

Estudo da relação ecológica das espécies de leveduras com a *Candida albicans*

Após realização da prova pública

Cátia Filipa Torres Caetano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Joana Rita Gonçalves Araújo Rolo Mateus
Co-orientador: Mestre Carlos Alberto da Silva Gaspar

Dezembro, 2022

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Cátia Filipa Torres Caetano, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10935 do Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade das ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 13/12 /2022

Cátia Filipa TORRES CAETANO

Cátia Filipa Torres Caetano

Folha em branco

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, Rui e Bela, por me apoiarem incondicionalmente e nunca travarem os meus sonhos. Sem eles esta caminhada, que começou na licenciatura, nunca teria sido possível. Apesar de muitas vezes não perceberem as situações e não saberem qual o melhor conselho estiverem sempre lá para que pudesse desabafar.

Quero agradecer à minha orientadora, Joana Rolo, por ter aceite trabalhar comigo e acompanhar-me nesta etapa tão importante. Agradecer por todo o apoio e conhecimento transmitido ao longo destes meses, mas também pela disponibilidade, conselhos e motivação dada ao longo da tese.

De igual forma, agradeço ao meu co-orientador, Carlos Gaspar, por todo o conhecimento que adquiri, pelas sugestões dadas, pela motivação, confiança e todo o apoio dado ao longo da dissertação.

Ao professor Doutor José Martinez-de-Oliveira, à Doutora Ana Palmeira de Oliveira e à Doutora Rita Palmeira de Oliveira, pelos conteúdos transmitidos, assim como pelo caloroso acolhimento, integração e união de todo o grupo de investigação.

Quero agradecer a todas as minhas colegas de laboratório, pelas amizades criadas, pelo ambiente excecional que se gerou, por todo o apoio dentro e fora do CICS. Um agradecimento também especial a todos os meus colegas dos outros laboratórios por todo o apoio dado.

Aos meus amigos, aos que sem eles nada disto seria possível, à minha afilhada, que esteve sempre presente, às minhas colegas de casa e aos meus colegas de curso por todo o apoio essencial e palavras de motivação, nunca me deixando desmotivar. Um muito obrigado, por se terem cruzado na minha vida e por terem ficado!

Folha em branco

Resumo

O papel da comunidade fúngica, a microbiota, na saúde da mucosa vaginal é uma área de investigação muito atual. O aparecimento de novas tecnologias de sequenciação e avanços na bioinformática permitiram descobrir novas espécies de fungos neste nicho.

Candida spp. constitui o grupo mais importante de fungos patogénicos oportunistas, sendo o mais prevalente em infeções vulvovaginais. Contudo fungos como a *Rhodotorula spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Malassezia spp.* têm vindo a emergir como potenciais patogénicos deste nicho, sendo por isso relevante, do ponto de vista científico, perceber qual a sua interação ecológica com a *C. albicans* quando estão presentes em co- cultura.

O objetivo deste estudo foi avaliar qual o impacto das novas leveduras na patogenicidade da *C. albicans*, no crescimento *in-vitro*, na formação de biofilme *in-vitro* em diferentes momentos de colonização (mistos e pré- formados) e na formação de tubo germinativo. Os ensaios foram realizados com uma única espécie ou com co- culturas de *C. albicans* ATCC10231 com uma outra espécie de levedura, *R. mucilaginosa* DSM13621, *M. furfur* DSM6170 e *C. albidus* DSM70215.

Os resultados mostraram que a *M. furfur* cria uma relação de simbiose com a *C. albicans* demonstrando uma maior taxa de crescimento em co-cultura (aproximadamente 1/3), um aumento da biomassa do biofilme, quando misturadas (154,1%) e pré- formados (166,8%) e um aumento da formação de tubo germinativo da *C. albicans* (119,8%). Já para as leveduras *R. mucilaginosa* e *C. albidus* a relação é antagónica (com um decréscimo significativo em todos os ensaios), inibindo a patogenicidade da *C. albicans*.

Palavras-chave

Biofilme; Candida spp.; Cryptococcus spp.; Malassezia spp.; Rhodotorula spp.; Tubo Germinativo

Folha em branco

Abstract

The role of the fungal community, the mycobiota, in the health of the vaginal mucosa is a current area of research. The emergence of new sequencing technologies and advances in bioinformatics made it possible to discover new fungi in this niche. *Candida spp.* constitutes the most important group of opportunistic pathogenic fungi, being the most prevalent fungal species in vulvovaginal infections.

However, fungi such as *Rhodotorula spp.*, *Cryptococcus spp.* and *Malassezia spp.* have emerged as potential pathogens in this niche. Therefore it is relevant, from a scientific point of view, to understand their ecological interaction with *Candida spp.*, when they are present in co-culture.

The main aim of this study was to evaluate the impact of yeasts on *C. albicans*' pathogenicity focusing on *in-vitro* growth and *in-vitro* biofilm formation at different times of colonization (mixed and preformed) and germ tube formation. The assays were performed with a single species or with co-cultures of *C. albicans* ATCC10231 with one yeast species (*R.mucilaginosa* DSM13621, *M. furfur* DSM6170 or *C. albidus* DSM 70215).

The results showed that *M. furfur* creates a symbiotic relationship with *C. albicans*, yielding a higher growth rate of the co-culture (an increase of around 1/3), a higher amount of biofilm biomass of the co-culture, both when mixed (154.1%) and preformed (166.8%) and a higher rate of germ tube formation of *C. albicans* (119.8%). However, as for the yeasts *R. mucilaginosa* and *C. albidus*, the relationship is antagonistic (with a significant decrease in all assays), thus repressing *C. albicans*' pathogenicity.

Keywords

Biofilm; *Candida spp.*; *Cryptococcus spp.*; Germ Tube; *Malassezia spp.*; *Rhodotorula spp.*

Folha em branco

Índice

| | |
|--|----|
| Capítulo 1..... | 3 |
| Introdução..... | 3 |
| 1.1. Microbiota e Micobiota | 3 |
| 1.2. Mucosa oral, vaginal, intestinal e da pele | 5 |
| 1.3. Comunidades Fúngicas emergentes em estudo | 7 |
| 1.3.1. <i>Candida spp.</i> | 8 |
| 1.3.2. <i>Rhodotorula Spp.</i> | 9 |
| 1.3.3. <i>Malassezia spp.</i> | 10 |
| 1.3.4. <i>Cryptococcus spp.</i> | 12 |
| 1.4. Epidemiologia e Incidência | 12 |
| 1.5. Curva de Crescimento Microbiano | 15 |
| 1.6. Fatores de Virulência | 16 |
| 1.6.1. Biofilmes..... | 18 |
| 1.6.2. Tubo germinativo..... | 21 |
| Capítulo 2..... | 22 |
| Objetivos deste trabalho..... | 22 |
| Objetivo Geral | 22 |
| Objetivos específicos | 22 |
| Capítulo 3..... | 23 |
| Materiais e Métodos..... | 23 |
| 3.1. Delineamento do estudo | 23 |
| 3.2. Materiais e Métodos | 23 |
| 3.3. Preparações das estirpes | 25 |
| 3.3.1. Estirpes utilizadas..... | 25 |
| 3.3.2. Condições de armazenamento e preparação das estirpes..... | 25 |
| 3.4. Curvas de crescimento | 26 |
| 3.5. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes | 28 |
| 3.5.1. Biofilmes simples..... | 28 |
| 3.5.2. Biofilmes Mistos..... | 29 |
| 3.5.3. Biofilmes pré- formados..... | 30 |
| 3.6. Formação do tubo germinativo | 32 |
| 3.7. Análise estatística | 33 |

| | |
|---|----|
| Capítulo 4..... | 34 |
| Resultados | 34 |
| 4.1. Curva de Crescimento das leveduras a 25°C | 34 |
| 4.1.1. Curva de Crescimento a 25°C pelo Método das Diluições Sucessivas (UFC/mL) | 35 |
| 4.2. Curva de Crescimento das leveduras a 37°C | 37 |
| 4.2.1. Curva de Crescimento a 37°C pelo Método das Diluições Sucessivas (UFC/mL) | 38 |
| 4.3. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes simples | 39 |
| 4.3.1. Biofilmes simples a 25°C..... | 39 |
| 4.3.2. Biofilmes simples a 37°C | 41 |
| 4.3.3. Visualização dos biofilmes por Microscópio Invertido..... | 42 |
| 4.4. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes mistos | 43 |
| 4.4.1. Biofilmes mistos a 25°C | 43 |
| 4.4.1.1. Avaliação da biomassa dos Biofilmes mistos a 25°C..... | 43 |
| 4.4.1.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 25°C..... | 44 |
| 4.4.2. Biofilmes mistos a 37°C | 45 |
| 4.4.2.1. Avaliação da biomassa dos Biofilmes Mistos a 37 °C..... | 45 |
| 4.4.2.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 37°C | 47 |
| 4.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes Pré- Formados ... | 48 |
| 4.5.1. Avaliação dos Biofilmes Pré- Formados a 25°C..... | 48 |
| 4.5.1.1. Avaliação da biomassa dos biofilmes Pré- Formados a 25° C..... | 48 |
| 4.5.1.2 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 25°C | 49 |
| 4.5.2. Avaliação dos biofilmes pré- formados a 37°C..... | 50 |
| 4.5.2.1. Avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 37° C..... | 50 |
| 4.5.2.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 37° C | 52 |
| 4.6 Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo | 53 |
| 4.6.1. Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo a 25° C..... | 53 |
| 4.6.2. Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo a 37° C | 54 |
| 4.7 Quadro resumo - Correlação entre resultados | 56 |
| Capítulo 5..... | 58 |
| Discussão | 58 |
| Capítulo 6..... | 70 |
| Conclusão..... | 70 |
| Referências Bibliográficas | 72 |
| Anexos..... | 82 |

Folha em branco

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Distribuição das diferentes comunidades fúngicas nos diferentes nichos..... | 7 |
| Figura 2- Diagrama da curva de crescimento bacteriano, ilustrando as suas 4 fases distintas. Adaptação de: Prescott' Microbioly, 7 ^o edição [33] | 16 |
| Figura 3- Esquema do procedimento para a realização das curvas de crescimento. No esquema o procedimento está representado para apenas 1 estirpe..... | 27 |
| Figura 4- Esquema do procedimento para a realização dos biofilmes simples e mistos | 30 |
| Figura 5- Esquema do procedimento para a realização dos biofilmes Pré- Formados | 31 |
| Figura 6- Representação gráfica da densidade ótica (OD 600) nm vs. Tempo (horas) da curva de crescimento de 12 horas da estirpe <i>C. albicans</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>C. grutti</i> e das misturas das 2 últimas leveduras com a <i>C. albicans</i> | 34 |
| Figura 7- Representação Gráfica UFC/mL vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das 3 leveduras isoladas e das misturas da <i>C. albicans</i> + <i>R. mucilaginosa</i> e da <i>C. albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 36 |
| Figura 8- Representação gráfica OD 600 nm vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das estirpes <i>C. albicans</i> e <i>M. furfur</i> e das misturas em estudo em dois meios líquidos distintos (YPD e YPD suplementado)..... | 37 |
| Figura 9- Representação Gráfica UFC/mL vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das duas leveduras isoladas e das misturas em YPD e YPD com suplementação lipídica | 39 |
| Figura 10- Representação gráfica da formação de biofilmes a 25°C pela <i>C. albicans</i> , <i>R. mucilaginosa</i> e <i>C. albidus</i> com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa (590 nm) e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos..... | 40 |
| Figura 11- Formação de biofilmes a 37°C pela <i>C. albicans</i> e <i>M. furfur</i> com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa (590nm) e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos | 41 |
| Figura 12- Biofilmes dos isolados utilizados neste estudo, com aps 48 h. (a) Biofilme formado pela <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ;(b) Biofilme formado pela <i>R. mucilaginosa</i> DSM 13621; (c) Biofilme formado pela <i>M. furfur</i> DSM 6170 e (d) Biofilme formado pelo <i>C. albidus</i> DSM 70215 | 42 |
| Figura 13- Formação de biofilmes mistos a 25°C com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos | 43 |
| Figura 14- Representação em coluna das unidades formadoras de colonias dos biofilmes mistos a 25°C contadas após 24 horas de incubação e os respetivos erros padrões..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 15- Formação de Biofilmes mistos a 25°C pelos 3 isolados e as misturas, de acordo com a atividades metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 45 |
| Figura 16- Formação de biofilmes mistos a 37°C com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa, (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 46 |
| Figura 17- Representação em coluna das unidades formadoras de colónias dos biofilmes mistos a 37°C contadas após 24 horas de incubação e os respetivos erros padrões..... | 46 |
| Figura 18- Formação de Biofilmes mistos a 37°C pelos 2 isolados e as misturas, de acordo com a atividades metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 47 |
| Figura 19- Formação de biofilmes pré- formados a 25°C, de acordo com a biomassa, (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 48 |
| Figura 20- Representação em coluna das unidades formadoras de colónias dos biofilmes pré- formados a 25°C contadas e os respetivos erros padrões..... | 48 |
| Figura 21- Formação de Biofilmes pré- formados a 25° C pelos 3 isolados e as misturas, de acordo com a atividades metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos..... | 50 |
| Figura 22- Formação de biofilmes pré- formados a 37°C, de acordo com a biomassa, (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 51 |
| Figura 23- Representação em coluna das unidades formadoras de colónias dos biofilmes pré- formados a 37°C contadas após 24 horas de incubação e os respetivos erros padrões | 51 |
| Figura 24- Formação de Biofilmes pré- formados a 37° C pelos 2 isolados e as misturas, de acordo com a atividades metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos..... | 52 |
| Figura 25- Avaliação da formação de tubo germinativo a 25°C por parte da <i>C.albicans</i> e das misturas dos outras 2 leveduras com a <i>C.albicans</i> . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos..... | 54 |
| Figura 26- Avaliação da formação do tubo germinativo a 37°C pela <i>C. albicans</i> e da mistura da <i>M. furfur</i> com a levedura controlo no meio YPD e YPD suplementado . Valores de p< 0,05 foram considerados estatisticamente significativos | 55 |

Folha em branco

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Lista dos equipamentos utilizados no decorrer dos procedimentos utilizados no estudo..... | 23 |
| Tabela 2- Lista dos reagentes utilizados no decorrer dos ensaios realizados neste estudo..... | 24 |
| Tabela 3- Cálculo da taxa de crescimento das leveduras que crescem a 25°C e das 2 misturas correspondentes durante a fase exponencial da curva microbiana (no T8 e T9) e cálculo da percentagem correspondente ao crescimento comparado com o controlo <i>C. albicans</i> (100%)..... | 35 |
| Tabela 4- Cálculo da taxa de crescimento das leveduras que crescem a 37°C e das misturas correspondentes durante a fase exponencial (no T6 e T7) e cálculo da percentagem correspondente ao crescimento comparado com o controlo <i>C. albicans</i> (100%)..... | 38 |
| Tabela 5- Resultados dos 2 ensaios independentes realizados dos biofilmes simples com 48 horas de incubação a 25°C das 3 leveduras e convertidos em %, sendo a referencia (100%) a <i>C. albicans</i> | 40 |
| Tabela 6- Resultados dos 2 ensaios realizados dos biofilmes simples a 37°C e convertidos em %, sendo a referencia (100%) a <i>C. albicans</i> | 41 |
| Tabela 7- Média dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes mistos a 25°C e convertidos em %, sendo a referencia (100%) a <i>C. albicans</i> | 43 |
| Tabela 8- Média dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 25°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo a <i>C. albicans</i> | 44 |
| Tabela 9- Resultados dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes mistos a 37°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a <i>C. albicans</i> | 46 |
| Tabela 10- Resultado dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 37°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo a <i>C. albicans</i> | 47 |
| Tabela 11- Média dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 25°C e convertidos em %, sendo a nossa referência (100%) a <i>C. albicans</i> | 48 |
| Tabela 12- Média dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 25°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo a <i>C. albicans</i> | 49 |
| Tabela 13- Resultados dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 37°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a <i>C. albicans</i> | 51 |
| Tabela 14- Resultados dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 37°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo <i>C. albicans</i> | 52 |

| | |
|---|----|
| Tabela 15- Resultados dos valores da capacidade de formação de tubo germinativo pela <i>C. albicans</i> e pela mesma na presença das leveduras a 25°C..... | 53 |
| Tabela 16- Resultados dos valores correspondentes à capacidade de formação do tubo germinativo a 37°C da <i>C. albicans</i> isolada e da mesma com a <i>M. furfur</i> nos 2 meios líquidos usados..... | 55 |
| Tabela 17- Quadro resumo de todos os ensaios realizados neste trabalho..... | 56 |

Folha em branco

Lista de Acrónimos

| | |
|-----------------|---|
| ATCC | <i>American type Culture Collection</i> |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CICS-UBI | Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior |
| CV | Cristal Violeta |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DSM | <i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> |
| GRP | Gabinete de Relações Públicas |
| MTT | 3-(4,5- dimethylthiazol—2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| O.D. | Optical Density (Densidade ótica) |
| PBS | <i>Phosphate- Buffered Saline</i> |
| PDA | <i>Potato Dextrose Agar</i> |
| RPM | Rotações por minuto |
| SDA | <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> |
| UBI | Universidade da Beira Interior |
| UFC | Unidades formadoras de colónias |
| UFC/ml | Unidades formadoras de colónias por mililitro |
| YPD | <i>Yeast peptone Dextrose</i> |

Folha em branco

Comunicações Científicas

Comunicação Oral deste trabalho no XVII International CICS-UBI Symposium.

Caetano C.F., Gaspar C., Oliveira A.S.; Oliveira R.P., Oliveira J.M., Oliveira A.P, Rolo J. “Study of ecological relationship of yeast species with *candida albicans*”, XVII International CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal- 20 e 21 de julho de 2022

Artigo de revisão submetido

Caetano C.F., Gaspar C., Oliveira J.M., Oliveira A.P, Rolo J. “The role of yeasts in human health: a review”, .2, 2022.

Folha em branco

Capítulo 1

Introdução

1.1. Microbiota e Micobiota

Ao conjunto de microrganismos que, habitualmente, colonizam o interior do corpo humano designamos por microflora ou microbiota, sendo esta constituída por uma complexa diversidade de bactérias, vírus e fungos [1]. A sua constituição genómica designa-se por microbioma humano [1].

A composição deste microbioma é único para cada indivíduo, não se mantendo estático ao longo da vida, devido a mudanças ambientais, nutricionais e ecológicas.

A microbiota intestinal permite que o organismo humano se mantenha em homeostasia e saudável devidos aos papéis importantes que desempenha tais como, a produção de vitaminas, a desintoxicação, a regulação do metabolismo do colesterol e a regulação da expressão génica [2, 3]. O microbioma humano intestinal exerce um papel muito importante na composição do microbioma vaginal, existindo, uma correlação entre o meio intestinal e o vaginal [4].

Existe uma grande comunidade microbiana (numérica e versátil) no intestino, especialmente no cólon com números reportados de espécies que variam entre as 400 e as 1500, algumas das quais ainda não são cultiváveis [5, 6]. Devido a este ecossistema dinâmico que habita no intestino, muito do conhecimento que adquirimos até então sobre as interações entre as comunidades microbianas e o hospedeiro vieram do estudo da microbiota intestinal [2].

A soma dos genes e dos genomas transportados por espécies de fungos existentes num determinado nicho ambiental ou biológico é denominado “micobioma” [7]. O conjunto de organismos fúngicos que habitam no trato reprodutivo feminino inferior é nomeado de micobiota vaginal [8].

Apesar do amplo conhecimento acerca dos diferentes tipos de bactérias (microbiota) que colonizam o meio vaginal, o estudo da incidência dos organismos fúngicos presentes na vagina foi durante muito tempo subestimado por parte da comunidade científica, não lhes sendo atribuído o devido valor e relevância quanto à sua ação na homeostasia do micobioma. Atualmente os fungos vêm emergindo como um dos principais causadores de doenças no ser humano, atuando principalmente como microrganismos oportunistas em

indivíduos imunocomprometidos, hospitalizados ou com outras doenças crônicas [9, 10].

Esta comunidade fúngica (também designada de “Biosfera rara”) desempenha funções muito importantes tais como, a estabilidade da microflora e a manutenção da dinâmica do hospedeiro [11].

Ainda que o mecanismo patogénico atribuído a uma única espécie fúngica consuma grande parte do que se sabe sobre a micologia, pensa-se que os estudos do micobioma e das suas interligações estabelecerão uma relação entre a composição e a função de toda a comunidade fúngica em processos de doença.

Habitualmente, um correto equilíbrio das comunidades microbianas no intestino irá ajudar o hospedeiro a combater infeções causados por bactérias, vírus ou fungos.

Segundo a literatura, sabe-se que as alterações da microbiota e da composição da micobiota em mulheres em fase fértil contribui para uma dinâmica temporal nas comunidades vaginais [12]. Na verdade, estas flutuações são influenciadas por fatores como, as mudanças hormonais, a idade, as práticas sexuais, o uso de fármacos antimicrobianas, entre outras [13].

Quando ocorrem estas alterações, designada por disbiose, sucede um aumento na probabilidade de adquirir alguma infeção causada por microrganismos patogénicos. É importante salientar que estas alterações, quando originadas por influências externas vão facilitar a invasão e que, as infeções gastrointestinais (GI) afetam a composição da microbiota [3].

As interações que acontecem entre comunidades microbianas não só são biologicamente estimulantes de perceber, como ajudam a que sejam descobertas novas terapêuticas antifúngicas. Dentro da família dos fungos, existem espécies que não apresentam qualquer perigo para o ser humano, contudo um pequeno número destas é considerado patogénico humano e podem provocar infeções colocando em causa a vida [14, 15].

Notavelmente, as interações microbianas têm vindo a ser implicadas no processo patogénico. Para além deste processo, também as avaliações dos mecanismos de comensalismo poderão, num futuro próximo, levar a estratégias preventivas que dificultem a transição de um estado comensal para um estado patogénico [16].

Contudo os estudos realizados nestas comunidades são mais exigentes e desafiantes. Comparando com as bactérias, o estudo da caracterização das comunidades fúngicas torna-se mais difícil devido à presença de parede celular, à dificuldade em recuperar o DNA com as metodologias usadas para recuperar o DNA bacteriano, aos métodos ineficazes para o isolamento de DNA genómico, à variação nos comprimentos das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacers*) que influenciam a eficácia do PCR, e aos bancos de dados de referência com controlo de qualidade serem insuficientes [17,18].

Todavia, avanços recentes na tecnologia de sequenciamento e ferramentas de bioinformática de ponta trouxeram a possibilidade de aprofundar conhecimento acerca destas comunidades de fungos que residem nas superfícies da mucosa vaginal [2]. Métodos como a sequenciação independente de cultura e amplificação por PCR de regiões espaçadoras transcritas internas (ITS1 ou ITS2) para identificação de espécies têm vindo a ser usadas mais regularmente [19].

Por isso, com todos estes avanços, novas leveduras oportunistas têm aparecido em estudos da microbiota vaginal, que até então não se associaria a este nicho. Estes fungos comensais podem estar presentes em diversas partes do corpo (cavidade oral, trato gastrointestinal, vagina e pele) sustentando uma comunidade versátil e relativamente estável [20, 21].

1.2. Mucosa oral, vaginal, intestinal e da pele

A cavidade **oral** representa uma grande parte da microbiota humana, incluindo milhares de espécies diferentes. As populações de microrganismos invasivos incluem principalmente géneros de microrganismos aeróbios e anaeróbios obrigatórios, tais como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Neisseriae* [22]. Quando os dentes entram em erupção, géneros de microrganismos anaeróbios, como *Prevotella* e *Fusarium*, dominam a microbiota devido à presença de ambiente anaeróbio entre as gengivas e os dentes [22].

Um outro estudo relatou algumas das comunidades fúngicas que conseguem colonizar a cavidade oral, sendo elas espécies pertencentes ao género *Candida*, *Rhodotorula*, *Celadosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus* [7].

A microbiota da **pele** é constituída por inúmeras bactérias, fungos e vírus. Tal como no intestino, estas comunidades têm funções essenciais na proteção contra agentes patogénicos invasores e na modulação do sistema imunitário [23].

Contradizendo o modo de dispersão das bactérias, onde a colonização varia de acordo com o ambiente em que se encontra seja ele seco, húmido ou sebáceo, os fungos colonizam de igual forma qualquer que sejam os ambientes [24].

O género *Malassezia* predomina em locais ricos em sebo, como a cabeça, braços, pernas e tronco, enquanto os pés são colonizados por um conjunto diverso de *Malassezia spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Epicoccum spp.* [24]. Para além destes fungos, algumas técnicas moleculares como a amplificação direta por PCR e o sequenciamento do gene rRNA (18S e ITS1) identificaram outras leveduras que se podem relacionar de forma comensal à pele humana, como a *Rhodotorula spp.*, *Debaromyces spp.*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Trichophyton spp.*, *Alternaria spp.* e *Celadosporium spp.* [25-27].

Já no nicho **vaginal**, embora muito menos abundantes que as bactérias (valores inferiores a 1%), fungos nomeadamente a *Candida albicans* têm sido denominados como o microrganismo mais predominante e com consequências na saúde vaginal.

Para além da presença da *Candida albicans*, outros estudos vieram demonstrar que também a *Clavispora lusitaniae*, *Malassezia spp.*, *Rhodotorula sp.*, *Aspergillus spp.* e *Leptosphaerulina spp.* colonizam o microbioma [28]. No nosso grupo de investigação já foram descobertas amostras colonizadas por leveduras do género *Cryptococcus spp.*

A microbiota **intestinal** é muito versátil, sendo constituída por centenas de microrganismos. Estudos realizados com fungos demonstraram que os que mais predominam neste nicho são os géneros como a *Candida spp.*, *Malassezia spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Galactomyces spp.*, *Ruminococcus spp.*, entre outros [29].

Na figura 1 é apresentado um esquema resumo, com algumas das comunidades fúngicas mais indicadas em artigos publicados recentemente como sendo capazes de colonizar mais do que um nicho diferente.

Dentro desta panóplia de leveduras, seleccionámos três que iremos utilizar no nosso estudo juntamente com a *Candida albicans*.

A *Candida spp.* sendo uma das leveduras mais estudadas, juntamente com a *Saccharomyces spp.*, e estando presente em todos os nichos apresentados,

nomeadamente no nicho principal do nosso estudo (nicho vaginal) irá ser o nosso controlo durante todo o trabalho.

Através do diagrama, observamos que géneros como a *Malassezia spp.* e o *Cryptococcus spp.* são capazes de colonizar diferentes nichos, entre eles o nicho vaginal, sendo por isso interessantes do ponto de vista científico em usá-los no nosso estudo. A última levedura escolhida, apesar de aparecer apenas na microbiota vaginal e na pele, o género *Rhodotorula spp.* tem vindo a ser destacado como um dos microrganismos oportunistas emergentes e com características interessantes.

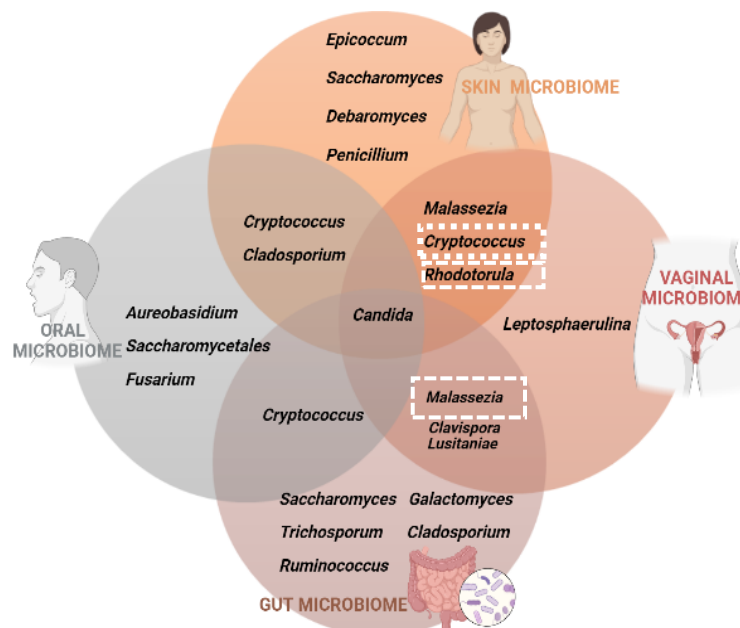


Figura 1-Distribuição das diferentes comunidades fúngicas nos diferentes nichos

1.3. Comunidades Fúngicas emergentes em estudo

As leveduras são fungos ubiqüitários, unicelulares e eucariotas pertencentes ao reino Fungi constituindo um conjunto de aproximadamente 600 espécies. Destas 600 espécies colonizadores apenas uma percentagem bastante inferior conseguem colonizar o Homem de forma patogénica [30].

Um microrganismo patogénico emergente pode ser definido como o causador de uma doença infecciosa cuja incidência está a aumentar numa nova população ou numa já existente, devido a mudanças a longo prazo na sua epidemiologia [31].

Neste estudo, e de acordo com a figura 1 observada no ponto anterior, as espécies de fungos que irão ser utilizadas são: *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Malassezia furfur* e o *Cryptococcus albidus*.

1.3.1. *Candida spp.*

O género *Candida spp.* é uma das leveduras mais frequentemente isolada em humanos, em amostras de infeções superficiais e invasivas de diferentes locais do corpo [32].

É um género de fungos que pertencem ao filo Ascomycota, à classe *Saccharomycetes* e à família *Cryptococaceae*. São leveduras ovais ou esféricas, com características idênticas aos ascomicetos e basidiomicetos, não possuem pigmentação, mas que conseguem formar pseudomicélios ou micélios. Apresentam tanto reprodução assexuada por gemulação multipolar (multipolar budding) [33], como reprodução sexuada através da transição branco-opaco de *C. albicans* que torna as células competentes para o acasalamento [117, 118].

As causas de infeção podem ser originadas por dois meios diferentes: endógeno (proveniente da própria microbiota do hospedeiro) ou exógena (vinda de profissionais de saúde, pacientes hospitalizados, equipamento contaminado ou até mesmo do parceiro sexual) [34, 35].

Dentro do género *Candida* mais de 17 espécies estão associadas a infeções causadas a seres humanos. Grande parte delas são leveduras comensais em organismos saudáveis, levando a infeções ligeiras e sistémicas quando se encontram num ambiente com condições favoráveis. Contudo, passam a ser patogénicas quando este mesmo ambiente é modificado, isto é, há um comprometimento no sistema imunológico do hospedeiro. Dentre elas, as que mais estão associadas a criar infeções são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* [32, 36, 37].

A estirpe *Candida albicans* possui inúmeras características que lhe conferem patogenicidade, sendo por isso, a estirpe dentro deste género mais virulenta e das que causa maior número de infeções. Algumas destas características são, a morfogénese (transição dimórfica), a secreção de enzimas (tais como as APs-aspartil proteases, e fosfolipases) e as biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas) [38].

A transição dimórfica permite-lhe adotar 2 estágios diferentes sofrendo alterações morfológicas de uma levedura dimórfica ovalada para um organismo

com crescimento hifal (podendo ainda adotar um estilo de vida como comensal ou como patogénico) [39].

Para além destas duas morfologias extremistas (fase leveduriforme e fase filamentosa), este fungo ainda pode apresentar uma serie de outras morfologias durante o seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas (leveduras alongadas unidas entre si) [40].

Enquanto a forma de levedura, devido à sua morfologia arredondada, é importante para a disseminação através da corrente sanguínea e permite a aderência a superfícies, a forma filamentosa permite a invasão do hospedeiro (através do tecido epitelial) e confere uma maior resistência à fagocitose.

A sua presença na micobiota vaginal pode ocorrer de diversas formas: assintomática, quando está presente no conteúdo vaginal sem produzir sintomas; sintomática, causando infeções e episódios esporádicos de fácil tratamento; e recorrente, em que a mulher tem mais de 4 episódios ao longo do ano e o seu tratamento é difícil de realizar [119].

Tal como referido, por ser um dos géneros mais predominantes na micobiota vaginal e com uma relação causa-efeito nas infeções vulvovaginais, este género tem sido o foco de praticamente todos os estudos sobre a micologia e a micobiota vaginal [41].

1.3.2. *Rhodotorula Spp.*

Leveduras do género *Rhodotorula* fazem parte do filo- Basidiomycota, colonizam plantas, seres humanos e outros mamíferos. Compreende 8 espécies, entre elas *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* que são conhecidas por causar doenças em seres humanos.

Estes fungos por tolerarem baixos níveis de humidade, são capazes de sobreviver a temperatura ambiente, e por isso, as condições ideais em relação à temperatura estão entre os 18° C e os 22 ° C [42]. Apesar de produzirem blastoconídios unicelulares, este fungo não consegue gerar pseudo-hifas ou mesmo hifas.

A sua transmissão ocorre geralmente pelo ar, mas também pode ser transmitido pela água e pelo solo, nomeadamente nos mares oceânicos, lagos, alguns tipos de frutas e bagas (como por exemplo, os morangos), leite e escova de dentes [43].

Esta levedura aeróbia estrita contém características metabólicas bastante particulares. Algumas delas são a acumulação de diversas proteínas e enzimas, tais como amílases e celulasas, e a capacidade de produzir glicogénio durante a fase exponencial do seu crescimento. Para além do glicogénio conseguem assimilar a maltose, sacarose, galactose, xilose, rafinose e trealose [44].

Estas vão contribuir para degradar as fibras solúveis, consideradas nutricionalmente importantes e com muitos benefícios para a saúde [45].

Para além disto, a *Rhodotorula* é um ótimo produtor de urease (sendo urease-positiva) e também de um micronutriente essencial- os folatos [45].

Estas leveduras acumulam cerca de 60% da sua massa celular em forma de gordura e por isso são denominadas leveduras oleaginosas [15].

Muitas destas características morfológicas, fazem com que seja possível que este género possa ser falsamente identificado e confundido com o *Cryptococcus spp.*, no entanto já foram descobertas algumas diferenças, tais como, as vias de sinalização, a composição da parede celular e a suscetibilidade aumentada das suas membranas [46].

Embora as leveduras sejam microrganismo não fotossintéticos, algumas delas tem a capacidade de sintetizar carotenóides. Uma delas, é a *Rhodotorula spp.* que consegue acumular carotenóides no interior das suas células. Estes carotenoides tem uma alta gama de aplicabilidades na medicina, na indústria química, farmacêutica, cosmética, de alimentos e de rações [47].

Para além das transmissões referidas, estes fungos tem uma afinidade especial por materiais de plástico [48], e por isso, são frequentemente encontrados em dispositivos médicos onde crescerão em forma de biofilmes [49].

Na literatura, esta levedura ainda não está devidamente descrita, não havendo por isso qualquer informação acerca da sua colonização na vagina. A pouca informação que se sabe, evidências que também já foram identificadas no nosso grupo de investigação, é que a *Rhodotorula spp.* terá a capacidade de colonizar a vulva. Mais estudos serão necessários realizar acerca da presença deste fungo na microbiota vaginal.

1.3.3. *Malassezia spp.*

Estudos filogenéticos e genómicos vieram demonstrar que a *Malassezia spp.* pertence ao filo Basidiomycota à classe da Malasseziomycetes [120].

Do conhecimento adquirido até então, ainda é controverso se a *Malassezia* spp. é uma levedura comensal ou patogénica e que estes estádios estão relacionados com diferentes circunstâncias que podem acontecer.

Sabe-se que este género pode apresentar, assim como a *Candida* spp., forma leveduriforme e hifal, sendo por isso um organismo pleomórfico. A forma leveduriforme está normalmente associada a indivíduos saudáveis com uma pele normal, aparecendo predominantemente em culturas [50].

As características fisiológicas, macro e micro, não são suficientes para se conseguir identificar a espécie, apenas sugerem o género, de modo que é imprescindível realizar testes que unam a morfologia, as características bioquímicas e molecular para termos uma identificação fiável [51].

Alguns dos testes realizados são: a capacidade de crescer num meio isento de suplementação de ácidos gordos de cadeia longa; crescer a uma temperatura de até 40°C; assimilar Tweens 20, 40, 60, 80 e de ser produtora de catalase, urease e β -glicosidase [50, 51].

Por serem encontrados essencialmente na pele de humanos e mamíferos supôs-se que conseguissem sobreviver nestas condições específicas de crescimento: temperatura de aproximadamente 37°C conseguindo ir até aos 40°C; condições aeróbicas e baixa disponibilidade de nutrientes [52].

A dependência de lípidos, por parte desta levedura, para o seu crescimento é uma característica de todas as espécies do género exceto a *M. pachydermatis*. Desta forma a distribuição das espécies lipofílicas está maioritariamente concentrada em zonas da pele ricas em lípidos, como o couro cabeludo, o rosto e o tronco [53]. A disponibilidade de lípidos no trato gastrointestinal, particularmente no intestino delgado, pode favorecer a colonização intestinal por estas espécies de *Malassezia* spp.

No nosso estudo o isolado de *Malassezia* que vamos usar é a *Malassezia furfur*. Esta espécie por ser lipodependente, necessita de suplementação de ácidos gordos de cadeia longa para que consiga crescer.

Num estudo anterior, a *Malassezia* foi o segundo género mais comum encontrado nas fezes humanas através do ITS, mais especificamente a espécie *M. restrita* e *M. globosa* [116].

Embora seja considerada uma levedura que coloniza predominantemente a pele, atualmente já é possível identificar em várias amostras e em ambientes imprevistos utilizando métodos como o NGS, visto que, as culturas de *Malassezia* spp. são conhecidas por serem muito difíceis de identificar por métodos dependentes de cultura. Devido à presença de células vivas e de uma grande

quantidade de DNA de *Malassezia* encontrado no conteúdo intestinal, este género passou a estar associado à mucosa intestinal, sugerindo que possui uma elevada capacidade de sobrevivência no ambiente intestinal [54].

1.3.4. *Cryptococcus spp.*

Segundo Kurtzman et al. o género *Cryptococcus* contém organismos encapsulados, classificados ao filo *Basidiomycota*, na ordem *Filobasidiales* e na família *Filobasidiaceae* [55].

Atualmente, cerca de 70 espécies de *Cryptococcus spp.* já foram descritas, contudo para fins práticos, as mais patogénicas são o *C. neoformans* e o *C. gatti* que se destacam por ser os mais comuns em criptococose humana e animal.

Fungos do género *Cryptococcus spp.* são leveduras basidiomicetos que contém estirpes criptocócicas patogénicas bem como não patogénicas, sendo as infeções principalmente de carácter oportunista. A espécie *C. albidus* apresenta células globosas e com cápsula.

São capazes de crescer numa gama de temperaturas entre os 25°C e os 30°C, contudo alguns isolados conseguem apresentar algum crescimento a 37°C.

Esta levedura cresce em diferentes habitats (como no solo, árvores e excrementos de pássaros), estando disponíveis em diferentes morfologias na natureza (células de levedura ou como esporos) [56-58]. O seu metabolismo é altamente dependente da existência de oxigénio [59].

Para além disso, os poucos estudos que existem afirmam que, o *Cryptococcus* também conseguirá colonizar a microbiota vaginal, uma vez que, já foram observados blastoconídeos no fluido vaginal [60].

A infeção por *Cryptococcus spp.* ocorre a partir da inalação de esporos no ar e após a sua instalação pode espalhar-se através da corrente sanguínea ou linfática. O sucesso da sua colonização no hospedeiro ocorre devido ao conjunto de características específicas deste fungo, aos fatores de virulência que conferem patogenicidade e às características do sistema imunitário do hospedeiro, levando a altos índices de morbidade e mortalidade [61].

1.4. Epidemiologia e Incidência

Nas últimas décadas, diversos fatores têm vindo a alterar a epidemiologia das infeções fúngicas.

O aumento da incidência e da prevalência de leveduras como a *Candida spp.* está associado ao aumento das infeções nosocomiais.

Este género é um dos causadores mais frequentes de infeções fúngicas, sendo a espécie *Candida albicans* o agente infeccioso mais comum em amostras clínicas de humanos (72%-91%) [62].

Cerca de 30 % das mulheres apresentam colonização por esta levedura, e em hospitais corresponde a cerca de 80 % das infeções fúngicas documentadas. Estes valores representam um grande desafio aos investigadores e aos especialistas devido às dificuldades de diagnóstico e terapêutica adequada para estas infeções. Estas leveduras diplóides e dimórficas são comensais que colonizam a cavidade oral, a pele, o trato gastrointestinal e reprodutor, e, embora façam parte da microbiota vaginal saudável, ainda são classificados como patogénicos oportunistas, devido à sua alta prevalência (85-95%) [62].

A disbiose vaginal reflete a interrupção da homeostasia da comunidade microbiana, tendo como consequências, doenças ginecológicas. Diferentes estudos demonstraram a associação entre estas alterações e o aumento de infeções vulvovaginais, tais como, a vaginose bacteriana (VB), candidose vulvovaginal (CVV), infeções sexualmente transmissíveis (IST), infeção por papiloma vírus humano (HPV), entre outros [7, 63- 65].

A *Rhodotorula spp.* é uma levedura ambiental que anteriormente não era considerado um microrganismo patogénico, contudo algumas estirpes de *Rhodotorula spp.* surgiram como potenciais oportunistas capazes de colonizar e causar infeção, especialmente em indivíduos debilitados imunologicamente. Esta levedura foi classificada como a terceira levedura mais isolada de hemoculturas e aquela que mais aparece, através de funcionários e de pacientes hospitalizados [66].

Uma das consequências da dominância desta levedura no ser humano, consiste essencialmente em infeções da corrente sanguínea, assim como do sistema nervoso central (SNC) englobando principalmente doentes que usam cateter venoso central (CVC) [67].

Contudo, já existem na literatura evidências de que para além de fungemia e meningite, este género também causa infeções cutâneas, peritonite, ceratite e infeções oculares [67, 68].

Estas manifestações clínicas tornam a as infecções causadas por *Rhodotorula spp.* semelhantes à criptococose, todavia, torna-se mais desafiante e complicado as infecções desta levedura por serem resistentes aos azólicos (como o isavuconazol, que tem uma boa atividade contra o *Cryptococcus spp.*) [69].

A incidência desta levedura, e consequentes infecções têm vindo a crescer ao longo dos anos, estando em 0.5 % nos EUA e em 2.3% na Europa [70]. Contudo, apesar de terem sido descritos casos de fungémia devido à *Rhodotorula spp.*, ainda permanece por esclarecer se este fenómeno está diretamente relacionado com a colonização intestinal [48].

A ***Malassezia spp.*** é um dos principais elementos da microbiota fúngica da pele de vários mamíferos, tendo vindo a ser intensamente investigadas devido ao seu comportamento patogénico, sob certas condições, causando distúrbios cutâneos e infecções invasivas [71].

Infeções cutâneas superficiais, como a pitiríase versicolor e psoríase, causadas por esta levedura são muito comuns. Na segunda, a *Malassezia spp.* está envolvida na indução da superprodução de moléculas inflamatórias, favorecendo a exacerbação das lesões [72]. Para além destas, a *Malassezia spp.* também está associada a doenças como o eczema seborreico e atópico.

A fungémia causada por esta levedura, está normalmente associada à administração de soluções lipídicas através de cateteres venosos. Uma das espécies que mais surge como colonizadora destes cateteres é a *M. furfur*.

O ***Cryptococcus spp.*** é a terceira causa de infeção oportunista entre pacientes transplantados de órgãos e células hematopoiéticas, precedido por *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* [74].

Estima-se que num ano aparecem mais de 1 milhão de novos casos de criptococose em todo o mundo, especialmente em doentes portadores do vírus HIV [75, 76].

Espécies saprófitas como o *C. albidus* e o *C. laurentii* são responsáveis por 80% dos casos relatados de criptococose não- *neoformans* e não- *gattii* [77].

1.5. Curva de Crescimento Microbiano

Os diversos processos de divisão celular provocam um aumento no número de células presentes numa população microbiana. A taxa de crescimento é definida como a variação do número de células por unidade de tempo. A variação da taxa de crescimento é o que faz traçar uma curva, através desses pontos.

Habitualmente, durante este processo, a cultura celular é realizada num ambiente fechado, o que faz com que o meio não seja renovado fazendo com que a concentração de nutrientes no meio vá diminuindo ao longo do tempo, em contrapartida com o teor de metabolitos celulares [82, 83].

A curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases distintas: fase lag ou latência, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular.

1.5.1.1. Fase de latência ou lag

Durante o período, que se segue à inoculação do meio de cultura, as células do microrganismo têm de, inicialmente, passar por um momento de adaptação ao meio. Por isso, durante este período inicial não ocorre uma grande multiplicação celular. Durante este período verifica-se a ocorrência de síntese de novas enzimas e outros componentes [82, 83].

1.5.1.2. Fase exponencial ou log

Corresponde ao período em que as células iniciam o seu processo de divisão atingindo uma taxa máxima de acordo com o seu potencial, do meio de cultura e das condições de crescimento utilizadas chegando depois a um tempo de geração constante.

O formato da curva reflete, aparentemente, a adaptação de nutrientes pelas proteínas transportadoras de nutrientes existentes na célula. A concentrações muito elevadas de nutrientes, os sistemas de transporte vão ficar cheios tornando-se saturados, levando a que a taxa de crescimento não aumente mais com o aumento contínuo de nutrientes [82, 83].

1.5.1.3. Fase estacionária

Devido ao facto de o crescimento ocorrer sobre um ambiente fechado, existirá um momento em que o número total de microrganismos vivos permanece constante.

Tal poderá dever-se a um equilíbrio entre a divisão e a morte celular ou ao facto de a população cessar a divisão celular, mas permanecer metabolicamente ativa [82, 83].

A entrada na fase estacionária acontece devido a fatores, como a escassez de nutrientes limitantes e/ou oxigénio e a acumulação de metabolitos celulares tóxicos [82, 83].

1.5.1.4. Fase de declínio ou morte

A última fase da curva de crescimento acontece devido ao facto de os fatores que levam a que o crescimento entre em estacionário se torne sempre contínuo causando danos irreversíveis nas células, levando à perda da viabilidade celular.



Figura 2-Diagrama da curva de crescimento bacteriano, ilustrando as suas 4 fases distintas. Adaptação de: Prescott' Microbioly, 7ª edição [82]

1.6. Fatores de Virulência

Tal como já referido acima, os patogénicos fúngicos são uma causa (ainda subestimada) de doenças graves, estando assim associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade.

Tal como outros patogénicos, a sua sobrevivência, crescimento no hospedeiro e os danos causados no mesmo são mediados por fatores de virulência. Estes fatores são os que diferenciam microrganismos inofensivos de microrganismos patogénicos [78].

Já é do conhecimento científico que a prevalência do género *Candida*, especialmente a espécie *C. albicans* em indivíduos com os fatores de predisposição presentes é elevada, no entanto esta colonização também depende da expressão de fatores de virulência por esta espécie, visto ser um comensal presente no microbioma humano.

Portanto, para que ocorra a patogenicidade são precisos que ocorram dois processos [78]:

1) Sobrevivência e crescimento do microrganismo infetante;

A sobrevivência dentro do hospedeiro é essencial numa fase inicial do estabelecimento de uma infeção. As condições indispensáveis para esta instalação e crescimento podem ser de natureza geral (por exemplo, metabolismo dos nutrientes) ou específicos para hospedeiros humanos (por exemplo, fatores de evasão).

2) Dano no hospedeiro criando rutura na homeostasia. Esta rutura é manifestada através dos sintomas da doença.

A patogenicidade do género *Candida* é devida a diversos fatores de virulência, tais como a capacidade em escapar aos mecanismos de defesa por parte do hospedeiro, produção de tubo germinativo e a capacidade de aderência e formação de biofilmes, que podem-se desenvolver tanto no hospedeiro como em dispositivos médicos [79].

A patogenicidade do género *Malassezia* é conferida pela produção de lípases extracelulares, índoles, espécies reativas de oxigénio, lipoxigenase, ácido azelaico, melanina, transição dimórfica para a forma hifal e capacidade de aderência e formação de biofilme [121].

Os principais fatores de virulência de *Cryptococcus* são a produção de cápsula polisacarídica, de melanina e a secreção de várias proteínas como: urease, oxidases e proteases [122].

A patogenicidade do género *Rhodotorula* é conferida por fatores de virulência como os carotenóides, capacidade de produzir biofilmes e adesão [123].

Já é sabido que um fator de virulência não é mais importante que o outro, ou mais dominante que outro e considerando-se que as condições diferem nos diversos sítios de infecção, é bem provável que os fatores de virulência associados sejam alterados dependendo da zona da infecção. Para além disso é importante enfatizar que a capacidade de causar danos não é apenas uma propriedade isolada do microrganismo, mas sim de uma interação de um hospedeiro suscetível e um microrganismo na estrutura de resposta ao dano [80, 81].

1.6.1. Biofilmes

Os biofilmes são estruturas formadas por comunidades dinâmicas e distintas de microrganismos que aderem a uma superfície, envolvidos por uma matriz polissacarídica extracelular. Este fenómeno acontece devido às propriedades físico-químicas da superfície celular das leveduras.

Para além disso, o crescimento dos biofilmes está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente, assim como pela difusão dos mesmos pela matriz do biofilme formado.

O primeiro passo para a formação de biofilmes é a adesão de células de levedura às superfícies, sendo procedido pelo processo de infecção, que inclui a colonização e invasão [84]. Por fim, dá-se o crescimento e maturação dos biofilmes, que depende de fatores como o pH, temperatura, nutrientes fornecidos e principalmente dos fatores de virulência [85].

Esta capacidade de formar biofilmes oferece inúmeras vantagens às leveduras, tais como a resistência a agentes antimicrobianos, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, aumento da virulência, troca de material genético, comunicação e aumento da proteção contra radiações UV [50, 86].

Este habitat tem como principais funções ajudar a colonizar e a sobreviver independentemente do microambiente em que esteja inserido (intestino, pele, cavidade oral e vagina), oferecer uma proteção extra contra agentes antimicrobianos e evasão imunológica do hospedeiro [87].

De notar que estes biofilmes oferecem benefícios para o microrganismo onde, dentro deles, os fungos podem fortalecer os seus fatores de virulência, aumentar a sua capacidade de invadir o hospedeiro (por indução de hifas) e produzir enzimas extracelulares.

Dentro de um biofilme, podem existir diferentes microrganismos que irão competir entre si por nutrientes podendo interagir de forma sinérgica,

estimulando o crescimento, de forma antagônica, produzindo compostos que inibem o crescimento dos outros microrganismos residentes ou de forma neutra, atenuando os fatores de virulência para que seja possível haver biofilmes formados de diferentes espécies e/ou gêneros a crescer em conformidade [85].

Atualmente constatou-se que isolados vaginais de *Candida spp.* têm uma grande capacidade de produzir biofilmes numa vasta gama de temperaturas (neste estudo são usadas a 25°C e a 37°C). Estes fazem parte de um conjunto de fatores de virulência desta levedura, que irá reforçar a capacidade de permanecer na mucosa vaginal devido às propriedades bioquímicas dos biofilmes.

Os biofilmes da *Candida spp.* são compostos por células na forma de levedura, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. A transição de células planctônicas para células aderentes a uma superfície leva conseqüentemente a uma transformação no comportamento fenotípico e mudanças na expressão gênica [88].

A sua formação envolve uma série de processos que envolvem: a adesão das células em forma de levedura a uma superfície, fixando as células planctônicas; proliferação e filamentação, em que as leveduras transitam para a forma de hifas através de fatores de transição; maturação do biofilme e formação da matriz extracelular (com 24 a 48 horas de crescimento) e por último irá ocorrer a dispersão do biofilme, em que as células irão colonizar outras zonas do corpo de forma mais virulenta do que as suas células planctônicas [88].

Num estudo anterior, utilizando o gênero *Rhodotorula spp.*, avaliando a capacidade formadora de biofilmes, demonstrara que esta levedura conseguia aderir pouco à superfície e produzir biofilmes. No entanto um estudo, realizado em 2020, demonstrou que esta provavelmente conseguiria aderir apenas a dispositivos médicos, como por exemplo material de implantes e cateteres, e que a percentagem de biofilmes produzido, de acordo com Nunes et al., tinha uma classificação média a baixa para a formação de biofilmes [73, 89].

Acerca do *Cryptococcus spp.* sabe-se que é capaz formar biofilmes não só em placas de poliestireno como em dispositivos médicos e que esta formação do biofilme segue um conjunto de fases coordenadas entre si: adesão à superfície, formação de microcolônias, produção de EPM (matriz exopolimérica protetora autoproduzida) e maturação [90].

A adesão tem um período de 2 a 4 horas, em que as células estão metabolicamente ativas e irão ficar aderidas a uma superfície plástica em monocamada. Durante o estado intermédio (4 a 16 horas) as células estão num crescimento exponencial uniforme pela superfície plástica, formando microcolónias. Por último o estado de maturação acontece 24 a 48 horas depois, em que a atividade metabólica das células nos biofilmes continua elevada e constante [90].

Também para a *Malassezia spp.* já foram realizados ensaios para perceber se a mesma tem a capacidade de aderir a uma superfície e permitir assim, uma maior resistência a fármacos e aumento da sua virulência [121]. Estes estudos descobriram que cerca de 40% dos resultados representam altos valores de adesão por parte da *Malassezia furfur* e que através de observações por SEM (Microscopia eletrónica de varredura) se percebeu que esta formação precisava de mais de 24 horas para que ocorresse.

Estudos nesta área são muito relevantes, visto que, a comunidade científica acredita que a interação fungos- bactérias ou fungos-fungos acontecem dentro de biofilmes, também designado por “biofilmes de espécie mista” e que estes trazem muitas consequências para a saúde humana.

Nomeadamente, nas últimas décadas, a incidência de infeções microbianas correlaciona-se com a formação de biofilmes especialmente em dispositivos médicos chega a cerca de 65% dos casos [84].

1.6.2. Tubo germinativo

Do espectro das leveduras, o género *Candida* tem vindo a ser associado às infeções mais invasivas, sendo estas as que mais tem crescido nos últimos anos devido ao aumento do número de doentes imunocomprometidos e do uso de dispositivos médicos.

Esta invasão ocorre devido a fatores de virulência tal como a formação do tubo germinativo (observado apenas para a espécie *C. albicans*). Espécies non-*albicans* (NAC) não produzem tubo germinativo da mesma maneira que a *C. albicans*.

Como já foi mencionado anteriormente, o estado leveduriforme pode evoluir para a fase filamentosa [40]. O critério para a diferenciação entre uma hifa verdadeira e uma pseudo-hifa está na realização e observação da formação de tubo germinativo (hifa verdadeira).

O que se consegue visualizar, é que, durante a formação da hifa verdadeira, não há a constrição entre a célula-mãe e o filamento, já as pseudo-hifas possuem uma constrição entre a célula-mãe e o comprimento do filamento [40, 91].

A orientação do tubo germinativo em estado leveduriforme e pseudo-hifas é determinado pelo polarissoma, isto é, um complexo de proteínas que estão envolvidas na orientação do crescimento do tubo germinativo. Já na orientação do tubo germinativo em hifa verdadeira a orientação é dada quer pelo polarissoma como pelo spitzkörper (responsável pelo crescimento e desenvolvimento polarizado encontrado apenas em hifas verdadeiras) [91,92].

Tanto a forma comensal como a forma hifal são indispensáveis para a patogenicidade da *C. albicans*, o fator mais importante é a transição que ocorre entre as duas formas.

Alguns estudos referem que as hifas têm uma maior capacidade em aderir e penetrar nas células epiteliais humanas, e, portanto, a *C. albicans*, na forma de hifa poderá ser mais invasiva e patogénica e na forma de levedura é normalmente associada a uma forma comensal, de transmissão e disseminação [93].

A formação de tubo germinativo tem sido associada ao aumento da lesão tecidual [94] e a uma alta estimulação da resposta imune inata [86].

Capítulo 2

Objetivos deste trabalho

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objeto avaliar a possível relação ecológica de 3 leveduras (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Malassezia furfur* e *Cryptococcus albidus*) com a *Candida albicans* na mucosa vaginal através do estudo dos fatores de virulência da *Candida albicans* na presença de outras leveduras.

Objetivos específicos

- 1) Estudar o crescimento das quatro leveduras isoladamente e o crescimento das mesmas quando misturadas em dupla (sendo o microrganismo base a *C. albicans*);
- 2) Caracterizar os isolados quanto à sua capacidade de formação de biofilmes;
- 3) Caracterizar a mistura dos isolados quanto à sua capacidade de formação de biofilmes mistos e pré- formados por meio de duas metodologias: avaliação da biomassa por CV e da atividade metabólica por MTT;
- 4) Analisar a capacidade de formação de tubo germinativo pela *C. albicans* na presença das restantes leveduras

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Delineamento do estudo

Neste trabalho apresentamos um estudo experimental, realizado a partir de quatro leveduras de coleção diferentes onde pretendemos estudar a interação entre as mesmas quando comparados com a ação isolada da *Candida albicans* ATCC 10231. A interação foi avaliada através da capacidade de formação de biofilmes e de tubo germinativo, assim como, da análise das suas curvas de crescimento na sua ação isolada como em co-cultura.

3.2. Materiais e Métodos

Tabela 1- Lista dos equipamentos utilizados no decorrer dos procedimentos utilizados no estudo

| <i>Equipamento</i> | <i>Modelo</i> |
|---|---|
| Centrífuga | MiniSpin Eppendorf, Hamburgo, Alemanha |
| Tissue Culture Plates 96 wells | VWR European article No. 734-2327 |
| Densitómetro | Grant- bio,DEN-1, Grant Instruments, Fisher Scient New Hampshire, EUA |
| Microscópio ótico | Nikon YS100, Tóquio, Japão |
| Câmara de Neubauer | OptikLabor, Gorlitz, Alemanha |
| Agitador Orbital | Aralab Agitorb 200, Aralab, Lisboa, Portugal |
| Agitador Vórtex | Labnet international, inc., Edison, Nova Jersey, Esta Unidos da América |
| Espectrofotómetro Ultravioleta-Visível | UV- 1700 PharmaSpec, Shimadzu Corp., Quioto, Ja |
| Contador de Colónias | Colony counter Digital S, J.P. Selecta S.A., Barcelon Espanha |
| Estufa | Binder, Dias de Sousa S.A., Setúbal, Portugal |

| | |
|--|--|
| Balança de precisão | Radwag ® PS2100-R2, Radom, Polónia |
| Sistema de água Milli-Q | Milli-Q, Millipore, Merck, Darmstadt, Alemanha |
| Leitor de Microplacas Anthos 2020 | Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos da América |

Tabela 2- Lista dos Reagentes utilizados no decorrer dos experimentos realizados neste estudo

| Reagentes | Origem |
|---|---|
| Meio SDA (4%agar) | VWR, Avantor, Pensilvânia, Estados Unidos da América |
| Potato Dextrose Agar (PDA) | Biolife, Lot: GN7204 |
| Tween 80 | Fisher Scientific cas: 9005-65-6 |
| Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X | PBS: 1,37 M NaCl, Fisher Scientific, New Hampshire, Estados Unidos da América; 27 mM KCl, ChemLab, Zedelgem, Bélgica; 100 mM Na ₂ HPO ₄ , Fisher Scientific, New Hampshire, Estados Unidos da América; 20 mM KH ₂ PO ₄ , ChemLab, Zedelgem, Bélgica |
| Metanol >99% | Fisher chemical, New Hampshire, EUA |
| Ácido acético 99.7% | Fisher chemical, New Hampshire, EUA |
| YPD | Fisher Scientific, New Hampshire, Estados Unidos da América |
| Soro Fetal Bovino | Biochrom, mbH, Berlim, Alemanha |
| Cristal Violeta | VWR, Avantor, Pensilvânia, EUA |

3.3. Preparações das estirpes

3.3.1. Estirpes utilizadas

Neste estudo foram usadas linhagens padrão da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) e da “*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*” (DSM), sendo elas, a *Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 13621, *Malassezia furfur* DSM 6170 e *Cryptococcus albidus* DSM 70215.

3.3.2. Condições de armazenamento e preparação das estirpes

Os isolados das leveduras foram mantidos a -80°C em caldo Brain Heart Infusion (GBHI) suplementado com 20% de glicerol para serem usadas em estudos futuros.

As culturas de leveduras foram inoculadas em placas de SDA (para as leveduras *C. albicans* e *R. mucilaginosa* e incubadas a 37°C e 25°C respectivamente), em placas de PDA (para o *C. albidus* e incubadas a 25°C) e placas de SDA com 0.5% azeite e 0.5% Tween 80 (meio designado por SDA suplementado) para a *M. furfur* a 37°C. Todos os microrganismos foram incubados durante pelo menos 24 horas.

3.3.3. Pré-Inóculo

Os pré-inóculos são separados em duas temperaturas específicas: 25°C e 37°C e são realizados a partir de uma cultura pura de cada levedura realizada conforme descrito no ponto 3.3.2.

A 25°C são utilizados os isolados da *C. albicans*, *R. mucilaginosa* e *C. albidus*, onde num erlenmeyer de 100 mL, foi colocado 20 mL de YPD, e é inoculado no meio uma porção de cultura correspondente a uma ansa de 10 µl. Os erlenmeyers estiveram sob agitação (150 RPM), a 25°C durante 14 horas.

A 37°C são utilizados os isolados da *C. albicans* e da *M. furfur*, onde para a *C. albicans* se utiliza o meio líquido YPD e para a *M. furfur* se utilizada o meio YPD suplementado (YPD+0.5% azeite+0.5% tween 80). Antes de ir para o agitador

orbital, a 150 RPM, é inoculado no meio uma porção de cultura correspondente a uma ansa de 10 µL . Os erlenmeyers estiveram sob agitação (150 RPM), a 37°C durante 14 horas.

3.4. Curvas de crescimento

A partir de cada pré-inóculo, foi retirado 2 mL do conteúdo para uma cuvete e feita a leitura da densidade ótica (O.D.) num espectrofotómetro. A partir desta leitura foi reajustada a O.D. da cultura inicial para 0.1, que será a O.D. inicial para todas as curvas, através do seguinte cálculo:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (1)$$

em que C_i corresponde à O.D. inicial, ou seja, da O.D. lida acima da suspensão inicial; V_i corresponde ao volume a retirar dessa suspensão, sendo por isso a incógnita desta equação; C_f corresponde à densidade ótica pretendida, ou seja 0.1; V_f corresponde ao volume final da suspensão num segundo erlenmeyer (onde se vai realizar a curva).

O cálculo da equação (1) indica-nos o volume de microrganismo (suspensão inicial) que terá de ser transferida para o segundo erlenmeyer.

Depois de realizada a transferência da suspensão para os balões de erlenmeyer, estes foram colocados num agitador orbital a 25°C e/ou num agitador a 37°C conforme os pré-inóculos realizados no ponto 3.3.3.

Ao fim de uma hora de incubação retiram-se os balões do agitador orbital, de modo a recolher uma alíquota para efetuar a medição da O.D. a 600 nm. Ao fim de algumas horas quando a O.D. chega perto de 1, recolhe-se 200 µL da suspensão para a cuvete adicionando 1800µL de PBS estéril 1X, obtendo assim um fator de diluição de 10 X. Quando, com esta diluição, a O.D. chegar perto de 1 passamos a diluir 20 X. Este procedimento repete-se, de hora a hora, num total de 12 horas, para os isolados a 25°C, e 10 horas para os isolados a 37°C.

Para além das leituras realizadas no espectrofotómetro realizaram-se ensaios de diluição seriados, onde a partir de cada suspensão (de hora a hora) 20 µL são transferidos para 4 poços de uma placa de 96 poços, contendo 180 µL de PBS estéril 1X (correspondendo à diluição 10^{-1}). De seguida realizaram-se em PBS as diluições seriadas até 10^{-6} . De seguida, plaquearam-se as diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Para tal, transferiu-se 5µL de cada diluição em quadruplicado para as placas de

SDA, PDA e SDA suplementado (de acordo com os microrganismos usados, explicado no ponto 3.3.2).

As placas foram colocadas nas respectivas estufas durante a noite, sendo depois efetuada a contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) com o auxílio de um contador de colónias.

O esquema de todo o procedimento prático desta técnica encontra-se representado na figura 3.

As curvas de crescimento mistas foram realizadas, tal como as anteriores. Num mesmo erlenmeyer colocámos a mesma concentração de cada levedura (na razão 1:1). A partir da equação (1), retiramos os volumes dos microrganismos usados na mistura, e adicionamos o mesmo volume das duas suspensões iniciais.

As medições da O.D, e a avaliação das unidades formadoras de colónias foram efetuadas de hora a hora, tal como descrito anteriormente.

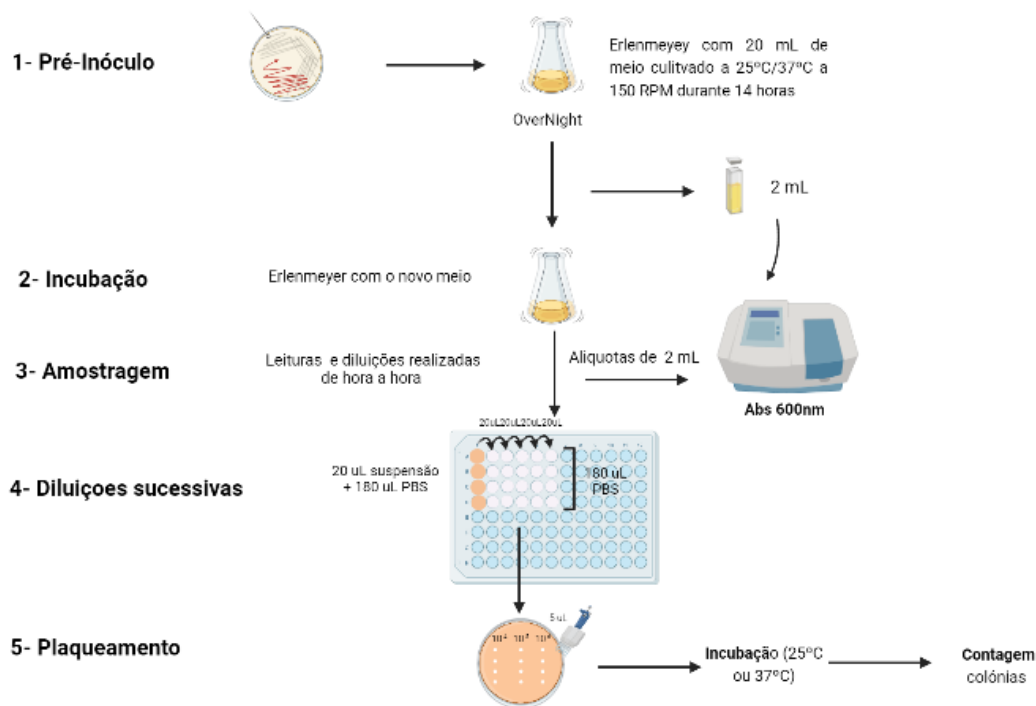


Figura 3-Esquema do procedimento para a realização das curvas de crescimento. No esquema o procedimento está representado para apenas uma estirpe

3.5. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes foi analisada de acordo com a avaliação da biomassa total dos biofilmes simples, a avaliação da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes mistos e pré- formados.

Devido às diferentes condições de temperatura dos microrganismos, foi necessário realizar 2 pré-inóculos. O modo como os pré-inóculos foram realizados estão descritos na secção 2.1.3.

Após o inóculo, as células foram recolhidas por centrifugação a 14000 g durante 2 minutos. Este processo repete-se mais duas vezes, com lavagens com 1mL de PBS estéril entre cada uma das centrifugações.

3.5.1. Biofilmes simples

As células recolhidas do pré-inóculo a 25°C foram ressuspensas no meio YPD até uma concentração de 0.5 Macfarland correspondente aproximadamente a 1×10^6 células/mL.

Para as células recolhidas do pré-inóculo a 37°C, as da *C. albicans* foram ressuspensas em YPD e as da *M. furfur* foram ressuspensas no meio YPD suplementado até uma concentração de 0.5 MacFarland correspondente a 1×10^6 células/mL

Das suspensões das leveduras que crescem a 25°C, transfere-se 100 µL para uma placa nova de 96 poços, colocando-a durante 48 horas na incubadora a 25°C.

Para a suspensão das leveduras que crescem a 37°C transferem-se 100 µL de cada suspensão para uma outra placa de 96 poços, colocando-a na estufa a 37°C durante 48 horas.

Após o período de incubação, o meio foi retirado cuidadosamente e as células não aderentes foram removidas por lavagem completa do biofilme 3 vezes com 200 µl de PBS estéril por poço. Este passo é importante para a remoção das células planctónicas.

Para se avaliar a biomassa total dos biofilmes coloca-se 100 µL de metanol a 99%, por 15 min. Passado este tempo, retira-se o metanol e deixa-se os poços secarem à temperatura ambiente. Posto isto, vamos observar as imagens dos

biofilmes formados num microscópio invertido. As imagens adquiridas foram observadas numa ampliação de 200 X.

Posto isto, 100 µL de solução 0.05% de cristal violeta são adicionados a todos os poços durante 20 minutos. O excesso de cristal violeta é removido sob água corrente. O biofilme corado foi ressuspensão com uma solução de ácido acético a 33% (V/V).

Antes de as placas serem lidas a 590 nm, realizou-se uma diluição de 1:10, colocando-se 10 µl de solução de cada poço num novo com 90 µl de ácido acético. Todas as placas possuíram sempre 1 coluna com meio YPD e YPD suplementado, utilizada como controlo negativo. Este teste foi realizado em 2 ensaios independentes com quatro réplicas em cada um dos mesmos.

Os resultados obtidos para cada isolado de levedura foram gerados pela média de 2 ensaios independentes com quatro réplicas em cada.

3.5.2. Biofilmes Mistos

Para a avaliação da capacidade da formação de biofilmes mistos, realizou-se o pré-inóculo, as lavagens com PBS e as suspensões, tal como foi explicado acima para o ensaio dos biofilmes simples.

Posto isto, avaliamos a interação dos biofilmes de 2 leveduras.

Para a co cultura das leveduras que crescem a 25°C, na mesma placa de 96 poços adicionou-se uma 50 µL da suspensão da *C. albicans* com 50 µL da suspensão de *C. albidus* em 4 poços, noutros 4 colocou-se 50 µL da suspensão de *C. albicans* e 50µl da suspensão de *R. mucilaginosa*. Como controlo adicionou-se 50 µl de cada levedura com 50 µl de meio YPD em 4 poços.

Para as misturas das leveduras que crescem a 37°C, na mesma placa nova de 96 poços adicionou-se 50 µl da suspensão de *C. albicans* com 50µl da suspensão de *M. furfur*. Como controlo coloca-se 50 µl de cada microrganismo com 50 µl de meio YPD (para a *C. albicans*) ou YPD suplementado com 0.5% de azeite e 0.5% de tween 80 (para a *M. furfur*) em 4 poços.

A avaliação da biomassa realiza-se tal e qual como no protocolo dos biofilmes simples, no entanto também se realizou a contagem do número de unidades formadoras de colónias. Para isso, inicialmente na placa de 96 poços duplicamos

as réplicas (em vez de 4 colocamos 8 poços), os 4 primeiros são utilizados para a leitura da biomassa, os últimos 4 são utilizados para as UFC.

Os poços para as UFC/mL são lavados 3 vezes com 200 µl de PBS estéril, sendo ressuspensionado posteriormente em 200µl de PBS tentando retirar a maior quantidade de biofilme aderido à superfície da placa. Posteriormente foram realizadas 6 diluições seriadas até à 10⁻⁶, sendo plaqueadas as diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶. De seguida transfere-se 5 µl das diluições para as placas de SDA, PDA e SDA suplementado onde irão ser contabilizadas depois de 24 horas de incubação.

Para se avaliar a atividade metabólica, 100 µl de solução MTT é adicionado a cada poço. As placas são cobertas em folha de alumínio e incubadas no escuro a 25°C e a 37°C (para os biofilmes mistos *Candida-Malassezia*) durante 4h.

Após este tempo e antes de as placas serem lidas a 490 nm, 10 µl de cada poço é transferido num novo com 90 µl de água. Todo este procedimento está esquematizado no diagrama abaixo para uma melhor compreensão.

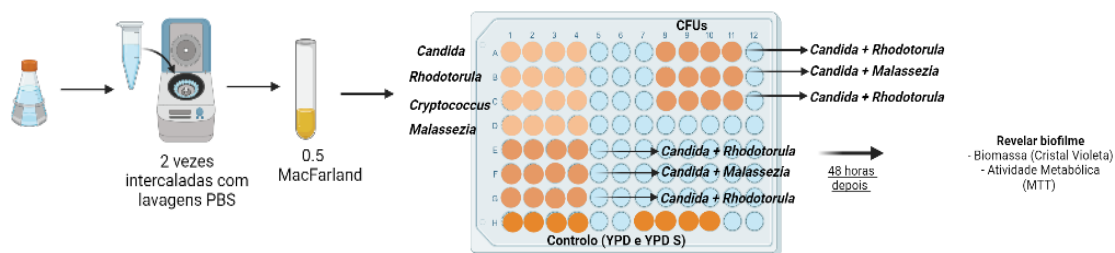


Figura 4- Esquema do procedimento para a realização dos biofilmes simples e mistos

3.5.3. Biofilmes pré- formados

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilmes pré- formados, realizou-se a partir do pré- inóculo da *C. albicans* uma suspensão da mesma (uma para cada temperatura) em YPD até uma concentração de 0.5 MacFarland correspondente a 1x10⁶ células/mL.

50 µl desta suspensão foram adicionados a 2 novas placas de 96 poços (uma placa para cada temperatura usada). Na placa correspondente aos 25°C, adicionou-se esta suspensão em 24 poços (8 para as misturas, 4 para o controlo e 16 para

UFC). Na placa correspondente aos 37°C, adicionou-se em 16 poços (4 para a mistura, 4 para o controle e 8 para UFC/mL).

No dia seguinte, a partir de outro pré-inóculo de *C. albidus*, *R. mucilaginosa* e *M. furfur* realizou-se uma suspensão para cada com YPD e YPD suplementado (para a *M. furfur*) até uma concentração de 0.5 MacFarland, o que corresponde aproximadamente a 1×10^6 células /mL.

Antes das suspensões das 3 leveduras serem colocadas na placa, lavou-se 3 vezes os biofilmes formados com a suspensão da *C. albicans*, com 100 µl de PBS estéril 1X para que se consiga retirar as células planctônicas.

Posto isto, adicionou-se os inóculos das 3 leveduras (50 µl nos poços das misturas, 50 µl nos poços controle e 50 µl nos poços das UFC/mL). Ainda nos poços de controle das 4 leveduras, coloca-se 50 µl de meio YPD ou YPD suplementado (para o caso da *M. furfur*).

A revelação dos biofilmes, tanto para a avaliação da biomassa assim como da atividade metabólica, acontece 48 horas de incubação (uma placa na estufa a 25°C e outra placa na estufa a 37°C).

A avaliação da biomassa, das unidades formadoras de colônias e da atividade metabólica realizou-se com o mesmo protocolo dos biofilmes mistos.

No diagrama abaixo está representado o esquema do procedimento inicial para os biofilmes pré- formados.

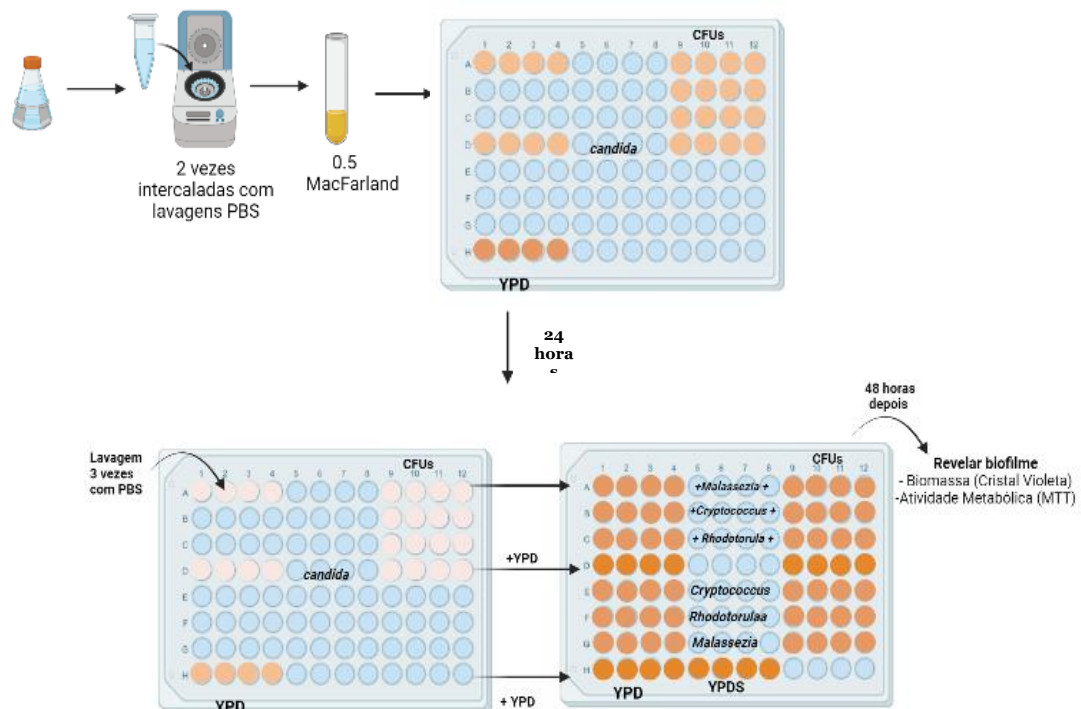


Figura 5- Esquema do procedimento para a realização dos biofilmes Pré- Formados

3.6. Formação do tubo germinativo

A formação do tubo germinativo foi avaliada quer para a *C. albicans* ATCC 10231 quer para as diferentes misturas com outras leveduras (*C. albicans* + *R. mucilaginosa*, *C. albicans* + *C. albidus* e *C. albicans* + *M. furfur*).

As suspensões de células das leveduras foram preparadas em aproximadamente 2 mL de PBS estéril, até uma concentração de 1 MacFarland.

Para a avaliação da *C. albicans* isolada, foi transferido 125 µL de suspensão em 775 µL de YPD enriquecido com 10% de Soro fetal bovino e incubado num agitador orbital a 37°C a 180 RPM durante 2h30 minutos.

Para avaliarmos a percentagem de formação de tubo germinativo da *C. albicans* a 25°C foi transferido 125 µl de suspensão em 775 µl de YPD enriquecido com 10% de Soro fetal bovino que ficou no agitador a 25°C a 180 RPM durante 2h30 minutos.

A avaliação da capacidade de formação do tubo germinativo da *C. albicans* na presença das leveduras que crescem a 25°C, isto é, co- culturas de *C. albicans* + *R. mucilaginosa* e de *C. albicans* + *C. albidus*), foi realizada através de 2 transferências de 125 µl da suspensão de cada levedura em 650 µl de YPD enriquecido com 10% de Soro fetal bovino e incubada num agitador orbital a 25°C a 180 RPM durante 2 h30 minutos.

Para a avaliação do tubo germinativo misto entre a *C. albicans* e a *M. furfur*, foram realizadas 2 transferências de 125 µl da suspensão das leveduras em 650 µl de YPD e em YPD suplementado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e incubada num agitador orbital a 37°C a 180 rpm durante 2h30 minutos.

Após a incubação, 10 µl da cultura foram coletados e observados em microscópio ótico, com uma ampliação de 40X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

A percentagem de células que expressam tubo germinativo foi calculada visualmente através do número total de células.

Os resultados obtidos para cada mistura de isolados de leveduras foram classificados comparando a proporção (%) de células com tubo germinativo do total de células existentes, com o resultado obtido usando o controlo (*C. albicans*).

3.7. Análise estatística

Para analisar a diferença na formação de biofilmes e do tubo germinativo entre o controlo, as leveduras isoladas e as misturas, foram realizadas o teste de análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste Dunnett com um grau de confiança de 95%. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para a análise dos biofilmes simples formados a 37°C para os isolados da *Candida albicans* e da *Malassezia furfur*, visto só termos 2 amostras para comparar escolhemos o teste T student para a análise estatística. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 5.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Curva de Crescimento das leveduras a 25°C

O primeiro passo do presente trabalho experimental assentou na elaboração de uma curva de crescimento para os isolados da *C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *C. albidus*, e para as misturas *C. albicans* + *R. mucilaginosa* e *C. albicans* + *C. albidus*.

Esta parte experimental, demonstrada através de 2 ensaios independentes, realizou-se de forma a determinar o comportamento das 3 estirpes padrão quando isoladas e quando em co cultura, sendo a levedura em comum em todas as misturas, o controlo - *C. albicans*.

Os valores registados, foram inseridos no seguinte gráfico (Figura 6).

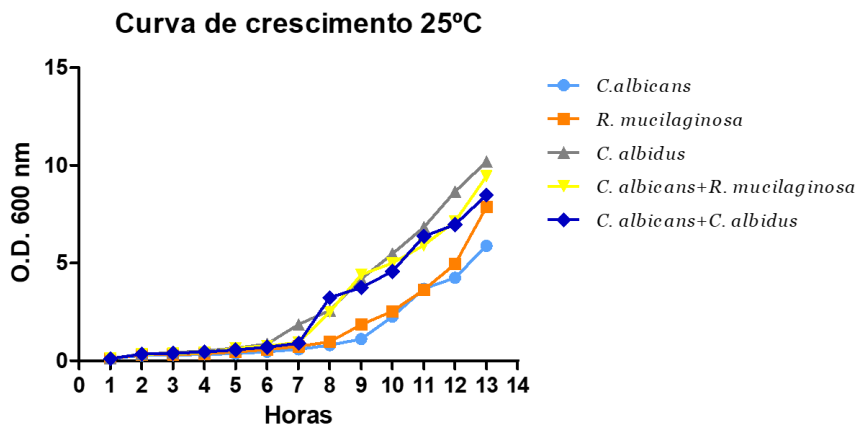


Figura 6- Representação gráfica da densidade ótica (OD 600) nm vs. Tempo (horas) da curva de crescimento de 12 horas da estirpe *C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *C. grutti* e das misturas das 2 últimas leveduras com a *C. albicans*

Após a análise do perfil de crescimento obtido (figura 6), é possível determinar duas das quatro fases distintas duma curva de crescimento microbiano. Em todas as leveduras e nas misturas verificou-se que, possuem uma fase de latência (lag) e uma fase exponencial (log) de grande duração não conseguindo, no período definido, chegar à fase estacionária nem à fase de declínio (morte).

Observamos através da figura 6 que quando se encontram, na simulação de co cultura, não existe alterações quanto à velocidade do crescimento e quanto ao ponto que diferencia a fase de latência com a entrada na fase exponencial.

Após a obtenção deste gráfico, e de acordo com o propósito do nosso estudo, realizamos uma análise à taxa de crescimento entre 2 leituras, na fase exponencial, e a sua conversão em percentagem sendo o nosso 100 %, o valor do crescimento da estirpe *C. albicans*. Essa análise encontra-se representada na tabela 3.

Tabela 3- Cálculo da taxa de crescimento das leveduras que crescem a 25°C e das 2 misturas correspondentes durante a fase exponencial da curva microbiana (no T8 e T9) e cálculo da percentagem correspondente ao crescimento comparado com o controlo *C. albicans* (100%).

| | OD (8,9) | Taxa de Crescimento | % |
|---|----------|---------------------|--------|
| <i>C.albicans</i> | 1,16 | 0,019 | 100 |
| <i>R.mucilaginosa</i> | 0,69 | 0,012 | 60,13 |
| <i>C. albidus</i> | 1,29 | 0,021 | 112,23 |
| <i>C.albicans</i> + <i>R.mucilaginosa</i> | 0,59 | 0,001 | 51,53 |
| <i>C.albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 0,83 | 0,014 | 72,05 |

Através da tabela 3 podemos observar que, apesar de visualmente parecer que as misturas possuem um aumento do crescimento em relação à *C. albicans*, a taxa de crescimento das misturas, quer com a *Rhodotorula mucilaginosa* quer com o *Cryptococcus albidus* diminui. Essa diminuição é mais acentuada para a mistura da *C. albicans* + *R. mucilaginosa*, tendo sido registado uma diminuição para metade.

4.1.1. Curva de Crescimento a 25°C pelo Método das Diluições Sucessivas (UFC/mL)

Ao mesmo tempo, em que foi realizado o ensaio das curvas de crescimento através das leituras da OD_{600 nm}, foi necessário perceber a correlação existente entre um determinado valor da leitura da OD das diferentes leveduras e o valor obtido nas Unidades Formadoras de Colónias por cada mililitro (UFC/mL).

Devido ao facto de não se conseguir ter a certeza que cada colónia surgiu de uma célula única, os resultados em vez de serem expressos em número de microrganismos são expressos em UFC.

Esta análise é feita, tal como nas curvas de crescimento, de hora a hora, para conseguirmos retirar algumas conclusões comparando resultados.

Para tal, realizamos uma segunda curva de crescimento, recorrendo às diluições seriadas que são apresentadas na figura 7.

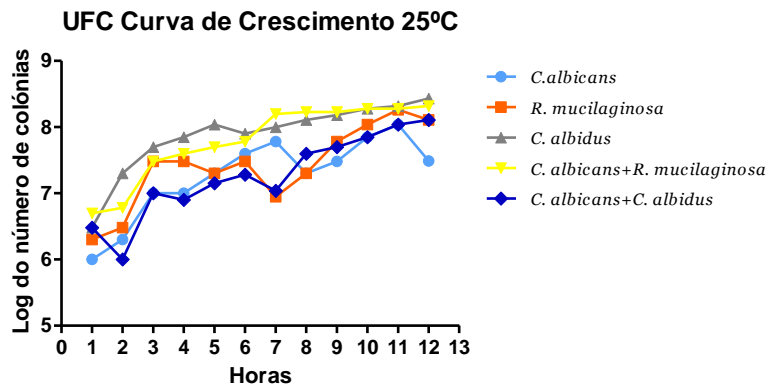


Figura 7- Representação Gráfica UFC/mL vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das 3 leveduras isoladas e das misturas da *C. albicans* + *R. mucilaginosa* e da *C. albicans* + *C. albidus*

De acordo com os dados apresentados na figura 7, verificamos que existem algumas diferenças entre as diferentes curvas. Ao contrário da curva apresentada com as leituras da absorvância a 600 nm, nesta observamos que a mistura representada a amarelo, constituída pela junção da *C. albicans* mais *R. mucilaginosa* tem um crescimento acentuado quando comparada com a *C. albicans* isoladamente.

Na curva correspondente ao nosso controlo, apesar do declínio do último ponto na figura 7, é muito pouco provável que esta variação tenha consequências no crescimento celular correspondente ao T12, visto que, segundo a literatura esta levedura tem uma fase exponencial muito mais duradora do que as horas analisadas no nosso trabalho.

4.2. Curva de Crescimento das leveduras a 37°C

Neste trabalho foi necessário dividir os ensaios experimentais em 2 fases, isto é, em 2 temperaturas distintas. Esta divisão é crucial devido às diferentes características dos fungos usados no estudo, tendo diferentes temperaturas ótimas para o crescimento das diferentes leveduras, para que consiga colonizar o hospedeiro causando assim infecção.

Para além da divisão de temperatura, sentimos a necessidade de testar ainda, quais seriam as diferenças em usar o meio líquido que “beneficia” o crescimento da estirpe *C. albicans* (YPD), ou usar o meio característico da *M. furfur* (YPD suplementado com ácidos gordos).

Por isso, elaboramos a partir de 2 ensaios independentes, uma curva de crescimento de modo a avaliar o comportamento da estirpe padrão de *C. albicans*, da estirpe padrão da *M. furfur* e da mistura das mesmas. Essas curvas estão representadas na Figura 8.

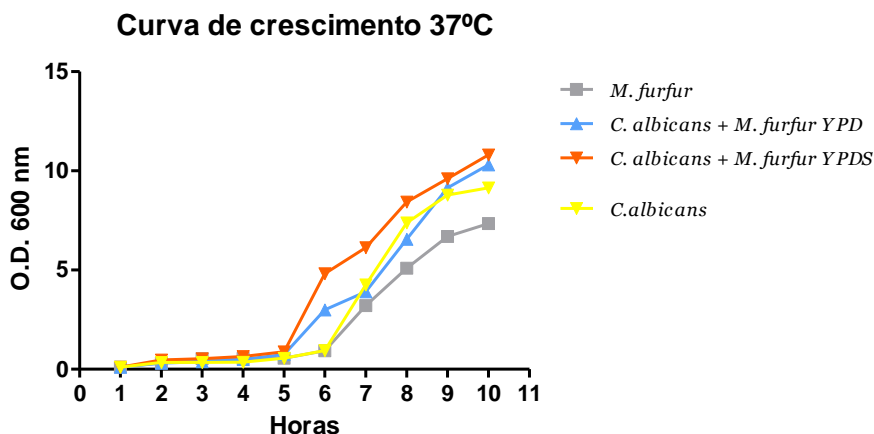


Figura 8- Representação gráfica da densidade ótica (OD 600) nm vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das estirpes *C. albicans* e *M. furfur* e das misturas em estudo em dois meios líquidos distintos (YPD e YPD suplementado)

Após a análise da Figura 8, e tal como na curva de crescimento a 25°C, conseguimos identificar apenas duas das quatro fases características duma curva de crescimento microbiano, a fase de latência (lag) e a fase exponencial (log).

Com a curva obtida, podemos observar que existe uma diferença evidente entre a levedura controlo (*C. albicans*) quando comparada com as misturas (seja em YPD

ou YPD suplementado). Este aumento foi mais acentuado para a mistura que crescia em meio YPD suplementado. Para além das diferenças presentes na velocidade de crescimento, concluímos também que quando se encontram misturadas entram em fase exponencial mais cedo, do que, quando temos a *C. albicans* e a *M. furfur* isoladas.

Tal como para a curva a 25°C, e de acordo com um dos objetivos do trabalho, fomos avaliar as diferenças existentes na taxa de crescimento que ocorre nas leveduras isoladas e na sua mistura. Estes valores estão representados na tabela 4.

Tabela 4-Cálculo da taxa de crescimento das leveduras que crescem a 37°C e das misturas correspondentes durante a fase exponencial (no T6 e T7) e cálculo da percentagem correspondente ao crescimento comparado com o controlo *C. albicans* (100%).

| | OD(6,7) | Taxa de Crescimento | % |
|--|---------|---------------------|---------|
| <i>C.albicans</i> + <i>M. Furfur</i> YPD | 2,16 | 0,036 | 91,31% |
| <i>C. albicans</i> + <i>M. Furfur</i> YPDS | 3,1 | 0,051 | 131,36% |
| <i>C.albicans</i> | 2,36 | 0,039 | 100% |
| <i>M. Furfur</i> | 2,01 | 0,033 | 84,96% |

Através da análise da tabela 4, podemos observar que, apesar de a curva realizada pelas leituras das O.D_{600 nm}, para a mistura em YPD parecer mostrar que existe um crescimento mais rápido em relação à estirpe *C. albicans*, quando realizamos o cálculo da taxa de crescimento e a respetiva percentagem, a conclusão não é concordante.

Portanto, para a mistura das leveduras no meio líquido YPD, a taxa de crescimento é inferior ao nosso controlo, no entanto, para a mistura dos microrganismos em YPD suplementado essa taxa está concordante com a informação transmitida na figura 8 (um aumento do crescimento).

4.2.1. Curva de Crescimento a 37°C pelo Método das Diluições Sucessivas (UFC/mL)

Tal como já foi referido acima, ao mesmo tempo em que se realizava as leituras da OD_{600 nm}, eram realizadas uma sucessão de diluições, no intervalo de tempo de 1

hora num período total de 9 horas. Tal foi necessário para que conseguíssemos perceber qual o número total de células que se observavam em cada fase da curva microbiana, assim como, permite que exista uma comparação com os resultados obtidos na figura 8.

Posto isto, a respetiva curva correspondente à UFC/mL está representada na figura 9.

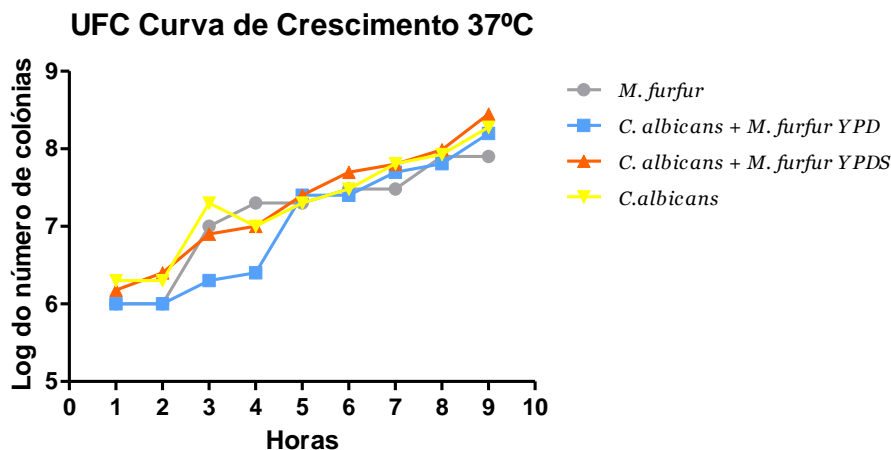


Figura 9- Representação Gráfica UFC/mL vs. Tempo (em horas) da curva de crescimento das duas leveduras isoladas e das misturas em YPD e YPD com suplementação lipídica

De acordo com a figura 9, podemos notar que, ao contrário da figura 8 em que era notória uma diferença entre as leveduras - *C. albicans* e *M. furfur* e a mistura das mesmas, as UFC/mL não demonstram alterações entre as misturas e as leveduras isoladas.

4.3. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes simples

4.3.1. Biofilmes simples a 25°C

Os valores médios da biomassa dos biofilmes simples dos 3 isolados a 25°C estão representados na figura 10 e o respetivo cálculo da percentagem em comparação com o controlo está representado na tabela 5.

Tabela 5-Resultados dos 2 ensaios independentes realizados dos biofilmes simples com 48 horas de idade a 25°C das 3 leveduras e convertidos em %, sendo a referencia (100%) *C. albicans*.

| | Média | % |
|-------------------------|-------|----------|
| <i>C.albicans</i> | 1,83 | 100 % |
| <i>R.mucilaginososa</i> | 3,9 | 213,41 % |
| <i>C.albidus</i> | 2,49 | 135,98 % |

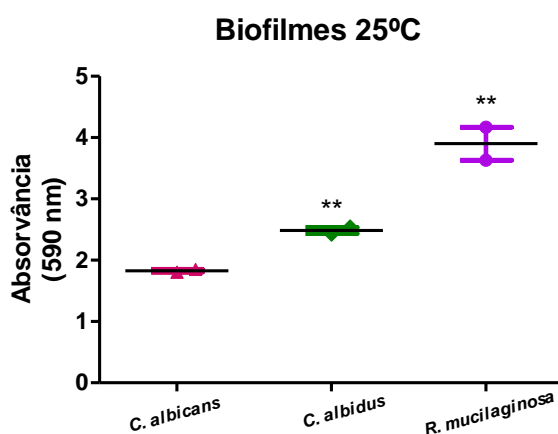


Figura 10-Representação gráfica da formação de biofilmes a 25°C pela *C. albicans*, *R. mucilaginososa* e *C. albidus* com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa (590 nm) e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

De acordo com a biomassa total dos biofilmes simples, representada pela média aritmética das quatro réplicas por ensaio e mostradas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *Rhodotorula mucilaginososa* > *Cryptococcus albidus* > *Candida albicans*. A diferença na formação do biofilme foi estatisticamente significativa entre o isolado da *Candida* e os outros isolados ($P < 0,05$).

Através da tabela 5 conseguimos observar que, a *R. mucilaginososa* tem a capacidade formar, segundo a biomassa total, duas vezes mais biofilme do que a *C. albicans*.

4.3.2. Biofilmes simples a 37°C

Os valores médios da biomassa dos biofilmes simples dos 2 isolados (*C. albicans* e *M. furfur*) a 37°C estão representados na Figura 11 e o respetivo cálculo da percentagem em comparação com a *C. albicans* está representado na tabela 6.

Tabela 6- Resultados dos 2 ensaios realizados dos biofilmes simples a 37°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a *C. albicans*

| | Média | % |
|-------------------|-------|----------|
| <i>C.albicans</i> | 1,11 | 100 % |
| <i>M.furfur</i> | 4,13 | 371,01 % |

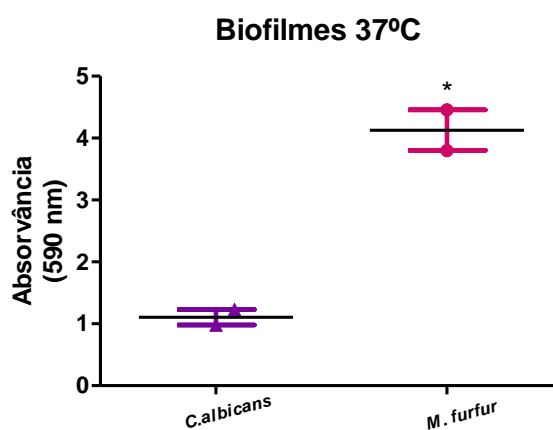


Figura 11- Formação de biofilmes a 37°C pela *C. albicans* e *M. furfur* com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa (590nm) e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

De acordo com a biomassa total dos biofilmes simples a 37°C, exibida pela média aritmética das quatro réplicas por ensaio e mostradas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *Malassezia furfur* > *Candida albicans*. A diferença na capacidade de formação de biofilme foi estatisticamente significativa para o isolado da *M. furfur* em comparação com o controlo (*C. albicans*), para valores de $p < 0,05$.

Em relação ao nosso controlo, segundo a tabela 6, a *M. furfur*, tem 3 vezes mais capacidades de aderir, formando biofilme.

4.3.3. Visualização dos biofilmes por Microscópio Invertido

As imagens obtidas dos biofilmes formados utilizando o microscópio invertido encontram-se na figura 12.

Foram observados os biofilmes simples formados pelos 4 isolados padrão, com uma ampliação de 200 X.

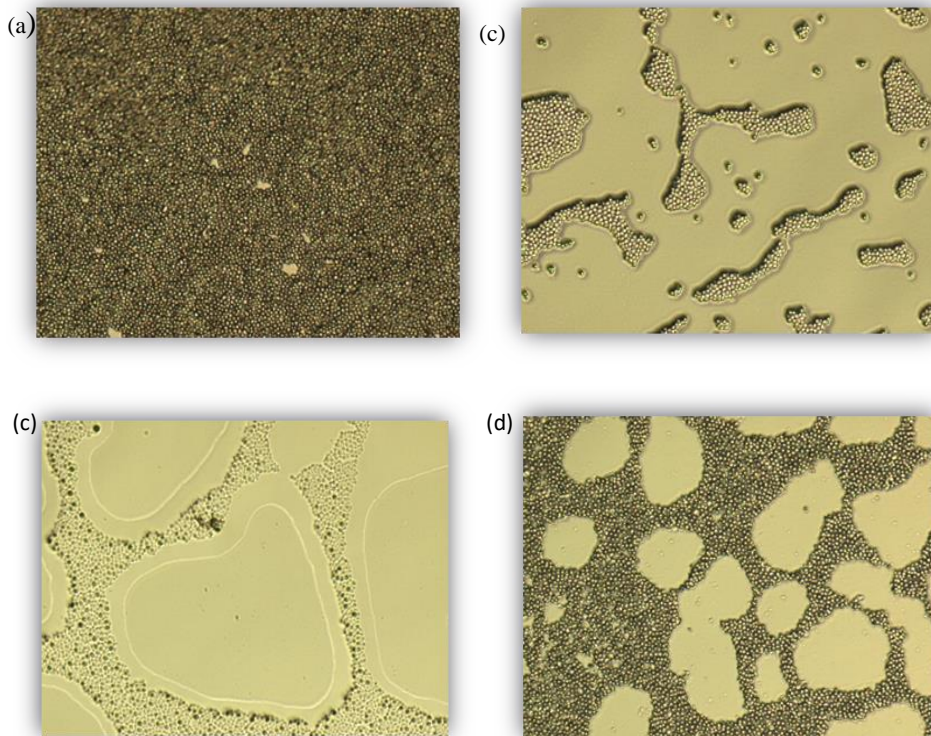


Figura 12- Biofilmes dos isolados utilizados neste estudo, com uma 48horas de idade. (a) Biofilme formado pela *C. albicans* ATCC 10231 ;(b) Biofilme formado pela *R. mucilaginosa* DSM 13621; (c) Biofilme formado pela *M. furfur* DSM 6170 e (d) Biofilme formado pelo *C. albicans* DSM 70215

Através das imagens adquiridas podemos verificar a presença de biofilme em todos os isolados, sendo que visualmente, o biofilme formado pela *C. albicans* apresenta-se mais denso e não se encontra em monocamada.

4.4. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes mistos

4.4.1. Biofilmes mistos a 25°C

4.4.1.1. Avaliação da biomassa dos Biofilmes mistos a 25°C

Os valores médios da biomassa total dos biofilmes mistos dos 3 isolados e das misturas entre os mesmos (tendo como levedura em comum a *C. albicans*) estão representados na Figura 13, as respectivas conversões em percentagem estão registadas na tabela 7. Os valores das unidades formadoras de colónias correspondentes aos biofilmes mistos a 25°C estão na figura 14.

Tabela 7-- Média dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes mistos a 25°C e convertidos em %, sendo a referencia (100%) *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|---|---------------------|----------|
| <i>C.albicans</i> + <i>C.albidus</i> | 3,35 | 142,89 % |
| <i>C.albicans</i> + <i>R.mucilaginososa</i> | 2,26 | 96,46 % |
| <i>C.albicans</i> | 2,34 | 100 % |
| <i>R.mucilaginososa</i> | 3,89 | 166,18 % |
| <i>C.albidus</i> | 2,42 | 103,32 % |

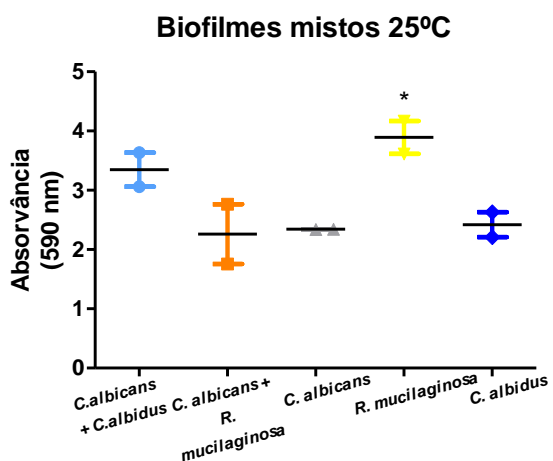


Figura 13-Formação de biofilmes mistos a 25°C com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa, através do CV (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

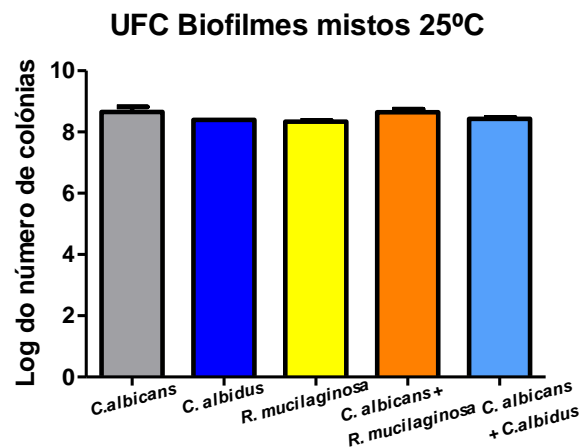


Figura 14- Representação em coluna das unidades formadoras de colónias dos biofilmes mistos a 25°C contadas após 24 horas de incubação e os respetivos erros padrões

Em relação aos valores da biomassa dos biofilmes mistos, representada pela média aritmética de quatro réplicas e apresentadas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes mistos, de maior para menor, foi: *R. mucilaginosa* > *C. albicans* + *C. albidus* > *C. albidus* > *C. albicans* > *C. albicans* + *R. mucilaginosa*.

Comparando as misturas com o nosso isolado de *C. albicans* podemos concluir que quando colocadas em simultâneo com o *C. albidus* a formação de biofilme aumenta, contudo não de forma estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Já a mistura *C. albicans* + *R. mucilaginosa* não apresenta diferenças relevantes no biofilme formado quando comparado com o nosso controlo.

De acordo com os resultados da figura 14, e fazendo uma correlação com a figura 13, podemos reparar que a mistura realizada pela *C. albicans* com a *R. mucilaginosa*, quanto à avaliação da biomassa, não mostra resultados significativos e relevantes, visto que, os valores de absorvância e as UFC/mL são aproximadamente iguais.

4.4.1.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 25°C

Os valores médios da atividade metabólica dos biofilmes mistos dos 3 isolados e das misturas dos mesmos estão representados na figura 15 e as respetivas percentagens foram registadas na tabela 8.

Tabela 8- Média dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 25°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|---|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 1,213 | 72,28 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>R. mucilaginosa</i> | 1,11 | 65,87 % |
| <i>C. albicans</i> | 1,68 | 100 % |
| <i>R. mucilaginosa</i> | 2,96 | 176,60 % |
| <i>C. albidus</i> | 2,54 | 151,42 % |

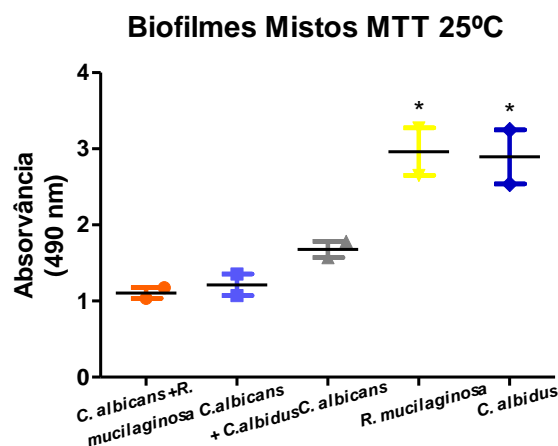


Figura 15- Formação de Biofilmes mistos a 25°C pelos 3 isolados e as misturas, de acordo com a atividade metabólica, utilizando o MTT (490 nm). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes mistos a 25°C, representada pela média aritmética de quatro réplicas e representadas em valores de absorvância (A490 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *R. mucilaginosa* > *C. albidus* > *C. albicans* > *C. albicans* + *C. albidus* > *C. albicans* + *R. mucilaginosa*.

De acordo com a atividade metabólica, ambas as misturas mostraram uma diminuição da viabilidade dos biofilmes, sendo mais acentuada para a mistura de *C. albicans* + *R. mucilaginosa*.

4.4.2. Biofilmes mistos a 37°C

4.4.2.1. Avaliação da biomassa dos Biofilmes Mistos a 37 °C

Os valores médios da biomassa total dos biofilmes mistos a 37°C dos isolados e também das misturas com diferentes meios líquidos (YPD e YPD suplementado) estão representados na figura 16 e as respectivas conversões em percentagem, sendo sempre feita a comparação com a *C. albicans* são apresentados na tabela 9. Os valores, em logaritmo, das unidades formadoras de colónias correspondentes aos biofilmes mistos a 37°C estão na figura 17.

Tabela 9- Resultados dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes mistos a 37°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|---------------------------------------|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>M. furfur</i> | 3,23 | 154,06 % |
| <i>C. albicans</i> | 2,09 | 100 % |
| <i>M. furfur</i> | 1,43 | 68,26 % |

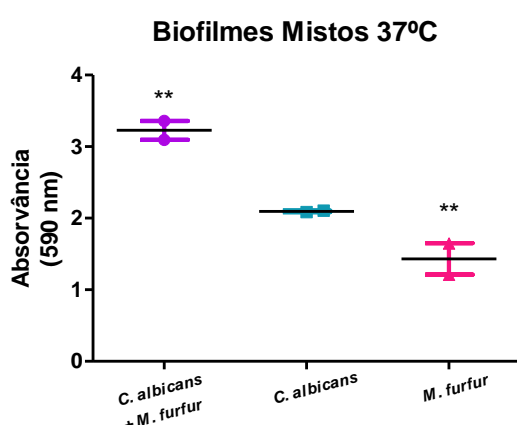


Figura 16- Formação de biofilmes mistos a 37°C com 48 horas de incubação, de acordo com a biomassa, através do CV (590nm) e os respectivos erros padrões. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

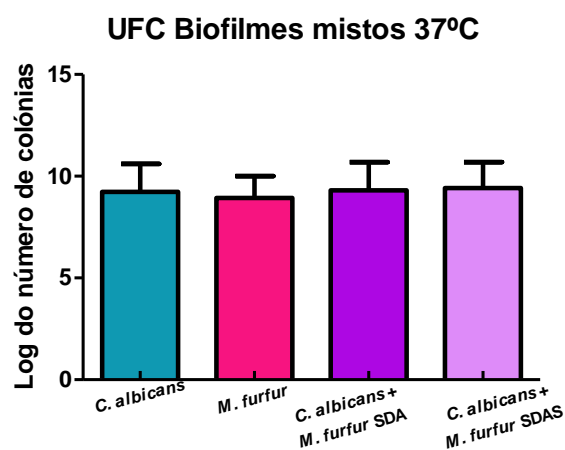


Figura 6- Representação em coluna das unidades formadoras de colônias dos biofilmes mistos a 37°C contadas após 24 horas de incubação e os respectivos erros padrões

Em relação à biomassa dos biofilmes mistos a 37°C, revelada pela média aritmética de quatro réplicas e mostradas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes mistos em relação à *C. albicans*, de maior para menor, foi: *C. albicans* + *M. furfur* > *C. albicans* > *M. furfur*. A diferença na formação de biofilmes foi estatisticamente significativa tanto para o isolado como para a mistura equiparando com o controlo ($p < 0,05$).

As UFC/mL não nos revelam grandes diferenças entre os isolados e as misturas com a *C. albicans*. As colônias para a mistura *C. albicans* + *M. furfur* foram plaqueadas em placas de SDA e em placas de SDA suplementado com o intuito de, na contagem, tentarmos perceber se influenciava o crescimento das colônias. Como podemos observar na figura 17, tal não aconteceu, os números de colônias formadas são bastante semelhantes.

4.4.2.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 37°C

Os valores médios da atividade metabólica dos biofilmes mistos dos 4 isolados estão representados na figura 18, já os valores transformados em percentagem da atividade metabólica dos biofilmes mistos estão representados na tabela 10.

Tabela 10- Resultado dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes mistos a 37°C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|---------------------------------------|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>M. furfur</i> | 2,14 | 129,39 % |
| <i>C. albicans</i> | 1,65 | 100 % |
| <i>M. furfur</i> | 3,54 | 214,69 % |

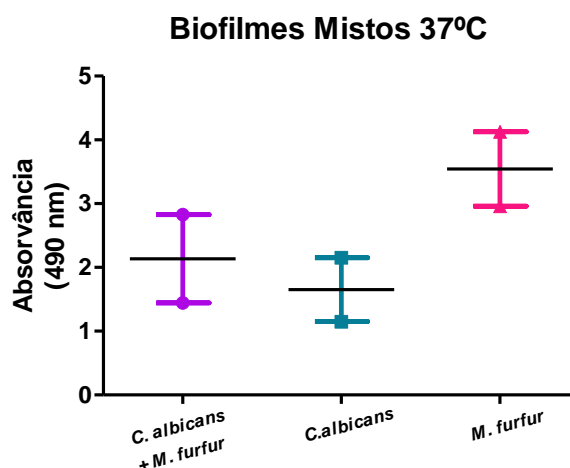


Figura 18- Formação de Biofilmes mistos a 37°C pelos 2 isolados e as misturas, de acordo com a atividades metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes mistos a 37°C, representada pela média aritmética de quatro réplicas e representadas em valores de absorvância (A490 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *M. furfur* > *C. albicans* + *M. furfur* > *C. albicans*.

4.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes Pré-Formados

4.5.1. Avaliação dos Biofilmes Pré- Formados a 25°C

4.5.1.1. Avaliação da biomassa dos biofilmes Pré- Formados a 25°C

Os valores médios da biomassa dos biofilmes pré- formados dos 3 isolados e das suas misturas com a *C. albicans* estão representados na figura 19 e as respetivas percentagens da biomassa total em comparação com o controlo encontram-se registados na tabela 11. As UFC/mL dos biofilmes pré- formados estão representados na figura 20.

Tabela 11- Média dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 25°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a *C. albicans*

| | média dos 2 ensaios | % |
|---|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 2,86 | 76,90 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>R. mucilaginosa</i> | 2,56 | 69,02 % |
| <i>C. albicans</i> | 3,71 | 100 % |
| <i>R. mucilaginosa</i> | 4,95 | 133,40 % |
| <i>C. albidus</i> | 3,75 | 101,01 % |

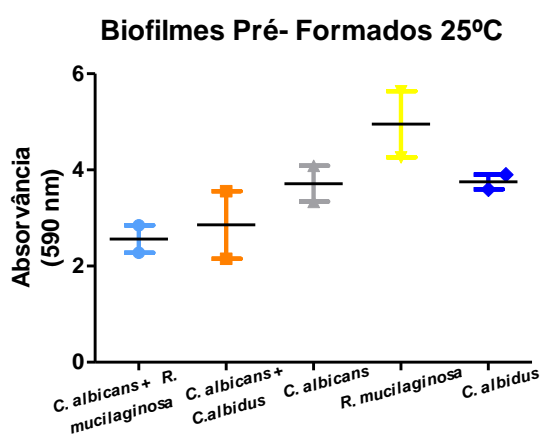


Figura 19- Formação de biofilmes pré- formados a 25°C, de acordo com a biomassa, através do CV (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

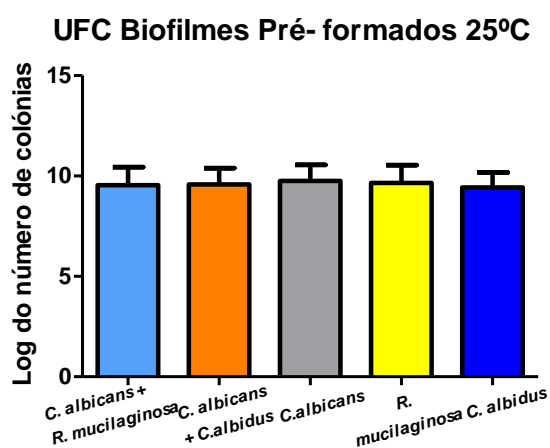


Figura 20- Representação em coluna das unidades formadoras de colônias dos biofilmes pré- formados a 25°C contadas e os respetivos erros padrões

Em relação à biomassa dos biofilmes pré- formados, representada pela média aritmética de quatro réplicas e mostradas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi *R. mucilaginosa* > *C. albidus* > *C. albicans* > *C. albicans*+ *C. albidus* > *C. albicans* + *R. mucilaginosa*. A diferença na formação de biofilmes não foi estatisticamente significativa tanto para os isolados como para as misturas quando equiparadas com o controlo ($p>0,05$).

Na figura 20 estão representadas as UFC/mL dos biofilmes pré- formados a 25°C, efetuadas para que conseguíssemos compreender se os valores de absorvância lidos nos biofilmes estariam ou não de acordo com a contagem do número de colónias. Para os biofilmes pré- formados a 25°C esta diferença não existiu em nenhum dos isolados e também em nenhuma das misturas.

4.5.1.2 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 25°C

Os valores médios da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados dos 3 isolados estão representados na figura 21, já os valores transformados em percentagem da atividade metabólica dos biofilmes mistos estão representados na tabela 12.

Tabela 12- Média dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 25° C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo *C. albicans*

| | média dos 2 ensaios | % |
|---|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>R. mucilaginosa</i> | 1,07 | 90,32 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 1,17 | 98,53 % |
| <i>C. albicans</i> | 1,19 | 100 % |
| <i>R. mucilaginosa</i> | 1,97 | 166,11 % |
| <i>C. albidus</i> | 1,81 | 152 % |

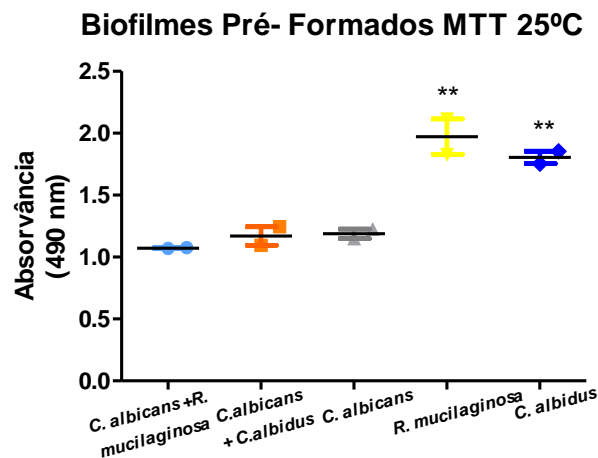


Figura 7- Formação de Biofilmes pré- formados a 25° C pelos 3 isolados e as misturas, de acordo com a atividade metabólica, utilizando o MTT (490 nm) . Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 25°C, representada pela média aritmética de quatro réplicas e apresentadas em valores de absorvância (A490 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *R. mucilaginoso* > *C. albidus* > *C. albicans* > *C. albicans* + *C. albidus* > *C. albicans* + *R. mucilaginoso*.

A diferença na formação de biofilmes não foi estatisticamente significativa para as misturas quando equiparadas com o controlo ($p > 0,05$), mas foram significativas comparando com os isolados das leveduras ($p < 0,05$).

Os valores da atividade metabólica da *C. albicans* não se alterou praticamente nada quando estão em mistura quer com a *R. mucilaginoso* ou com o *C. albidus*.

4.5.2. Avaliação dos biofilmes pré- formados a 37°C

4.5.2.1. Avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 37° C

Os valores médios da biomassa dos biofilmes pré- formados dos 2 isolados e das suas misturas com a *C. albicans* estão representados na figura 22 e as respetivas percentagens da biomassa total em comparação com o controlo encontram-se registados na tabela 13. As UFC/mL dos biofilmes pré- formados estão representados na figura 23.

Tabela 13- Resultados dos 2 ensaios da avaliação da biomassa dos biofilmes pré- formados a 37°C e convertidos em %, sendo a referência (100%) a *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|--------------------------------------|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>M.furfur</i> | 2,99 | 166,85 % |
| <i>C. albicans</i> | 1,79 | 100 % |
| <i>M. furfur</i> | 1,45 | 80,64 % |

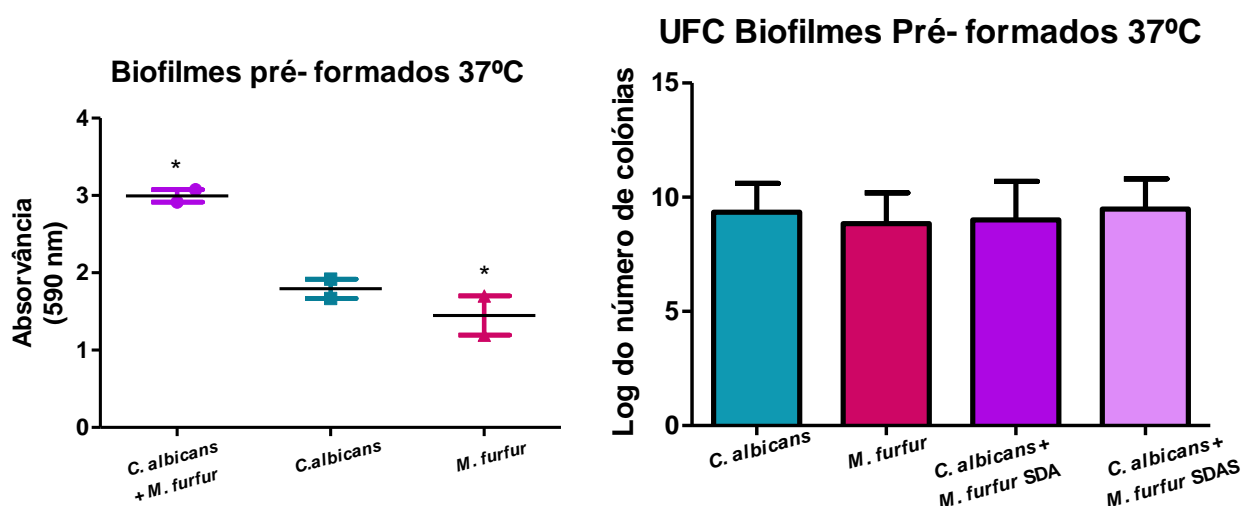


Figura 22- Formação de biofilmes pré- formados a 37°C, de acordo com a biomassa, através do CV (590nm) e os respetivos erros padrões. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Figura 23- Representação em coluna das unidades formadoras de colónias dos biofilmes pré- formados a 37°C contadas após 24 horas de incubação e os respetivos erros padrões

Em relação à biomassa total dos biofilmes pré- formados a 37°C, representada pela média aritmética de quatro réplicas e mostradas em valores de absorvância (A590 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi *C. albicans* + *M. furfur* > *C. albicans* > *M. furfur*. A diferença na formação de biofilmes foi estatisticamente significativa tanto para os isolados como para as misturas quando equiparadas com o controlo ($p < 0,05$).

Tal como já tínhamos observado para os valores de absorvância dos biofilmes mistos a 37°C, a mistura da *C. albicans* com a *M. furfur* faz com que, mesmo que as leveduras sejam colocadas em contacto em simultâneo, ou com um desfasamento de 24 horas (biofilme pré- realizado da *C. albicans*) o resultado é sempre de aumento da adesão.

4.5.2.2. Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 37° C

Os valores médios da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados dos 2 isolados estão representados na figura 24, já os valores transformados em percentagem da atividade metabólica dos biofilmes mistos estão representados na tabela 14.

Tabela 14- Resultados dos 2 ensaios independentes realizados da atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 37° C, convertidos em percentagem tendo em conta o controlo *C. albicans*

| | Média dos 2 ensaios | % |
|---------------------------------------|---------------------|----------|
| <i>C. albicans</i> + <i>M. furfur</i> | 1,56 | 133,48 % |
| <i>C. albicans</i> | 1,17 | 100 % |
| <i>M. furfur</i> | 1,99 | 171,25 % |

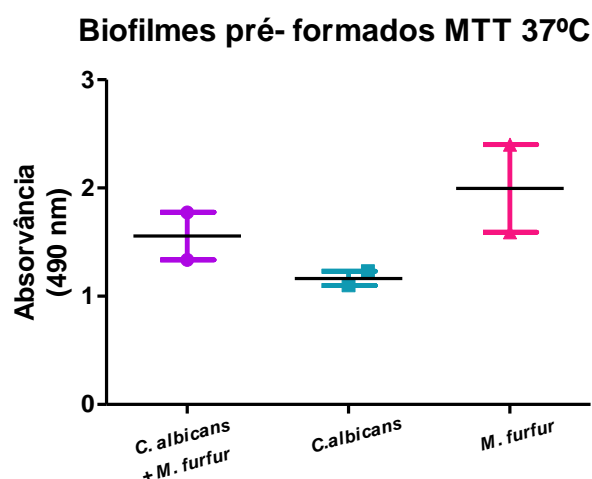


Figura 24- Formação de Biofilmes pré- formados a 37° C pelos 2 isolados e as misturas, de acordo com a atividade metabólica, utilizando o MTT (490 nm).. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes pré- formados a 37°C, representada pela média aritmética de quatro réplicas e apresentadas em valores de absorvância (A490 nm), a escala de formação de biofilmes, de maior para menor, foi: *M. furfur* > *C. albicans* + *M. furfur* > *C. albicans*.

A diferença na formação de biofilmes não foi estatisticamente significativa para a mistura nem para o isolado da *M. furfur* quando equiparadas com o controlo ($p > 0,05$).

4.6 Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo

Para a *C. albicans* um dos fatores de virulência mais importantes, e que é uma característica única, é a sua capacidade de formar tubo germinativo, isto é, a sua capacidade de transitar da forma de levedura para a forma hifal.

Devido às diferentes temperaturas ótimas das leveduras em estudo, tal como nos biofilmes, realizamos o trabalho para 2 temperaturas distintas- 25°C e 37°C.

4.6.1. Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo a 25° C

Os valores médios, de 2 ensaios independentes, da formação do tubo germinativo a 25°C mostrados em percentagem (%) estão representados na figura 25.

Para conseguirmos realizar uma comparação entre as misturas dos isolados e a *C. albicans*, e apesar de já ser do conhecimento científico, que a 37°C é que a *C. albicans* consegue formar um maior número de tubos germinativos, fomos testar como é que ela se comportava a 25°C.

Na tabela 15 encontram-se representados os valores médios da percentagem de formação do tubo germinativo nos 2 ensaios realizados, assim como, a sua representação na forma de percentagem.

Tabela 15- Resultados dos valores da capacidade de formação de tubo germinativo pela *C. albicans* e pela mesma na presença das leveduras a 25°C

| | Média | % |
|---|-------|---------|
| <i>C. albicans</i> | 6,01 | 100 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>R. mucilaginosa</i> | 1,06 | 17,63 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>C. albidus</i> | 0,86 | 14,28 % |

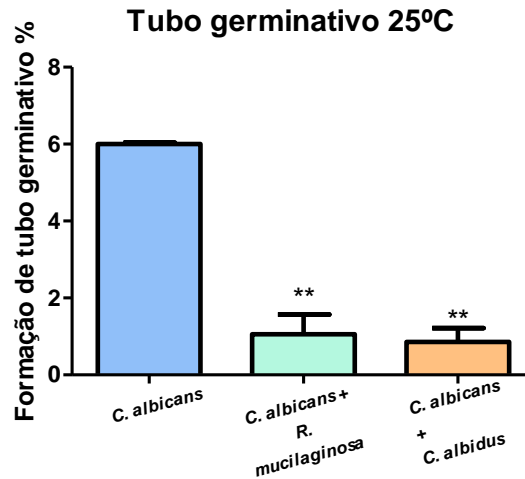


Figura 25- Avaliação da formação de tubo germinativo a 25°C por parte da *C. albicans* e das misturas das outras 2 leveduras com a *C. albicans*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Através da figura 25 podemos concluir que, em mistura, a capacidade de formar tubo germinativo diminui bastante.

A diferença na capacidade de formação de tubo germinativo foi estatisticamente significativa para ambas as misturas dos isolados quando equiparadas com o controlo ($p < 0,05$).

4.6.2. Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo a 37° C

Os valores médios, de 2 ensaios independentes, da formação do tubo germinativo a 25°C mostrados em percentagem (%) estão representados na figura 26. Na tabela 16 encontram-se representados os valores médios da percentagem de formação do tubo germinativo a 37°C nos 2 ensaios realizados, assim como, a sua representação em comparação com a *C. albicans* na forma de percentagem

Tabela 16- Resultados dos valores correspondentes à capacidade de formação do tubo germinativo a 37°C da *C. albicans* isolada e da mesma com a *M. furfur* nos 2 meios líquidos usados

| | média | % |
|--|-------|----------|
| <i>C. albicans</i> | 21,69 | 100 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>M. furfur</i> YPD | 18,98 | 87,51 % |
| <i>C. albicans</i> + <i>M. furfur</i> YPDS | 25,99 | 119,82 % |

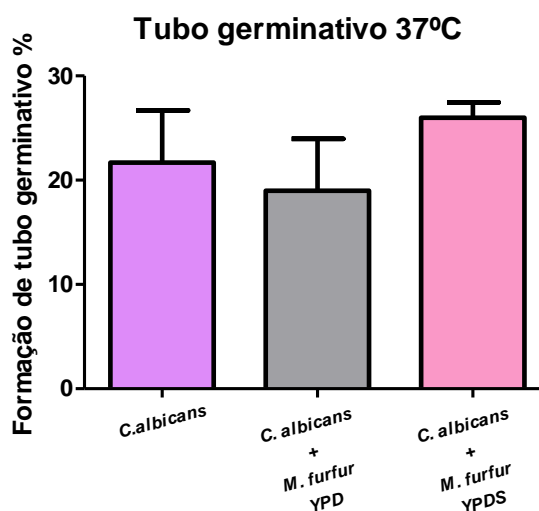


Figura 26- Avaliação da formação do tubo germinativo a 37°C pela *C. albicans* e da mistura da *Malassezia* com a levedura controlo no meio YPD e YPD suplementado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos














De acordo com a figura 26, podemos visualizar que os isolados quando em misturas diminuem ligeiramente o número de tubos germinativos (%) formados.

A diferença na capacidade de formação de tubo germinativo não foi estatisticamente significativa para ambas as misturas dos isolados quando equiparadas com o controlo ($p > 0,05$).

4.7 Quadro resumo - Correlação entre resultados

Após todos os resultados mencionados acima, e de forma a facilitar a sua análise e a retirada de conclusões, elaborámos um quadro resumo. Este quadro representa os ensaios realizados e os resultados apenas das misturas e não das suas ações isoladas. As setas representam o efeito da mistura no nosso controlo, tendo 3 cores diferentes. A cor verde representa um aumento da virulência da *C. albicans* na presença de outra levedura, a cor laranja representa uma ligeira diminuição nos resultados quando comparados com a ação isolada e a cor vermelha exibe a diminuição da ação da *C. albicans* em co- cultura com outra levedura.

Tabela 17- Quadro resumo de todos os ensaios realizados neste trabalho

| <i>C. albicans</i> + | <i>R. mucilaginosa</i> | <i>M. furfur</i> | <i>C. albidus</i> |
|-------------------------|---|---|--|
| Curvas de crescimento |  |  |  |
| Biofilmes mistos |  |  |  Biomassa  Atividade Metabólica |
| Biofilmes Pré- formados |  |  |  |
| Tubo germinativo |  |  |  |

Com apenas uma análise superficial desta ilustração de resultados podemos dizer que as leveduras *R. mucilaginosa* e o *C. albidus*, nas curvas de crescimento e nos fatores de virulências estudados, *quando* presentes com a *C. albicans* levam a uma diminuição da patogenicidade e da virulência em relação à ação da *C. albicans*. Para a *M. furfur* a conclusão é totalmente contrária, visto que, a junção de ambas a levedura contribuirá para um aumento do número de células, aderência e invasão do hospedeiro pelos microrganismos.

Portanto, podemos dizer que as 2 leveduras que exercem um efeito retrocedente à ação da *C. albicans* podem ser classificadas como antagonistas da mesma. Já a *M. furfur*

pode ser denominada como simbiote do nosso controlo, devido a que, quando juntas cresçam e multiplicam-se e aumentam os seus fatores de virulência.

Capítulo 5

Discussão

Embora as doenças fúngicas humanas, até há pouco tempo, tenham vindo a ser negligenciadas, os estudos mais recentes vieram demonstrar que possuem uma alta mortalidade. Estima-se que matem mais de 1,6 milhões de pessoas todos os anos [95].

A sua alta mortalidade e morbidade está associada às dificuldades existentes que os clínicos possuem em realizar um diagnóstico precoce e correto.

A colonização define-se como o crescimento de um fungo num dado hospedeiro sem existir resposta imunológica. Esta pode ocorrer em nichos como a cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório, urinário, pele, mucosa vaginal e circulação sanguínea [96].

Esta colonização é encontrada até 75% dos indivíduos saudáveis, de forma assintomática. Na mucosa vaginal a colonização manifesta-se em 20 a 30 % das mulheres [96].

Os mecanismos envolvidos na interação entre espécies do género *Candida spp.* e o hospedeiro advém de muitas interações entre os ligandos celulares da *Candida spp.* e os recetores presentes no hospedeiro. Estas interações estão relacionadas com a presença deste género, tanto como agente colonizador como patogénico [97].

Tal como outros microrganismos, acredita-se que a colonização, sobrevivência e crescimento de fungos patogénicos no hospedeiro, assim como os danos causados ao mesmo estejam relacionados dependentes de fatores de virulência [78]. O desenvolvimento destes fatores é que diferenciam um microrganismo patogénico de inofensivo [78].

Neste trabalho avaliou-se a relação ecológica da *C. albicans* com 3 géneros fúngicos emergentes no nicho vaginal. Esta avaliação focou-se nas curvas de crescimento, na capacidade de formar biofilme e na de formar tubo germinativo da *C. albicans* na presença das outras leveduras.

Primeiramente avaliou-se o crescimento das estirpes padrão de forma isolada, em iguais condições de temperatura, disponibilidade de oxigénio e nutrientes, em meio líquido e observámos que o crescimento do *C. albidus* é maior do que o da *R. mucilaginosa* sendo seguido da *C. albicans*. A 37°C conseguimos observar que o crescimento da *M. furfur* é menos exponencial do que o crescimento da *C. albicans*.

Durante a cinética do crescimento da *C. albicans* este microrganismo sintetiza alguns metabolitos, tais como a síntese de lipopolissacarídeos e ácidos gordos, (durante a fase de latência com um aumento de ferro e manganês) e na fase exponencial, devido ao aumento de ferro é sintetizado o Fum 12 (fumarato hidratase) [98].

Um estudo relatou que leveduras do género *Rhodotorula spp.* são capazes de produzir glicogénio durante a fase exponencial do seu crescimento e conseguem acumular lípidos e carotenóides durante a fase estacionária da curva microbiana [99].

A capacidade de acumular lípidos é muito variável, pois enquanto algumas leveduras como a *Rhodotorula spp.* e o *Cryptococcus spp.* conseguem acumular cerca de 40 a 70 % de lípidos em relação à sua biomassa total, géneros como a *Saccharomyces spp.* e a *Candida spp.* são usualmente incapazes de acumular lípidos acima dos 10% da sua biomassa, mesmo quando cultivadas nestas condições [100].

O metabolismo da *Malassezia spp.* possui a capacidade de produzir catalase, urease e β - glicosidade e durante a fase exponencial produz lípases.

Na curva de crescimento da figura 6, as leituras foram realizadas durante 12 horas e por isso os resultados apenas mostraram 2 das fases presentes neste tipo de curva- fase de latência (lag) e fase exponencial (log).

Quando simulamos a co cultura, protagonizada pela mistura das leveduras a 25°C com a *C. albicans*, verificamos que não existem alterações quanto à velocidade no crescimento das mesmas, isto é, o T (horas) em que entram na fase exponencial, sendo o ponto que diferencia a fase de latência com a exponencial o mesmo entre todas.

Apenas através da análise do gráfico, já conseguimos observar que a ambas as misturas a 25°C, apresentam um menor crescimento quanto comparado à *C. albicans*. Esta diminuição fica mais evidente após o cálculo da taxa de crescimento realizado a partir de 2 pontos (T8 e T9), dois pontos pertencentes à fase exponencial de todas as curvas. Esta taxa revelou que quando juntas, num mesmo ambiente, apresentam diminuições no crescimento das mesmas.

Das duas misturas analisadas, aquela que se destaca pela diminuição mais abrupta é a mistura constituída pela *C. albicans* com a *R. mucilaginosa*.

Esses dados podem indicar a presença de algum metabolito no meio de cultura, libertado pelas leveduras, que provavelmente atuaram sobre as células fúngicas de forma a inibir o seu crescimento.

Uma análise mais aprofundada acerca dos metabolitos das leveduras emergentes e a sua função presente no sobrenadantes das leveduras ainda precisa ser concretizada.

Para complementar o nosso estudo, os métodos das diluições sucessivas (UFC/ml) revelaram alguns resultados discordantes das leituras realizadas no espectrofotómetro.

Para a mistura formada pela *C. albicans* e pelo *C. albidus* verificou-se um decréscimo no número das mesmas quando comparadas com os seus crescimentos na forma isolada.

Para a mistura constituída pela *R. mucilaginosa* com o nosso controlo os resultados são um pouco controversos, visto que, a taxa de crescimento da curva desta mistura apresentou uma diminuição na capacidade de se multiplicarem (51, 53 %) e as UFC/mL apresentou um aumento considerável das colónias formadas pelas mesmas.

A curva de crescimento realizada a 37°C para a mistura com a *M. furfur* mostrou, tal como a curva anterior 2 fases distintas do crescimento, e que quando as leveduras são colocadas a crescer no meio YPD, o crescimento é inferior em comparação com a *C. albicans*. No entanto no meio YPD suplementado (YPDS) com 0,5 % azeite e 0,5 % tween 80 o crescimento é muito superior ao controlo.

Através da avaliação da taxa de crescimento percebemos que na mistura com YPDS o crescimento é cerca 131,4% quando comparado com a *C. albicans*. Já em relação às UFC/mL, estas não mostraram diferenças muito díspares entre as misturas e os isolados. Das duas misturas, aquela que consegue produzir um maior número de colónias continua a ser a mistura com YPD suplementado.

Este aumento de crescimento resultante da mistura da *C. albicans* com a *M. furfur* pode advir do facto de a *Malassezia spp.*, por ser uma levedura lipodependente, apresentar uma falha na produção de ácido mirístico, que é um percussor de ácidos gordos.

A sua necessidade de ácidos gordos para que ocorra o seu crescimento, faz-nos acreditar que, como a *C. albicans* consegue produzir ácidos gordos entre a fase de latência e a fase exponencial, vai estimular a *M. furfur* a crescer devido ao aumento de nutrientes disponíveis.

Por isso, estas leveduras quando presentes em simultâneo vão aumentar a sua taxa de crescimento e o seu número de células viáveis capazes de colonizar, conseguindo, portanto, causar infeção no hospedeiro.

Nas últimas décadas, a incidência de infeções causadas por fungos devido à formação de biofilmes chega aos 65% de todos os casos registados [84].

O crescimento em biofilme confere inúmeras vantagens aos microrganismos, os quais incluem as resistências aos agentes antimicrobianos e aos tratamentos com antifúngicos, virulência mais acentuada, proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro, entre outros.

Assim como as bactérias, os fungos também são capazes de formar biofilmes, o que têm levado a um aumento da sua relevância clínica e de problemas económicos, na medida em que, por serem organismos eucariontes são mais complexos que as bactérias levando a diagnósticos e tratamentos mais difíceis.

Devido a estes fatores, o biofilme é um dos principais modos de crescimento de diversos fungos oportunistas, como é o caso dos fungos utilizados neste trabalho, nomeadamente da *C. albicans* que é a levedura mais estudada e com mais informação disponível na literatura acerca da microbiota vaginal [84].

No presente estudo foi avaliada a capacidade de formação de biofilme para os isolados padrão de *Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus* e *Malassezia furfur* utilizando a quantificação da biomassa total (CV).

Os resultados mostraram que em relação à *C. albicans* todos os outros isolados apresentaram valores mais elevados de biomassa, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que diz que todos os isolados estão especialmente adaptados para crescer em superfícies sendo excelentes candidatos como formadores de biofilmes [121, 122, 123].

Contudo este aspeto ainda não está tão bem estudado para todas os géneros de leveduras quando comparados com os estudos já realizados em bactérias.

Nos dias de hoje já existem modelos, critérios e até fenótipos delineados, quando se trata de biofilmes formados por leveduras. Para além disto, já é feita a comparação entre biofilmes formados por bactérias e por leveduras, que são mais simples, com os biofilmes formados por fungos filamentosos.

No caso da formação de biofilme pela espécie *C. albicans*, investigadores afirmam que os diferentes resultados encontrados na literatura a respeito desta e das demais leveduras sofrem alterações devido a fatores como, o meio de cultura utilizado, a disponibilidade de oxigénio e nutrientes, o pH e a origem das espécies [101].

Sabe-se também que, para a *Candida spp*, a formação de hifas (passo importante para que ocorra a maturação do biofilme seguida da dispersão) pode contribuir para encontrar quantidades mais altas de biomassa total [102]. Em relação à viabilidade celular, esta relação não é tao direta, uma vez que, estudos mostraram variações nestes valores entre diferentes espécies [102].

Por outro lado, a levedura *Rhodotorula spp.* é uma levedura que ainda não está tão bem estudada. No entanto, atualmente apresentam relevância como agentes causadores de fungémias devido ao uso de CVC (cateter venoso central), e até há pouco tempo não eram uma levedura associada a uma alta capacidade formadora de biofilme em microplaca.

No entanto, alguns estudos, afirmam que quando comparadas entre espécies deste género, a *R. mucilaginosa* foi a que, através do ensaio com cristal violeta, apresentou uma maior habilidade para formar biofilme [49].

Todavia, um outro estudo relatou que, dos isolados que utilizou de *R. mucilaginosa*, existiu um aumento significativo do biofilme em número de células (UFC/mL) até às 48 horas de incubação do biofilme, mas que por outro lado, a atividade metabólica e a biomassa total do biofilme foi diferente entre os isolados. Porém, para todos houve uma diminuição de todos os parâmetros estudados após as 48 horas de incubação do biofilme [103].

No nosso estudo, observou-se que o isolado padrão de *R. mucilaginosa* apresentou uma elevada capacidade de formação de biofilme após 48 horas de incubação, tendo registado valores de absorvância 2X superiores à *C. albicans*.

Os resultados obtidos nos nossos ensaios para o *C. albidus*, tal como nas outras leveduras, estão em concordância com a literatura. Em relação ao nosso controlo, o *C. albidus* possui uma alta capacidade de formação de biofilme, conseguindo obter cerca 1,3X mais biomassa total.

Alguns estudos relataram, que ao contrário do *C. neoformans*, esta espécie não consegue crescer a 37°C e isso explicaria a falta de sucesso na manifestação de infeções por parte do *C. albidus* e do *C. laurentiie* [104]. Todavia estudos posteriores referiram alguma tolerância térmica destas espécies não-*neoformans* no trato gástrico, o que poderia estar envolvido na criptococose humana e animal [105].

Em relação aos resultados obtidos para a espécie *M. furfur*, estes estão em concordância com os estudos realizados acerca da *M. pachydermatis*, contudo é importante salientar que esta espécie, ao contrário da utilizada neste estudo, não é uma levedura lipodependente [106].

Os nossos biofilmes foram visualizados 48 horas após o seu contacto com a superfície, visto que, dados obtidos anteriormente afirmam que 24 horas de contacto não são suficientes para que ocorra a adesão. Esta visualização também aconteceu em estudos realizados com a *M. pachydermatis* em que a matriz celular após 48 horas de formação de biofilme era muito mais abundante do que em apenas 24 horas [106].

Neste estudo, realizou-se também a avaliação da capacidade de formação de biofilmes aquando da presença de dois microrganismos diferentes (designados por biofilmes mistos). Esta mistura acontece ao mesmo tempo, em iguais concentrações de inóculo e tempos de incubação para todos os microrganismos, para que obtivéssemos os resultados mais confiáveis e realistas possíveis.

Esta quantificação foi observada por 2 métodos, MTT (atividade metabólica) e o CV (biomassa total).

O corante cristal violeta (CV), é um corante básico que se liga aos polissacarídeos da matriz extracelular e às moléculas que tenham carga negativa presentes na superfície onde se encontra o biofilme aderido corando tanto as células viáveis com as mortas, bem como a matriz extracelular [107].

O ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a atividade metabólica celular, permitindo quantificar o número de células viáveis presentes [108]. Estes ensaios são usualmente realizados no escuro, uma vez que o reagente MTT é muito sensível à luz.

Normalmente em estudos da atividade metabólica são usados sais como o XTT, no entanto, já foram encontradas evidências científicas de que existe redução do MTT para formazano em estruturas celulares lipídicas [124]

Os resultados mostraram que, com a *R. mucilaginosa* a quantidade de biofilme formado, tanto pela avaliação da biomassa como da atividade metabólica, era inferior quando comparado com o controlo.

Já para o *C. albidus*, os valores da biomassa da sua mistura com a *C. albicans* foram superiores ao controlo isolado, porém os valores da atividade metabólica revelaram uma diminuição do metabolismo celular nesta mistura.

Apesar dos valores obtidos da biomassa total terem apontado um crescimento da quantidade de biofilme produzido, as contagens das colónias pelos métodos das diluições sucessivas (UFC/ml) mostraram-nos resultados divergentes. Para a mistura constituída pela *C. albicans* com o *C. albidus* o logaritmo do número de colónias que cresceram foi inferior ao do isolado padrão da *C. albicans*.

Isto poderá levar-nos a pensar, que a leitura feita da biomassa total realizada como é uma leitura das células viáveis e mortas levou a uma leitura errada da massa fúngica aderida. Portanto, apesar de existir um aumento da biomassa total, a viabilidade presente no biofilme misto diminui em relação à *C. albicans* quando isolada.

Para o outro isolado, para a *M. furfur*, houve um aumento significativo e relevante da biomassa total do biofilme para a sua mistura com a *C. albicans*, com um *p*

value=0.0075 (Anexo A2). Para além da biomassa total, os valores do ensaio com o MTT revelaram um aumento da viabilidade celular na mistura.

Com estes resultados podemos aferir que as leveduras *C. albicans* e *M. furfur* quando misturadas em simultâneo, formam mais biofilme (logo a sua adesão ao hospedeiro fica mais forte), tornam-se mais viáveis e, portanto, podem-se tornar mais virulentas causando não só mais infeção como uma infeção mais difícil de curar.

Alguns estudos anteriores, vieram demonstrar que a capacidade de formação de biofilme pela *Candida spp.* e pela *Malassezia spp.* são dependentes de um conjunto de fatores, tais como a hidrofobicidade, aderência e produção de fosfolipases, que pode ajudar a explicar a transição dimórfica de comensal para patogénico destes microrganismos [109]. A hidrofobicidade tem uma grande contribuição na adesão microbiana, aumentando as interações hidrofóbicas, permitindo que o microrganismo forme biofilme, aumentando a sua resistência a fármacos e a sua virulência [110].

Em relação ao biofilme pré- formado, o propósito desta experimentação, foi perceber se depois de a *C. albicans* estar “instalada” e em forma de biofilme, a junção de outras leveduras iria afetar ou não o biofilme já existente e, portanto, afetar a colonização.

Para a mistura composta pela *R. mucilaginoso* como pelo *C. albidus*, através da biomassa, houve uma diminuição na capacidade de formar biofilme. Tal como aconteceu para os biofilmes mistos, nos pré- formados, para a mistura da *C. albicans* com a *M. furfur* houve um aumento significativo na quantidade de biofilme formado (p value = 0.0151).

Na avaliação da atividade metabólica para os isolados a 25°C, ambas as misturas não apresentaram praticamente diferença na viabilidade celular. Já a mistura a 37°C houve um aumento, não significativo da viabilidade celular quando comparada com a *C. albicans* isolada.

Os microrganismos quando colonizam o mesmo ambiente, e, portanto, co-habitam nestes biofilmes, vão ter de competir por nutrientes e interagindo entre si.

Podem interagir de forma sinérgica, estimulando o crescimento, podem ser antagónicas competindo de maneira que apenas 1 consiga sobreviver inibindo o crescimento dos que o rodeiam e por último, podem interagir de forma neutra, anulando os fatores de virulência, fazendo com que seja possível que se desenvolva biofilmes de diferentes espécies em conformidade.

Fazendo uma correlação entre os resultados obtidos dos biofilmes simples, mistos e biofilmes pré-formados, podemos elaborar algumas hipóteses justificadoras dos valores obtidos nos ensaios.

Para a levedura *R. mucilaginosa* podemos observar que isoladamente tem uma ação muito maior, isto é, uma maior capacidade produtiva de biofilme tanto em biomassa como em viabilidade celular do que quando está em simultâneo com a *C. albicans*.

Como vimos anteriormente, a mistura destas leveduras em relação à *C. albicans*, apresentaram alguns valores mais baixos na quantificação de biofilme produzido em pré- formado e na viabilidade celular no biofilme misto. No que toca à biomassa dos biofilmes mistos e à viabilidade dos biofilmes pré-formados, os valores são muito parecidos, apesar de mais baixos, e, portanto, é quase irrelevante.

Desta mistura podemos ponderar que, por um lado, estes resultados são fruto de uma inibição da *R. mucilaginosa* por parte da *C. albicans*, visto que, os seus valores isoladamente são muito superiores em relação à mistura e os da mistura são similares aos valores isolados da estirpe padrão da *C. albicans*.

Por outro lado, alguns estudos realizados em 2019, apesar de terem sido estudados para o nicho intestinal, pensam que poderá existir na *Rhodotorula spp.* um efeito probiótico. Estes achados foram encontrados após a comparação realizada com um dos probióticos mais estudados, a *Saccharomyces spp.*. Estes efeitos positivos ocorrem devido à competição com a flora intestinal e também pela ligação de patogénicos ou de toxinas à superfície celular destas leveduras [111, 112].

O que se pensa é que a *Rhodotorula spp.* expressa moléculas semelhantes na sua parede celular, portanto, espera-se que o comensal possa exercer efeitos benéficos ao diminuir a inflamação [111, 112]. No entanto, o efeito poderá ser inferior ao da *Saccharomyces spp.* e de outras leveduras do filo *Ascomycota*, uma vez que a *Rhodotorula spp.*, tal como todos os Basidiomycota, não possuem 1-3- β - glucano na sua parede celular e, portanto, não serão capazes de ativar o recetor da dectina 1 na superfície dos macrófagos, logo não haverá estimulação do sistema imunológico local [113].

Agora, de um modo geral, a *Rhodotorula spp.* traz certos aspetos positivos na saúde do ser humano colonizado e, por isso, nunca é benéfico erradicar por completo este fungo. De um modo global, podemos pensar que a junção com a *C. albicans*, irá fazer com que aconteça um decréscimo na aderência devido a algum efeito probiótico por parte da *Rhodotorula ssp.*

Para o *C. albidus* conseguimos verificar que apenas no ensaio da avaliação da biomassa dos biofilmes mistos é que a sua ação isolada é inferior à ação da mistura com a *C. albicans*. Para os restantes ensaios quando isolada foi sempre superior quando comparados com a sua ação em co-cultura.

Através dos resultados mostrados no capítulo anterior, podemos dizer que apenas na biomassa dos biofilmes mistos é que houve um aumento, contudo este é colocado em causa devido ao gráfico das UFC/mL da mistura. Portanto, houve diminuição dos valores de absorvância em todos os ensaios, sendo que na viabilidade celular dos biofilmes pré- formados esta diminuição foi quase nula.

Tal como para a *R. mucilaginosa*, após estes resultados surgem algumas hipóteses para os mesmos. Podemos pensar que, como os valores da absorvância lidos para as misturas não são muito diferentes dos valores registados para a ação isolada da *C. albicans*, logo, o nosso controlo terá a capacidade de inibir a ação e virulência do *C. albidus*.

Em jeito de resumo, podemos dizer que o facto de a *C. albicans* poder estar presente com o *C. albidus* no mesmo nicho, não irá representar alterações muito expressivas na patogenicidade da *C. albicans*.

Após a análise realizada acima e de todas as hipóteses levantadas, notamos que ambas as leveduras a 25°C têm um comportamento similar quer na sua ação isolada quer quando misturada com a *C. albicans*, ou seja, apresentam um efeito negativo para a virulência e patogenicidade da *C. albicans* sempre que estão em co-cultura

Este acontecimento poderá estar diretamente relacionado com as características morfológicas apresentadas por ambas. Na prática clínica, a *Rhodotorula spp.* pode ser falsamente identificada com o *Cryptococcus spp.*, visto que, têm semelhanças em termos de crescimento, tamanho, forma da célula, presença de cápsula, são urease-positivos, leveduras não fermentáveis e podem assimilar glicose, maltose, sacarose, galactose, xilose, rafinose e trealose [44]. Contudo, apesar de todas estas semelhanças, elas possuem entre si algumas diferenças nas vias de sinalização, na composição da parede celular e na incapacidade de fermentar açúcares [46].

No caso da *M. furfur*, na quantificação da biomassa dos 2 tipos de biofilmes, os seus valores são sempre inferiores quando estão na sua ação isolada, em contrapartida os valores de MTT nos 2 biofilmes apresentam valores superiores quando comparados com os valores da mistura.

Nestes resultados a *C. albicans* apresenta, nos ensaios de biomassa, valores superiores à *M. furfur* e valores inferiores, para o MTT.

Após a análise dos gráficos podemos averiguar que para qualquer ensaio o valor de absorvância registado da mistura é sempre superior em comparação com a *C. albicans*. Este aumento é mais expressivo para a avaliação da biomassa, do que, a avaliação da viabilidade celular.

Assim como foi feito para as leveduras anteriores, colocaram-se hipóteses para estes resultados, contundo este microrganismo e a sua mistura apresentam comportamentos drasticamente diferentes em relação aos primeiros 2.

Podemos considerar que, em termos de biomassa, elas têm uma ação simbiote (de interajuda) conseguindo que juntas obtenham valores mais altos do que ambas as leveduras isoladas. Esta ação pode acontecer, em virtude da transição dimórfica existente nestas 2 leveduras, que já mostraram ter influência na biomassa total do biofilme formado.

Para a viabilidade celular, podemos supor que devido ao seu crescimento ser menos significativo, elas podem ter uma ação neutra, visto que, os resultados encontram-se entre os valores apresentados pelas leveduras na sua ação isolada. Por outro lado, podemos colocar em questão que a *M. furfur* consiga despertar na *C. albicans* um crescimento celular e uma maior adesão.

Em jeito de resumo, na formação de biofilme elas interajudam-se, produzindo uma maior quantidade de biofilme conseguindo, portanto, aderir com mais facilidade às superfícies e/ou aos hospedeiros. Esta adesão permite-lhes que a infeção resultante das mesmas aconteça com uma probabilidade de sucesso maior, com uma virulência mais acentuada, logo, com uma dificuldade de cura substancialmente superior.

Para além da capacidade de formar biofilme, outros fatores são muito importantes para desencadear infeções provocadas por estas leveduras. Um destes fatores fulcrais é a formação de tubo germinativo, e conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa, variabilidade fenotípica e a produção de enzimas, tais como a fosfolipase.

A *C. albicans* é uma espécie dimórfica capaz de transitar a sua morfologia de levedura para hifa. A capacidade de diferenciar as duas formas tem relação direta com a invasão aos tecidos do hospedeiro facilitando a sua penetração [114]. Provavelmente, a forma filamentosa é a que possui maior virulência devido à razão da maior superfície de contacto entre o microrganismo e a área a ser infetada, embora ambas as formas sejam encontradas tanto na forma comensal como na forma patogénica [114].

O ensaio do tubo germinativo realizado permite fazer uma distinção entre algumas espécies de *Candida*, contudo, é necessário ter alguns cuidados na sua realização. A incubação realizada durante o ensaio, nunca deve ultrapassar as 3 horas de duração para que leveduras não- *albicans* produzam pseudo filamentos (com constrição tal como os tubos germinativos) que induzem a falsos diagnósticos de *C. albicans*.

O tubo germinativo é, na verdade, o início de uma hifa verdadeira, que ao contrário da pseudo-hifa não apresenta constrição entre a célula-mãe e o filamento.

Em todos os estudos onde este ensaio foi utilizado, a temperatura ótima para a sua realização é os 37°C, no entanto, como no nosso trabalho estamos a trabalhar com leveduras que não conseguem crescer a temperaturas tão elevadas realizamos o controlo (*C. albicans* isolada) para as 2 temperaturas em estudo- 25°C e 37°C.

Tal como esperávamos, houve uma diferença bastante nítida dos 2 controlos onde a uma temperatura de 37°C a nossa estirpe padrão de *C. albicans* formou, aproximadamente, 22% de tubos germinativos. A 25°C apenas 6% do número total de células contadas são tubos germinativos.

Em relação às misturas constituídas pela *C. albicans* com a *R. mucilaginosa* e a *C. albicans* com o *C. albidus* podemos observar que houve um decréscimo muito significativo (p value =0.0034).

No caso da *R. mucilaginosa*, um estudo em 2019 destacou a ausência ou rara capacidade de poderem formar pseudo-hifas ou hifas [115].

Estes resultados reforçam com os resultados encontrados para os biofilmes mistos e pré-formados, uma vez que, no processo de formação de biofilme da *C. albicans*, tal como já mencionado acima, após a adesão dos microrganismos à superfície do hospedeiro ocorre a colonização onde é fulcral que as células aderidas formem tubos germinativos, que se prolongam até hifas. Só depois desta conversão da forma em levedura para a forma hifal é que o biofilme passa para o estágio seguinte, ou seja, crescimento e maturação.

Posto isto, sendo que, observámos que os biofilmes das misturas realizadas entre a *C. albicans* e o *C. albidus* ou com a *R. mucilaginosa* apresentavam uma menor quantidade e uma menor viabilidade celular em relação ao controlo, seria de esperar que a percentagem de tubos germinativos formados por estas duas misturas também fosse inferior ao controlo, uma vez que, os mesmos são precisos para que haja biofilme.

Em relação à mistura composta pela *C. albicans* e a *M. furfur*, podemos observar 2 resultados opostos. Quando a suspensão é realizada no meio YPD (meio favorável ao

crescimento da *C. albicans*) a percentagem de tubos germinativos formados decresce tenuemente em comparação com o controlo. Já para o meio que favorece a *M. furfur*, devido à presença de azeite e tween 80, a capacidade de formar tubos germinativos da mistura aumentou em relação ao controlo.

Tal como já tínhamos verificado no ensaio das curvas de crescimento, parece que, o meio de YPD suplementado apresenta valores acentuados do crescimento e agora, da formação de tubo germinativo.

Esta preferência pelo meio YPD suplementado pode estar correlacionado com alguns dos resultados anteriores, visto que, como obtivemos um maior crescimento vamos ter uma maior massa celular e, portanto, uma quantidade de biofilme maior que consequentemente levará a um aumento de transições dimórficas de leveduras para hifas. Para além disso, estes resultados podem ser justificados, devido a dados recentes, que dizem que apesar de não ser muito frequente, observaram que as leveduras do género *Malassezia spp.* são capazes de produzir micélios transitando para a forma leveduriforme e, portanto, podemos classificá-las como leveduras dimórficas, assim como a *C. albicans*. A mudança morfológica que ocorre permite que os fungos se adaptem a diferentes ambientes hospedeiros, alterando as estratégias de virulência.

Todos estes dados podem levar-nos a levantar a hipótese, de que tal como nos biofilmes, elas aliam-se e juntas conseguem obter percentagens mais elevadas de tubos germinativos formados. Este aumento, leva consequentemente, a um aumento da virulência da *C. albicans* na invasão ao hospedeiro e instalação da infeção.

Das 3 leveduras em estudo, existem as que sobressaem devido a uma ação mais negativa, positiva ou de forma neutra. A *rhodotorula mucilaginosa*, poderá, com ensaios futuros, vir a auxiliar os investigadores a descobrir novos tratamentos para as infeções vulvovaginais. Esta hipótese advém da possível ação probiótica desta levedura.

Em relação ao *Cryptococcus albidus*, este parece não ter grande influência na virulência da *C. albicans* aquando da sua mistura.

Pela via oposta, podemos avaliar que, adicionando futuros ensaios, poderá existir na co cultura com a *malassezia furfur* uma possibilidade de novos métodos de diagnóstico das infeções fúngicas vulvovaginais.

Capítulo 6

Conclusão

Atualmente, estudos sobre a microbiota vaginal têm vindo a ser investigados com mais ênfase, nomeadamente a presença de leveduras importantes nos nichos. Contudo o papel dos diferentes géneros fúngicos na saúde vaginal continua por investigar.

E por isso neste trabalho pretendemos explorar a dinâmica ecológica destas espécies em simulação de co-habitação em ambiente vaginal.

Por isso, pretendeu-se avaliar qual seria a relação ecológica de 3 leveduras emergentes selecionadas para este estudo quando presentes em co-cultura com a *C. albicans*. Para tal, foram avaliadas as diferentes curvas de crescimento entre os isolados e as misturas das leveduras, a capacidade de formação de biofilmes na sua forma isolada, mista e em pré-formados e a capacidade de formação do tubo germinativo pela *C. albicans* quando em co-cultura.

Após a análise de resultados verificou-se que para as misturas protagonizadas pela *C. albicans* com a *R. mucilaginosa* e da *C. albicans* com o *C. albidus* existiu um decréscimo da expressão do fenótipo de virulência em todos os ensaios realizados. Esta diminuição da virulência da *C. albicans* foi mais acentuada para a mistura com a *R. mucilaginosa*.

Para a mistura com a *M. furfur* verificou-se que existiu um aumento em todos os ensaios da análise da expressão fenotípica de alguns fatores de virulência. Este aumento traduz-se numa relação simbiote entre as duas leveduras, aumentando a patogenicidade levando a um aumento da infeção.

O estudo apresentou algumas limitações, não existindo resultados que evidenciem qual das leveduras exerce mais influência nos resultados das misturas, tendo sido apenas levantado hipóteses de acordo com as características morfológicas, bioquímicas e da virulência encontrada em diversos artigos publicados. Para trabalhos posteriores seria interessante continuar este estudo e aprofundar o conhecimento na área, através de sondas fluorescentes ou de meios sólidos seletivos para que se consiga distinguir as colónias dos diferentes géneros aquando da contagem das unidades formadoras de colónias.

Para além disso, futuramente, mais ensaios são necessários realizar na área da micologia vaginal. Será importante realizar um estudo que quantifique a presença destas novas espécies de fungos neste nicho em amostras vaginais em mulheres sintomáticas.

É importante também estudar os metabolitos produzidos por estas leveduras na sua cinética de crescimento de modo que possamos obter mais conclusões acerca do que acontece no crescimento das mesmas quando estão em co-cultura.

Todos estes futuros estudos em junção com o realizado nesta dissertação, irão contribuir para um aumento do conhecimento das infeções fúngicas vulvovaginais por parte dos especialistas levando a um diagnóstico mais correto.

Para além disso os investigadores ficarão a conhecer melhor as funções e/ou as consequências que estes géneros podem trazer à saúde vaginal conseguindo desenvolver terapêuticas antifúngicas com uma maior capacidade em impedir a colonização e instalação da doença.

Referências Bibliográficas

- [1]- J. Qin, M. H. I. T. Consortium, R. Li et al., “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing,” *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 59–65 (2010).
- [2]- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB, Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90(3):859–904, (2010).
- [3]- Walter J, Ley R, “The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes”. *Annu Rev Microbiol* 65:411–429, (2011).
- [4]-Fidel Jr PL, Sobel JD. “Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis”. *Clinical Microbiology Reviews.*;9(3):335-348, (1996).
- [5]- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P,” A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing”. *Nature* 464:59–65, (2010)
- [6]- Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, Mchardy AC, Yatsunencko T, Niazi F, Affourtit J, Egholm M, Henrissat B, Knight R, Gordon JI, “Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16):7503–750, (2010).
- [7]- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, et al., “Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals”. *PLoS Pathog* 6: e1000713, (2010).
- [8]- L. L. Bradford and J. Ravel, “The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women’s health and diseases”, *Virulence*, vol. 8, no. 3, pp. 342–351, (2017).
- [9]- M. E. J. Woolhouse, D. T. Haydon, and R. Antia, “Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps,” *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 20, no. 5. pp. 238–244, (2005).
- [10]- G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, and T. C. White, “Hidden Killers: Human Fungal Infections,” vol. 4, no. 165, pp. 1–10, (2012).
- [11]- M. L. Sogin, H. G. Morrison, J. A. Huber et al., “Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 32, pp. 12115– 12120, (2006).
- [12]- Ma B, Forney LJ, Ravel J. “Vaginal microbiome: rethinking health and disease”. *Annu Rev Microbiol.*; 66:371–89, (2012).

- [13]- Hickey RJ, Zhou X, Settles ML, Erb J, Malone K, Hansmann MA, et al., “Vaginal microbiota of adolescent girls prior to the onset of menarche resemble those of reproductive-age women”. *mBio.*;6:e00097-15, (2015).
- [14]- Kwon-Chung KJ, Benett JE. “Infections due to *Trichosporon* and *miscellaneous* fungi In: Kwon-Chung KJ, eds. *Medical mycology*”. Philadelphia: Lea &Febiger; p.768-82, (1992).
- [15]- Ratledge C. “Microbial oils and fats: na assessment of their commercial potencial. Prog”. *Ind. Microbiol.*; 16: 119-206 (1982).
- [16]- d'Enfert C.” *Assassinos ocultos: persistência de patógenos fúngicos oportunistas no hospedeiro humano*”. *Curr Opin Microbiol*; 12:358-64; PMID:19541532, (2009).
- [17]- Limon, JJ, Skalski, JH, Underhill, DM, 2017. “Comensal Fungi in health and disease”. *Cell Host Microbe* 22, 156–165.
- [18]- Richard, ML, Sokol, H.,. “The gut mycobiota: insights into analysis, ambiental interações e papel nas doenças gastrointestinais”. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 331–345, (2019).
- [19]- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, Miller AN, et al. “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (its) region as a universal DNA barcode marker for fungi”. *P Natl Acad Sci USA.*; 109:6241–6246, (2012).
- [20]- Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, Stewart CJ, Metcalf GA, Muzny DM, Gibbs RA, et al. “The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort”. *Microbiome.*;5(1):153, (2017).
- [21]- Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM. “Commensal fungi in health and disease”. *Cell Host Microbe.*;22(2):156–65, (2017).
- [22]- Willey JP, Harley and Klein’s *Microbiology*, In: Joanne MW, Linda MS, Christopher JW, 7 Eds., New York: McGraw-Hill Higher Education, (2008).
- [23]- Scharschmidt, TC & Fischbach, MA, “What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome”. *Drug Discov. Today Dis. Mech* 10, e83–e89 (2013).
- [24]- Findley, K. et al. “Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin”. *Nature* 498, 367-370 (2013).
- [25] -Gao, Z., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., & Blaser, M. J., “Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations”. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 10, p. 3575-3581, (2010).
- [26]- Findley, K., OH, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., ... & Becker, J. “Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin”. *Nature*, v. 498, n. 7454, p. 367, (2013).

- [27] - Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L. F., ... & Bieber, T., “Microbiome in healthy skin, update for dermatologists”. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 30, n. 12, p. 2038-2047, (2016).
- [28]- L. Lehtoranta, A. A. Hibberd, N. Yeung, A. Laitila, J. Maukonen, and A. C. Ouwehand, “Characterization of vaginal fungal communities in healthy women and women with bacterial vaginosis (BV); a pilot study”. *Microb. Pathog.*, vol. 161, p. 105055, (2021).
- [29]- A. K. Nash, T. A. Auchtung, M. C. Wong et al., “The gut mycobome of the Human Microbiome Project healthy cohort,” *Microbiome*, vol. 5, no. 1, p. 153, (2017).
- [30]- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B., “*Candida albicans* pathogenicity mechanisms”. *Virulence*, 4(2), 119–28, (2013).
- [31]- M. E. J. Woolhouse, D. T. Haydon, and R. Antia, “Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps,” *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 20, no. 5. pp. 238–244, (2005).
- [32]- Colombo, A.L. et al., “Brazilian guidelines for the management of candidiasis- a joint meeting reporto of three medical societies: Sociedade brasileira de infetologia , Sociedade Paulista de Infetologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical”. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.3, n.17, p.283-312, (2013).
- [33]- Mannarelli BM, Kurtzman CP., “Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts byusing short oligonucleotides in a PCR”. *J Clin Microbiol.*;36(6):1634–41, (1998).
- [34]-Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A. “*Microbiologia médica*. 6 ed”. Traduzida, c.74. São paula: Elsevier, (2010).
- [35]- NeppelenBroek, K.H. et al., “Identification of candida specie in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques”. *Oral Diseases*, (2013).
- [36]- Sardi,J. C. et al., “*Candida* species: current epidemiology, pathonenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options”, *Jornal of Medical Microbiology*. V.62, p.10-24, (2013).
- [37]-Press, E. G.; Shields, R.K; Clancy, C. J. “*Candida* Biofilm: clinical implications of recente advances in research”. *Current Fungal Infection Reports*. V.8, p.72-80, (2014).
- [38]- El-Houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., and Elkhatib, W. F. “Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens”. *Microb. Pathog.* 128, 13–19, (2019).
- [39]- Sobel JD., “Pathogenesis of *Candida* vulvovaginitis. Current topics in medical mycology”. New York: Springer; p. 86–108, (1989).

- [40]- Sudbery P, Gow N, Berman J., “The distinct morphogenic states of *Candida albicans*”. Trends Microbiol; 12(7): 313-324, (2004).
- [41]- Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM., “Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions”. J Fungi (Basel).;6, (2020).
- [42]- Hof H., “Pilze im Darm – das Mykobiom des Darms [Fungi in the gut – the gut mycobiome]”. Z Gastroenterol.;55(8):772- 8, (2017).
- [43]- Staib F., “*Rhodotorula*, ihr Vorkommen im menschlichen Körper”. Zbl Bakt I Abt Orig.; 167:86-93, (1956).
- [44]- Larone DH., “Medically important fungi: a guide to identification, 5th ed”. Washington, DC: ASM Press, (2011).
- [45]- Korhola M, Hakonen R, Juuti K, Edelmann M, Kariluoto S, Nyström L, Sontag-Strohm T, Piironen V., “Production of folate in oat bran fermentation by yeasts isolated from barley and diverse foods”. J Appl Microbiol.;117(3):679-89, (2014).
- [46]- Yockey J, Andres L, Carson M, Ory JJ, Reese AJ., “Cell envelope integrity and capsule characterization of *Rhodotorula mucilaginosa* strains from clinical and environmental sources”. mSphere.;4(3):e00166-19, (2019).
- [47]- Frengova, G.I.; Beshkova, B.M., “Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance”. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.36, p.163-180, (2009).
- [48]- Wirth F, Goldani LZ., “Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen”. Interdiscip Perspect Infect Dis.;465717, (2012).
- [49]-Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL., “Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates”. Antimicrob Agents Chemother.;57(1):382-9, (2013).
- [50]- GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J., “The genus *Malassezia* with description of four new species”. Antonie van Leeuwenhoek, v.69, n.4, p.337-355, (1996).
- [51]- Guillot, J.; Guého, E.; M.; Midgley, G.; Chévrier, G.; Dupont, B. “Identification of *Malassezia* species. A practical approach”. Journal mycologie médicale, v.6, p.103-110, (1996).
- [52]- Gaitanis, G., Magiatis, P., Hantschke, M., Bassukas, I. D., and Velegraki, A, “The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases”. Clin. Microbiol. Rev. 25, 106–141, (2012).
- [53]- Prohic, A., Jovovic Sadikovic, T., Krupalija-Fazlic, M., & Kuskunovic-Vlahovljak, S., “*Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions”. International Journal of Dermatology, 55(5), 494–504, (2016).

- [54]- Liguori, G., Lamas, B., Richard, ML, Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, TW, et al., “Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's Disease patients”. *J Crohn's Colitis*. 10, 296-305, (2016).
- [55]- Kurtzamn, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T. *Cryptococcus*. In: Kurtzman, C. P.; FELL, J. W.; Boekhout, T., “The yeasts: a taxonomic study”. 5th ed. New York: ACM Press,. p. 1661-1662, (2011).
- [56]- May, R.C.; Stone, N.R.; Wiesner, D.L.; Bicanic, T.; Nielsen, K., “*Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen”. *Nat. Rev. Microbiol*, 14, 106–117, (2016).
- [57]- Emmons, C.W., “Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil”. *J. Bacteriol*, 62, 685–690 (1951).
- [58]- Emmons, C.W., “Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*)”. *Am. J. Hyg*, 62, 227–232, (1955).
- [59]- Casadevall A, Perfeito JR., “*Cryptococcus neoformans*”. Washington DC: ASM Press;(1998).
- [60]- Gardner HL. Candidiasis. Em: Gardner HL, Kaufman RH, eds, “Bening diseases of the vulva and vagina”. 2.^a ed. Boston: G.K. Hall Medical Publishers;. P.217-42, (1981).
- [61]- Kwon-Chung, Kyung J. et al., “*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosiss”. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 7, p. a019760, (2014)
- [62]- Barousse MM, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL. “Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents”. *Sex Transm Infect.*;80(1):48–5, (2004).
- [63] - Van de Wijgert JHHM., “The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: consequences for treatment and prevention”. *PLoS Med.*; 14:e1002478, (2017).
- [64]- Shannon B, Gajer P, Yi TJ, Ma B, Humphrys MS, Thomas-Pavanel J, et al. “Distinct effects of the cervicovaginal microbiota and herpes simplex type 2 infection on female genital tract immunology”. *J Infect Dis.*; 215:1366–75, (2017).
- [65]- Eastment MC, McClelland RS. “Vaginal microbiota and susceptibility to HIV”. *AIDS.*;32: 687–98, (2018).
- [66]- Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M., “Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review”. *J Antimicrob Chemother.*; 55:312–6, (2005).

- [67]- Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, Zaragoza Ó, Almirante B, Cuenca-Estrella M, et al., “Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain”. *Med Mycol.*; 55:125–36, (2017).
- [68]- Franconieri F, Bonhomme J, Doriot A, Bonnamy C, Ficheux M, Lobbedez T, et al., “Fungal peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in a capd patient treated with liposomal Amphotericin B: a case report and literature review”. *Perit Dial Int.*; 38:69–73, (2018).
- [69]- Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O. “Isavuconazole MIC distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015–2017)”. *Clin Microbiol Infect.*;25: 634.e1-4, (2019).
- [70]-Villar JM, Velasco CG, Delgado JD. “Fungemia devido a *Rhodotorula mucilaginosa* em um paciente imunocompetente em estado crítico”. *J Infect Chemother*; 18: 581–3, (2012).
- [71]- P. Krzyściak et al., “Prevalence of *Malassezia* species on the skin of HIV-seropositive patients,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, (2020).
- [72]- Prohic A. “Psoriasis and *Malassezia* Yeasts”. *Psoriasis – A Systemic Disease*, p. 89, (2012).
- [73]- Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL, “Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates”. *Antimicrob Agents Chemother* 57(1):382–389, (2013).
- [74]- Pappas, P. G.; Perfect, J. R.; Cloud, G. A.; Larsen, R.A.; Pankey, G.A.; Lancaster, D.J.; Henderson, H.; Kauffman, C.A.; Haas, D.W.; Saccante, M.; Hamill, R.J.; Holloway, M. S.; Warren, R.M.; Dismukes, W.E., “Cryptococcosis in human immunodeficiency virus- negative patients in the era of Effective azole therapy”. *Clinical infectious diseases*, v.33, p. 690-9, (2001).
- [75]- Harrison TS., “The burden of HIV-associated cryptococcal disease”. *AIDS.*;23(4):531–2, (2009).
- [76]-Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM., “Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living”, (2009)
- [77]- Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM., “Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review”. *Infection.*; 35:51–8, (2007).
- [78]- S. Brunke, S. Mogavero, L. Kasper, and B. Hube, “Virulence factors in fungal pathogens of man”, *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 32, no. Figure 1, pp. 89–95, (2016).
- [79]- P. Faria-gonçalves et al., “Microbial Pathogenesis Recurrent vulvovaginal *Candida spp* isolates phenotypically express less virulence traits”, vol. 148, (2020).

- [80]-Casadevall A, Pirofski LA., “The damage-response framework of microbial pathogenesis”. *Nat Rev Microbiol*, 1:17-24, (2003).
- [81]- Casadevall A, Pirofski LA., “Host–pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity”. *Infect Immun*, 67:3703-3713, (1999).
- [82]- Willey, Joanne M., Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton, Lansing M. Prescott, and Joanne M. Willey. *Prescott's Microbiology 7 th.* (2011).
- [83]- R. M. Maier and I. L. Pepper, “Bacterial Growth”, no. I. Elsevier Inc., (2015).
- [84]- Mello, T.P. et al., “Assessment of biofilm formation by *scedosporium apiosperum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *lomentospora prolificans*”. *Biofouling*. V.32, n.7, p.737-749, (2016).
- [85] - Martins, C. H. G., Pires, R. H., Cunha, A. O., Pereira, C. A. M., Singulani, J. de L., Abrão, F., ... Mendes-Giannini, M. J. S, “*Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm”. *Fungal Biology*, 120(4), 530–537, (2016).
- [86]- L. Mukaremera, et al., “*Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition” *Front. Immunol.* 8 (2017).
- [87]- M. Ghannoum, “Cooperative evolutionary strategy between the bacteriome and mycobiome,” *MBio*, vol. 7, no. 6, (2016).
- [88]- N. O. Ponde, L. Lortal, G. Ramage, J. R. Naglik, and J. P. Richardson, “*Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions”, *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 91–111, (2021).
- [89]- M. Gharaghani, S. Taghipour, and A. Zarei Mahmoudabadi, “Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Rhodotorula spp.*”, *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 11, pp. 8903–8909, (2020).
- [90]- Rasmussen TB, Givskov M., “Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs”. *Int J Med Microbiol* 296:149–16 (2006).
- [91]- Whiteway M, Bachewich C., “Morphogenesis in *Candida albicans*”. *Annu Rev Microbiol*; 61: 529-553, (2007).
- [92]- Crampin H, Finley K, Geramid-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J et al., “*Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae”. *J Cell Sci*; 118(13): 2935-2947, (2005).
- [93]- Cannon, R. D., et al., “Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis?” *J. Dent. Res.*, Washington, v. 74, n. 5, p. 1152-1160, (1995).
- [94]- B.M. Peters, et al., “Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis”. *Infect. Immun.* 82 (2) 532–543, (2014).

- [95]- WHO (World Health Organization). Constitution of the world Health organization. Available in: <https://radis.ensp.fiocruz.br/index.php/home/reportagem/avanco-dos-fungos> (2019).
- [96] - De Rossi, T., Lozovoy, M. A. B., Silva, Rosiane, V., Fernandes, Eduardo, V., Geraldino, Thais, H., Costa, Ivete, C., ... Felipe, I., “Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde”, 32(1), 15–28, (2011).
- [97] - Nett, J., & Andes, D., “*Candida albicans* biofilm development, modeling a host pathogen interaction”. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), 340–345, (2006).
- [98]- 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, (2008).
- [99]- Dworecka-Kaszak, B.; Kizerwetter-swida, M., “Pseudomycelium forming *Rhodotorula* unusual picture of biofilm”. *Mikologua Lekarska*, v.18, p.74-78, (2011).
- [100]- Meng, X.; Yang, J.; Xu, X.; Zhang, L.; Nie, Q.; Xian, M., “Biodiesel production from oleaginous microorganisms”. *Renewable Energy*, v.34, n. 1, p. 1-5, (2009).
- [101]- Pannanusorn, S.; Fernandez, V.; Romling, U., “Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection”. *Mycoses.*, p.1-9, (2012).
- [102]- B. Cardoso, “Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida spp.* em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP”, Diss. mestrado. Programa Pós-Graduação em Biociências Apl. à Farmácia. Univ. São Paulo., (2017).
- [103]- I. C. Jarros et al., “Microbiological and Virulence Aspects Of *Rhodotorula Mucilaginosa*”, *EXCLI J.*, vol. 19, pp. 687–704, (2020).
- [104]- Dabbagh R, Conant NF, Nielsen HS, Burns RO., “Effect of temperature on saprophytic cryptococci: temperature induced lysis and protoplast formation”. *J Gen Microbiol.*; 85:177–89, (1974).
- [105]- Rosario I, Soro G, Deniz S, et al., “Presence of *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*)”. *Mycopathologia.*;169: 315–9, (2010).
- [106]-Figueredo LA, Cafarchia C, Desantis S et al., “Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs”. *Vet Microbiol.*; 160: 126– 131, (2012).
- [107]- 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).
- [108]- Tockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A., "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives" (PDF). *Acta Histochemica*. 120 (3): 159–167, (2018),

- [109]- Angiolella, L., Leone, C., Rojas, F., Mussin, J., de Los Angeles Sosa, M., e Giusiano, G., “Biofilm, adherence and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*”. *Med. Mycol.*56, 110-116, (2018).
- [110]- Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY et al., “Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial”. *PLoS One.*; 8: e62902, (2013)
- [111]- Gedek BR., “Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*.” *Mycoses.*;42(4):261-4, (1999).
- [112]- Tiago FC, Martins FS, Souza EL, Pimenta PF, Araujo HR, Castro IM, Brandão RL, Nicoli JR., “Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces probiotics*”. *J Med Microbiol.*;61(Pt 9):1194-207, (2012).
- [113]- H. Hof, “*Rhodotorula spp.* in the gut - foe or friend?”, *GMS Infect. Dis.*, vol. 7, p. Doc02, (2019).
- [114]- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B., “*Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target”. *Expert Rev Anti Infect Ther.*;10(1):85-93, (2012).
- [115]- K. P. Alves, “Realidade e desafios de infecções emergentes por *Rhodotorula spp.* em pacientes hospitalizados”, Florianópolis, (2019).
- [116]- Suhr, M. J., Banjara, N., and Hallen-Adams, H. E., “Sequence-based methods for detecting and evaluating the human gut mycobiome”. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 209–215, (2016).
- [117]- Miller MG, Johnson AD., “White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating”. *Cell.*;110(3):293–302, (2002).
- [118]- Soll DR., “Why does *Candida albicans* switch?” *FEMS Yeast Res.*;9(7):973–989, (2009).
- [119]- Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis.*;14(Suppl 1):S148–53 (1992).
- [120]- Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. *Malassezia spp.* Yeasts of emerging concern in fungemia. *Front Cell Infect Microbiol.*;10:370, (2020).
- [121]- I. Kurniadi, W. H. Wijaya, and K. H. Timotius, “*Malassezia* virulence factors and their role in dermatological disorders,” *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, vol. 31, no. 2, pp. 65–70, (2022)
- [122]- Alspaugh, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 55-58 (2015).

[123]- I. C. Jarros *et al.*, "Microbiological and virulence aspects of *rhodotorula mucilaginosa*," EXCLI J, vol. 19, pp. 687–704, (2020)

[124]- Mosmann T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*. 65 (1–2): 55–63, (1983).

Anexos

Tabela A 1- Valores de p value relativos aos ensaios a 25°C

| Ensaio a 25°C | p value | Significância |
|------------------------------|---------|---------------|
| Biofilmes Simples | 0.0059 | ** |
| Biofilmes mistos(CV) | 0.0406 | * |
| Biofilmes mistos (MTT) | 0.0050 | ** |
| Biofilmes pré-formados (CV) | 0.0952 | ns |
| Biofilmes pré-formados (MTT) | 0.0012 | ** |

Tabela A 2- Valores de p value relativos aos ensaios realizados a 37°C

| Ensaio a 37°C | p value | Significância |
|------------------------------|---------|---------------|
| Biofilmes Simples | 0.0132 | * |
| Biofilmes mistos(CV) | 0.0075 | ** |
| Biofilmes mistos (MTT) | 0.2118 | ns |
| Biofilmes pré-formados (CV) | 0.0151 | * |
| Biofilmes pré-formados (MTT) | 0.2397 | ns |

Tabela A 3- Valores de p value relativos aos CFU/mL dos ensaios dos biofilmes a 25°C e 37°C

| CFU/mL | p value | Significância |
|-----------------------------|---------|---------------|
| Biofilmes mistos 25°C | 0.1603 | ns |
| Biofilmes mistos 37°C | 0.9930 | ns |
| Biofilmes pré-formados 25°C | 0.9990 | ns |
| Biofilmes pré-formados 37°C | 0.9865 | ns |

Tabela A 4- Valores de p value relativos aos ensaios da capacidade de formação de tubo germinativo

| Tubo Germinativo | p value | Significância |
|------------------|---------|---------------|
| 25°C | 0.0034 | ** |
| 37°C | 0.5552 | ns |