biofilms. The yeast's cell walls showed uncharacteristic scars and deformation. The planktonic cells showed *UME6* and *CHT2* expressions inhibited in biofilm formation and preformed biofilms, as well as the sessile preformed biofilm cells. Although sessile biofilms formation cells showed increased expression (~20%). The *ALS1* gene was less expressed in planktonic cells (~4 times) and more expressed in sessile cells (~1,5 to 2,5 times). The data was evaluated with ANOVA and Student T Tests.

Keywords: *Macrocybe titans*; *Candida tropicalis*; *Candida albicans*; Biofilm; virulence genes

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Macrocybe titans</i> encontrado na região oeste do estado do Paraná - Brasil .....	19
Figura 2: Microscopia eletrônica de <i>C. albicans</i> .....	19
Figura 3: Micrografia de <i>C. tropicalis</i> .....	21
Figura 4: Ciclo de formação e maturação de biofilme .....	23
Figura 5: Placa de 96 poços após incubação de 48 horas com as suspensões de <i>C. tropicalis</i> na presença do extrato aquoso de <i>M. titans</i> .....	34
Figura 6: Placa de 96 poços após incubação de 48 horas com as suspensões <i>C. albicans</i> na presença do extrato aquoso de <i>M. titans</i> .....	35
Figura 7: Poços corados com cristal violeta .....	35
Figura 8: Efeito do extrato aquoso de <i>M. titans</i> na formação de biofilmes de <i>C. albicans</i> .....	36
Figura 9: Efeito do extrato aquoso de <i>M. titans</i> na formação de biofilmes de <i>C. tropicalis</i> .....	36
Figura 10: Placa de 96 poços com biofilme pré-formado de <i>C. tropicalis</i> na presença do extrato aquoso de <i>M. titans</i> .....	38
Figura 11: Placa de 96 poços com biofilme pré-formado de <i>C. albicans</i> na presença do extrato aquoso de <i>M. titans</i> .....	38
Figura 12: Efeito do extrato aquoso de <i>M. titans</i> em biofilmes formados de <i>C. albicans</i> .....	39
Figura 13: Efeito do extrato aquoso de <i>M. titans</i> em biofilmes formados de <i>C. tropicalis</i> .....	39
Figura 14: Micrografias eletrônicas de varredura de <i>C. tropicalis</i> após tratamento com extrato aquoso de <i>Macrocybe titans</i> .....	41
Figura 15: Micrografias eletrônicas de varredura de <i>C. albicans</i> após tratamento com extrato aquoso de <i>macrocybe titans</i> .....	42
figura 16: Microscopia de fluorescência de <i>C. tropicalis</i> com <i>calcofluor white</i> após tratamento com extrato aquoso de <i>Macrocybe titans</i> .....	44
figura 17: Gráfico da expressão gênica diferencial de <i>UME6</i> e <i>CHT2</i> em <i>C. Albicans</i> .....	46
figura 18: Gráfico da expressão gênica diferencial de <i>ALS1</i> em <i>C. tropicalis</i> .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de tratamento.....	31
Tabela 2: Pares de <i>primers</i> utilizados na reação de qPCR.....	33

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 Revisão de literatura</b> .....	<b>17</b>
3.1 O cogumelo <i>macrocybe titans</i> .....	17
3.2 <i>Candida albicans</i> .....	19
3.3 <i>Candida tropicalis</i> .....	21
3.4 Biofilmes microbianos.....	23
<b>4 Material e métodos</b> .....	<b>27</b>
4.1 Local de desenvolvimento da pesquisa.....	27
4.2 Material biológico .....	27
4.3 Preparo do extrato aquoso de <i>M. titans</i> .....	27
4.4 Ensaio do efeito do extrato de <i>M. titans</i> sobre a formação de biofilme - método do cristal violeta.....	28
4.5 Ensaio do efeito do extrato de <i>M. titans</i> sobre a formação de biofilme pré-formado - método do cristal violeta .....	29
4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme .....	30
4.7 Microscopia de fluorescência do biofilme .....	30
4.8 Análise, por qRT-PCR da expressão gênica .....	31
4.8.1 Extração do RNA.....	31
4.8.2 Síntese do cDNA.....	32
4.8.3 PCR em tempo real.....	33
<b>5 Resultados e discussão</b> .....	<b>34</b>
5.1 Rendimento do extrato aquoso .....	34
5.2 Ensaio do efeito do extrato de <i>M. titans</i> sobre a formação de biofilme .....	34
5.3 Ensaio do efeito do extrato de <i>M. titans</i> sobre biofilme formado – cristal violeta .....	37
5.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	40
5.5 Microscopia de fluorescência .....	43
5.6 Expressão dos genes de virulência em <i>c. Albicans</i> .....	45

5.7 Expressão dos genes de virulência em <i>C. tropicalis</i> .....	46
<b>6 Considerações finais e perspectivas futuras .....</b>	<b>47</b>
<b>7 Referências .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos desenvolveram e adaptaram seu metabolismo dentro do habitat para sobreviver e competir com outros organismos. Assim como as plantas, esses seres vivos são capazes de produzir metabólitos secundários, que possuem uma vasta gama de atividades biológicas, são compostos anti-inflamatórios, antioxidantes, bactericidas, fungicidas, antitumorais e antidiabéticos (ZJAWIONY, 2004; SRIDHAR *et al.*, 2011; OWAID *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; MINATO *et al.*, 2018; MILHORINI *et al.*, 2018). No entanto, são pouco frequentes os trabalhos que exploram potenciais atividades biológicas do gigantesco fungo basidiomiceto do gênero *Macrocybe*: a espécie comestível *M. titans*. Dentre eles, pode-se destacar seu potencial enzimático (WESNIEWSKI *et al.*, 2010), citotóxico, anti-oxidante (KNAK *et al.*, 2009), e antifúngico (PEREIRA, 2020).

O investimento da indústria farmacêutica sobre o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos nas últimas décadas não tem trazido grandes inovações no mecanismo molecular de ação desses, em especial até onde sabemos não foram encontrados fármacos específicos para a combater a formação de biofilmes microbianos, o que fornece um grande leque de estudos que podem envolver as inibições das vias metabólicas de formação dos biofilmes e seus genes de interesse (NOBILE e JOHNSON, 2015).

Dentre os fungos causadores de doenças em humanos e animais, as leveduras do gênero *Candida* são as de principal destaque, sendo as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* de grande interesse médico, devido a sua alta incidência em infecções oportunistas, principalmente as nosocomiais (HIDRON *et al.*, 2008). Isso pode ser explicado pelos fatores de virulência que essas leveduras possuem, como os compostos das paredes celulares, capacidade de adesão, invasão de tecidos, e produção de matriz extracelular, todas características da formação de biofilme (MCCULLOUGH *et al.*, 1996; SILVA, 2012; ZUZA-ALVES, *et al.*, 2017).

Considerando a formação de biofilmes microbianos, vários mecanismos podem explicar o aumento da resistência aos antimicrobianos nessas estruturas, incluindo a barreira física formada por substância extracelular polimérica (*extracellular polymeric substance*, EPS) (COSTERTON *et al.*, 1999; LYNCH e ROBERTSON, 2008), presença de micro-organismos dormentes e de crescimento lento no interior dessas estruturas, o que tornam os micro-organismos inertes aos antimicrobianos (COSTERTON *et al.*,

1999; MAH e O'TOOLE, 2001) e genes de resistência que são expressos exclusivamente em biofilmes (MA *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2011). Essas características dos micro-organismos contribuem para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos e impulsionam a necessidade de novas estratégias para erradicar os biofilmes causados por bactérias e leveduras. Além das bactérias que conhecidamente são formadoras de biofilme, leveduras patogênicas também podem aderir a superfícies, e formar biofilmes resistentes a medicamentos (HAWSER e DOUGLAS, 1994).

Alguns genes são sugeridos como determinantes para a formação de biofilme. Podemos citar como exemplos a sequência semelhante à aglutinina (*ALS1*) em *C. tropicalis*, que codifica grandes glicoproteínas de superfície celular e que está relacionada ao mecanismo de adesão (HOYER *et al.*, 2001) e da proteína quitinase (*CHT2*) de *C. albicans*, um gene para produção de uma proteína responsável pela lise da quitina (componente da parede celular de fungos), possibilitado a mudança de forma, de levedura para hifa (XU *et al.*, 2013) e também a proteinase aspartil secretada (*SAP*), que contribui para os processos de adesão e invasão através da degradação ou distorção das estruturas da superfície celular (SILVA *et al.*, 2013). Somando-se temos também a escassez de fármacos capazes de combater especificamente biofilmes.

Neste contexto, trabalhos que explorem o efeito de extratos de basidiomicetos sobre a formação de biofilmes microbióticos podem oferecer importante contribuição para o desenvolvimento de medidas de prevenção e combate a essas estruturas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral elucidar o efeito do extrato de *M. titans* sobre a formação de biofilmes produzido pelas leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* e verificar seus perfis da expressão de genes.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Obtenção do extrato aquoso de *M. titans*;
- b) Verificação do efeito sobre a formação de biofilme;
- c) Verificação do efeito sobre o biofilme pré-formado;
- d) Análise imagética do biofilme;
- e) Análise imagética da morfologia das leveduras;
- f) Verificação do efeito sobre a expressão de genes relacionados com a formação de biofilmes.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 O cogumelo *Macrocybe titans*

O gênero *Macrocybe* foi proposto por Pegler, quando ele distinguiu e separou através de análises morfológicas e genéticas 7 espécies pertencentes ao gênero *Tricholoma*, que possuíam características únicas e não relacionadas as outras espécies desse gênero (PEGLER, 1998). No mesmo clado callistosporoid estão presentes também os gêneros *Callistosporium* e *Pleurocollybia* (CORRALES e LÓPEZ, 2005).

O gênero *Macrocybe* é de distribuição pantropical, sendo encontrado em áreas tropicais e subtropicais ao longo de toda América Central e América do Sul, como também regiões paleotrópicas, como Sri-lanka e Índia (KARLSEN-AYALA e SMITH, 2020; PEGLER *et al.*, 1998).

Portanto *M. titans* (H.E. Bigelow & Kimbr.) Pegler, Lodge e Nakasone (1998) pertence ao filo *Basidiomycota*; Sub-filo: *Agaricomycotina*; Classe: *Agaricomycetes*;

Ordem: *Agaricales*; Família: *Tricholomataceae*. É uma espécie de coloração marrom pálida a creme, que pode crescer sozinha ou em pequenos grupos de 2-3 cogumelos. Seu píleo é convexo e pode atingir majestosos 100 cm de diâmetro, em um estipe de 7 a 20 cm, em uma massa fresca de 30 kg (Figura 1).

A espécie já foi identificada em diversos países das Américas: Estados Unidos, México, Belize, Costa Rica, Panamá, Trinidad, Colômbia, Argentina, Brasil, Venezuela e Equador (RAMIREZ *et al.*, 2017; BATTISTIN e PICCIOLA, 2015; DELONG e BREWER; 2013; CALONGE *et al.*, 2007; CORRALES e LÓPEZ, 2005).

Trata-se de uma espécie saprófita, pois são capazes de se desenvolver apenas em matéria vegetal morta, e faz parte de um grupo conhecido como fungos da podridão castanha, que são seletivos aos carboidratos que degradam como fonte de carbono, deixando, por exemplo, a lignina intacta (WISNIEWSKI *et al.*, 2010). Também não há relatos de doenças, infecções, ou podridão em matéria vegetal viva (DELONG e BREWER, 2013). Ela é particularmente atraída por locais que sofreram modificação humana, como regiões próximas a áreas de cultivo e jardins urbanos (CORRALES e LÓPEZ, 2005).

É considerada uma espécie comestível, ainda que sejam escassos estudos com relação aos metabólitos primários e secundários que podem ser encontrados no fungo (CALONGE *et al.*, 2007). Contudo sabe-se que seu extrato é bastante rico em beta-glucanas e fucogalactanas (CARBONERO *et al.*, 2007; MILHORINI *et al.*, 2018). Também possui potencial produção enzimática (WESNIEWSKI *et al.*, 2010), além de capacidade citotóxica e anti-oxidante (KNAK *et al.*, 2009), anti-helmíntica (PEREIRA *et al.*, 2015) e antifúngica (PEREIRA, 2020).

Figura 1: *Macrocybe titans* ENCONTRADO NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ - BRASIL

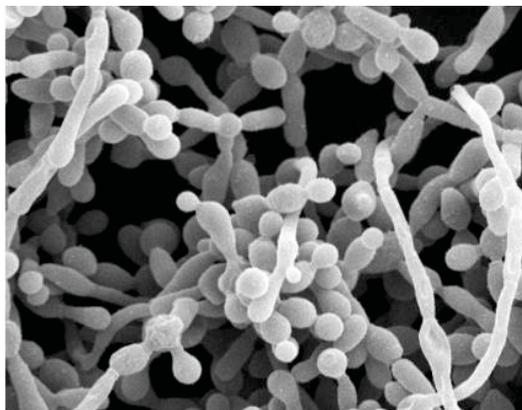


Legenda: Espécime de *M. titans* utilizada neste trabalho. Fonte: Claudemir Tezolin, Chácara Naturale (2014).

### 3.2 *Candida albicans*

*C. albicans* é um fungo ascomiceto, cujo grupo está dentro dos *Saccharomycotina*, ao lado de outras espécies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. dublinensis* e *C. parapsilosis* (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017; BUTLE e RASMUSSEN, 2009). Trata-se de uma levedura dimórfica, portanto, podendo trocar entre suas formas leveduriforme livres e filamentos, hifas, pseudo-hifas e clamidiósporos (Figura 2), dependendo do das características do meio em que se encontra (LÓPEZ-RIBOT, 2005).

Figura 2: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE *C. albicans*



Legenda: *C. albicans* em formação de biofilme, com presença de hifas e pseudo-hifas (LÓPEZ-RIBOT, 2005).

É inclusive essa capacidade de trocar de forma que possibilita a *C. albicans* cause infecções, pois em seu estado filamentoso ela possui capacidade de invasão e colonização de tecidos muito maior, do que em forma de levedura planctônica, formando biofilmes (WHITEWAY e BACHEWICH, 2007). Infecções por *Candida* spp. são citadas desde o século 2, sendo inicial nominada como *Aphthas albus*, mas apenas em meados do século 19 a natureza clínica do agente etiológico *C. albicans* foi identificada (MCCULLOUGH *et al.*, 1996).

Epidemiologicamente é o fungo com maior incidência de infecções oportunistas (HIDRON *et al.*, 2008), principalmente aquelas nosocomiais. Entre as espécies de *Candida*, é a principal causadora de infecções, chegando de 45% dos casos, com alta mortalidade para pacientes acima de 65 anos ou que passaram por procedimento cirúrgico (FU *et al.*, 2017; RAJA, 2020).

A espécie é normalmente encontrada na microbiota de seres humanos como um micro-organismo comensal, colonizando assintomaticamente tecidos como o trato gastrointestinal, cavidade oral, trato reprodutivo e pele (GULATI e NOBILE, 2016; NOBILE e JOHNSON, 2015). Indivíduos imunocompetentes normalmente não sofrem infecções por *C. albicans*, uma vez que seu sistema imune é capaz de conter a invasão do micro-organismo. Contudo indivíduos imunocomprometidos não o conseguem combater, e *C. albicans* pode trazer sérias complicações em uma infecção oportunista (LÓPEZ-RIBOT, 2005). Além de mudanças no ambiente, como alteração de pH e nutrientes ou uso de antibióticos, que também podem tornar pacientes suscetíveis (DOUGLAS, 2003; FOX e NOBILE, 2013).

McCullough e colaboradores (1996) verificaram a capacidade de infecção de *C. albicans* depende de três fatores de virulência da levedura: parede celular – composta por polissacarídeos mananas, glicanas e quitina, além de uma pequena porcentagem de proteína e lipídeos, formando uma complexa microestrutura; a capacidade de adesão – quanto mais virulenta, maior a adesão da célula ao tecido, e o que ocorre principalmente no estado filamentoso; por fim as proteinases – enzimas secretadas pelo micro-organismo que podem ter duas ações, degradação de anticorpos IgA, e também degradação das proteínas estruturais, como colágeno e queratina.

Atualmente, pode-se acrescentar à essa virulência sua incrível capacidade de formação de biofilmes, uma rede intrincada e complexa formada de múltiplas células filamentosas e leveduriformes, dispersas em uma matriz extracelular, que amplifica a

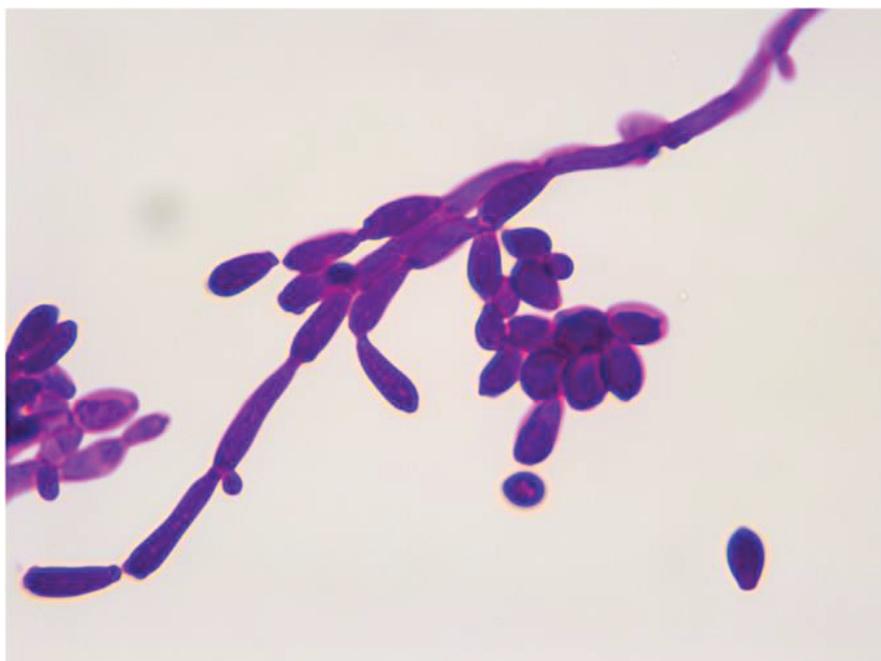
capacidade invasora do micro-organismo, além de fornecer proteção contra agentes antifúngicos (NOBILE e JOHNSON, 2015).

Dentre seus fatores de virulência e capacidade de formação de biofilmes, destacam-se os genes: *CHT2* que codifica a enzima quitinase, principalmente expressa durante a filimentação, para a redução da quitina presente na parede celular, permitindo assim que a levedura mude de forma (MCCREATH *et al.*, 1994; XU *et al.*, 2013); *UME6*, que expressa uma proteína intimamente relacionada ao aumento dos filamentos hifais e virulência e é induzida por condições de filimentação como temperatura de 37 °C e pH neutro (BANERJEE *et al.*, 2008; CARLISLE *et al.*, 2010).

### 3.3 *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis*, um fungo ascomiceto, apresenta colônias brancas ou levemente beges, cremosas e podendo apresentar bordas levemente enrugadas. Microscopicamente são células leveduriformes ovais, com blastoconídeos e presença de pseudohifas e hifas verdadeiras (SILVA, 2012) (FIGURA 3).

Figura 3: MICROGRAFIA DE *C. tropicalis*



Legenda: *C. tropicalis* corada por coloração de Gram com presença de células leveduriformes e filamentadas (ZHAI *et al.*, 2021).

A espécie é amplamente distribuída em ambientes, e comumente encontrada na microbiota humana de pele, trato gastrointestinal geniturinário (PAPON *et al.*, 2013). Contudo, desde a década de 1980 espécies de *Candida não-albicans* (CNA) levantam interesse, principalmente devido ao aumento da incidência de infecções nosocomiais (BODEY, 1993; WINGARD, 1995).

*C. tropicalis* é considerada a segunda maior causa de infecções oportunistas dentro do gênero *Candida* (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017), e principalmente os pacientes imunodeprimidos que são mais suscetíveis a infecções, tanto cutâneas quanto sistêmicas, sendo relatados casos em pacientes com AIDS, câncer, idosos e neonatos (KONTOYIANNIS *et al.*, 2001; NUCCI e COLOMBO, 2007; PAPON *et al.*, 2013).

Diversos fatores de virulência ligados ao gênero *Candida* podem explicar o interesse médio por trás da pesquisa em torno destas leveduras, *C. tropicalis* possui vários desses fatores como: adesão a tecidos e aparatos médicos, secreção de enzimas líticas, filamentação, formação de biofilme (SILVA, 2012; ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

A adesão na célula invasora é capacidade primordial da virulência deste micro-organismo, pois é o passo inicial para a colonização e infecção do hospedeiro (CANNON e CHAFFIN, 2001). Ela se dá primeiramente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, com a ajuda de proteínas específicas para esta função, conhecidas como adesinas (LI *et al.*, 2003). Depois elas serão capazes de filantar e formar biofilme, características que serão discutidas mais adiante (item 3.4). Neste sentido, pode-se chamar atenção para o gene *ALS1* (*agglutinin-like sequence*), responsável pela adesão de *C. tropicalis*, tendo sua expressão aumentada em células aderidas, quando comparada a células planctônicas (YU *et al.*, 2016).

Uma vez aderidas, as células invasoras passam a secretar diversas enzimas que vão ajudar no processo de infecção, aspartil-proteinases que serão responsáveis por degradar células de defesa e proteínas estruturais que permitirão a invasão dos tecidos; fosfolipases e lipases que degradarão lipídeos de membrana causando desestabilização das membranas plasmáticas e exposição de receptores que colaboram ainda mais com a aderência das leveduras; coagulases que desencadeiam a cascata de coagulação, resultando na formação de coágulos ao redor das células invasoras, o que dificulta o acesso dos mecanismos de defesa; e também hemolisinas, enzimas capazes de degradar a hemoglobina, com o objetivo de liberar o ferro presente

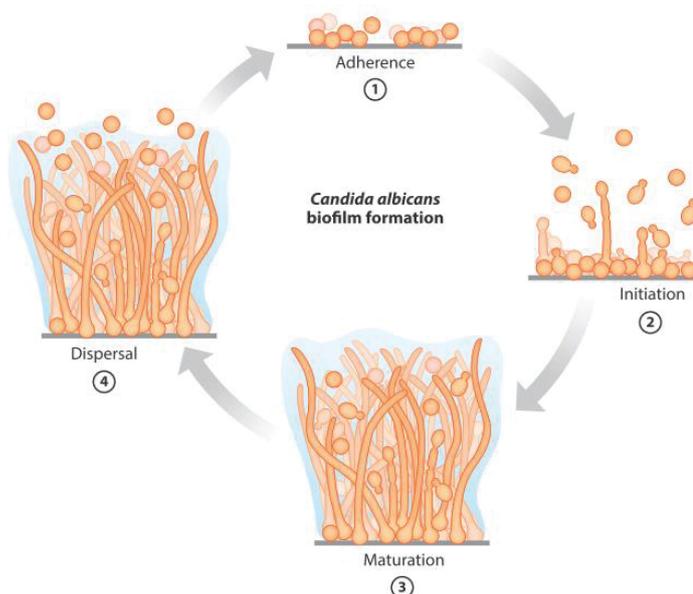
no anel porfírico, que será internalizado pela própria levedura (SARDI *et al.*, 2013; DEORUKHKAR *et al.*, 2014).

Aliada aos fatores de virulência, despontam característica de resistência a antifúngicos, tal como aos antifúngicos da família dos azóis, em especial o fluconazol. A resistência pode ocorrer de duas formas a este fármaco: através de bombas de extrusão (proteínas transportadoras) da molécula para fora da célula (SANGLARD e ODDS, 2002), ou através de uma mutação na enzima alvo *Erg11*, o que aumenta o produto final da via (o ergosterol – lipídeo de membrana dos fungos) e impede a ação do azol (FORASTIERO *et al.*, 2013). Resistência a anfotericina B também são relatadas desde a década de 1970 (WOODS *et al.*, 1974; DRUTZ e LEHRER, 1978).

### 3.4 Biofilmes microbianos

Biofilmes ocorrem quando células livres de micro-organismos se aderem a uma superfície e passam a formar microcolônias e secretar matriz extracelular. Sua formação ocorre em quatro etapas, adesão, iniciação, maturação e dispersão. A adesão das células planctônicas sendo a primeira e considerada reversível, e apenas depois da secreção da matriz extracelular que se pode considerar o biofilme firmemente aderido à superfície (COENYE e NELIS, 2010; CHEVALIER *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 4: CICLO DE FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DE BIOFILME



Legenda: Representação esquemática dos quatro estágios do ciclo de formação e maturação de biofilme microbiano: aderência, instalação, maturação e dispersão (NOBILE e JOHNSON, 2015).

A arquitetura de um biofilme é tridimensional e complexa, sendo formada por células vivas e mortas, e a matriz extracelular, que possui papel fundamental para a existência do biofilme, cujas principais substâncias são chamadas de substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substance*, EPS), as quais são basicamente componentes solúveis (polissacarídeos, polipeptídeos e ácidos nucleicos) e componentes insolúveis (celulose, pilis e flagelos) (FLEMMING *et al.*, 2016; WILSON *et al.*, 2017). O componente mais abundante da matriz extracelular é a água, podendo corresponder a aproximadamente 95% do total (FLEMMING *et al.*, 2016).

Um biofilme trará diversas vantagens para os micro-organismos que o formarem, pode ser constituído por uma ou mais espécies, cuja relação pode ser simbiótica ou comensal (COWAN *et al.*, 2016). As microcolônias imersas na matriz extracelular conseguem interagir. Já foi demonstrado que biofilmes formados por leveduras possuem uma intrincada rede de comunicação formada por hifas e pseudohifas entre as microcolônias (GACÍA-SANCHEZ *et al.*, 2004). Ao passo que em biofilmes bacterianos é possível verificar a presença de vazios no meio da matriz, como se fossem poros ou canais, que facilitam a circulação de líquidos por toda a estrutura (KARIMI *et al.*, 2015; WILKING, 2013).

Considerando as características peculiares dos biofilmes, existem escudos protetores contra antibióticos para células ali presentes. As células sésseis (que estão aderidas ao substrato) são mais resistentes aos antibióticos, além de fisiologicamente diferentes que as células planctônicas (COENYE e NELIS, 2010). Dois dos principais motivos desta resistência a antibióticos são a dificuldade de difusão da molécula pela matriz, e facilidade de transmissão de genes de resistência entre as microcolônias (FLEMMING *et al.*, 2016; WILSON *et al.*, 2017).

O interesse deste trabalho é verificar se o extrato possui capacidade de inibição de formação de biofilmes produzidos por leveduras, pois esses estudos prévios demonstraram a capacidade de alterações significativas na parede celular dos microrganismos, principalmente de leveduras como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Sendo assim justificável o estudo de maneiras de se evitar a formação de biofilmes.

### 3.5 Expressão gênica de *C. albicans* e *C. tropicalis* em biofilmes

O gene *UME6* é induzido em resposta a vários estímulos ambientais do hospedeiro e é especificamente importante para a extensão de hifas, contribuindo para

aumento da filamentação, que é importante tanto para a invasão tecidual quanto para a virulência (BANERJEE *et al.*, 2008; ZEIDLER, 2009). Foi identificado pela primeira vez como um componente do programa de desenvolvimento na forma filamentosa de *C. albicans*, sendo induzido na presença do soro do hospedeiro e à temperatura corporal de 37°C, condições que podem ser usadas *in vitro* para indução da filamentação (KADOSH e JOHNSON, 2005).

O gene *UME6* de *C. albicans* codifica uma proteína de 843 aminoácidos (um fator de transcrição) com um domínio de ligação ao DNA de dedo de zinco que é 41% idêntico ao de *Saccharomyces cerevisiae* (BANERJEE *et al.*, 2008). Carlisle *et al.* (2009) observaram que a expressão constitutiva de alto nível do gene *UME6* promove invasão e virulência tecidual em um modelo de candidíase sistêmica de camundongo e é suficiente para induzir a formação quase completa de hifas em condições não indutoras da filamentação.

Em biofilme, a expressão do gene *UME6* exibe um papel importante; Banerjee e colaboradores (2013) relatam que à medida que os níveis de expressão desse gene aumentam, as células de *C. albicans* fazem a transição de levedura para hifa, e demonstraram que a expressão aumentada de *UME6* está correlacionada com o aumento da formação de biofilme, tanto em superfícies abióticas como bióticas. Curiosamente, à medida que os níveis de *UME6* aumentam, as células transitam sequencialmente da forma de levedura para pseudo-hifas e para hifas, e há um aumento correspondente no número de genes específicos de filamentação expressos bem como nos níveis de expressão desses genes. Esses autores também observaram um aumento correspondente no nível de formação de biofilme *in vitro* e observaram também que, uma cepa de *C. albicans* expressando altos níveis constitutivos de *UME6* promoveu a invasão tecidual em um modelo tridimensional reconstituído de candidíase orofaríngea humana.

O gene *CHT2* codifica a quitinase 2 (EC:3.2.1.14), envolvida na remodelação da quitina na parede celular fúngica e desempenha um papel na separação celular durante o desenvolvimento, permitindo a transição da forma leveduriforme para hifas e sendo mais ativa na forma de hifas (KANEKO *et al.*, 2010, RAJENDRAN *et al.*, 2014, SHERRINGTON *et al.*, 2017). A quitina pode ser remodelada na parede celular através da ação de quatro quitinases (*Cht1-4*), (MCCREATH *et al.*, 1995), embora a função exata dessas enzimas ainda é pouco compreendida (RAJENDRAN *et al.*, 2014). A expressão dos genes *CHT2* e *CHT3* é maior durante o crescimento da forma

leveduriforme em comparação com a forma micelial e regulada negativamente pelo tratamento com micafungina (MCCREATH *et al.*, 1995).

Rajendran *et al.* (2014) relataram que as quitinases *Cht2* e *Cht3* foram transcricionalmente e bioquimicamente ativas durante a liberação de eDNA (DNA extracelular), em *C. albicans*, contribuindo assim para a formação de biofilme pois foi comprovado que existe uma correlação entre a liberação de eDNA, atividade de quitinase e formação de biofilme.

Existem 16 genes *ALS* na sequência do genoma de *C. tropicalis* (BUTLER *et al.*, 2009). Dentre vários grupos de genes envolvidos na formação do biofilme, a família *ALS* (*agglutinin-like sequence*), presente em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, desempenha um papel fundamental nesse processo e codifica proteínas com características de glicoproteínas de adesina na superfície celular (FILLER *et al.*, 2006). Tem sido mostrado que os genes *ALS* exibem expressão aumentada durante a formação de biofilme em *C. albicans* (O'CONNOR *et al.*, 2005), mas são raros os estudos sobre expressão da família de genes *ALS* em *C. tropicalis*, associados com formação de biofilme.

Yu *et al.* (2016) analisaram a expressão dos genes *ALS1*, 2 e 3 em biofilmes formados por diferentes linhagens de *C. tropicalis*, incluindo ATCC 750 (utilizada nesse trabalho). Esses autores verificaram que a expressão do gene *ALS3* apresentou a maior expressão em três condições testadas, sendo: biofilme em superfície de poliestireno, células planctônicas e leveduras aderidas à superfície de células epiteliais de bexiga urinária (TCC-SUP), exceto em duas linhagens e cepa ATCC 750. Comparando as expressões dos três genes *ALS* em leveduras cultivadas nessas três condições, os autores observaram um aumento expressão dos genes *ALS1* e 2 na superfície de placas de poliestireno, comparando com a expressão em células planctônicas e em TCC-SUP. Níveis aumentados de expressão do gene *ALS1* foram encontrados em uma das linhagens de *C. tropicalis*, nas placas de poliestireno (como utilizado nesse trabalho) e em TCC-SUP.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

As pesquisas foram realizadas no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina e UTFPR Campus Toledo.

### 4.2 Material biológico

Foi utilizada a linhagem identificada como MT3 do cogumelo basidiomiceto *M. titans*, coletada na região oeste do estado do Paraná e as leveduras *C. albicans* ATCC 9028 e *C. tropicalis* ATCC 750, pertencentes à micoteca do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Setor Palotina.

### 4.3 Preparo do extrato aquoso de *M. titans*

Partes do basidioma e píleo de *M. titans* foram secas em estufa a 70°C até peso constante e, através de trituração em moinho de faca, foi obtido um pó fino. O extrato aquoso foi preparado misturando 5 g do pó obtido em 20 mL de água destilada autoclavada (1:4 ou 250 mg.mL<sup>-1</sup>) e mantido em repouso a 4°C durante 24 horas (extração a frio). Posteriormente o extrato foi filtrado em voal para remoção do material não dissolvido, centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm e o sobrenadante filtrado com auxílio de seringa em filtro estéril PES (polietersulfona) hidrofílico de 0,45 µm, para esterilização.

O filtrado obtido foi liofilizado após 12 horas de congelamento das amostras, em um ultra freezer (marca COLDLAB), temperatura de -60 °C. As amostras foram dispostas no interior da câmara de secagem (modelo L-101, marca Liotop), em operação por um período de 120 horas. Após finalizar o processo de liofilização, o material foi acondicionado em freezer -20 °C, até a utilização. Para a determinação do rendimento das extrações foi utilizado o cálculo, conforme Equação 1:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Equação 1: cálculo de rendimento

Onde:

$m_{\text{extrato}}$  = massa (g) do extrato seco obtido após evaporação do solvente;

$m_{\text{amostra}}$  = massa total (g) da amostra utilizada.

O extrato liofilizado foi ressuspensão em água estéril autoclavada na proporção de 1 g.mL<sup>-1</sup>, e mais uma vez filtrado com auxílio de seringa em filtro estéril PES hidrofílico de 0,45 µm, a fim de garantir sua esterilidade, e armazenado ao abrigo da luz mantido a -20 °C.

#### 4.4 Avaliação do efeito do extrato de *M. titans* sobre a formação de biofilme - método do cristal violeta

Para o preparo do inóculo as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*, estocadas em freezer a -20 °C, foram reativadas em 5 ml de caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) por 48 horas a 35 °C e colônias isoladas foram obtidas por plaqueamento em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) por até 48 horas a 35 °C. Uma colônia da placa de SDA foi transferida para 5 ml de BHI e mantida por 24 a 48 horas a 35 °C, para indução da capacidade de formação de biofilme.

O ensaio de biofilme foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em triplicata. No primeiro poço da placa foram adicionados 200 µL de extrato aquoso liofilizado de *M. titans* na concentração de 1 g.mL<sup>-1</sup>. Nos poços 2 a 10 foram adicionados 100 µL de BHI e diluições seriadas do extrato foram realizadas na proporção 1:1, a partir do poço 1, que foi o controle negativo do ensaio (somente extrato diluído 1:1 em BHI). Posteriormente foram adicionados nesses poços 100 µL de leveduras na concentração de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL, ajustada previamente em câmara de Neubauer. O poço 11 serviu como controle positivo (somente leveduras diluídas em

BHI na proporção 1:1) e o poço 12 continha apenas meio de cultura BHI. As placas foram incubadas por 72 horas à 35 °C.

Após a etapa de desenvolvimento do biofilme, o sobrenadante foi removido com auxílio de uma micropipeta, os poços lavados três vezes com solução salina (NaCl 0,85%), e as placas foram secas invertidas em estufa à 60 °C, por uma hora. Para a coloração do biofilme, foram adicionados em cada poço 200 µL de solução de cristal violeta a 1 % e a placa mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de coloração a solução foi removida e os poços lavados 3 vezes com água destilada e secas por 30 minutos, na posição invertida. Para a leitura do biofilme foram adicionados 200 µL de álcool etílico 96% em cada poço, mantido por 20 minutos e após homogeneização, 100 µL foram transferidos para nova placa de 96 poços, para a realização da leitura do biofilme em leitor de ELISA a 595 nm (Adaptado de CHEVALIER *et al.*, 2012 e WILSON *et al.*, 2017). O ensaio foi feito em triplicata. Os dados analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *t* de Student, nível de significância  $p < 0,05$ , com o *software Statistica*® 7.

#### 4.5 Avaliação do efeito do extrato de *M. titans* sobre a formação de biofilme pré-formado - método do cristal violeta

O inóculo das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* foi preparado como descrito no item 4.4. Para analisar o efeito do extrato de *M. titans* sobre o biofilme pré-formado, 100 µL de BHI contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> das leveduras foi adicionado em poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato e as placas foram incubadas por 24 horas à 35 °C. Após a incubação, as células planctônicas (do sobrenadante e não aderidas) foram cuidadosamente removidas e os poços lavados com solução salina estéril. Em seguida foi adicionado 100 µL do extrato de *M. titans* com diluições seriadas em BHI na proporção 1:1 em BHI. A placa foi novamente incubada por mais 24 horas, a 35 °C. O controle positivo continha apenas o meio de cultura e o inóculo, enquanto o controle negativo continha apenas o meio de cultura e o extrato.

Após a segunda incubação, o sobrenadante foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina e realizada a coloração com cristal violeta e leitura em leitor de ELISA, como descrito no item 4.4. O ensaio foi feito em triplicata. Os dados

analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *t* de Student, nível de significância  $p < 0,05$ , com o *software Statistica*® 7.

#### 4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme

A microscopia eletrônica de varredura foi usada para investigar as modificações estruturais do biofilme após o tratamento com o extrato aquoso de *M. titans*.

O biofilme foi formado em lamínulas de vidro circulares estéreis (13 mm de diâmetro), para isso, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de extrato aquoso de *M. titans* e 500  $\mu\text{L}$  de solução das leveduras na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL em caldo BHI em uma placa de 24 poços, realizando uma diluição seriada também em caldo BHI até a  $125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , concentração encontrada neste trabalho como sub-inibitória da formação do biofilme em ambas as leveduras. As lamínulas de vidro foram colocadas nos poços, e realizada a incubação por 48 horas à  $35^\circ\text{C}$ . Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas com água destilada.

A preparação das amostras para a microscopia eletrônica foi realizada da seguinte forma: imersão da amostra com 1 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (diluída em PBS 0,1 M pH 7,2) durante 18 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Na sequência, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% (esta última por 2 vezes) durante 10 minutos cada.

O ponto crítico foi realizado em equipamento Leica EM CPD300 *Critical Point Dryer* durante aproximadamente 40 minutos e as imagens de MEV obtidas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 SEM com aumentos de 1.000 e 7.000 vezes.

#### 4.7 Microscopia de fluorescência do biofilme

Para a realização da Microscopia de Fluorescência foram utilizados os biofilmes preparados em lamínulas da mesma forma que para o ensaio de MEV. As lamínulas foram depositadas em lâmina de microscopia contendo hidróxido de potássio 10% e corante *Calcofluor White* ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Sigma-Aldrich), na proporção de 1:1. As imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência Olympus FSX100.

O *Calcofluor White* é um corante fluorescente que se liga à celulose e quitina – em especial ligações 1,3;1,4- $\beta$ -glucanas (HARRIS e FINCHER, 2009), e por isso, um

ótimo reagente corante de fungos, uma vez que emite coloração azul intenso ao ser excitado por iluminação fluorescente - 390 a 420 nm (PANIZO e MORENO, 2021).

#### 4.8 Análise da expressão gênica

##### 4.8.1 Extração do RNA

O RNA total foi obtido de células de *C. albicans* e *C. tropicalis* em biofilme em formação e pré-formado, sem contato com o extrato de *M. titans* e em biofilme exposto à ação do extrato do cogumelo a 125 mg.mL<sup>-1</sup>. O preparo do inóculo e as condições de incubação ocorreram conforme descrito para o ensaio de biofilme por cristal violeta, até a hora da retirada da incubação, porém foram realizados em microplacas de 24 poços, conforme descrito a seguir. Para a extração do RNA, as células planctônicas foram coletadas e reunidas em microtubos de centrifuga de 1,5 mL. Os poços contendo as células sésseis (aderidas) foram lavados 3 vezes com solução salina para remoção de células sobrenadantes remanescentes, e raspados com hastes de madeira, previamente esterilizadas por luz U.V., para remoção do biofilme formado, os quais foram diluídos com salina e transferidos para novos microtubos.

Desta forma foram obtidos seis grupos de análise para *C. albicans* e *C. tropicalis* (tabela 1).

Tabela 1: GRUPOS DE TRATAMENTO

Levedura		Grupo de tratamento		
		Controle Positivo	Biofilme em formação	Biofilme pré-formado
<i>C. albicans</i>	Planctônicas	CAP	BAP	FAP
	Sésseis	CAC	BAC	FAC
<i>C. tropicalis</i>	Planctônicas	CTP	BTP	FTP
	Sésseis	CTC	BTC	FTC

O RNA total das leveduras foi extraído utilizando-se o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega®) seguindo as instruções do fabricante para a extração de RNA de leveduras. O *pellet* celular obtido após centrifugação por 2 minutos a 14000 g foi ressuspensão com 100 µL de uma solução tampão contendo 1 M de sorbitol, 0,1% de β-mercaptoetanol, EDTA 0,1 M pH 7,4 e 50 unidades da enzima *lyticase* (Sigma-

Aldrich) com incubação por 30 minutos a 30 °C. Foram adicionados 75 µL do tampão de lise e após agitação do tubo, adicionados 350 µL de tampão de diluição de RNA, com centrifugação posterior por 10 minutos a 14000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 350 µL de etanol 95 % ultrapuro (RNAse free, Sigma-Aldrich). A solução foi transferida para uma microcoluna de filtração e centrifugada a 14000 g por 1 minuto. Após descarte do filtrado, foram adicionados na microcoluna 600 µL da solução de lavagem de RNA, e novamente centrifugada a 14000 g por 1 minuto. Após descarte do filtrado foram adicionados no centro da microcoluna 50 µL de uma solução de DNase e mantido por 15 minutos à 25 °C. A reação foi interrompida com a adição de 200 µL da solução de parada de DNase. Após nova centrifugação a 14000 g por 1 minuto, a coluna foi lavada com 600 µL da solução de lavagem de RNA por centrifugação a 14000 g por mais 1 minuto e uma segunda lavagem foi realizada com 250 µL da solução de lavagem de RNA por 2 minutos a 14000 g. O RNA extraído foi eluído adicionando 100 µL de água ultrapura (livre de nucleases) ao centro da coluna e coletado em um novo microtubo por centrifugação a 14000 g por 1 minuto. O RNA foi quantificado e verificada sua pureza em Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific).

#### 4.8.2 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o RNA total extraído utilizando o kit *GoScript™ Reverse Transcriptase* (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. Como a concentração de RNA total extraído foi variável, foi padronizada uma concentração de aproximadamente 400 ng de RNA, para todas as amostras testadas. Para a reação foram adicionados em microtubos de 200 µL o máximo de 4 µL de RNA, 0,5 µg de *primers* randômicos e a mistura foi incubada 5 minutos a 70 °C em termociclador (Applied Biosystems, modelo 2720), para eliminar *self annealing* do RNA, e na sequência, mantido por 5 minutos em banho de gelo. Aos 5 µL dessa reação foram adicionados 15 µL do mix contendo (4 µL do tampão 5x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM do mix de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 20 unidades de Inibidor de RNAse, 1 µL da enzima *GoScript™ Reverse Transcriptase* e água livre de nucleases para completar 20 µL. A reação foi realizada em termociclador usando o seguinte programa: 5 minutos a 25 °C 60 minutos a 42 °C.

#### 4.8.3 PCR em tempo real

O cDNA sintetizado na etapa anterior foi amplificado pela reação de polimerase em cadeia (*Polymerase chain reaction*, PCR) em tempo real, utilizando o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega®). A transcriptase reversa foi inativada incubando os tubos a 70 °C por 15 minutos. Um total de 4 µL do cDNA foi misturado com 10 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 1 µM de cada um dos oligonucleotídeos (primers) *forward* e *reverse* para cada gene (TABELA 2) e água livre de nucleases para completar 20 µL. A reação foi realizada em termociclador para PCR em tempo real CFX96™ (Bio-Rad). As condições de ciclagem foram: 94 °C por 2 minutos, para ativação da enzima e 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 60 °C por 60 segundos.

Tabela 2: PARES DE PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE qPCR

Levedura	Par de primers ( <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> )	
<i>C. tropicalis</i>	ALS1	F: 5' - GGGCTCTGGTCGTGATGT - 3'
		R: 5' - GTGAGGGAATGAGTCTTG - 3'
	ACT1	F: 5' - GACCGAAGCTCCAATGAATC - 3'
		R: 5' - AATTGGGACAACGTGGGTAA - 3'
<i>C. albicans</i>	UME6	F: 5' - CAGTGGTAATGGCACTAACACC - 3'
		R: 5' - GCACAACCTCCACAAATTGGTG - 3'
	CHT2	F: 5' - CAAACCACTTCCTACCCTGTTG - 3'
		R: 5' - GATGTTGGGTATGTAACCTGGGG - 3'
	ACT1b	F: 5' - CCAGCTTTCTACGTTTCC - 3'
		R: 5' - CTGTAACCACGTTTCAGAC - 3'

Os resultados das expressões gênicas foram avaliados conforme cálculo de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , uma forma de quantificação relativa, em que o gene de interesse é normalizado primeiramente com a expressão do gene *housekeeping*, e na sequência comparado ao grupo controle (LIVAKA e SCHMITTGENB, 2001).

Para investigar o efeito do extrato de *M. titans* sobre a expressão de genes envolvidos com virulência e morfogênese em *C. albicans*, cuja expressão pode estar relacionada à formação de biofilme, foi avaliada, através de qRT-PCR. A expressão dos genes *UME6* e *CHT2* frente ao gene *ACT1b* (*housekeeping*) responsável pela síntese de actina, que não varia sua expressão independentemente da exposição ou não das células ao extrato. Através dos resultados de expressão gênica do *ACT1b* foi

possível padronizar os dados pelo cálculo de  $\Delta\Delta cT$  e obter resultados mais precisos e exatos da comparação da expressão gênica de células tratadas e não tratadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

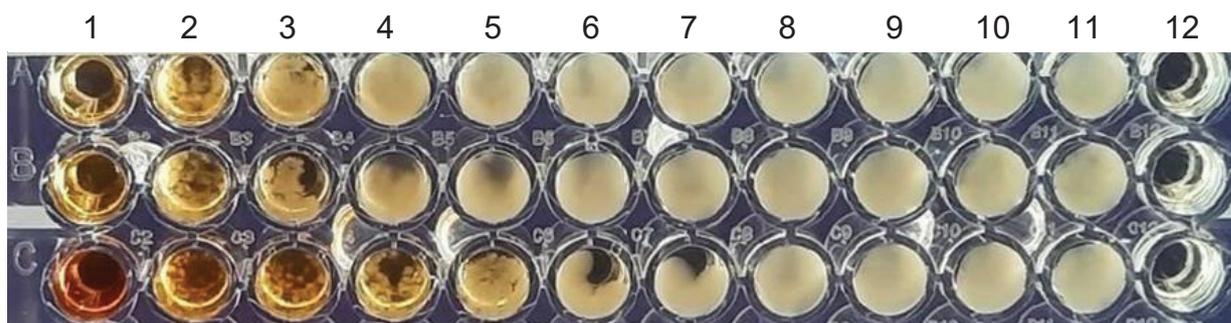
### 5.1 Rendimento do extrato aquoso

A partir de 25 g de *M. titans* secos e triturados, macerados por 24 horas 4 °C em 100 mL de água purificada obteve-se 85,7 g de extrato aquoso filtrado. Após liofilização, a matéria seca obtida foi de 9,4 g, gerando um rendimento 37,6%.

### 5.2 Avaliação do efeito do extrato de *M. titans* sobre a formação de biofilme

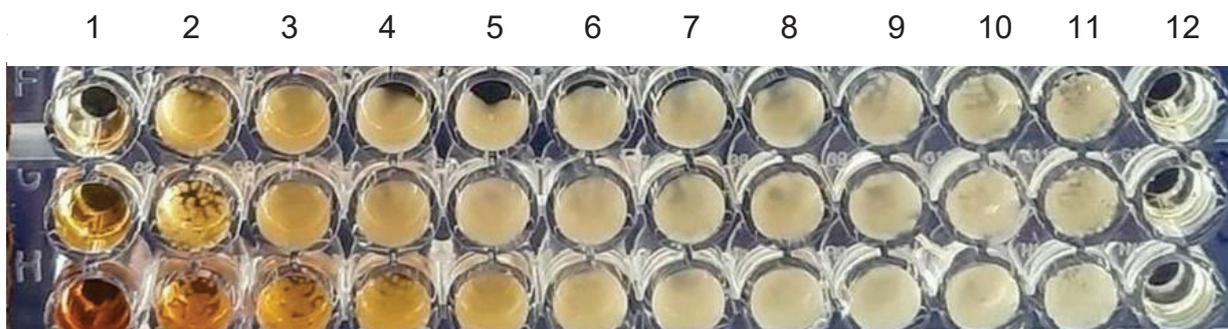
A utilização de placas de poliestireno tem se mostrado uma boa estratégia para propiciar o crescimento de leveduras (MARIONI *et al.*, 2016). Após a incubação é possível distinguir intensidades diferentes de turvação entre os poços (FIGURAS 5 e 6).

Figura 5: PLACA DE 96 POÇOS APÓS INCUBAÇÃO DE 48 HORAS COM AS SUSPENSÕES DE *C. tropicalis* NA PRESENÇA DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



LEGENDA – Ensaio realizado em triplicata (linhas: A, B e C). Coluna 1 – Controle negativo com extrato + BHI (1:1); colunas 2 a 10 – diluição seriada do extrato + suspensão das leveduras, em que coluna 2 possui 250 mg.mL<sup>-1</sup> de extrato e coluna 10 possui 1 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 11 – controle positivo com suspensão de leveduras; coluna 12 – controle negativo do caldo BHI.

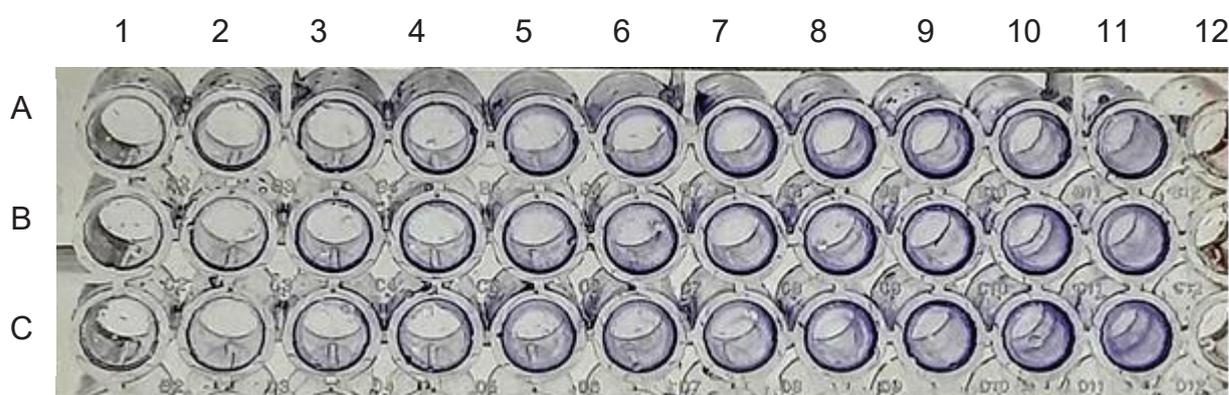
Figura 6: PLACA DE 96 POÇOS APÓS INCUBAÇÃO DE 48 HORAS COM AS SUSPENSÕES *C. albicans* NA PRESENÇA DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



LEGENDA – Ensaio realizado em triplicata (linhas: F, G e H). As colunas possuem a seguinte conformação: coluna 1 – Controle negativo com extrato + BHI (1:1); colunas 2 a 10 – diluição seriada do extrato + suspensão das leveduras, em que coluna 2 possui  $250 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato e coluna 10 possui  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; coluna 11 – controle positivo com suspensão de leveduras; coluna 12 – controle negativo do caldo BHI.

Após a coloração com cristal violeta também é possível notar diferentes intensidades de aderência do corante às paredes dos poços (FIGURA 7).

Figura 7: POÇOS CORADOS COM CRISTAL VIOLETA



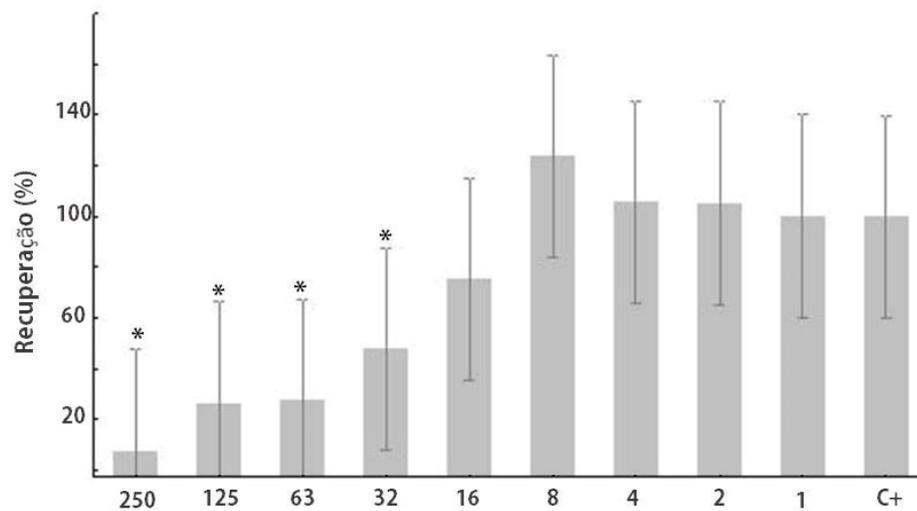
LEGENDA – poços após lavagem e remoção das células planctônicas, com a células aderidas coradas com cristal violeta, na seguinte conformação: coluna 1 – Controle negativo com extrato + BHI (1:1); colunas 2 a 10 – diluição seriada do extrato + suspensão das leveduras, em que coluna 2 possui  $250 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato e coluna 10 possui  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; coluna 11 – controle positivo com suspensão de leveduras; coluna 12 – controle negativo do caldo BHI.

Como demonstrado nos gráficos a seguir (FIGURAS 8 e 9), o extrato aquoso de *M. titans* foi capaz de inibir a formação de biofilme nas espécies de levedura testadas, em uma curva dose-resposta. Pode-se observar que a espécie de *C. albicans* apresenta maior resistência ao extrato, sendo necessário o mínimo de concentração em  $32 \text{ mg.mL}^{-1}$  para uma inibição de aproximadamente 52% ( $p = 0,0282$ ), pois concentrações menores, como a de  $16 \text{ mg.mL}^{-1}$  inibem apenas aproximadamente 25%

do biofilme, e não apresentam diferença significativa no crescimento do biofilme ( $p > 0,05$ ), em comparação ao grupo controle.

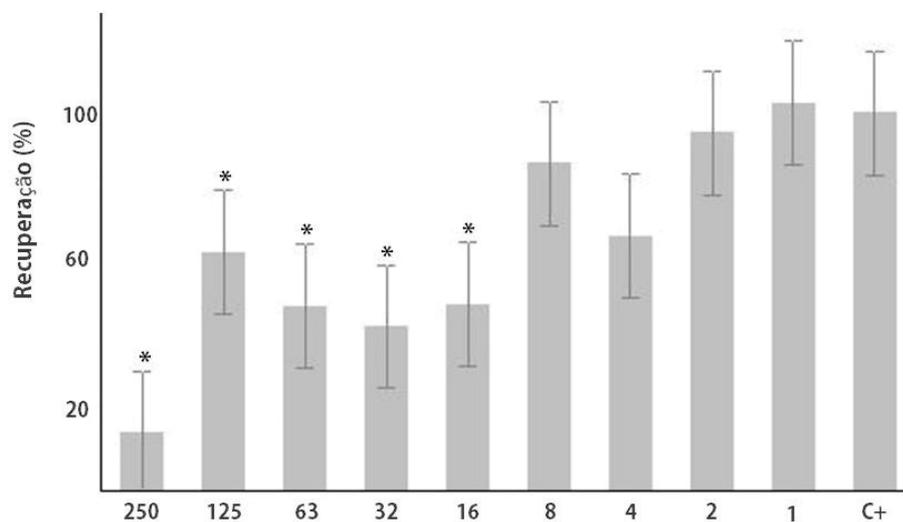
Por outro lado, a levedura *C. tropicalis* se mostra mais sensível a presença do extrato, em que o mínimo necessário para uma inibição com diferença estatística é a concentração de  $16 \text{ mg.mL}^{-1}$  que apresenta uma diminuição de  $\sim 51\%$  ( $p = 0,0035$ ) do crescimento da biomassa do biofilme, contudo a partir de  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a inibição não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Figura 8: EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans* NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *C. albicans*



LEGENDA – Efeito do extrato aquoso de *M. titans* na formação de biofilmes de *C. albicans*. Barra de erro indica o erro padrão da triplicata \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) comparado com o biofilme não tratado (C+).

Figura 9: EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans* NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *C. tropicalis*



LEGENDA – Efeito do extrato aquoso de *M. titans* na formação de biofilmes de *C. tropicalis*. Barra de erro indica o erro padrão da triplicata \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) comparado com o biofilme não tratado (C+).

Diferenças de susceptibilidade entre as espécies do gênero *Candida* já foram relatadas anteriormente, e podem variar dependendo do tipo de substância utilizada. Silva-Dias e colaboradores (2013) demonstraram que cepas de *C. albicans*, assim como demonstrado aqui, são menos suscetíveis ao hidrogel de quitosana, quando comparadas a *C. tropicalis*. Ao passo que a utilização de éster fentanil de ácido cafeico precisa do dobro da concentração de efeito sobre *C. albicans* para ter efeito sobre o biofilme de *C. tropicalis* (ALFARRAYEH *et al.*, 2021), assim como as leituras de absorbância, indicativas da quantidade de biofilme formado, de *C. tropicalis* também são maiores do que *C. albicans* sob a ação do óleo de *Pelargonium graveolens* (GIONGO *et al.*, 2016).

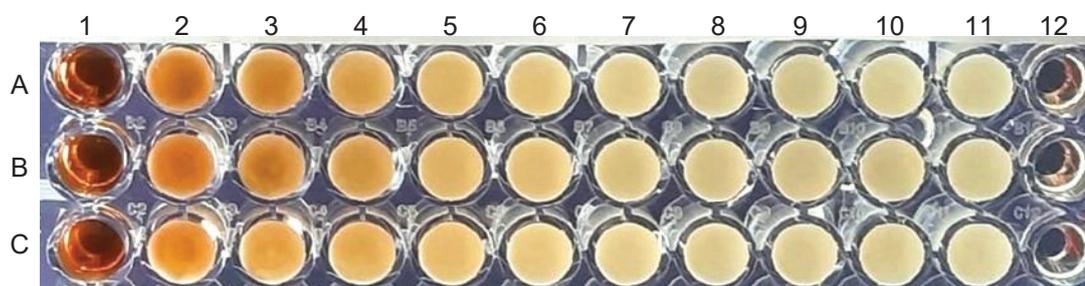
Estes resultados vão ao encontro da ação anti-biofilme de outros extratos vegetais presentes na literatura, como os de *Heterophyllaea pustulata*, *Camellia japonica*, *Thuja orientalis* e *Cymbopogon citratus* (MARIONI *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2017; SAHAL *et al.*, 2020). No entanto, são escassos os estudos sobre extratos de outras espécies de fungos e seu efeito sobre a formação de biofilmes (ZHOUL *et al.*, 2017), para o gênero *Macrocybe* foram encontrados artigos apenas sobre sua ação antimicrobiana (MO e ZHANG, 2009; ACHARYA, 2014; KHATUA, *et al.*, 2017).

Considerando-se a atual busca por extratos naturais capazes de inibir a formação de biofilmes quando aplicados a superfícies (CHEN *et al.*, 2013), em especial superfícies de aparatos médicos utilizados em pacientes acamados em hospitais, o extrato de *M. titans* demonstra com potencial para o desenvolvimento de um fármaco anti-biofilme.

### 5.3 Avaliação do efeito do extrato de *M. titans* sobre biofilme formado – cristal violeta

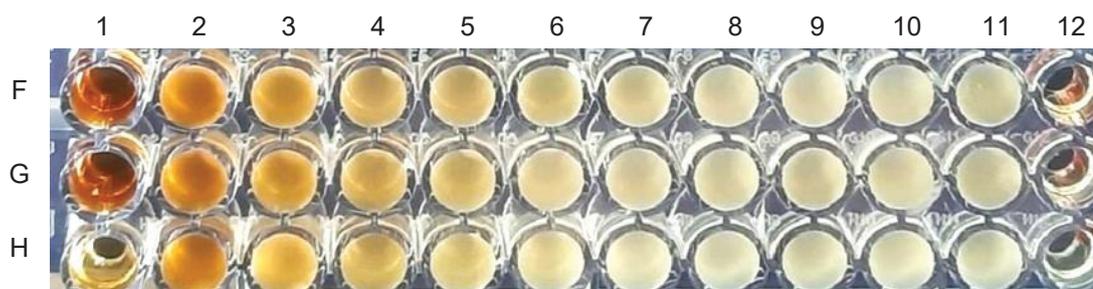
Após a incubação final das leveduras e antes do processo de coloração com cristal violeta, todos os poços com leveduras estão turvos, demonstrando a prévia formação do biofilme, com exceção dos poços de controle negativo do extrato e do meio de cultura (FIGURAS 10 e 11).

Figura 10: PLACA DE 96 POÇOS COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *C. tropicalis* NA PRESENÇA DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



LEGENDA – Ensaio realizado em triplicata (linhas: A, B e C). As colunas possuem a seguinte conformação: coluna 1 – Controle negativo com extrato + BHI (1:1); colunas 2 a 10 – diluição seriada do extrato + suspensão das leveduras, em que coluna 2 possui  $250 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato e coluna 10 possui  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; coluna 11 – controle positivo com suspensão de leveduras; coluna 12 – controle negativo do caldo BHI.

Figura 11: PLACA DE 96 POÇOS COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *C. albicans* NA PRESENÇA DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans*



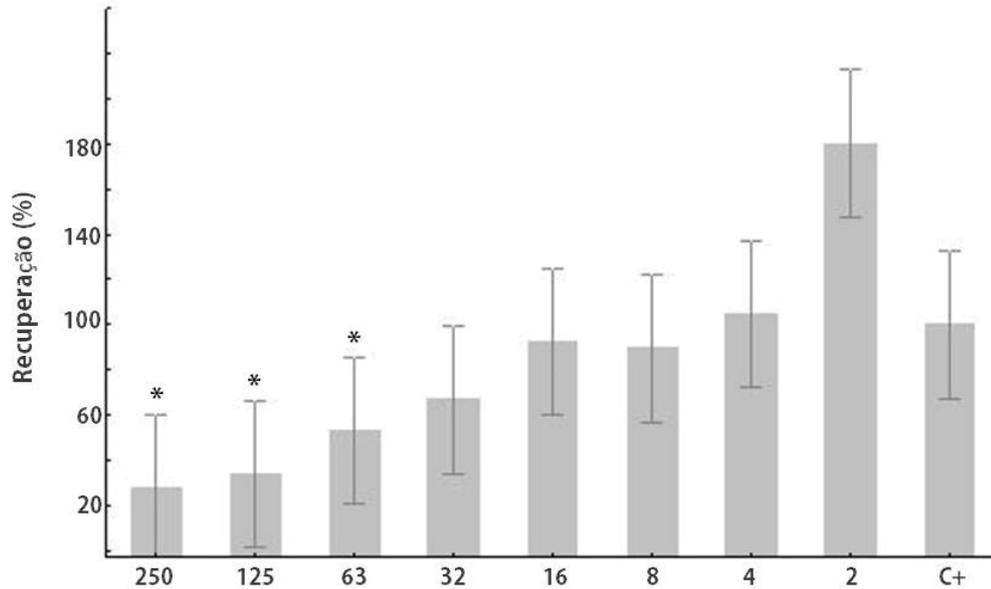
LEGENDA – Ensaio realizado em triplicata (linhas: F, G e H). As colunas possuem a seguinte conformação: coluna 1 – Controle negativo com extrato + BHI (1:1); colunas 2 a 10 – diluição seriada do extrato + suspensão das leveduras, em que coluna 2 possui  $250 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato e coluna 10 possui  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; coluna 11 – controle positivo com suspensão de leveduras; coluna 12 – controle negativo do caldo BHI.

Similarmente aos resultados encontrados para o efeito do extrato de *M. titans* sobre a formação de biofilmes, os biofilmes pré-formados das espécies de leveduras (FIGURAS 12 e 13) também podem ser rompidos pela sua ação. Mais uma vez, a espécie de *C. albicans* se mostrou mais resistente, sendo necessária a concentração mínima de  $63 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato para se ter uma destruição maior que 50% do biofilme já formado ( $p = 0,0061$ ).

Entretanto, com uma concentração mais baixa, em  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a espécie de *C. tropicalis* já tem aproximadamente 50% do seu biofilme deformado ( $p = 0,0102$ ), mesmo concentrações ainda mais baixas, como  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  ainda são capazes de desestruturar

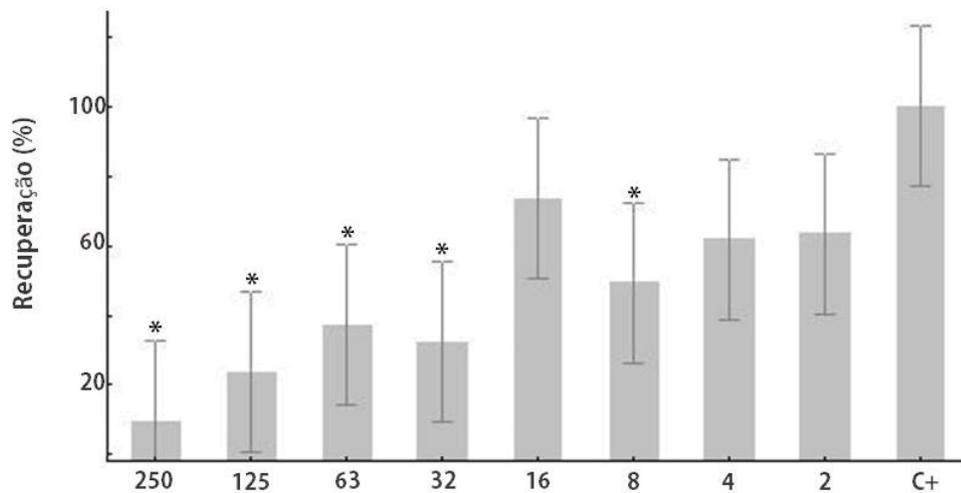
quase 40% do biofilme pré-formado, ainda que esses não apresentem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Figura 12: EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans* EM BIOFILMES FORMADOS DE *C. albicans*



LEGENDA – Efeito do extrato aquoso de *M. titans* na formação de biofilmes de *C. albicans*. Barra de erro indica o erro padrão da triplicata \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) comparado com o biofilme não tratado (C+).

Figura 13: EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *M. titans* EM BIOFILMES FORMADOS DE *C. tropicalis*



LEGENDA – Efeito do extrato aquoso de *M. titans* na formação de biofilmes de *C. tropicalis*. Barra de erro indica o erro padrão da triplicata \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) comparado com o biofilme não tratado (C+).

A utilização da maior concentração de extrato ainda não foi capaz de desestruturar completamente os biofilmes já formados, e desta forma também são encontrados estudos com a eliminação parcial do biofilme pré-formado (ALFARRAYEH *et al.*, 2021).

Outros extratos ricos em polissacarídeos também demonstraram resultados positivos na remoção de biofilme pré-formados, como a quitosana (SILVA-DIAS *et al.*, 2013) e o extrato de *Plectosphaerella cucumerina* (ZHOUL *et al.*, 2017). Conforme já se encontram na literatura outros exemplos de polissacarídeos capazes de desestruturar biofilmes (RENDUELES *et al.*, 2013). Embora necessite-se de estudos mais aprofundados, a ação dos polissacarídeos pode ser explicada pela interação entre os polímeros do extrato e as paredes celulares das leveduras. As fucogalactanas presentes no extrato de *M. titans* (MILHORINI *et al.*, 2018) possuem grupos sulfatos com carga negativa, que são capazes de interagir com as cargas iônicas das membranas celulares e a própria matriz extracelular, também possuidoras de carga negativa, gerando uma repulsão eletrostática e dispersão do biofilme.

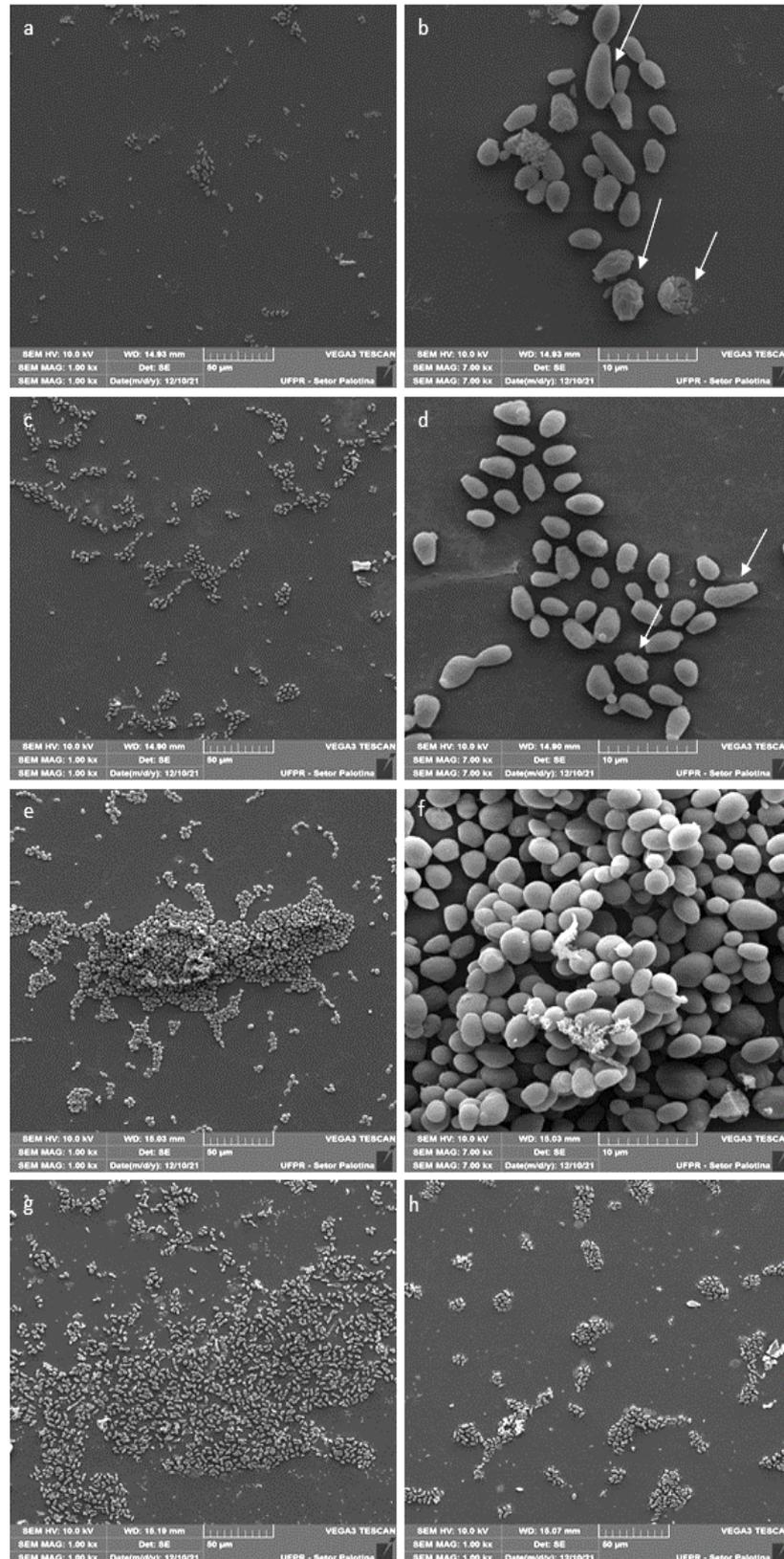
#### 5.4 Microscopia eletrônica de varredura

As células tratadas com o extrato aquoso de *M. titans* apresentaram deformações significativas na parede celular, na imagem *b* é possível verificar a presença de rugosidades na superfície celular que não são características da espécie, também é possível observar uma célula com essas mesmas rugosidades rompida, devido a fragilidade e desestabilização causadas (Figuras 14 e 15).

Não obstante também se verifica alteração da morfologia celular, com alongamento da célula (imagens *b* e *d*), além da presença de várias cicatrizes de brotamentos em uma única célula.

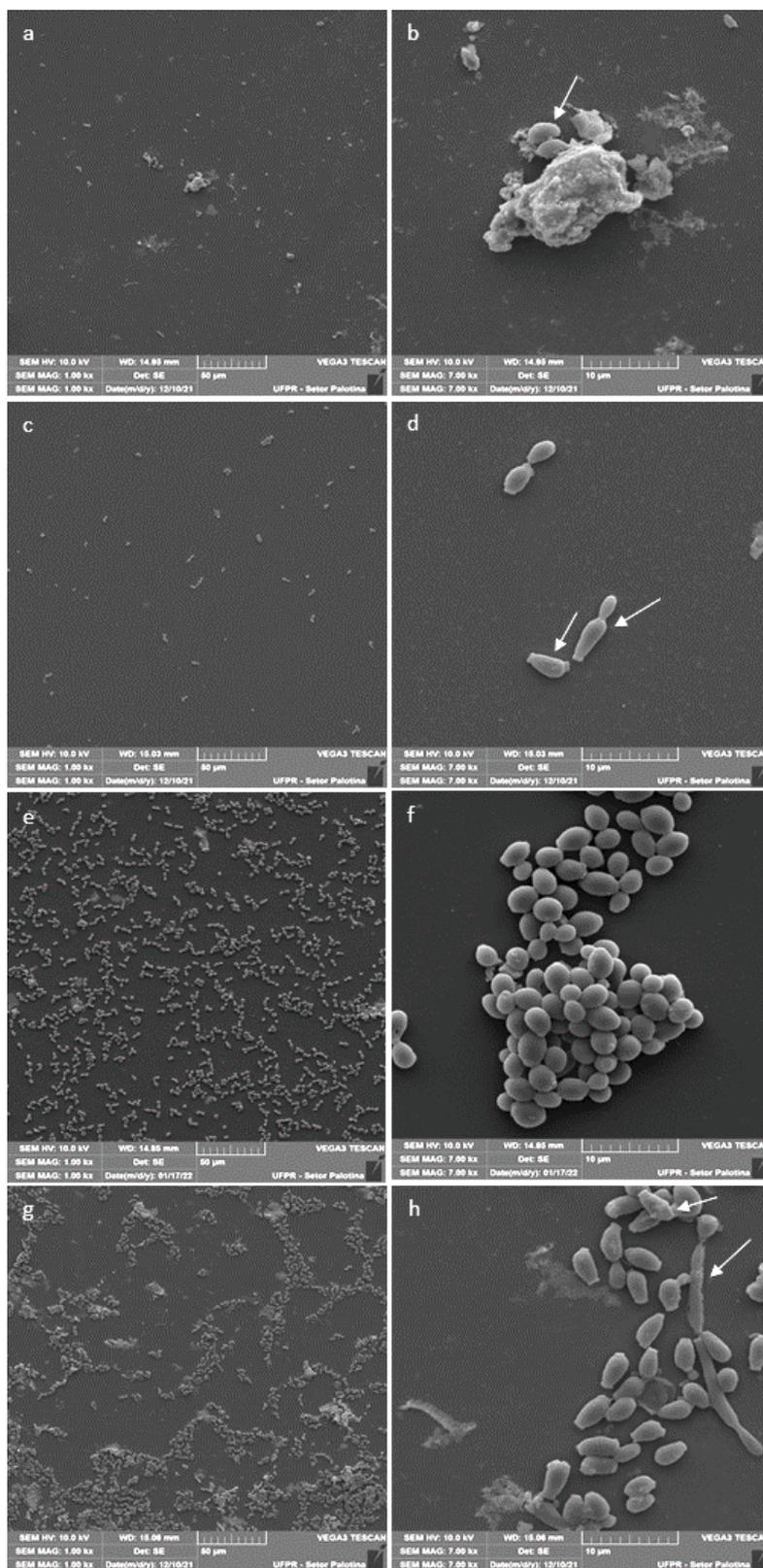
As células não tratadas (imagens *c* e *f*) apresentam estrutura homogênea e tridimensional do biofilme, com múltiplas camadas de leveduras, sem a presença de filamentos.

Figura 14: MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *C. tropicalis* APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: imagens a, c, e, g e h: aumento de 1000 vezes; imagens b, d e f: aumento de 7000 vezes; Imagens a e b: células tratadas durante a formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens c e d: células tratadas durante a formação do biofilme com 125 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens e e f: células não tratadas (controle positivo); Imagens g e h: células tratadas após a pré-formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>.

FIGURA 15 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *C. albicans* APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans*



LEGENDA: imagens a, c, e e g: aumento de 1000 vezes; imagens b, d, f e h: aumento de 7000 vezes; Imagens a e b são de células tratadas durante a formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens c e d são de células tratadas durante a formação do biofilme com 125 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens e e f são de células não tratadas (controle positivo); Imagens g e h são de células tratadas após a pré-formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>.

Em ambas as leveduras também fica claro a capacidade do extrato em inibir o biofilme, seja ele em formação ou mesmo o pré-formado. Analisando as imagens de menor aumento (1000 vezes), em que é possível observar-se a abundância ou escassez das células espalhadas pela superfície, as imagens *a* e *c* das Figuras 14 e 15 pode-se notar a escassez de células nas concentrações inibitórias em comparação com as imagens *e*, que trazem o controle positivo (crescimento do biofilme sem tratamento com extrato), em que as leveduras crescem de forma profusa, e formando agregados, não apenas horizontalmente, mas também verticalmente.

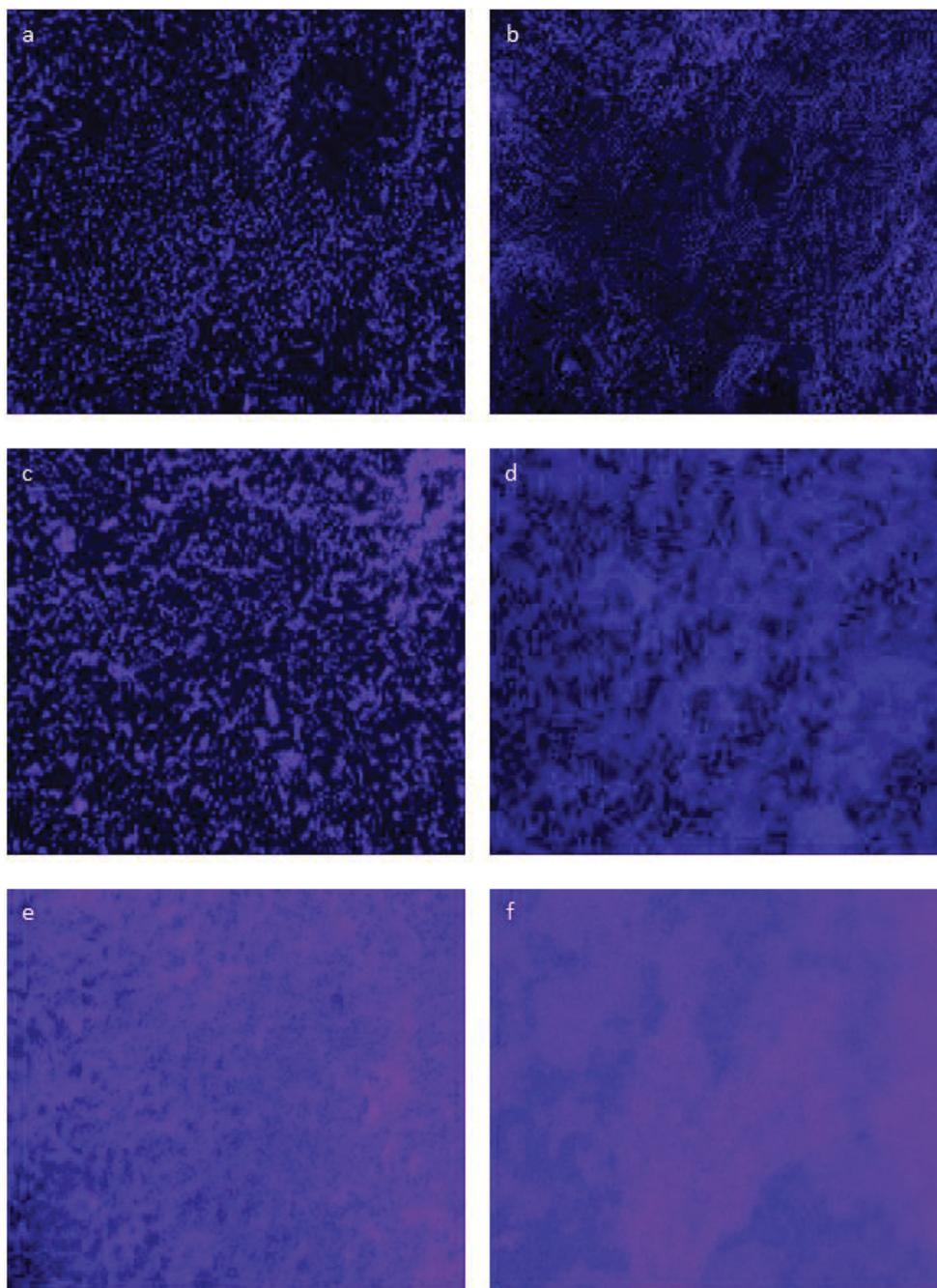
Para os biofilmes pré-formados, as imagens *g* e *h*, das figuras 14 e 15, apresentam uma grande cobertura pelas células do campo, contudo, percebem-se detritos celulares espalhados, além de uma menor agregação das células, é possível notar espaços vazios e células fragilizadas pela ação do extrato.

A utilização de éster fentanil de ácido cafeico também demonstra a distorção da parede celular (ALFARRAIEH *et al.*, 2021), assim como outros extratos de cogumelos, como os de *Laetiporus sulphureus* (YOUNIS *et al.*, 2019) e *Coprinellus congregatus* (YOO e CHOI, 2014).

## 5.5 Microscopia de fluorescência

Os resultados observados com essa coloração reforçam a tese demonstrada nas imagens observadas na MEV. As microfotografias de fluorescência mostram grande espaçamento entre as células quanto maior a concentração do extrato, quando comparadas com as micrografias de células não tratadas, essas pouco apresentam espaços livres, e demonstram uma enorme coesão entre as células. Indicando a efetividade do extrato (FIGURA 16). A análise de microscopia de fluorescência foi realizada apenas com a levedura *C. tropicalis*, pois durante o experimento o microscópio confocal de fluorescência apresentou problemas técnicos, não sendo possível seu reparo em tempo hábil.

FIGURA 16: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE *C. tropicalis* COM CALCOFLUOR WHITE APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE *Macrocybe titans*



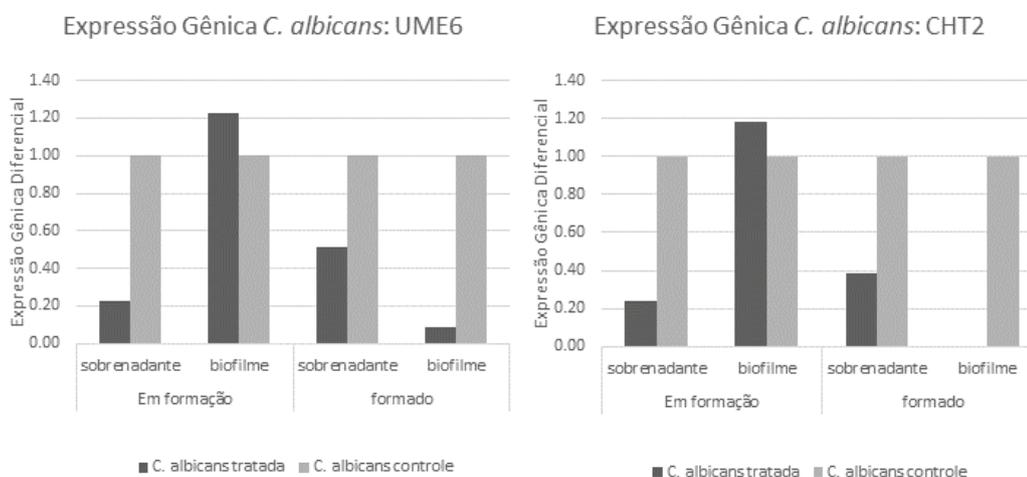
LEGENDA: as imagens *a*, *c*, e *e* estão aumentadas em 1000 vezes; as imagens *b*, *d* e *f* estão aumentadas 400 vezes; Imagens *a* e *b* são de células tratadas durante a formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens *c* e *d* são de células tratadas durante a formação do biofilme com 125 mg.mL<sup>-1</sup>; Imagens *e* e *f* são de células não tratadas (controle positivo); Imagens *g* e *h* são de células tratadas após a pré-formação do biofilme com 250 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 5.6 Expressão dos genes de virulência em *C. albicans*

A Figura 17 demonstra a variação das expressões gênicas entre os diferentes tratamentos da levedura. Houve diferença na expressão entre os genes avaliados, entre as células planctônicas e sésseis entre as células que estiveram em contato com o extrato desde o início, e àquelas que primeiramente formaram o biofilme, para depois serem expostas ao extrato aquoso de *M. titans*.

Nota-se resultados similares entre as expressões dos genes *UME6* e *CHT2*, ambos participantes dos processos de filamentação e alongamento das hifas. Biofilmes pré-formados que entram em contato com o extrato apresentam expressão desses dois genes bastante diminuídas e o mesmo comportamento é observado nas células planctônicas. Contudo, quando as leveduras são expostas desde o início à presença do extrato, as células sésseis apresentam um leve aumento (aproximadamente 20%) na expressão desses genes. Com base na literatura, o aumento da expressão dos genes *UME6* e *CHT2* em *C. albicans* normalmente está relacionado ao aumento na formação de biofilmes. No entanto nesse trabalho foi observado que, biofilmes em formação, em contato com a concentração sub-inibitória mínima do extrato (concentração sub-letal, que diminui o biofilme, mas não causa a morte total das leveduras), apresentaram um sutil aumento na expressão desses genes, comparando com os biofilmes já formados e submetidos à ação do extrato.

Nesse trabalho demonstra-se que a expressão tanto de *UME6* quando de *CHT2* foi maior em biofilmes em formação em contato com a concentração sub-inibitória mínima do extrato aquoso de *M. titans*, indicando que o extrato pode ser capaz de diminuir a formação de biofilme, mas não interferir de forma significativa na expressão desses genes. Pereira *et al.* (2020) observaram um aumento expressivo da filamentação em *C. albicans* em microcultivo em ágar fubá na presença da concentração sub-inibitória mínima do mesmo extrato de *M. titans* utilizado nesse trabalho (PEREIRA *et al.*, 2020). Portanto, pode existir algum componente nesse extrato que causa um aumento da filamentação, contribuindo para o aumento da expressão desses dois genes durante a formação do biofilme. O aumento da expressão de *CHT2* provavelmente está relacionado com o aumento da separação celular durante o tratamento com o extrato.

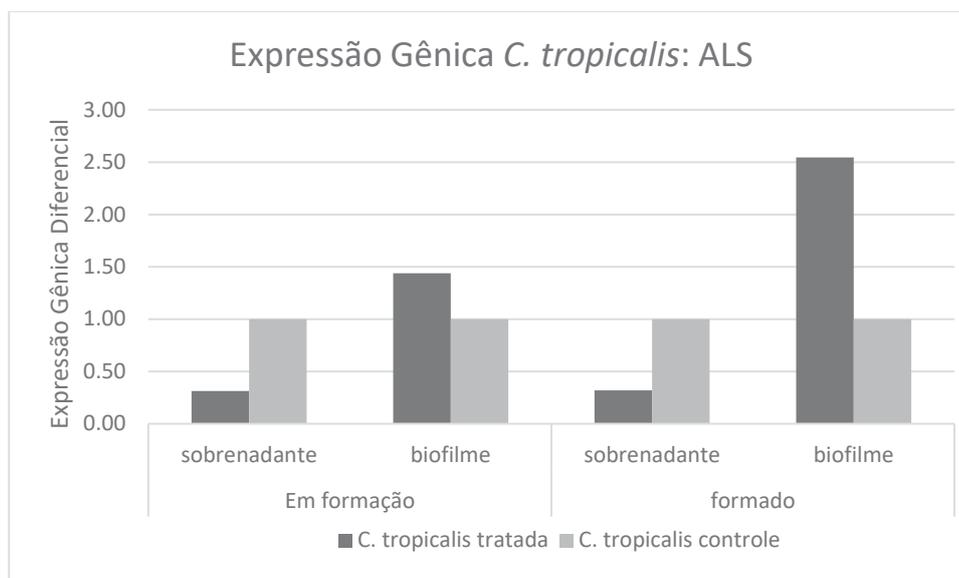
FIGURA 17: GRÁFICO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE *UME6* E *CHT2* EM *C. albicans*

LEGENDA: Expressão gênica dos genes *UME6* e *CHT2* em células tratadas e não tratadas, sésseis (biofilme) e planctônicas (sobrenadante), em ensaios de formação do biofilme e biofilme pré-formados em *C. albicans*.

### 5.7 Expressão dos genes de virulência em *C. tropicalis*

Para *C. tropicalis* foi avaliada a expressão do gene *ALS1* (*agglutinin-like sequence*) frente ao gene normalizador *ACT1* (*housekeeping*) responsável pela síntese de actina, como o gene análogo em *C. albicans*, em células tratadas ou não com o extrato de *M. titans*.

Conforme demonstrado na Figura 18, observou-se aumento na expressão de *ALS1* em células em biofilmes, tanto em formação quanto formados, sendo, nesse último, super-expresso em células tratadas com o extrato do cogumelo.

FIGURA 18: GRÁFICO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE *ALS1* EM *C. tropicalis*

LEGENDA: Expressão gênica do *ALS1* em células tratadas e não tratadas, sésseis (biofilme) e planctônicas (sobrenadante), em ensaios de formação do biofilme e biofilme pré-formados.

A expressão gênica foi diminuída em células planctônicas (sobrenadantes), comparando com as sésseis (aderidas), como observado para os genes de *C. albicans*. Quando comparadas com controle (na ausência do extrato), as células planctônicas expressam cerca de 3 vezes menos o gene alvo. Uma explicação para esse fato pode estar relacionada à um maior efeito do extrato sobre as células não aderidas, uma vez que biofilmes são considerados barreiras para ação de agentes antimicrobianos.

As células sésseis apresentaram maior nível de expressão gênica, em específico as de biofilme pré-formado exposto posteriormente ao extrato, o aumento da expressão gênica é maior do que 2,5 vezes as leveduras controle. Neste mesmo cenário, destaca-se que a expressão do gene *ALS1* em células sésseis de biofilme formado pode ser aproximadamente 10 vezes maior do que em células planctônicas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato aquoso de *M. titans* é capaz de inibir a formação de biofilmes das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, bem como também é capaz de desestruturar seus biofilmes pré-formados. Os resultados comprovam-se pelas análises de cristal violeta, que demonstram a

diminuição da biomassa nos biofilmes tratados. Assim como as análises imagéticas da microscopia de fluorescência e da microscopia eletrônica de varredura (MEV) também apresentaram diminuição da quantidade de células na área coberta. Através da MEV também foi possível verificar a deformação das paredes celulares das leveduras, indicando que o extrato tenha potencial ação sobre a desestruturação dos componentes celulares.

A análise das expressões dos genes de virulência apresentou resultados que devem ser futuramente aprofundados. Os níveis de expressão dos genes analisados nesse trabalho apresentaram resultados similares para ambas as leveduras: em células sésseis demonstraram aumento da expressão e em células planctônicas sua expressão foi diminuída. Os genes *UME6*, *CHT2* em *C. albicans* estão envolvidos com a mudança de forma e aumento da extensão das hifas e *ALS1* de *C. tropicalis*, apresenta um importante papel na adesão celular.

Se reconhece que este trabalho apresenta uma limitação devido à utilização de apenas duas linhagens de leveduras. Os experimentos foram projetados para avaliar a relação inicial entre a capacidade de inibição de formação de biofilme pelo extrato de *M. titans* sobre essas leveduras. Estudos futuros que incluam diferentes isolados clínicos e diferentes tempos de contato com o extrato poderá melhor elucidar os mecanismos envolvidos com a expressão dos genes analisados, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

É importante a continuação dos estudos com os extratos de *M. titans* em vista da escassez de relatos na literatura sobre seus compostos bioativos e usos farmacêutico. Uma hipótese para a ação antibiofilme desse extrato seria, provavelmente, relacionada a efeitos sinérgicos de uma combinação de muitas substâncias bioativas liberadas durante a extração. Nosso grupo de pesquisa ainda visa a elucidação destes compostos através de técnicas cromatográficas para isolamento e quantificação, assim como técnicas espectrométricas para identificação. Também se pretendem novos estudos para definição das vias moleculares da modulação gênica em leveduras de interesse médico, assim como outros micro-organismos formadores de biofilme.

## 7 REFERÊNCIAS

ACHARYA, K. Antioxidant and antimicrobial potentiality of quantitatively analysed ethanol extract from *Macrocybe crassum*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29 n. 2, p. 53-60, 2014.

ALFARRAYEH, I.; POLLÁK, E.; CZÉH, Á.; VIDA, A.; DAS, S.; PAPP, G. Antifungal and anti-biofilm effects of caffeic acid phenethyl ester on different *Candida* Species. **Antibiotics**, v. 10, n. 1359. 2021.

BANERJEE, M.; THOMPSON, D. S.; LAZZELL, A.; CARLISLE, P. L.; PIERCE, C.; MONTEAGUDO, C.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; KADOSH, D. *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 1354–1365, 2008.

BANERJEE M, UPPULURI P, ZHAO XR, CARLISLE PL, VIPULANANDAN G, VILLAR CC, LÓPEZ-RIBOT JL, KADOSH D. Expression of UME6, a key regulator of *Candida albicans* hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1- and Sun41-dependent mechanisms. **Eukaryotic Cell**, v. 12 n. 2. p. 224-232, 2013.

BATTISTIN, E.; PICCIOLA, P. Two particular taxa from Brazil: *Macrocybe titans* and *Marasmius leoninus*. **Rivista Micologica Romana**. Bollettino dell'Associazione Micologica ed Ecologica Romana, v. 96 n. 3: 31–38. 2015.

BODEY, G. P. Hematogenous and major organ candidiasis. **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment**. 2d ed. p. 279–329, 1993.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M.; LIN, M. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, 657–662, 2009.

CALONGE, D. F.; MATA, M.; UMAÑA, L. *Macrocybe titans*, um fungo espetacular presente em la Costa Rica, América Central. **Bull. Famm**, v. 32, p. 21-24, 2007.

CANNON, R. D.; CHAFFIN, W. L. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. **Journal of Dental Education**, v. 65, 785–778, 2001.

CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; WAIHRICH, L. G.; AMAZONAS, M. A. L. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMI-NI, M. Further Investigations on the Polysaccharides Obtained from the Stems and Caps of *Macrocybe titans*. **XXXV Reunião Anual da SBBq**, 2006.

CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. *Candida albicans* UME6, a filament-specific transcriptional regulator, directs hyphal growth via a pathway involving hgc1 cyclin-related protein. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 9, p. 1320–1328, 2010.

CHEN, M.; YU, Q.; SUN, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14 n. 9, 18488–18501, 2013.

CHEN, P.; QIN, H. J.; LI, Y. W.; MA, G. X.; YANG, J. S.; WANG, Q. Study on chemical constituents of an edible mushroom *Volvariella volvacea* and their antitumor activity *in vitro*. **Natural Product Research**, v. 20, p.1-6, 2018.

CHEVALIER, M.; MEDIONI, E.; PRÊCHEUR, I. Inhibition of *Candida albicans* yeast–hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 7, 2012.

CHOI, H. A.; CHEONG, D. E.; LIM, H. D.; KIM, W. H.; HAM, M. H.; OH, M. H. WU, Y.; SHIN, H. J.; KIM, G. J. Antimicrobial and anti-biofilm activities of the methanol extracts of medicinal plants against dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Journal of Microbiolog and Biotechnology**, v. 27 n. 7, 1242–1248, 2017.

COENYE, T.; NELIS, H. J. *In vitro* and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods** v. 83, n. 2, p. 89-105, 2010.

CORRALES, A.; LÓPEZ, C. A. *Macrocybe Titans* (Bigelow Y Kimbr.) Pegler, Lodge Y Nakasone, un registro nuevo para colombia. **Actualidades Biológicas**, v. 27 n. 82: 93-97, 2005.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

COWAN, S. E.; GILBERT, E.; LIEPMANN, D.; KEASLING, J. D. Commensal Interactions in a Dual-Species Biofilm Exposed to Mixed Organic Compounds, **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4481–4485, 2000.

DELONG, J.; BREWER, M. T. *Macrocybe titans*: largest mushroom species in the western hemisphere found growing in georgia. **University of Georgia Extension**, 2013.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, 2014.

DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11: p. 30–36, 2003.

DRUTZ, D. J., Lehrer, R. I. Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. **The American Journal of the Medical Sciences**, 276, p. 77–92. 1978.

DUSANE, D. H.; PAWAR, V. S.; NANCHARAIAH, Y. V.; VENUGOPALAN, V. P.; KUMAR, A. R; ZINJARDE, S. S. Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. **Biofouling**, v. 27 n. 6, p. 645-654, 2011.

FILLER, S. G. *Candida*–host cell receptor–ligand interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 333-339, 2006.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U., STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14 n. 9, p. 563–575. 2016.

FORASTIERO, A., MESA-ARANGO, A. C., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., ALCAZAR-FUOLI, L., BERNAL-MARTINEZ, L., PELAEZ, T. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (*Erg11p*) modifications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vv. 57, p. 4769–4781. 2013

FOX, E. P.; NOBILE, C. J. The role of *Candida albicans* biofilms in human disease, in Dietrich LA, Friedmann TS (Eds). *Candida albicans* symptoms, causes and treatment options. **Nova Science Publishers**, p. 1-24; 2013..

FU, J.; DING, Y.; WEI, B. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. **Boston Medical Center infectious diseases**, v. 17, n. 329, 2017.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 536–545, 2004.

GIONGO, J. L.; DE ALMEIDA VAUCHER, R.; FAUSTO, V. P.; QUATRIN, P. M.; LOPES, L. Q. S.; SANTOS, R. C. V.; GÜNDEL, A.; GOMES, P.; STEPPE, M. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 170-178, 2016.

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

HARRIS, P. J.; FINCHER, G. B.; Distribution, Fine Structure and Function of (1,3;1,4)- $\beta$ -Glucans in the Grasses and Other Taxa. **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3  $\beta$ -Glucans and Related Polysaccharides**, c. 4.6, p. 621-654, 2009.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 915–921, 1994.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; HORAN, T.C.; SIEVERT, D.M.; POLLOCK, D.A.; FRIDKIN, S.K. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention: 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, p. 996–1011, 2008.

HOYER, L.L.; GREEN, C.B.; OH, S.-H.; ZHAO, X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit. **Medical Mycology**, v. 46, p. 1–15, 2008.

KADOSH D., JOHNSON A. D. Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 2903–2912. 2005.

KANEKO, Y.; OHNO, H.; KOHNO, S.; MIYAZAKI, Y.; Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, n. 5, p. 355-357, 2010.

KARIMI, A., KARIG, D., KUMAR, A.; ARDEKANI, A. M. Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. **Lab on a Chip**, v. 15, p. 23–42, 2015.

KARLSEN-AYALA, E.; SMITH, M. E. *Macrocybe titans*: The Mushroom Giant of the Western Hemisphere. **Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension**, 2020.

KHATUA, S.; GHOSH, S.; ACHARYA, K. Chemical composition and biological activities of methanol extract from *Macrocybe lobayensis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Vv. 7 n. 10, p. 144-151, 2017.

KNAK, M. U.; GUEDES, A.; TAVARES, L. B. B. Atividade citotóxica frente a *Artemia salina* e antioxidante do fungo *Macrocybe titans*. **Dynamis revista tecno-científica**, v. 5, n. 81, 2009.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA H. A.; BOKTOUR M.; THORNBY J.; HACHEM R.; BODEY G. P., RAAD, I. I. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, v.10, p. 1676–1681, 2001.

LI X., YAN Z., XU J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149 p. 353–362, 2003.

LIVAKA, K. J.; SCHMITTGEB, T. D.; Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method; **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; *Candida albicans* biofilms: More than filamentation. **Current Biology**, v. 15, n. 12, 2005.

LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415–428, 2008.

MA, L.; JACKSON, K.D.; LANDRY, R.M.; PARSEK, M.R.; WOZNIAK, D.J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 8213–8221, 2006.

MAH, T.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 34–39, 2001.

MARIONI, J.; SILVA, M. A.; CABRERA, J. L; MONTOYA, S. C. N.; PARAJE, M. G. The Anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1321-1328, 2016.

MCCREATH, K. J.; SPECHT, C. A.; ROBBINS, P. W. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA** v. 92, p. 2544-2548, 1995.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 25, p. 136-144, 1996.

MILHORINI, S. D. S.; SMIDERLE, F. R., BISCAIA, S. M. P.; ROSADO, F. R.; TRINDADE, E.S.; IACOMINI, M. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 50-56, 2018.

MINATO, K. I.; LAAN, L. C.; VAN DIE I.; MIZUNO, M. *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide stimulates anti-inflammatory properties during monocyte-to-macrophage differentiation. **International Journal Biological of Macromolecules**, v. 122, p. 705-712, 2018.

MO, M.; ZHANG, Q. Study on antimicrobial activity of the extracts of *Macrocybe gigantean*. **Science and Technology of Food Industry**, v. 30, n.5, p. 151-153, 2009.

NGUYEN, D.; JOSHI-DATAR, A.; LEPINE, F.; BAUERLE, E.; OLAKANMI, O.; BEER, K.; MCKAY, G.; SIEHNEL, R. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science**, v. 334, p. 982–986, 2011.

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

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; ANDES, D. R.; MITCHEL, A. P. Function of *Candida albicans* adhesin hwp1 in biofilm formation. **Eukaryotic Cell**, v. 5, N. 10, p. 1604–1610, 2006.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 58, p. 77–82, 2007.

O'CONNOR, L.; LAHIFF, S.; CASEY, F.; GLENNON, M.; CORMICAN, M.; MAHER, M. Quantification of *ALS1* gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 153-162, 2005.

ORSI, C. F.; BORGHI, E.; COLOMBARI, B.; NEGLIA, R. G.; QUAGLINO. D.; ARDIZZONI, A.; MORACE, G.; BLASI, E. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (*HWP1*) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 69, n. 70, p. 20-27, 2014.

OWAID, M. N.; AL-SAEEDI, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A. Antimicrobial activity of mycelia of oyster mushroom species (*Pleurotus* spp.) and their liquid filtrates (in vitro). **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n.5, p. 376-380, 2015.

PANIZO, M. M.; MORENO, X.; Laboratory identification of fungal infections. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2021.

PAPON, N., COURDAVAULT, V., CLASTRE, M., BENNETT, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLOS Pathogens** v. 9 n. 9, 2013.

PEGLER, D. N.; LODGE, D. J.; NAKASONE, K. K. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 494-504, 1998.

PEREIRA, F. C. B. N. Análise do potencial antimicrobiano do extrato de *Macrocybe titans* nas características morfológicas de *Candida albicans*. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Biologia Molecular) Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, 2020.

PEREIRA, F. C. B. N.; SNAK, A.; SCHEMMER, J. N.; SILVA, S.; TIBÉRIO, A. E. G.; ROSADO, F. R.; FERNANDES, N. L. M. Avaliação do efeito do extrato aquoso de fungos basidiomicetes em larvas de *Strongyloidea*. **5º Simpósio de Biotecnologia na Agroindústria**, Palotina, 2015.

RAJA, N. S.; Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of *Candida* bloodstream infections because of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in two district general hospitals in the United Kingdom. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 1, 2021.

RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; LAPPIN, D. F.; NILE, C. J.; SMITH, K.; WILLIAMS, C.; MUNRO, C. A.; RAMAGE, G. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 303, 2014.

RAMÍREZ, N. A.; NIVEIRO, N.; MICHLIG, S. A.; POPOFF, O. S. First Record of *Macrocybe titans* (*Tricholomataceae*, *Basidiomycota*) in Argentina. **Check List**, v. 13, n. 4, 153–158. 2017.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 334–346. 2013.

SAHAL, G.; WOERDENBAG H. J.; HINRICHS, W. L. J.; VISSER, A.; TEPPER, P. G.; QUAX, W. J.; VAN DER MEI, H. C.; BILKAY, I. S. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 246, 2020.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 73–85, 2002.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T. FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, 2013.

SHERRINGTON, S. L.; SORSBY, E.; MAHTEY, N.; KUMWENDA, P.; LENARDON, M. D.; BROWN, I.; BALLOU, E. R.; MACCALLUM, D. M.; HALL, R. A.; Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLOS Pathogens**, v. 22, n. 13, 2017.

SRIDHAR, S.; SIVAPRAKASAM, E.; BALAKUMAR, R.; KAVITHA, D.; Evaluation of antibacterial and antifungal of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. Karst fruit bodies extracts. **West Journal of Science Technology**, v. 1, p. 8-11, 2011.

SILVA, S. Polissacarídeos do cogumelo *Macrocybe titans*: caracterização estrutural e atividade biológica. 101 f. Dissertação (Mestrado Ciências - Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2017.

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

SILVA-DIAS, A.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J.; COBRADO, L.; MONTEIRO-SOARES, M.; QUEIROZ, J. A.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 1, p. 25-33, 2014.

STAAB, J. F.; BRADWAY, S. D.; FIDEL, P. L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science** v. 283, p. 1535-1538, 1999.

STAAB, J. F.; BAHN, Y. S.; TAI, C. H.; COOK, P. F.; SUNDSTROM, P. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of *Hwp1* requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. **Journal of Biological Chemistry**. V. 279, p. 40737-40747, 2004.

SUNDSTROM, P., J. E. CUTLER, J. F. STAAB. Reevaluation of the role of *HWP1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3281-3328, 2002.

TSUCHIMORI, N.; SHARKEY, L. L.; FONZI, W. A.; FRENCH, S. W.; EDWARDS, J. E.; FILLER, J. R. S. G. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1997-2002, 2000.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C.; Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 529–553, 2007.

WILKING, J. N. et al. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 110, p. 848–852, 2013.

WILSON, C.; LUKOWICZ, R.; MERCHANT, S.; VALQUIER-FLYNN, H.; CABALLERO, J.; SANDOVAL, J.; OKUOM, M.; HUBER, C.; BROOKS, T.; WILSON, E.; CLEMENT, B.; WENTWORTH, C.; HOLMES, A. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. **Research & Reviews | Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n. 4, 2017.

WISNIEWSKI, A. C.; DE ALMEIDA, M. A. L.; PALMAS, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 185-293, 2010.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida species* other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases** v. 20, p. 115–175, 1995.

WOODS, R. A.; BARD, M.; JACKSON, I. E.; DRUTZ, D. J. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 129, p. 53–58. 1974.

XU, H.; NOBILE, C. J.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. Glucanase Induces Filamentation of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

YAN, J.; ZHU, L.; QU, Y.; QU, X.; MU, M.; ZHANG, M.; MUNEER, G.; ZHOU, Y.; SUN, L. Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms. **International Journal Biological of Macromolecules**, v. 123, p. 945-956, 2018.

YU, S.; LI, W.; LIU, X.; CHE, J.; WU, Y.; LU, J.; Distinct expression levels of ALS, LIP, and SAP genes in *Candida tropicalis* with diverse virulent activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1175, 2016.

ZEIDLER U., LETTNER T., LASSNIG C., MÜLLER M., LAJKO R., HINTNER H., BREITENBACH M., BITO A. *UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 126–142, 2009.

ZHAI, L.; ZHOU, Y.; WU, Y.; JIN, Y.; ZHU, Q.; GAO, S.; LI, X.; SUN, Z.; XIAO, Y.; HUANG, B.; TIAN, K. Isolation and identification of *Candida tropicalis* in sows with fatal infection: a case report. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 108, 2021

ZHOU, J.; BI, S.; CHEN, H.; CHEN, T.; YANG, R.; LI, M.; FU, Y.; JIA, A. Q. Anti-Biofilm and Antivirulence Activities of Metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 769, 2017.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from *Aphylophorales* (*Polypore*) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 300–310, 2004.

ZUZA-ALVES, D.L.; SILVA-ROCHA, W.P. CHAVES, G.M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1927, 2017.