

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA  
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA**

**ALEXANDRE TADACHI MOREY**

**INFERÊNCIA DE REDE DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE  
GENES RELACIONADOS AO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS*  
INFLUENCIADOS PELO ÁCIDO LÁTICO**

**MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO**

**LONDRINA  
2016**

ALEXANDRE TADACHI MOREY

**INFERÊNCIA DE REDE DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO BIOFILME DE *CÂNDIDA ALBICANS* INFLUENCIADOS  
PELO ÁCIDO LÁTICO**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Martins Lopes.

LONDRINA  
2016

**INFERÊNCIA DE REDE DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* INFLUENCIADOS  
PELO ÁCIDO LÁTICO**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Bioinformática.

---

**Prof. Dr. Fabrício Martins Lopes**  
Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná

---

**Prof. Dr. Alessandro Botelho Bovo**  
Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná

---

**Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas**  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de agosto de 2016.

À minha mãe, Vanda Alice Galo,  
pelo exemplo em minha vida e incentivo  
constante em meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício Martins Lopes, pelo auxílio durante o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho.

Aos professores membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Alessandro Botelho Bovo e Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas, pela disponibilidade e apoio em relação às melhorias deste estudo.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade deste curso, especialmente aos professores do programa de Pós-graduação em Bioinformática.

Aos colegas de turma pelo companheirismo e amizade durante as disciplinas, principalmente ao Sérgio Paulo Dejato da Rocha e Juan Josue Puño Sarmiento.

Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste curso e estudo, principalmente ao Eliandro Reis Tavares, pelo auxílio no levantamento de dados deste trabalho.

MOREY, Alexandre Tadachi. **Inferência de rede de regulação da expressão de genes relacionados ao biofilme de *Candida albicans* influenciados pelo ácido láctico**. 2016. 33 f. Monografia (Especialização em Bioinformática) – Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal Tecnológica do Paraná. Londrina, 2016.

## RESUMO

*Candida albicans* é uma levedura comensal de diferentes sítios anatômicos do homem, porém, em casos de imunodebilidades do hospedeiro tornam-se patogênicas, acometendo principalmente mucosas orofaríngeas e do trato urogenital. Um dos principais problemas enfrentados atualmente em relação às infecções causadas por este fungo é a formação do biofilme, uma comunidade microbiana composta por células de uma ou mais espécies protegida por uma matriz extracelular e que apresenta fenótipo diferente em relação às células planctônicas. No caso de mulheres, além de *C. albicans*, a bactéria *Streptococcus agalactiae*, produtora de ácido láctico, podem causar infecções na mucosa vulvovaginal e estudos iniciais indicam que estes dois micro-organismos podem formar biofilmes mistos. Assim, o presente estudo utilizou dados de transcriptoma de *C. albicans* cultivada na presença de ácido láctico e inferiu, utilizando o software DimReduction, redes de regulação da expressão de genes relacionados à formação de biofilme nesta levedura a partir 3 genes alvos: *GPD2* (orf19.691), *ACH1* (orf19.3171) e *GCN4* (orf19.1358). Após a análise das 3 redes de regulação foi possível afirmar que a inferência estatística que apresentou maior correlação com a inferência biológica da formação do biofilme em *C. albicans* foi a que continha os genes *GCN4* (orf19.1358), *SEC6* (orf19.5463), *GPX2* (orf19.85), orf19.7490, *CTP1* (Orf19.5870) e Orf19.6668. Estes genes estão relacionados, principalmente, à adesão, formação de hifas, produção da matriz extracelular, via metabólica de carboidratos e ciclo celular, necessários para a formação e maturação do biofilme. Estes dados abrem perspectivas para o entendimento molecular da influência do ácido láctico na formação do biofilme em *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Biofilme misto. Transcriptoma. Redes de regulação.

MOREY, Alexandre Tadachi. **Inference a prediction network regulating the expression of genes related to *Candida albicans* biofilm influenced by lactic acid.** 2016. 33 s. Monograph (Specialization in Bioinformatics) – Post Graduation Program in Bioinformatics, Technological Federal University of Paraná. Londrina, 2016.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is commensal yeast of different anatomical sites of man, but in host immunosuppressed cases become pathogenic, affecting mainly oropharyngeal mucosa and urogenital tract. One of the main problems faced today in relation to infections caused by this fungus is the formation of the biofilm, a microbial community consisting of cells from one or more species protected by an extracellular matrix and with different phenotype compared to planktonic cells. In the case of women, beyond *C. albicans*, *Streptococcus agalactiae* bacteria, producing lactic acid, can cause infections vulvovaginal mucous membrane and initial studies indicate that these two micro-organisms can form mixed biofilms. Thus, the present study used data transcriptome of *C. albicans* cultured in the presence of lactic acid and inferred using the software DimReduction, predictions networks of gene expression related to the formation of this biofilm yeast target genes from 3: GPD2 (orf19.691), ACH1 (orf19.3171) and GCN4 (orf19.1358). After reviewing the 3 networks of regulation was possible to state that the statistical inference with the highest correlation with biological inference of biofilm formation in *C. albicans* was that contained the *GCN4* gene (orf19.1358) *SEC6* (orf19.5463), *GPX2* (orf19.85) orf19.7490, *CTP1* (Orf19.5870) and Orf19.6668. These genes are related mainly to membership, hyphae formation, and extracellular matrix production, metabolic pathway of carbohydrates and cell cycle necessary for the formation and maturation of biofilm. These data open up prospects for the molecular understanding of the influence of lactic acid in the formation of biofilms in *C. albicans*.

**Keywords:** mixed Biofilm. Transcriptome. Regulatory networks.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>11</b>
2.1 Biofilme de <i>Candida albicans</i> .....	11
2.2 Metodologia .....	14
2.2.1 Seleção do grupo de dados do transcriptoma de <i>Candida albicans</i> .....	14
2.2.2 Análise dos genes de <i>Candida albicans</i> exclusivamente expressos na presença de ácido láctico e seleção dos genes relacionados à formação de biofilme .....	15
2.2.3 Inferências das redes de regulação dos genes selecionados .....	16
2.3 Resultados e discussões.....	16
2.3.1 Genes exclusivamente expressos na presença de ácido láctico e seleção dos genes relacionados à formação de biofilme. ....	16
2.3.2 Redes de regulação de genes alvos relacionados à formação de biofilme em <i>Candida albicans</i> na presença de ácido láctico. ....	19
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreu um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas em humanos, estas podem ser classificadas como superficiais (pele, mucosas, cabelo e unhas) ou sistêmicas, quando envolvem vários órgãos (RÜPING et al., 2008; LASS-FLÖRL, 2009). Acredita-se que este fato esteja ocorrendo devido à crescente população de pacientes imunossuprimidos, incluindo aqueles com câncer, receptores de transplantes de órgãos sólidos e de células hematopoiéticas, portadores do HIV, neonatos prematuros, idosos e pacientes em recuperação de cirurgias altamente invasivas (WARNOCK, 2007; WALSH et al., 2008). Nota-se que os avanços nas terapias medicinais, como a quimioterapia para pacientes com câncer, o uso de medicamentos imunossupressores e o amplo uso de antibacterianos, podem melhorar a doença primária, mas também submeter os pacientes a um alto risco de aquisição de infecções fúngicas (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008). Dentre as espécies de fungos mais prevalentes, leveduras do gênero *Candida* apresentam destaque nas infecções fúngicas, sendo que *Candida albicans* ainda é a principal espécie relacionada a infecções sistêmicas (RUHNKE, 2006; LUQUE et al., 2009; NUCCI et al., 2013). Sítios anatômicos comuns dessas leveduras em humanos incluem o trato gastrointestinal, geniturinário e a pele (ACHKAR; FRIES, 2010; FERRER, 2000; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1990), sendo que metade da população humana é colonizada por *Candida* spp. nas suas cavidades orais, principalmente (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1990).

Um outro grupo de risco para infecções por esta levedura são as mulheres grávidas, que apresentam duplo aumento na prevalência da colonização vaginal por espécies de *Candida* em comparação com mulheres não-gestantes. Esta associação é influenciada, principalmente, pelo aumento dos níveis de estrogênios circulantes, deposição de glicogênio e outros substratos presentes na vagina durante a gravidez (HAY; CZEIZEL, 2007), que promovem a adesão da levedura e penetração na mucosa (FERRER, 2000). Leveduras presentes neste sítio anatômico se tornam patogênicas quando a colonização no hospedeiro é favorável ao seu desenvolvimento (HETTIARACHCHI et al., 2010; SOUZA et al., 2009). Adicionalmente, *Streptococcus agalactiae*, um coco Gram-positivo fermentador, com produção de ácido lático, é um comum colonizante do trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis sem causar sintomas de doenças, sendo parte

da microbiota normal de muitas mulheres (DANDO et al., 2014; DORAN; NIZET, 2004; GIBBS; SCHRAG; SCHUCHAT, 2004; MCCORD et al., 2001). Em sua forma invasiva pode acometer mulheres grávidas, neonatos ou adultos não-gestantes (KROHN; HILLIER; BAKER, 1999; PHARES et al., 2008).

A maioria dos quadros de candidíase vulvovaginal está associada à formação de biofilme, seja em superfície abiótica (dispositivos médicos: cateteres, próteses, marca-passos) ou biótica (epitélio). Esse processo pode ocorrer em resposta a diversos sinais, tais como, alta densidade celular, pH, escassez de nutrientes e estresse físico ambiental (DONLAN; CONSTERTON, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE et al., 2006). O biofilme é formado por células sésseis aderidas a um substrato e envoltas em uma matriz extracelular. As células sésseis apresentam fenótipo alterado principalmente em relação à taxa de crescimento e a resistência aos agentes antimicrobianos, e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (DONLAN; CONSTERTON, 2002; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Dessa forma, infecções associadas à formação de biofilme são de difícil tratamento, o que pode contribuir para o aumento da taxa de mortalidade de pacientes com candidemia (TUMBARELLO et al., 2007; 2012).

Estudos anteriores sobre biofilme têm se baseado em apenas um único tipo de microrganismo (BIZERRA et al., 2008; COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005). Os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie microbiana ou mais comumente, espécies mistas, tais como bactérias e fungos, formando as comunidades de biofilme polimicrobianas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JENKINSON; DOUGLAS, 2002), em que podem ocorrer interações sinérgicas, mutualistas e antagônicas entre os microrganismos (KURAMITSU et al., 2007; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006).

Espécies bacterianas e populações fúngicas modulam seu comportamento coletivo usando sinais extracelulares conhecidos como moléculas *quorum-sensing* (CUGINI et al., 2007; HORNBY et al., 2001). Esta regulação ocorre em resposta à densidade celular e também outros fatores abióticos. Os processos como co-agregação e formação de biofilme promovem a síntese e secreção de moléculas *quorum-sensing*, aumentando a probabilidade de células vizinhas em detectar os sinais para induzir uma resposta (HORNBY et al., 2001).

Dado que há significantes taxas de mulheres colonizadas por *Candida*

*albicans* e *Streptococcus agalactiae*, e que os biofilmes estão relacionados com maior frequência e gravidade das infecções microbianas humanas, há uma necessidade de compreender o comportamento do biofilme, principalmente os de comunidade mista, já que o modelo de biofilme monoespécie, muitas vezes, não representa as comunidades multi-espécies de bactérias e fungos encontrados prevalentemente no processo da doença. Uma vez que é conhecido também o perfil metabólico de *S. agalactiae* em relação à produção de ácido láctico, o presente estudo teve como objetivo inferir uma rede de regulação da expressão de genes relacionados ao biofilme de *Candida albicans* quando submetidos ao tratamento com ácido láctico. Assim, foram utilizados dados de transcriptoma, depositados em banco de dados, obtidos a partir de células de *Candida albicans* cultivadas na presença de ácido láctico. Em seguida, esses dados foram submetidos ao tratamento computacional para o estabelecimento das redes de regulação utilizando genes alvos. Ao final, a inferência estatística foi analisada em termos biológicos e os dados discutidos utilizando publicações de pesquisas experimentais.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Biofilme de *Candida albicans*

Espécies do gênero *Candida* podem ser comumente encontradas como comensais em vários sítios anatômicos de indivíduos saudáveis podendo, inclusive, atingir altas densidades celulares sem sintomas de doença (KAM; XU 2002; SOLL 2002). Entretanto, membros deste gênero são os mais frequentes causadores de infecções, correspondendo a 80% das doenças invasivas, sendo a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea. Também se constituem como principais responsáveis por infecções fúngicas no trato urinário, candidíase vulvovaginal e orofaríngea (LUNDSTROM; SOBEL, 2001; COLOMBO et al., 2006; RUHNKE, 2006; PFALLER; DIEKEMA 2007; ASMUNSDÓTTIR et al., 2008; CASTÓN-OSORIO et al., 2008; CONCIA et al., 2009; HORN et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Na natureza, os microrganismos existem em uma forma muito diferente das cepas laboratoriais cultivadas artificialmente, onde há meios líquidos e solidificados enriquecidos. Para conseguirem sobreviver dentro de ambientes hostis como aqueles encontrados no tecido do hospedeiro, expostos a anticorpos e fagócitos, ou em uma superfície inerte exposta a condições inóspitas como luz UV, dessecação, calor, frio, eles se adaptaram formando populações aderentes, as células sésseis. Uma ampla coleção desse grupo de células aderidas à superfície é chamada de biofilme microbiano (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MAH; O'TOLLE, 2001; PROSSER et al., 1987).

Assim, o biofilme microbiano pode ser definido como uma comunidade sésbil de uma ou mais espécies de micro-organismos, caracterizado por células que estão ligadas a superfícies abióticas ou bióticas. São envoltos em uma matriz extracelular de carboidratos ou exopolissacarídeos que eles produzem, formando uma arquitetura tridimensional complexa (COSTERTON et al., 1995; FLEMMING; WINGENDER, 2010; HARRIOTT; NOVERR, 2011; SAMARANAYAKE, 2006). Células em biofilmes exibem um fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento e a transcrição de genes, diferente do modo planctônico de crescimento (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além disso, o biofilme apresenta resistência aumentada às defesas do hospedeiro e ataques de agentes antimicrobianos,

contribuindo para a patogênese de muitas doenças infecciosas (CHANDRA et al., 2001; COSTERTON et al., 1995; MAH; O'TOLLE, 2001; O'TOLLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Os mecanismos responsáveis pela resistência aos antimicrobianos são vários: penetração retardada do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme, taxa alterada de crescimento das células sésseis, as quais crescem mais lentamente do que as células planctônicas, presença de células persistentes, aquisição e/ou expressão (aumentada) de genes que codificam resistência aos antimicrobianos (BIZERRA et al., 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002; LEWIS, 2008; PETERSON et al., 2015; RAMAGE et al., 2012).

Processos físicos, biológicos e químicos estão envolvidos na formação do biofilme (PARK et al., 2014), como composição do meio de cultivo, temperatura, presença de agentes antimicrobianos, inóculo, tipo de micro-organismo, número de células, hidrodinâmica, taxa do fluxo, presença de cisalhamento, substrato, rugosidade e química do material (DONLAN; COSTERTON, 2002, HO et al., 2013; ROSINI; MARGARIT, 2015).

Os biofilmes podem se formar em dispositivos médicos, bem como em tecidos de mucosas do hospedeiro (BIZERRA et al., 2008; HARRIOTT; NOVERR, 2011; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006). Podem atuar como reservatórios de microrganismos patogênicos, favorecendo a disseminação da infecção para outros locais do corpo (COLOMBO et al., 1999; SMITH et al., 2003). Estima-se que mais da metade das infecções hospitalares estão associadas a biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Entretanto, o exato processo pelos quais os micro-organismos de biofilmes provocam doença no hospedeiro humano ainda é mal compreendido. Mecanismos sugeridos incluem: destacamento das células ou de agregados de células de biofilmes de dispositivos médicos, resultando em infecções na corrente sanguínea ou do trato urinário, produção de endotoxinas, resistência ao sistema imune do hospedeiro, e fornecimento de um nicho para a geração de organismos resistentes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A formação de biofilme em *C. albicans* ocorre em três fases. A primeira fase é a adesão a uma superfície, que começa após a incubação. Esta fase de adesão inicial é regulada por fatores não-específicos, como a interação hidrofóbica ou eletrostática, e fatores específicos através de receptores como fibrinogênio e fibronectina (CHANDRA et al., 2001; NETT; ANDES, 2006). A segunda fase é o processo no qual as *C. albicans* aderidas continuamente multiplicam-se e as células

de levedura se transformam em hifas que, em seguida, formam estruturas tridimensionais, geralmente compostas de leveduras, pseudohifas, e hifas (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; KOJIC; DAROUICHE, 2004). A última fase de maturação é o processo de aumento quantitativo de substâncias extracelulares (HANSEN et al., 2007). O polimorfismo de *C. albicans* serve como um fator importante que influencia a formação de biofilme (AAS et al., 2005; MANSON; RAUCH; GILMORE, 2008).

Diferentes trabalhos têm mostrado que vários genes apresentam expressão diferencial durante a formação do biofilme, sendo necessários durante as fases de formação, como *EFG1*, um regulador do desenvolvimento da filamentação (STOLDT et al., 1997; SOHN et al., 2003; LIN et al., 2013), o gene *ACE2*, um fator transcricional que regula a expressão de quitinase e proteínas da parede celular (KELLY et al., 2004; NETT et al., 2009), *EAP1*, responsável pela produção de uma proteína associada à parede celular (LI et al., 2007; KUCHARIKOVA et al., 2011), *HWP1*, que também codifica uma proteína associada à parede celular, aumenta a capacidade de adesão e formação de biofilme em poliestireno (GRANGER et al., 2005; ENE, BENNETT, 2009), *CPH1*, relacionados ao processo de filamentação, processo importante na formação do biofilme (LO et al., 1997; LEWIS et al., 2002; RAMAGE et al., 2002; LIN et al., 2013), *BCR1*, um fator transcricional, requerido na formação de biofilme (NOBILE, MITCHELL, 2005; NOBILE et al., 2006; SRIKANTHA et al., 2013), *PGA10*, gene relacionado a aderência (PÉREZ et al., 2006; BONHOMME et al., 2011).

Alguns genes estão relacionados à biomassa produzida durante a formação do biofilme, como *ALS3* (NOBILE et al., 2006), *BCR1* (NOBILE; MITCHELL, 2005; NOBILE et al., 2006), *GCN4* (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004), *KEM1*, *MDS3*, *NUP85*, *SUV3* (RICHARD et al., 2005), *TEC1* (NOBILE; MITCHELL, 2005), *CPH1* (LEWIS et al., 2002; RAMAGE et al., 2002), *MKC1* (KUMAMOTO, 2005), *CHK1* (KRUPPA et al., 2004; NOBILE et al., 2012)

Estudos anteriores sobre biofilme de *Candida albicans* têm se baseado apenas em sua formação isolada (BIZERRA et al., 2008; COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005), porém os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie microbiana ou, mais comumente, espécies mistas, tais como bactérias e fungos, formando as comunidades de biofilme polimicrobianas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JENKINSON; DOUGLAS, 2002), em que podem ocorrer interações sinérgicas entre os micro-organismos (KURAMITSU et al., 2007;

THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006), que modulam seu comportamento coletivo usando sinais extracelulares conhecidos como moléculas *quorum-sensing* (CUGINI et al., 2007; HORNBY et al., 2001), aumentando a probabilidade de células vizinhas em detectar os sinais para induzir uma resposta (HORNBY et al., 2001).

A formação desses biofilmes mistos apresenta um ambiente protegido, permitindo maior sobrevivência a agressões externas e facilita diferentes interações bacterianas-fúngicas (DOUGLAS, 2003; SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009). O resultado clínico deste misto de interação é que as infecções aumentam a frequência e a gravidade da doença (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009) com taxas de mortalidade significativamente mais elevadas (70%) quando comparados com as infecções causadas por uma única espécie do micro-organismo (23%) (FAIX; KOVARIK, 1989).

*C. albicans* é o microrganismo mais comumente detectado em associação com bactérias (DOUGLAS, 2003). Porém a arquitetura do biofilme e as consequentes funções biológicas destas associações não têm sido identificadas com precisão porque ainda não são bem compreendidas as interações entre as cepas criadas a partir de um ambiente de incubação mista (PARK et al., 2014).

Por causa da heterogeneidade das espécies dentro de biofilmes polimicrobianos, tem sido difícil avaliar a relevância e contribuição de espécies individuais para a patogênese da doença. No entanto, com a utilização de técnicas tradicionais e computacionais, é possível aumentar a compreensão do processo sinérgico desta associação, analisando os fatores moleculares que influenciam a estabilidade da formação do biofilme misto.

## **2.2 Metodologia**

### **2.2.1 Seleção do grupo de dados do transcriptoma de *Candida albicans***

Inicialmente foi realizada uma análise no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando os descritores *Candida albicans* e *bacterial microbiota*, uma vez que o foco da análise é a influência de micro-organismos da microbiota de mucosas sobre o

crescimento e biofilme de *Candida albicans*. Assim, foi então selecionado o estudo “The Transcriptional Stress Response of *Candida albicans* to Weak Organic Acids” (COTTIER et al., 2015), publicado no ano de 2015 na Revista G3 (Bethesda) – Genes, Genomes and Genetics. O estudo em questão avaliou a influência de ácidos fracos, abundantes metabólitos produzidos por bactérias da microbiota de mucosas, sobre o crescimento de *Candida albicans* (SC5314). Foi utilizada a estratégia de sequenciamento da resposta transcricional de *Candida albicans* submetida ao tratamento de ácidos láctico, acético, propiônico e butírico em diferentes tempos de cultivo. Os dados evidenciaram uma resposta transcricional diferente para cada tipo de ácido, em condições agudas e crônicas, com genes exclusivamente presentes em cada tipo de tratamento, sugerindo que metabólitos produzidos por outros micro-organismos da microbiota influenciam a fisiologia da levedura *Candida albicans*, inclusive na interação parasito-hospedeiro, alterando o processo do equilíbrio saúde-doença.

### **2.2.2 Análise dos genes de *Candida albicans* exclusivamente expressos na presença de ácido láctico e seleção dos genes relacionados à formação de biofilme**

Para o início do processo de inferência de redes de regulação gênica, é necessário selecionar genes candidatos. Como critério de seleção, foram analisados genes de *Candida albicans* exclusivamente expressos na presença de ácido láctico, um metabólito produzido também pela bactéria *Streptococcus agalactiae*. Em seguida, todos esses genes foram analisados por meio de informações presentes no banco de dados “*Candida* Genome Database” ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)) e então selecionados os mais relacionados à produção de proteínas funcionais à adesão, formação de hifas e biofilme, um processo agravante nos casos de infecções causadas por estes micro-organismos.



### 2.2.3 Inferências das redes de regulação dos genes selecionados

Após selecionados os genes de interesse, conforme descrito no item anterior, os dados foram analisados utilizando o projeto DimReduction (LOPES et al., 2008), um software multiplataforma (Java) de código aberto com seleção de características genéticas, uma abordagem de reconhecimento de padrões que auxilia na escolha, de acordo com alguns critérios importantes, para explicar certos fenômenos biológicos, incluindo diferentes algoritmos com dimensionalidade e inferência, por meio de validação cruzada, de redes de regulação gênica.

A inferência dos relacionamentos entre os genes foi realizada observando apenas a expressão, logo os genes candidatos inferidos não necessitam de nenhum conhecimento *a priori*, gerando a possibilidade de descoberta de relações desconhecidas.

## 2.3 Resultados e discussões

### 2.3.1 Genes exclusivamente expressos na presença de ácido láctico e seleção dos genes relacionados à formação de biofilme.

A análise dos dados presentes na amostra inicial (artigo de referência) permitiu identificar os genes de *Candida albicans* (SC5314) expressos exclusivamente na presença de ácido láctico e suas principais funções são apresentados no quadro abaixo (quadro 1).

**Quadro 1** - Genes (ORFs) de *Candida albicans* exclusivamente expressos na presença de ácido láctico.

Nº da ORF	Descrição da função do gene (ORF)	Referências
<i>ACH1</i>	Codificante da acetil-coA-hidrolase, proteína solúvel presente em hifas, antígeno humano, participante da adesão em poliestireno, associada à sinalização do farnesol, induzida pelo cetoconazol, prevalente na fase estacionária do crescimento.	VYLKOVA et al., 2011
<i>ATP18</i>	Codificante da subunidade do complexo F1F0 ATP sintase.	CABEZON et al., 2009

<i>COX8</i>	Supostamente codificante da enzima citocromo C oxidase, induzida pela flucitosina (antifúngico), reprimida pela caspofungina (antifúngico)	CABEZON et al., 2009
<i>CTA24</i>	Codificante de um suposto fator transcricional, reprimido pela proteína Efg1, membro da família dos genes do telomero proximal, expressão aumentada em modelo de candidíase oral.	ZAKIKHANY et al., 2007
<i>CTN1</i>	Codificante da carnitina acetil transferase, requerido no crescimento em fontes de carbono não fermentáveis, não presente no crescimento filamentosos ou no mecanismo de patogenicidade em camundongos, induzida na presença de macrófagos, participante da formação do biofilme.	NOBILE et al., 2012
<i>CYB2</i>	Codificante de uma proteína supostamente precursora do citocromo B2, induzido na presença de ferro, reprimido em meio alcalino, regulado pelo gene <i>SSN6</i> , reprimido pelo gene <i>HAP43</i> e induzido na formação do biofilme.	NOBILE et al., 2012
<i>FUM12</i>	Supostamente codificante da fumarato hidratase, enzima do ciclo do ácido cítrico, induzido na presença de ferro, proteína presente nas fases exponencial e estacionário do crescimento.	KUSCH et al., 2008
<i>GCN4</i>	Codificante de um fator transcricional, indução no anabolismo de aminoácidos, requerido na formação do biofilme e formação de hifas.	NOBILE et al., 2012
<i>GCY1</i>	Produtor da aldo/ceto redutase, reprimido na presença do farnesol, prevalente na fase estacionária do crescimento, ausente na formação do biofilme.	NOBILE et al. 2012
<i>GLX3</i>	Codificante da proteína ligante da imunoglobulina E, participante do estresse oxidativo, prevalente na fase estacionária do crescimento, participante da formação do biofilme.	NOBILE et al. 2012
<i>GPD2</i>	Codificante da proteína da superfície celular, similar a glicerol-3P-desidrogenase, induzida no processo de regeneração da parede celular, induzida na presença de macrófagos e participante da formação do biofilme.	DESAI et al., 2013
<i>HGT10</i>	Produtor da glicerol permease, envolvida na captação de glicerol, induzida em processos de estresse osmótico, expressão reduzida em meio rico em glicose, participante do processo de regeneração da parede celular.	SINGH et al 2011

<i>HGT8</i>	Codificante de uma proteína com alta afinidade por glicose, membro da superfamília de transporte de glicose e apresenta expressão aumentada na formação de biofilme.	BONHOMME et al., 2011
ITS2	Região não codificante, participante da maturação do rRNA 18S, 5.8S e 25S rRNA	JONES et al., 2004
<i>KGD1</i>	Codificante para uma proteína, supostamente, 2-oxoglutarato-desidrogenase, regulada pelo gene <i>EFG1</i> e <i>HAP43</i> , ausente na formação de hifas, prevalente na fase estacionária do crescimento, presente na formação do biofilme em cateter.	SINGH et al 2011
<i>LYS12</i>	Codificante da homoisocitrato desidrogenase, participante da via de biossíntese de lisina, expressão levemente diminuída na fase estacionária do crescimento e ausente na formação do biofilme.	GABRIEL et al., 2013
<i>LYS22</i>	Codificante da homocitrato sintase, reprimida pelo óxido nítrico e hipóxia, expressão diminuída na fase estacionária do crescimento, induzida na presença de cetoconazol, induzida na formação do biofilme.	GABRIEL; MILEWSKI, 2016
orf19.1389	A proteína produzida por este gene é ortóloga da atividade de formação da calda poli-A, papel na atividade metabólica do mRNA e a proteína apresenta localização citoplasmática.	CGD, 2010
orf19.1480	Suposto codificador da succinate desidrogenase, enzima do ciclo do ácido cítrico, expressão reduzida na presença de óxido nítrico, reprimido pelos genes <i>EFG1</i> e <i>HAP43</i> .	SINGH et al., 2011
orf19.1857	Suposto codificador do ácido L-azetidina-2-carboxílico acetiltransferase.	NOBILE et al., 2013
orf19.200	Suposto codificador de proteína ligante ao RNA, expressão reprimida na formação do biofilme.	NOBILE et al., 2012
orf19.3954.1	Função ainda não estabelecida, gene ortólogo de <i>C. parapsilosis</i> (CDC317: CPAR2_101170), <i>Candida tenuis</i> (NRRLY-1498: CANTEDRAFT_113855), <i>Debaryomyces hansenii</i> (CBS767: DEHA2G20240g) e <i>Pichia stipitis</i> (Pigna1: psti_CGOB_00174)	CGD, 2010
orf19.962	Codificante de uma proteína com domínio participante	SINGH et al.,

	da ligação da RNA polimerase I ao sítio promotor, induzido pelo gene <i>HAP43</i> .	2011
<i>OSM2</i>	Suposto codificador da enzima mitocondrial fumarato redutase, regulado por Ssn6p, GCN2P e Gcn4p, expressão diminuída pelo gene <i>HOG1P</i> , prevalente na fase estacionária do crescimento e reprimido pelo gene <i>HAP43P</i> .	SINGH et al., 2011
<i>PGA62</i>	Codificante de uma adesina presente na parede celular, induzido na presença de fluconazole, altas concentrações de ferro, durante a regeneração da parede celular, reprimido por <i>CYR1</i> e <i>RAS1</i> e induzido por <i>TBF1</i> .	CHAUDHURI et al., 2011
<i>PYC2</i>	Suposto codificante da piruvato carboxilase, reprimido por <i>SSK1</i> , tratamento com benomil e alta expressão do gene <i>MDR1</i> , prevalente na fase estacionária do crescimento e reprimido na formação do biofilme.	BONHOMME et al., 2011
<i>SIM1</i>	Codificante de uma proteína adesina, envolvida na manutenção da parede celular, possivelmente secretada e induzida na formação do biofilme.	NOBILE et al., 2012
<i>TPM2</i>	Suposto codificante da proteína tropomiosina, regulada por Gcn4, reprimida em situações de baixa concentração de aminoácidos, induzida na presença de macrófagos, levemente expressa na fase estacionária do crescimento e reprimida na formação do biofilme.	NOBILE et al., 2012

Pela análise das funções descritas no quadro acima, os genes fortemente relacionados à aderência em superfícies, formação de hifas e maturação do biofilme são *GPD2* (orf19.691), *ACH1* (orf19.3171) e *GCN4* (orf19.1358), utilizados para a inferência das redes de regulação pelo software DimReduction.

### **2.3.2 Redes de regulação de genes alvos relacionados à formação de biofilme em *Candida albicans* na presença de ácido láctico.**

Após o processamento dos dados pelo software DimReduction, conforme os parâmetros previamente estabelecidos e utilizando os 3 genes candidatos

selecionados previamente, foi possível obter as prováveis redes de regulação, apresentadas nas figuras 1, 2 e 3.

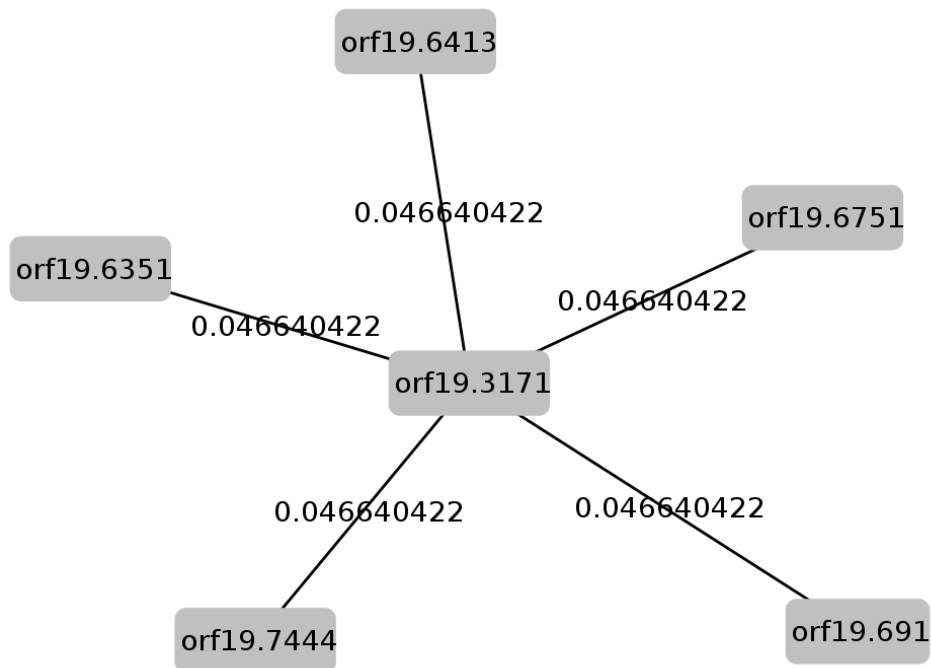


**Figura 1:** Rede de regulação inferida pelo software DimReduction utilizando o gene *GPD2* como alvo da análise.

A figura 1 (acima) representa a primeira inferência de rede de regulação apresentada pelo software, tendo como gene alvo o *GPD2* (orf19.691), que codifica uma proteína de superfície similar à enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (NEVES et al., 2004). Esta proteína também é induzida nos momentos em que a célula necessita realizar a regeneração da parede celular e/ou formação de hifas (CASTILLO et al., 2006; NOBILE et al., 2012; LUO et al., 2013). Estudos também confirmaram a associação deste gene na formação do biofilme (DESAI et al., 2013; LUO et al., 2013). Estas mesmas funções biológicas foram observadas num outro gene pertencente à este rede, o *RHR2* (orf19.5437), codificante da enzima glicerol-3-fosfatase (BONHOMME et al., 2011; CASTILLO et al., 2006; DESAI et al., 2013).

O gene representado pela orf19.3914, ainda não caracterizado, produz uma proteína que apresenta domínios relacionados à iniciação da tradução no citoplasma da levedura (CGD, 2010) e o gene *ZCF4* (orf19.1227) está fortemente relacionado a um fator transcricional (MAICAS et al., 2005). A análise em conjunto destes genes apresenta relação biológica, porém esta relação pode estar associada a diferentes

eventos fisiológicos celulares de *Candida albicans*, além dos processos de formação do biofilme.



**Figura 2:** Rede de regulação inferida pelo software DimReduction utilizando o gene *ACH1* como alvo da análise.

Utilizando o gene *ACH1* (orf19.3171) como candidato para a inferência de uma rede de regulação (figura 2), é possível observar que o gene *GPD2* (orf19.691), alvo da rede apresentada na figura anterior (figura 1), apresentou correlação novamente com a formação de biofilme em *Candida albicans*.

O gene *ACH1* é codificante da enzima acetil-coA hidrolase, presente na fase de formação de hifas, uma das proteínas responsáveis pela aderência em superfícies abióticas e presente nos mecanismos biológicos de alcalinização do meio (MARCHAIS et al., 2005; SHIRTLIFF et al., 2009; VYLKOVA et al., 2011).

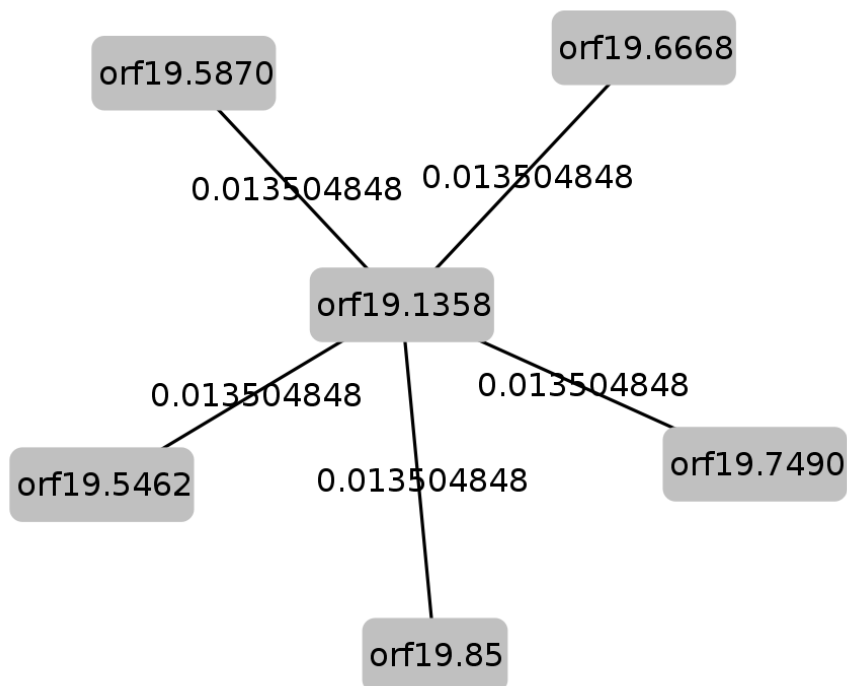
Adicionalmente, nesta rede de regulação estão presentes os genes orf19.7444 e orf19.6751, codificam fatores relacionados à transcrição e tradução (CGD, 2010), respectivamente.

O gene orf19.6413 codifica uma proteína sem função definitivamente conhecida, porém este gene também foi expresso num estudo que avaliou a

formação de biofilme em cateter (NETT et al., 2009). Por outro lado, o gene orf19.6351, ainda não caracterizado, apresenta ortologia com genes de *C. dubliniensis* (CD36: Cd36\_11880), *Candida tenuis* (NRRL Y-1498: cten\_CGOB\_00231), *Debaryomyces hansenii* (CBS767: DEHA2D04928g) e *Pichia stipitis* (Pignal: PICST\_29234) (CGD, 2010).

A análise das funções dos genes correlacionados apresentados nesta inferência (figura 2) demonstram que apesar da associação biológica nos eventos da formação do biofilme, para que se possa descrever melhor relação biológica em relação ao modelo matemático, mais informações das funções das proteínas codificadas por estes genes são necessárias.

A figura abaixo (figura 3) apresenta a rede de regulação gerada pelo software quando foi utilizado como gene alvo o *GCN4* (orf19.1358), demonstrando que outros 5 genes apresentam expressão correlacionada a este candidato.



**Figura 3:** Rede de regulação inferida pelo software DimReduction utilizando o gene *GCN4* como alvo da análise.

Como mencionado, células do biofilme exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e a transcrição de genes, diferente do modo planctônico de crescimento (DONLAN; COSTERTON, 2002). Condições ambientais são fortes influenciadoras da capacidade de formar biofilme e alguns estudos têm

investigado a formação de biofilme *in vitro* utilizando diferentes meios de crescimento, enriquecidos ou não, em diferentes pHs, temperaturas e osmolaridade (HO et al., 2013; ROSINI; MARGARIT, 2015).

Os principais genes envolvidos na formação do biofilme podem ser divididos quanto à fase de adesão, filamentação e maturação da arquitetura da comunidade. Nesta fase, há um intenso processo metabólico para a produção de matriz extracelular, cuja finalidade é fortalecer a estrutura e proteger as células presentes no interior do biofilme. Além disso, alguns genes tornam-se necessários para estabilizar as condições físico-químicas do ambiente, como por exemplo, o gene *GCN4*, que apresenta função nos processos biológicos de neutralização do pH, filamentação, formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas e regulação positiva em relação a ativação do catabolismo (FRADIN et al., 2005; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; TRIPATHI et al., 2002; ), fatores necessários no processo de formação e permanência do biofilme. Neste contexto, o gene *SEC6* (orf19.5463) apresenta relação, com expressão aumentada, nas condições de formação de hifas (JONES, SUDBERY, 2010), um processo bastante relacionado à maturação do biofilme e invasão dos tecidos do hospedeiro.

O gene *GCN4* (orf19.1358) codifica uma proteína fator transcricional que é requerido na formação do biofilme (NOBILE et al., 2012). Adicionalmente, outros genes, como *SEC6* (orf19.5463), *GPX2* (orf19.85) e orf19.7490, estão relacionados aos eventos de formação de biofilme, como adesão e formação de hifas (BONHOMME et al., 2011; JONES, SUDBERY, 2010; NOBILE et al., 2012).

Na fase de maturação do biofilme, as células da levedura iniciam uma comunicação entre si que resultam na expressão de genes específicos de biofilme favorecendo a secreção da matriz, contendo substâncias polissacarídicas extracelulares que estabilizam a rede do biofilme (HANSEN et al., 2007; NETT; ANDES, 2006), geralmente o tamanho das microcolônias aumenta e a sua espessura atinge até cerca de 100  $\mu\text{m}$ . Para que a completa maturação ocorra, muitas proteínas relacionadas ao transporte de moléculas são necessárias, o que explica a relação do gene Orf19.7490, um transportador transmembrana (GAUR et al., 2008), do gene *CTP1* (Orf19.5870), um transportador mitocondrial de citrato (SINGH et al., 2011) e do gene Orf19.6668, com função provável associada a via da ubiquitina, participante do ciclo celular (CGD, 2010)



Biofilmes de *Candida* têm sido estudados primariamente em superfícies abióticas (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006), mas atenção significativa tem sido dada para a formação sobre superfícies bióticas, incluindo os tecidos orais e vaginais (DONGARI-BAGTZOGLOU et al., 2009; HARRIOTT et al., 2010). Essas mucosas fornecem um ambiente excelente para o desenvolvimento de biofilme e suas fases de formação são semelhantes ao observado *in vitro* (HARRIOTT et al., 2010). *Candida albicans* apresenta diversos fatores de proteção em relação às moléculas tóxicas produzidas pelo hospedeiro, o gene *GPX2* codifica uma enzima peroxidase que protege a levedura do estresse oxidativo (LORENZ et al., 2004).

Com base nas inferências geradas a partir dos 3 genes alvos citados anteriormente, é possível afirmar que a melhor convergência entre a inferência estatística e a análise biológica está apresentada na rede gerada a partir do gene *GCN4* (orf19.1358). Assim, a inferência das relações dos genes de forma estatística é uma ferramenta útil para gerar hipóteses dentro do grande universo de possibilidades nas combinações possíveis entre as variáveis.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do número significativo de genes associados à formação de biofilme por *Candida albicans* publicado na literatura, os mecanismos de regulação desse processo e a correlação com outros genes ainda não foram totalmente elucidados. Adicionalmente, levando em consideração o grande interesse dos pesquisadores microbiologistas em conhecer a influência de metabólitos produzidos por outros micro-organismos na formação de biofilme misto, este estudo utilizou programas computacionais para inferir uma suposta rede de regulação de genes associados à formação do biofilme na presença de ácido láctico, um metabólito produzido por *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria comumente presente em mucosas do trato urogenital e também associada à formação de biofilme. Após a análise dos dados obtidos, é possível estabelecer que os genes *GCN4* (orf19.1358), *SEC6* (orf19.5463), *GPX2* (orf19.85), Orf19.7490, Orf19.7490, *CTP1* (Orf19.5870) e Orf19.6668 estão fortemente associados à formação do biofilme em *Candida albicans* e apresentam uma forte correlação biológica neste processo.

A inferência estatística auxilia o estabelecimento de informações biológicas ainda pouco conhecidas, porém a validação destas informações deve ser realizada em condições experimentais controladas. Para a confirmação desta rede de regulação, recomenda-se a análise da correlação direta da expressão destes genes na presença de ácido láctico e ainda do biofilme formado na presença de *Streptococcus agalactiae* ou metabólitos produzidos por esta bactéria. Caso seja confirmada esta rede de regulação, estas informações contribuirão significativamente para o estabelecimento inicial de uma via bioquímica da formação do biofilme por *Candida albicans* e elucidação molecular da influência de metabólitos bacterianos em biofilme misto.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-32, Nov 2005.
- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 2, p. 253-73, Apr 2010.
- ASMUNDSDÓTTIR, L. R. et al. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 2, p. e17-24, Jul 2008.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 7, p. 671-9, Jul 1999.
- BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 3, p. 442-50, May 2008.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 588-94, Dec 2006.
- BONHOMME, J. et al. Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. **Mol Microbiol**, v. 80, n. 4, p. 995-1013, May 2011.
- CABEZÓN, V. et al. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. **Proteomics**, v. 9, n. 20, p. 4770-86, Oct 2009.
- CASTILLO, L. et al. Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. **Fungal Genet Biol**, v. 43, n. 2, p. 124-34, Feb 2006.
- CASTÓN-OSORIO, J. J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32 Suppl 2, p. S103-9, Nov 2008.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001.
- CHAUDHURI, R. et al. FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. **BMC Genomics**, v. 12, p. 192, 2011.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, Aug 2006.
- COLOMBO, A. L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 4, p. 281-6, Aug 1999.
- CONCIA, E.; AZZINI, A. M.; CONTI, M. Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. **Drugs**, v. 69 Suppl 1, p. 5-14, 2009.

- COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995.
- COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **Int J Artif Organs**, v. 28, n. 11, p. 1062-8, Nov 2005.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999.
- COTTIER, F. et al. The transcriptional stress response of *Candida albicans* to weak organic acids. **G3 (Bethesda)**, v. 5, n. 4, p. 497-505, Apr 2015.
- CUGINI, C. et al. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 4, p. 896-906, Aug 2007.
- DANDO, S. J. et al. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 691-726, Oct 2014.
- DESAI, J. V. et al. Regulatory role of glycerol in *Candida albicans* biofilm formation. **MBio**, v. 4, n. 2, p. e00637-12, 2013.
- DONGARI-BAGTZOGLU, A. et al. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7967, 2009.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.
- DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 23-31, Oct 2004.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 30-6, Jan 2003.
- ENE, I. V.; BENNETT, R. J. Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 12, p. 1909-13, Dec 2009.
- FAIX, R. G.; KOVARIK, S. M. Polymicrobial sepsis among intensive care nursery infants. **J Perinatol**, v. 9, n. 2, p. 131-6, Jun 1989.
- FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 71 Suppl 1, p. S21-7, Dec 2000.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-33, Sep 2010.
- FRADIN, C. et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 397-415, Apr 2005.

- GABRIEL, I. et al. Homoisocitrate dehydrogenase from *Candida albicans*: properties, inhibition, and targeting by an antifungal pro-drug. **FEMS Yeast Res**, v. 13, n. 2, p. 143-55, Mar 2013.
- GABRIEL, I.; MILEWSKI, S. Characterization of recombinant homocitrate synthase from *Candida albicans*. **Protein Expr Purif**, v. 125, p. 7-18, Sep 2016.
- GARCIA-SANCHEZ, S. et al. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic Cell**, v.3, n.2, p.536-545, 2004.
- GIBBS, R. S.; SCHRAG, S.; SCHUCHAT, A. Perinatal infections due to group B streptococci. **Obstet Gynecol**, v. 104, n. 5 Pt 1, p. 1062-76, Nov 2004.
- GRANGER, B. L. et al. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. **Microbiology**, v.151, p.1631-1644, 2005.
- HANSEN, S. K. et al. Evolution of species interactions in a biofilm community. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 533-6, Feb 2007.
- HARRIOTT, M. M. et al. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 12, p. 3635-44, Dec 2010.
- HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 557-63, Nov 2011.
- HAY, P.; CZEIZEL, A. E. Asymptomatic *Trichomonas* and *Candida* colonization and pregnancy outcome. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 21, n. 3, p. 403-9, Jun 2007.
- HETTIARACHCHI, N. et al. Prevalence and management of non-*albicans* vaginal candidiasis. **Sex Transm Infect**, v. 86, n. 2, p. 99-100, Apr 2010.
- HO, Y. R. et al. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. **Med Microbiol Immunol**, v. 202, n. 2, p. 105-15, Apr 2013.
- HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 12, p. 1695-703, Jun 2009.
- HORNBY, J. M. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 2982-92, Jul 2001.
- INGLIS, D. O.; ARNAUD, M.B.; BINKLEY, J.; SHAH, P.; SKRZYPEK, M. S.; WYMORE, F.; BINKLEY, G.; MIYASATO, S. R.; SIMISON, M.; SHERLOCK, G. **The *Candida* Genome Database incorporates multiple *Candida* species.** Disponível em: <<http://www.candidagenome.org>>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- JENKINSON, H. F.; DOUGLAS, L. J. In: Polymicrobial diseases. Brogden KA, Guthmiller JM, editor. ASM Press. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections; p. 357–73, 2002.

JONES, L. A.; SUDBERY, P. E. Spitzenkorper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 10, p. 1455-65, Oct 2010.

JONES, T. et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 19, p. 7329-34, May 2004.

KAM, A. P.; XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, n. 1, p. 19-28, May 2002.

KELLY, M. T. et al. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. **Mol. Microbiol**, v.53, n.3, p.969-983, 2004.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 255-67, Apr 2004.

KROHN, M. A.; HILLIER, S. L.; BAKER, C. J. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1410-5, Jun 1999.

KRUPPA, M. et al. The Two-Component Signal Transduction Protein Chk1p Regulates Quorum Sensing in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v.3, n.4, p.1062-1065, 2004.

KUCHARÍKOVÁ, S. et al. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 9, p. 1261-9, Sep 2011.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.59, p.113-133, 2005.

KURAMITSU, H. K. et al. Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 71, n. 4, p. 653-70, Dec 2007.

KUSCH, H. et al. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. **Int J Med Microbiol**, v. 298, n. 3-4, p. 291-318, Apr 2008.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, May 2009.

LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 107-31, 2008.

LEWIS, R. E. et al. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.46, n.4, p.1153-1155, 2002.

LI, F. et al. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. **Eukaryot Cell**, v.6, p.931-939, 2007.

- LIN, C. H. et al. Genetic control of conventional and pheromone-stimulated biofilm formation in *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003305, 2013.
- LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v.90, p.939-949, 1997.
- LOPES, F. M.; MARTINS, D. C.; CESAR, R. M. Feature selection environment for genomic applications. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 451, 2008.
- LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-87, Oct 2004.
- LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria: a review. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1602-7, Jun 2001.
- LUO, S. et al. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. **J Infect Dis**, v. 207, n. 4, p. 594-603, Feb 2013.
- LUQUE, A. G. et al. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 53-9, Jan 2009.
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001.
- MAICAS, S. et al. In silico analysis for transcription factors with Zn(II)(2)C(6) binuclear cluster DNA-binding domains in *Candida albicans*. **Comp Funct Genomics**, v. 6, n. 7-8, p. 345-56, 2005.
- MANSON, J. M.; RAUCH, M.; GILMORE, M. S. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. **Adv Exp Med Biol**, v. 635, p. 15-28, 2008.
- MARCHAIS, V. et al. DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. **FEMS Microbiol Lett**, v. 245, n. 1, p. 25-32, Apr 2005.
- MCCORD, N. et al. A complete audit cycle of intrapartum group B *streptococcus* prophylaxis. **Health Bull (Edinb)**, v. 59, n. 4, p. 263-7, Jul 2001.
- NETT, J. E. et al. Time course global gene expression analysis of an in vivo *Candida* biofilm. **J Infect Dis**, v. 200, n. 2, p. 307-13, Jul 2009.
- NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 340-5, Aug 2006.
- NEVES, L.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C. Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 51-62, Oct 2004.
- NOBILE, C. J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 126-38, Jan 2012.

NOBILE, C. J. et al. Genetic control of chlamyospore formation in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 12, p. 3629-37, Dec 2003.

NOBILE, C. J. et al. Critical role of BCR1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. **PLoS Pathogens**, v.2, n.7, p.636-649, 2006.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. **Curr Biol.**, v.15, n.12, p.1150-1155, 2005.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 49-79, 2000.

PARK, S. J. et al. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. **Yonsei Med J**, v. 55, n. 2, p. 449-58, Mar 2014.

PÉREZ, A. et al. Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. **FEMS Yeast Res**, v.6, p.1074-1084, 2006.

PETERSON, B. W. et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 2, p. 234-45, Mar 2015.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, Jan 2007.

PHARES, C. R. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. **JAMA**, v. 299, n. 17, p. 2056-65, May 2008.

PROSSER, B. L. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 31, n. 10, p. 1502-6, Oct 1987.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMAGE, G. et al. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.214, p.95-100, 2002.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 979-86, Nov 2006.

RICHARD, M. L. et al. *Candida albicans* Biofilm-Defective Mutants. **Eukaryotic Cell**, v.4, n.8, p.1493-1502, 2005.

RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 4, p. 5-24, May 2008.



- RODRÍGUEZ, D. et al. Predictors of candidaemia caused by non-*albicans* *Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 11, p. 1676-82, Nov 2010.
- ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 6, 2015.
- RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 495-504, Apr 2006.
- RÜPING, M. J.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. **Drugs**, v. 68, n. 14, p. 1941-62, 2008.
- SAMARANAYAKE, L. P. Essential microbiology for dentistry. 3 Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2006.
- SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. Oral candidosis. London: Wright, 1990.
- SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis**, v. 14, n. 7, p. 582-90, Oct 2008.
- SHIRTLIFF, M. E. et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2392-401, Jun 2009.
- SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 299, n. 1, p. 1-8, Oct 2009.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 2, p. 288-305, Mar 2012.
- SINGH, R. P. et al. Cap2-HAP complex is a critical transcriptional regulator that has dual but contrasting roles in regulation of iron homeostasis in *Candida albicans*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 28, p. 25154-70, Jul 2011.
- SMITH, A. J. et al. *Staphylococcal* species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. **J Hosp Infect**, v. 55, n. 3, p. 184-9, Nov 2003.
- SOHN, K. et al. EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. **Mol Microbiol.**, v.47, n.1, p.89-102, 2003.
- SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Trop**, v. 81, n. 2, p. 101-10, Feb 2002.
- SOUZA, P. C. et al. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical-vaginal cytology stained by Harris-Shorr. **Arch Gynecol Obstet**, v. 279, n. 5, p. 625-9, May 2009.

SRIKANTHA, T. et al. Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* a/ $\alpha$  biofilms. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 6, p. 875-88, Jun 2013.

STOLDT, V. R. et al. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. **EMBO J.**, v.16, n.8, p.1982-1991, 1997.

THEIN, Z. M. et al. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467-75, Nov 2009.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 8, p. 672-80, Aug 2006.

TRIPATHI, G. et al. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. **EMBO J**, v. 21, n. 20, p. 5448-56, Oct 2002.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 1843-50, Jun 2007.

TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33705, 2012.

VYLKOVA, S. et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBio**, v. 2, n. 3, p. e00055-11, 2011.

WALSH, T. J. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 3, p. 327-60, Feb 2008.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2007.

ZAKIKHANY, K. et al. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 2938-54, Dec 2007.