



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**MORGANA RAMOS MARTINS XEREZ**

**FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ) INIBE A FORMAÇÃO DO  
BIOFILME DE *Candida albicans***

**FORTALEZA**

**2016**

MORGANA RAMOS MARTINS XEREZ

FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ) INIBE A FORMAÇÃO DO  
BIOFILME DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

X28f

Xerez, Morgana Ramos Martins.

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) inibe a formação do biofilme de *Candida albicans* /  
Morgana Ramos Martins Xerez. – Fortaleza, 2016.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.

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

1. Biofilme. 2. *Candida albicans*. 3. Hifas. 4. Fator de Necrose Tumoral alfa. I. Título.

CDD 617.6

---

MORGANA RAMOS MARTINS XEREZ

FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ) INIBE A FORMAÇÃO DO  
BIOFILME DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha filha, aos meus pais, ao meu  
esposo, ao meu irmão, ao meu orientador  
e aos meus amigos do Laboratório de  
Investigação em Osteoartropatias – LIO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por sempre me acompanhar e me dar força nos momentos de maior dificuldade.

À minha filha, Ingrid Xerez, meu maior incentivo para permanecer na batalha pela vida.

Ao meu esposo, Marcos Xerez, pelo incentivo, respeito, amor e paciência.

Aos meus pais, Zuleide Martins e Amilton Martins, exemplos de dedicação e bondade, que são merecedores de toda a minha admiração e gratidão.

Ao meu irmão, Amilton Júnior, pelo apoio e ajuda na execução do trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelas lições e orientações.

À Prof. Dra. Virgínia Claudia Girão, pelo auxílio na execução das fotografias.

Aos professores do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pelo apoio e orientações.

Aos meus colegas do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO), Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, Rodolfo de Melo Nunes pelo apoio e ensinamentos e em especial à Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves que se tornou uma amiga me orientando e me apoiando nos momentos de dificuldade.

Aos colegas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) em especial ao Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira pela ajuda incondicional no desenvolvimento do trabalho.

A todas as pessoas que de forma direta e indireta ajudaram para a execução do trabalho.

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar a ação do TNF- $\alpha$  frente ao biofilme de *Candida albicans*. Para tanto, cepas de *C. albicans* fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv) e fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006) foram incubadas em meio RPMI em placas de 96 poços, a 35 °C por 48 ou 96 horas para avaliar o desenvolvimento do biofilme em formação e maduro, respectivamente, na ausência ou presença de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  (0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL). A adição do TNF- $\alpha$  foi realizada no momento do preparo do cultivo para avaliar seu efeito no biofilme em formação ou após 48 horas de cultura para avaliação no biofilme maduro. Após incubação, a atividade metabólica foi avaliada por meio do ensaio de redução de XTT. A concentração inibitória mínima (CIM) do TNF- $\alpha$  em *C. albicans* foi avaliada, dentre as concentrações testadas 0,5, 1, 10 e 20 ng/mL, por meio da técnica de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3, preconizada pelo CLSI. Foi realizada uma análise da relação hifas/blastoconídios do biofilme por microscopia óptica, por meio de uma contagem das formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) e leveduriformes e em seguida aplicada uma fórmula que permitiu visualizar a relação entre a quantidade de formas filamentosas e as demais estruturas. Os resultados indicaram uma marcante inibição da formação do biofilme de forma dose-dependente e uma discreta inibição do biofilme maduro pelo TNF- $\alpha$ . Além disso, a análise da relação hifas/blastoconídios revelou redução estatisticamente significativa do número das formas filamentosas no biofilme em formação, quando na presença do TNF- $\alpha$ . No entanto, o crescimento de *C. albicans* na forma planctônica não foi afetado por nenhuma das concentrações de TNF- $\alpha$  utilizadas. Estes resultados indicam que o TNF- $\alpha$  inibe a formação do biofilme de *C. albicans*, provavelmente através da supressão da filamentação, etapa crucial para a formação do biofilme.

**Palavras-chave:** Biofilme. *Candida albicans*. Hifas. TNF.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the activity of TNF- $\alpha$  against *Candida albicans* biofilm. Therefore, weak biofilm producer (49BMv and 51BMv) and strong biofilm producer (ATCC 10231 and CEMM 01.05.006) strains of *C. albicans* were incubated in RPMI medium in 96-well plates at 35 °C for 48 or 96 hours in order to assess biofilm formation and mature biofilm, respectively, in the absence or presence of different concentrations of TNF- $\alpha$  (0.1, 0.5, 1, 10, 20 and 40 ng/ml). TNF- $\alpha$  was added during preparation of the biofilm to assess its effect on biofilm formation or after 48 hours of culture for evaluation in mature biofilm. After incubation, the metabolic activity was assessed using XTT reduction assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) of TNF- $\alpha$  against *C. albicans* was evaluated by broth microdilution technique according to Document M27-A3, recommended by CLSI, using the concentrations 0.5, 1, 10 and 20 ng/mL. An analysis of the hyphae/blastoconidia ratio in biofilm was performed using optical microscopy by counting of filamentous (hyphae and pseudo-hyphae) and yeast cells and then a formula which allowed visualization of the relationship between the amount of filamentous and other structures was applied. The results indicated that TNF- $\alpha$  showed a significant inhibition of biofilm formation in a dose-dependent way and a discrete mature biofilm inhibition. In addition, the analysis of hyphae/blastoconidia ratio showed a statistically significant reduction in the number of filamentous forms in biofilm formation in the presence of TNF- $\alpha$ . However, the growth of *C. albicans* in planktonic form was not affected by any of the TNF- $\alpha$  concentrations used. These results indicate that TNF- $\alpha$  inhibits the formation of *C. albicans* biofilms, probably through the suppression of filamentation, a crucial step in biofilm formation.

**Keywords:** Biofilm. *Candida albicans*. Hyphae. TNF.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da formação do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	15
Figura 2 – Estruturas morfológicas de <i>C. albicans</i> . ....	17
Figura 3 – Efeito do TNF- $\alpha$ na relação hifa/blastoconídio do biofilme em formação de <i>C. albicans</i> .....	33
Figura 4 – Efeito do TNF- $\alpha$ na relação hifa/blastoconídio do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> .....	34

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do TNF- $\alpha$ no biofilme em formação de <i>C. albicans</i> : Cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006) .....	29
Gráfico 2 – Efeito do TNF- $\alpha$ no biofilme em formação de <i>C. albicans</i> : Cepas fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv) .....	29
Gráfico 3 – Efeito do TNF- $\alpha$ no biofilme maduro de <i>C. albicans</i> : Cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006).....	31
Gráfico 4 – Efeito do TNF- $\alpha$ no biofilme maduro de <i>C. albicans</i> : Cepas fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv).....	31
Gráfico 5 – Relação das formas filamentosas do biofilme em formação de <i>C. albicans</i> . .....	33
Gráfico 6 – Relação das formas filamentosas do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da matriz do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	18
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DO	Densidade óptica
EPS	<i>Extracellular polymeric substance</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NK	Célula natural killer
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 Biofilme</b> .....	13
<b>2.1.1 Formação do biofilme</b> .....	14
<b>2.1.2 Estrutura e composição do biofilme</b> .....	15
<b>2.2 <i>Candida albicans</i></b> .....	16
<b>2.3 Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	19
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 PERGUNTA DE PARTIDA</b> .....	22
<b>5 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	22
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>6.1 Objetivo geral</b> .....	23
<b>6.2 Objetivos específicos</b> .....	23
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
<b>7.1 Desenho e local do estudo</b> .....	24
<b>7.2 Cepas</b> .....	24
<b>7.3 Reagentes e soluções</b> .....	24
<b>7.4 Preparo do inóculo</b> .....	25
<b>7.5 Determinação da concentração inibitória mínima do TNF-<math>\alpha</math> em <i>C. albicans</i></b> .....	25
<b>7.6 Efeito do TNF-<math>\alpha</math> frente ao biofilme em formação de <i>C. albicans</i></b> .....	26
<b>7.7 Efeito do TNF-<math>\alpha</math> frente ao biofilme maduro de <i>C. albicans</i></b> .....	26
<b>7.8 Análise da relação hifa/blastoconídio no biofilme de <i>C. albicans</i></b> .....	27
<b>7.9 Análise estatística</b> .....	27
<b>8 RESULTADOS</b> .....	28
<b>8.1 Determinação da concentração inibitória mínima do TNF-<math>\alpha</math> em <i>C. albicans</i></b> .....	28
<b>8.2 Efeito do TNF-<math>\alpha</math> frente ao biofilme em formação de <i>C. albicans</i></b> .....	28
<b>8.3 Efeito do TNF-<math>\alpha</math> frente ao biofilme maduro de <i>C. albicans</i></b> .....	30
<b>8.4 Análise da relação hifa/blastoconídio do biofilme em formação de <i>C. albicans</i></b> .....	32
<b>8.5 Análise da relação hifa/blastoconídio do biofilme maduro de <i>C. albicans</i></b> .....	33
<b>9 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>10 CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são formas de vida microbiana constituída por populações sésseis, envolvidas por uma matriz polimérica extracelular, que apresentam características distintas do crescimento planctônico correspondente (SARDI *et al.*, 2014). Microrganismos associados à biofilmes exibem uma maior resistência aos antimicrobianos e defesas do hospedeiro. Assim, uma vez estabelecidas, essas comunidades microbianas são extremamente difíceis de serem erradicadas (ZARNOWSKI *et al.*, 2014).

*Candida albicans* é considerada um fungo comensal encontrado na microbiota da pele e mucosas dos seres humanos. No entanto, pode se tornar um patógeno oportunista, sendo responsável por infecções superficiais e sistêmicas (HAN *et al.*, 2011; MATHÉ; DIJCK, 2013). A capacidade da levedura em formar biofilme é considerada uma estratégia de virulência essencial na gênese do processo infeccioso, quando o fungo apresenta uma maior resistência e patogenicidade, o que favorece sua disseminação no hospedeiro.

O Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina que, além de participar de várias etapas da fisiopatologia de doenças inflamatórias, é considerada um importante mediador contra agentes microbianos, particularmente agentes intracelulares e fungos. Assim, seu bloqueio farmacológico aumenta consideravelmente o risco de infecções, bem como dificulta a resposta do indivíduo quando as mesmas se instalam (LACAILLE *et al.*, 2008).

Pacientes tratados com drogas bloqueadoras do TNF- $\alpha$  apresentam uma maior incidência de infecções microbianas (LACAILLE *et al.*, 2008), portanto é razoável supor que a própria citocina interfere no desenvolvimento de fungos patogênicos como os do gênero *Candida*. Diante deste contexto e da relevância da formação dessas estruturas microbianas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do TNF- $\alpha$  frente ao desenvolvimento *in vitro* de *C. albicans*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biofilme

Biofilme pode ser definido como comunidades microbianas aderidas irreversivelmente a uma superfície biótica ou abiótica, embebidas numa matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas pelos próprios microrganismos (RAMAGE *et al.*, 2012; SARDI *et al.*, 2014).

Biofilmes são estruturas multicelulares complexas e altamente organizadas que conferem inúmeras vantagens aos microrganismos, tais como maior resistência à terapia antimicrobiana e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de contribuir para uma maior captação de nutrientes e proteção contra radiação ultra-violeta (UV), fagocitose e desidratação (RAMAGE *et al.*, 2002; KHAN; AHMAD, 2012; SERRANO-FUJARTE *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de resistência por parte do biofilme frente aos antimicrobianos pode ser até 1.000 vezes maior que a resistência de suas respectivas células planctônicas, o que dificulta consideravelmente a sua erradicação (NETT *et al.*, 2007; TAFF *et al.*, 2012). Essa resistência pode está diretamente relacionada a fatores como a penetração limitada do agente antimicrobiano devido à alta densidade da matriz extracelular, bem como o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (FELDMAN *et al.*, 2014).

A formação de biofilme é considerada um importante mecanismo de virulência dos microrganismos, uma vez que favorece sua colonização, invasão e disseminação no hospedeiro (KHAN; AHMAD, 2012; SILVA-DIAS *et al.*, 2015). Infecções associadas a formação de biofilme são consideradas um grave e crescente problema de saúde pública, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (SERRANO-FUJARTE *et al.*, 2015).

Aproximadamente, 65% dos casos de infecções microbianas estão correlacionados com a formação de biofilmes (SILVA-DIAS *et al.*, 2015). Biomateriais, como *stents*, catéteres, próteses, entre outros dispositivos médicos, associados ao comprometimento da imunidade do indivíduo, funcionam como excelentes substratos para

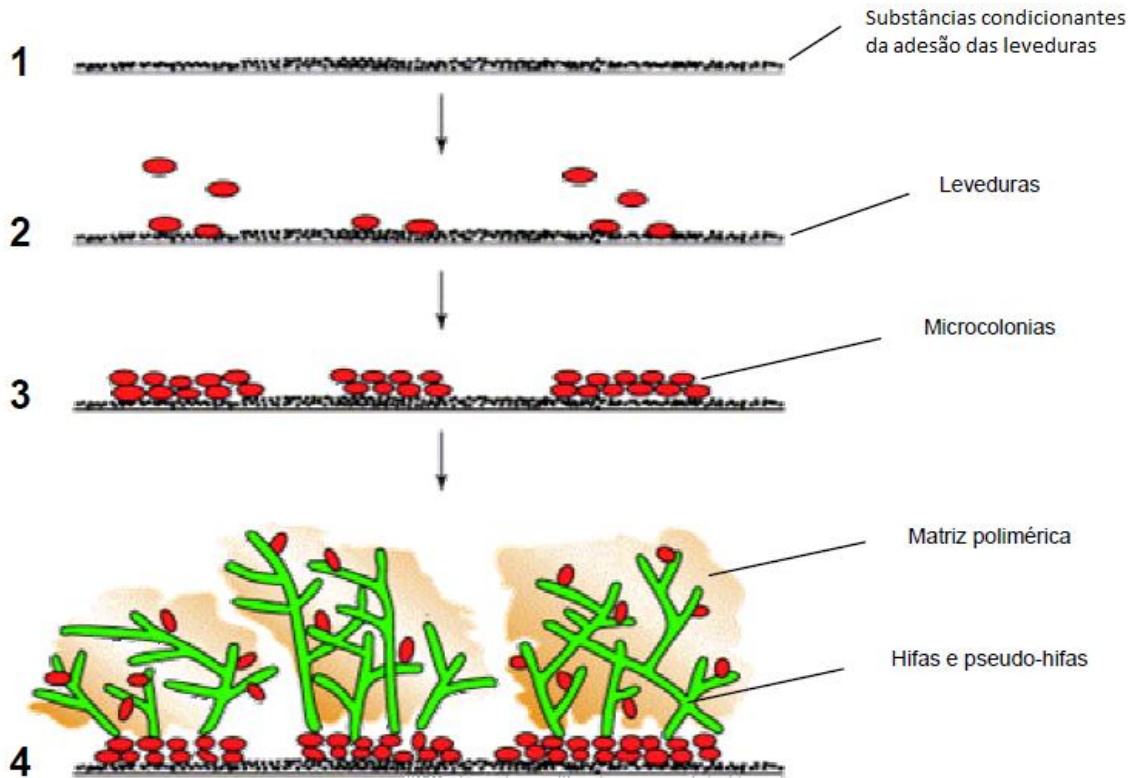
adesão e subsequente formação do biofilme (RAMAGE *et al.*, 2002; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; TAFF *et al.*, 2012).

### **2.1.1 Formação do biofilme**

O desenvolvimento do biofilme pode ser representado por estágios (Figura 1). Estágio inicial, denominado pré-adesão, no qual os microrganismos, em sua forma planctônica, recebem estímulos que os levam a aderir a uma superfície. Alguns fatores como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, moléculas de sinalização intercelular (*quorum sensing*), presença de compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura podem influenciar esse processo. Ainda neste estágio, a superfície sólida pode ser condicionada, ou seja, modificada por adsorção de substâncias e ter suas propriedades alteradas. O segundo estágio é a adesão reversível representada pela interação célula-superfície e colonização inicial. Essa adesão é considerada reversível, uma vez que é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. Em seguida, ocorre a adesão irreversível, que se caracteriza pela presença de microcolônias. Nesse instante, a motilidade cessa e genes envolvidos na comunicação célula-célula e na produção de EPS são ativados. Logo se inicia o estágio de maturação, que garante uma maior estabilidade e corresponde à maturação da estrutura que já vem sendo formada. Esse processo acontece por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela pronunciada produção e deposição de EPS, aumentando com isso a espessura do biofilme e a estabilidade da comunidade frente às condições do ambiente. Com a saturação do biofilme, pode ocorrer o destacamento de células, as quais poderão formar novos biofilmes (SUN *et al.*, 2013).



Figura 1 – Etapas da formação do biofilme de *C. albicans*: 1- Pré-Adesão: Adsorção de substâncias condicionantes de adesão na superfície; 2- Adesão reversível: Adesão inicial das células; 3- Adesão irreversível: Formação das microcolônias; 4- Maturação: Microcolônias com maior estabilização e formação da matriz extracelular.



Fonte: Adaptado de Douglas, 2003.

### 2.1.2 Estrutura e composição do biofilme

Dentre os componentes que constituem o biofilme, a água é o mais abundante, representando, aproximadamente, 70 a 97% da sua massa total. Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (menos de 10%), embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; LOPEZ-RIBOT, 2014).

A estrutura protetora do biofilme é denominada matriz extracelular, a qual é constituída por EPS (LOPEZ-RIBOT, 2014). Embora a composição da matriz extracelular

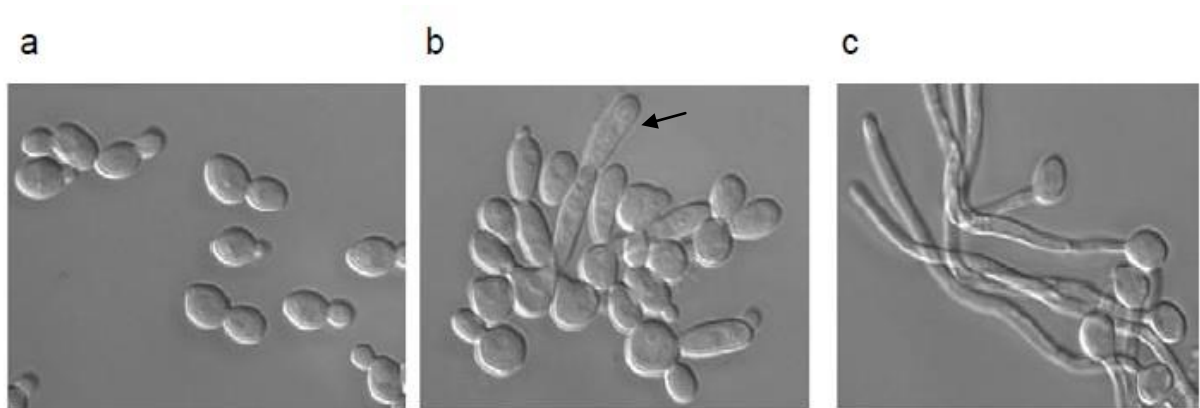
seja variável de acordo com a natureza dos microrganismos, em geral, as EPS constituem-se principalmente de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; KOO *et al.*, 2013). No interior da matriz extracelular, são observados microcanais de água que proporcionam a circulação de nutrientes e metabólitos necessários ao biofilme (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

EPS são componentes fundamentais que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme, apresentam-se de forma tridimensional, com aspecto de gel, altamente hidratados, onde os microrganismos permanecem, em grande parte, imobilizados (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Mantêm as células sempre em conjunto, contribuindo assim para sua arquitetura e estabilidade mecânica. Auxiliam na adesão dessas comunidades às superfícies, bem como atuam como uma barreira defensiva, protegendo as células no interior do biofilme contra condições de estresse, como a redução e a exaustão de nutrientes e água, presença de agentes antimicrobianos e condições ambientais. Em alguns casos, as EPS são capazes de sequestrar toxinas, conferindo também proteção contra radiação UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (KOO *et al.*, 2013; LOPEZ-RIBOT, 2014).

## **2.2 *Candida albicans***

Taxonomicamente o gênero *Candida* está distribuído no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes e Ordem Saccharomycetales. Esses microrganismos podem apresentar-se como leveduras, formas unicelulares e esféricas, medindo aproximadamente 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro ou, ainda, sob a forma de filamentos, por meio da produção de tubos germinativos, resultando na conversão da forma de levedura para estruturas alongadas com formação de pseudo-hifas. Algumas espécies, como *C. albicans*, são capazes de apresentar uma forma filamentosa verdadeira independente da temperatura, sendo, por isso, designados fungos pleomórficos (Figura 2). As pseudo-hifas são muito semelhantes às hifas verdadeiras, diferindo apenas na presença de constrição formada antes de cada brotamento (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Figura 2 – Estruturas morfológicas de *C. albicans*: a) leveduras; b) pseudo-hifas; c) hifas.



Fonte: Adaptado de Lu Y *et al.*, 2011.

*C. albicans* é uma levedura comensal encontrada na superfície da pele, mucosas, trato urogenital e gastrointestinal da população saudável. No entanto, diante de um desequilíbrio na relação microrganismo-hospedeiro, pode se tornar um patógeno oportunista (HAN *et al.*, 2011; MATHÉ; DIJCK, 2013), responsável por causar uma variedade de infecções fúngicas superficiais, como candidíase oral e vulvovaginal, além de infecções disseminadas (COLLETTE *et al.*, 2014).

Diversos fatores, como deficiências nutricionais, uso prolongado de drogas antimicrobianas, doenças autoimunes e terapias imunossupressoras favorecem uma maior propensão ao desenvolvimento de infecções oportunistas causadas por esse patógeno (EKSI *et al.*, 2013; FELDMAN *et al.*, 2014). Somado aos fatores supracitados, o fungo apresenta peculiaridades, como a capacidade em desenvolver mecanismos que lhe conferem uma maior invasão e patogenicidade. Dentre esses mecanismos, estão incluídos a produção de adesinas, dimorfismo celular, bem como a habilidade em formar biofilmes (FELDMAN *et al.*, 2014; CHILDERS *et al.*, 2015; SERRANO-FUJARTE *et al.*, 2015).

A conversão levedura-hifa é um mecanismo crucial para a invasão do patógeno aos tecidos e consequente instalação da infecção, além de dificultar que o microrganismo seja englobado por células do sistema imunológico, devido a sua morfologia (HAN *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2011). Constitui um marcante fator de virulência, associado ao aumento da infectividade, bem como é considerada uma etapa fundamental para a formação do biofilme (TSANG *et al.*, 2012).

O biofilme de *C. albicans* é constituído basicamente por uma rede de células sob a forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras embebidas por uma matriz extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (BAILLIE; DOUGLAS, 1999). Relatos prévios mostram que a matriz do biofilme de *C. albicans* consiste principalmente de carboidratos (39,6%, sendo 32,2% do valor representado por glicose) (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Entretanto, estudos mais recentes demonstram a predominância de moléculas de proteínas, correspondendo a 55% da matriz (Tabela1).

Tabela 1- Composição da matriz do biofilme de *C. albicans*

<b>Componentes</b>	<b>% dos compostos</b>
Proteínas	55
Carboidratos	25
Lipídios	15
Ác. Nucleicos	5

Fonte: Adaptado de Zarnowski *et al.*, 2014.

O papel dos polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA) na formação e desenvolvimento do biofilme já está bem documentado na literatura. Os polissacarídeos proporcionam estabilidade mecânica, auxiliam na adesão da estrutura às superfícies e na manutenção das células imobilizadas (ZHANG *et al.*, 2015). O eDNA auxilia na estabilização da estrutura do biofilme, aumentando a adesão inicial à superfície e promovendo a troca de informação genética, bem como age como um armazenador de nutrientes que pode ser utilizado durante fases de depleção (MARTINS *et al.*, 2010). No entanto, a função das proteínas tem sido pouco estudada, permanecendo imprecisa, porém Zhang *et al.* (2015) fornecem evidências de que as mesmas contribuem para a aquisição de nutrientes, resistência ao estresse, patogênese e estabilidade do biofilme.

### 2.3 Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda frente a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. É responsável por eventos, como a indução de outras citocinas, proliferação e diferenciação celular e processo de apoptose (ROACH *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2008). Foi em 1975, quando experiências demonstraram a capacidade de uma molécula protéica em promover a necrose de células tumorais, resultando em regressão de algumas formas de tumores, que a citocina recebeu a denominação de TNF (IDRISS; NAISMITH, 2000; BRADLEY, 2008). O TNF é também chamado de TNF- $\alpha$  para distingui-lo TNF- $\beta$  (Linfotoxina – LT) (ABBAS *et al.*, 2008).

A principal fonte celular de TNF- $\alpha$  é constituída por fagócitos mononucleares ativadas, embora uma ampla variedade de células, incluindo mastócitos, linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer* (NK), neutrófilos, células do músculo liso e cardíaco, células endoteliais, fibroblastos e osteoclastos, também sejam capazes de produzir tal citocina (BRADLEY, 2008).

Considerando a participação de tal citocina na fisiopatologia de doenças inflamatórias, o seu bloqueio funciona como um mecanismo extremamente eficaz no tratamento de uma série de doenças associadas a inflamação, como artrite reumatóide, espondilite anquilosante, doença de Crohn e psoríase. No entanto, como já citado anteriormente, o TNF- $\alpha$  funciona também como um importante mediador na resposta imune frente a microrganismos, logo o uso de drogas bloqueadoras de TNF- $\alpha$  resulta no aumento de sérios processos infecciosos em pacientes, incluindo infecções causadas por fungos oportunistas (BRADLEY, 2008; LACAILLE *et al.*, 2008; LIS *et al.*, 2014).

*C. albicans* tem se mostrado como um potente agente capaz de induzir a síntese de TNF- $\alpha$  a partir de células NK e monócitos humanos (DJEU *et al.*, 1988; RIIPI; CARLSON, 1990; AYBAY; IMIR, 1996). Além disso, Garner *et al.* (1994) relatam que mananas, polissacarídeos presentes na superfície de *C. albicans*, estimulam a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos. Louie *et al.* (1994) demonstraram aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  sérico em camundongos com candidíase sistêmica provocada pela inoculação de cepas de *C. albicans*.

O papel das citocinas frente a agentes microbianos, como o efeito regulador do TNF- $\alpha$  junto aos macrófagos e neutrófilos contra cepas de *C. albicans*, já está bem documentado (OHTA *et al.*, 2007). No entanto, não há estudos que comprovem a possível ação de tal substância diretamente frente aos microrganismos, sem que haja o intermédio de células da resposta inflamatória, bem como não há relatos de que haja a presença de receptores para o TNF- $\alpha$  ou outras citocinas em fungos, incluindo espécies de *Candida*. Entretanto, considerando a alta incidência de infecções fúngicas em pacientes que fazem uso de agentes bloqueadores do TNF- $\alpha$  (LACAILLE *et al.*, 2008), é razoável supor que a própria citocina pode influenciar no desenvolvimento de fungos patogênicos como os do gênero *Candida*.

### 3 JUSTIFICATIVA

*C. albicans* é considerada o principal agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas em indivíduos imunossuprimidos, sua capacidade em formar biofilme é uma importante estratégia de virulência e é responsável por reduzir a suscetibilidade do patógeno a antifúngicos (WIBAWA *et al.*, 2015), resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade, além de altos custos à saúde pública. O crescente fracasso no tratamento de infecções fúngicas tem levado a uma busca contínua de novas alternativas terapêuticas. O TNF- $\alpha$  é um importante mediador na resposta imune frente a agentes microbianos, inclusive os fungos. Estudos relatam que *C. albicans* tem se mostrado como um potente agente capaz de induzir a síntese de tal citocina a partir de células NK e monócitos humanos (GARNER *et al.*, 1994; AYBAY; IMIR, 1996). No entanto, não há relatos que comprovem uma possível ação direta de tal citocina frente aos microrganismos, sem que haja o intermédio de células da resposta inflamatória. Ademais, é observada uma elevada incidência de infecções fúngicas em pacientes que fazem uso de agentes bloqueadores de TNF- $\alpha$ . Considerando todos os fatores supracitados, foi avaliado o efeito do TNF- $\alpha$  frente ao desenvolvimento de *C. albicans*.

#### **4 PERGUNTA DE PARTIDA**

O TNF- $\alpha$  influencia no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*?

#### **5 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O TNF- $\alpha$  apresenta um efeito inibitório frente ao biofilme de *C. albicans*.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do TNF- $\alpha$  frente ao desenvolvimento de *C. albicans in vitro*.

### 6.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração inibitória mínima do TNF- $\alpha$ , dentre as concentrações testadas, em *C. albicans*;

Avaliar o biofilme em formação de *C. albicans, in vitro*, na presença de TNF- $\alpha$  através da avaliação da densidade óptica (DO);

Avaliar o biofilme maduro de *C. albicans, in vitro*, na presença de TNF- $\alpha$  através da avaliação da densidade óptica (DO);

Verificar a relação hifa/blastoconídio no biofilme em formação de *C. albicans* na presença de TNF- $\alpha$ ;

Verificar a relação hifa/blastoconídio no biofilme maduro de *C. albicans* na presença do TNF- $\alpha$ .

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 Desenho e local do estudo

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

### 7.2 Cepas

No estudo, foram utilizadas quatro cepas de *C. albicans* pertencentes à micoteca do CEMM: duas (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006) fortemente formadoras de biofilme de origem humana e duas (49BMv e 51BMv) fracamente formadoras de biofilme, isoladas por Brilhante *et al.* (2013) a partir da cavidade oral de emas.

### 7.3 Reagentes e soluções

Foram utilizados TNF- $\alpha$  recombinante murino (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA) e anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, EUA). As soluções de TNF- $\alpha$  foram diluídas em PBS (*phosphate-buffered saline*) estéril (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), como recomendado pelo fabricante, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  e armazenada a -20 °C. AMB foi diluída conforme indicação do CLSI. Para os testes, a AMB foi diluída em meio RPMI na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  e armazenada a -20 °C (CLSI, 2008). As concentrações testadas foram preparadas no momento da utilização a partir das soluções de estoque utilizando meio RPMI 1640 até atingir concentrações de 0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL para TNF- $\alpha$  (SONG *et al.*, 2008; MORICONI *et al.*, 2011; SUGITA *et al.*, 2013) e 10  $\mu\text{g/mL}$  para AMB.

#### 7.4 Preparo do inóculo

No preparo do inóculo utilizado para a formação do biofilme, as cepas foram repicadas em ágar batata por 48 horas a 35 °C. Fragmentos da colônia foram ressuspensos em meio RPMI 1640 e ajustados para 0,5 na escala de McFarland que corresponde a  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL.

Para determinar a concentração inibitória mínima do TNF- $\alpha$ , os fragmentos da colônia foram ressuspensos em salina a 0,9% e ajustados para 0,5 na escala de McFarland ( $1,0 - 5 \times 10^6$  UFC/mL). Posteriormente, foram realizadas duas diluições consecutivas, a primeira na proporção de 1:50 e a segunda de 1:20, em meio RPMI 1640, para a obtenção de uma concentração final de  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  células/mL (CLSI, 2008).

#### 7.5 Determinação da concentração inibitória mínima do TNF- $\alpha$ em *C. albicans*

Foi analisada a concentração inibitória mínima, dentre as concentrações 0,5, 1, 10 e 20 ng/mL, do TNF- $\alpha$  em *C. albicans* (ATCC 10231 e CEMM 01.05.06) por meio da técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com modificações.

Para realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços, com fundo em “U” e capacidade de 200  $\mu$ L. Inicialmente, foram adicionados 100  $\mu$ L do meio RPMI 1640 em cada poço, em seguida foi adicionado, nos quatro primeiros poços da primeira e terceira coluna da placa, o TNF- $\alpha$  numa concentração quatro vezes maior que 20 e 1 ng/mL, respectivamente. Então, foi realizada a homogeneização e 100  $\mu$ L dos poços contendo TNF- $\alpha$  foram coletados e adicionados à coluna seguinte. A AMB foi utilizada como controle, sendo adicionada nos quatro últimos poços da primeira coluna e diluída até a décima. A coluna 11 da placa foi utilizada para o controle positivo (inóculo + RPMI sem TNF- $\alpha$ ) e a coluna 12 foi dividida para o controle de esterilidade do TNF- $\alpha$  e RPMI 1640. Posteriormente, 100  $\mu$ L do inóculo fúngico de cada cepa foram adicionados em seus respectivos poços e a placa foi incubada a 35 °C e então foi realizada a leitura visual com 24 e 48 horas.

A concentração inibitória mínima (CIM) para a AMB foi considerada como sendo aquela capaz de inibir 100% do crescimento (CLSI, 2008) e 50% de inibição para o TNF- $\alpha$ . O experimento foi realizado com a presença da cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019.

### **7.6 Efeito do TNF- $\alpha$ frente ao biofilme em formação de *C. albicans***

O efeito do TNF- $\alpha$  no biofilme em formação de *C. albicans*, foi avaliado conforme Sidrim *et al.* (2015), quando investigou a ação de drogas antibacterianas no biofilme de *C. albicans*. O cultivo do biofilme de *C. albicans* foi realizado em placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato. Foram transferidos 100  $\mu$ L do inóculo fúngico nos poços, acrescidos de 100  $\mu$ L de RPMI suplementado de TNF- $\alpha$  (0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL final) ou AMB (10  $\mu$ g/mL final). Para o controle positivo foram adicionados 100  $\mu$ L de RPMI e 100  $\mu$ L do inóculo fúngico ao poço. No controle negativo foram adicionados 200  $\mu$ L de RPMI ao poço. Em seguida, foram incubados a 35 °C por 48 horas.

Após incubação, o sobrenadante foi aspirado, os poços foram lavados com 200  $\mu$ l de PBS por duas vezes e a atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido (XTT, Sigma, Alemanha) – ensaio de redução. 75  $\mu$ L de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6  $\mu$ L de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50  $\mu$ L de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 35 °C sob agitação de 80 rotações por minuto (rpm), durante 5 horas. A atividade metabólica no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à formazan, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Foi realizado controle de esterilidade para cada solução utilizada (solução salina, RPMI e TNF- $\alpha$ ). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

### **7.7 Efeito do TNF- $\alpha$ frente ao biofilme maduro de *C. albicans***

A ação do TNF- $\alpha$  no biofilme maduro de *C. albicans* foi avaliada, conforme Sidrim *et al.* (2015), quando investigou a ação de drogas antibacterianas no biofilme de *C. albicans*. O cultivo do biofilme de *C. albicans* foi realizado em placas de 96 poços de

poliestireno de fundo chato. Para investigação da atividade do TNF- $\alpha$  no biofilme maduro, os poços receberam apenas 100 $\mu$ L do inóculo fúngico, acrescidos de 100  $\mu$ L de RPMI ou 200  $\mu$ L de RPMI (controle negativo) e em seguida foram incubados a 35 °C por 48 horas.

Após incubação, o sobrenadante foi aspirado, os poços foram lavados com 200  $\mu$ L de PBS por duas vezes, em seguida uma alíquota de 200  $\mu$ L de uma solução de meio RPMI 1640 suplementado de TNF- $\alpha$  (0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL final) ou AMB (10  $\mu$ g/mL final) foram adicionadas a cada poço da placa e foram incubados por mais 48 horas a 35 °C. Após a segunda incubação, o sobrenadante foi aspirado, os poços lavados novamente e então a atividade metabólica do biofilme foi quantificada pelo ensaio de redução de XTT, como foi descrito acima.

### **7.8 Análise da relação hifa/blastoconídio no biofilme de *C. albicans***

Biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 em formação e maduro expostos ao TNF- $\alpha$  nas concentrações 0,5, 1, 10 e 20 ng/mL foram preparados, como foi descrito nos tópicos 7.6 e 7.7, respectivamente. Após incubação, descarte do sobrenadante e lavagem dos poços, 20  $\mu$ L de corante azul de algodão (lactofenol) foi adicionado em cada poço, realizada uma raspagem e 10  $\mu$ L do conteúdo foram transferidos para uma lâmina. Posteriormente, as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio Leica DFC 295 com câmera acoplada. Com o auxílio de um microscópio óptico (Fisher Scientific, Houston, TX) em um aumento de 200x, contendo um retículo micrométrico square (U-OCMSQ10/10), foi realizada uma contagem de blastoconídios (B) e formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) (F) em 10 (dez) campos distintos no controle positivo e concentrações do TNF- $\alpha$  e em seguida calculada a relação das formas filamentosas, usando a seguinte fórmula:  $F \times 100 / B + F$ .

### **7.9 Análise estatística**

Foi utilizada a Análise de Variância one-way, seguida de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para dados não paramétricos.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Determinação da concentração inibitória mínima do TNF- $\alpha$ em *C. albicans*

Dentre as concentrações de TNF- $\alpha$  utilizadas (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL) não foi encontrada uma concentração capaz de inibir o crescimento planctônico das cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006) de *C. albicans*.

### 8.2 Efeito do TNF- $\alpha$ frente ao biofilme em formação de *C. albicans*

A formação do biofilme foi inibida significativamente pelo TNF- $\alpha$ . Nas cepas fortemente formadoras de biofilme, ATCC 10231 e CEMM 01.05.006, observou-se uma redução na atividade metabólica de forma dose dependente, exceto nas concentrações de 0,1 e 0,5 ng/mL. A concentração de 40 ng/mL apresentou uma marcante inibição da formação do biofilme das cepas, como mostra o gráfico 1. Nas cepas fracamente formadoras de biofilme, 49BMv e 51BMv, também foi observada uma redução da atividade metabólica, principalmente na concentração de 40 ng/mL (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Biofilme em formação de *C. albicans* na ausência (controle) e na presença de TNF- $\alpha$  (0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL): cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006). A atividade metabólica foi quantificada por espectrofotômetro sob a absorvância de 492 nm. Os resultados foram representados com média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$ .

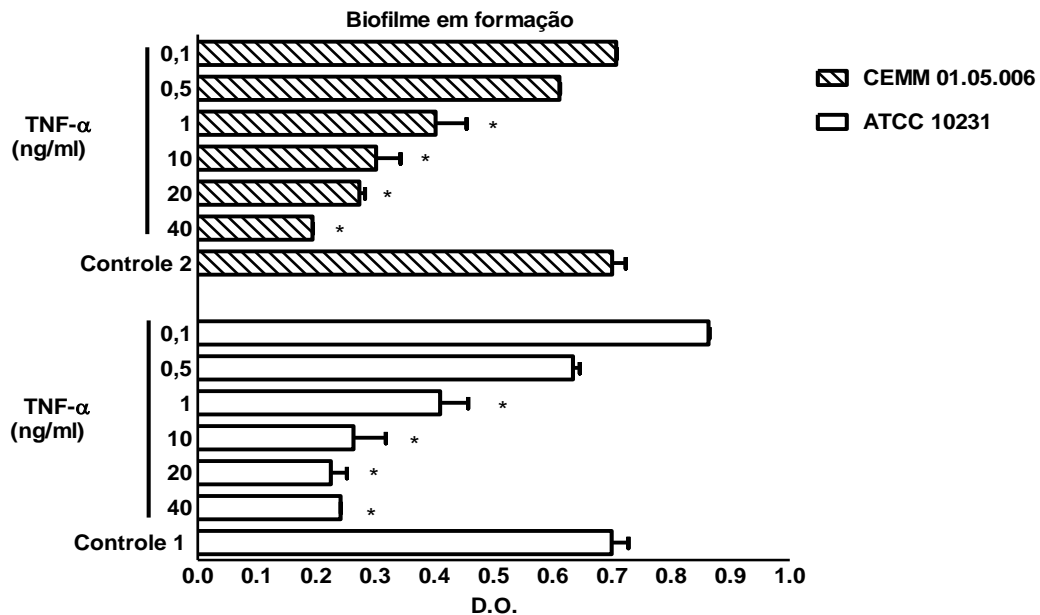
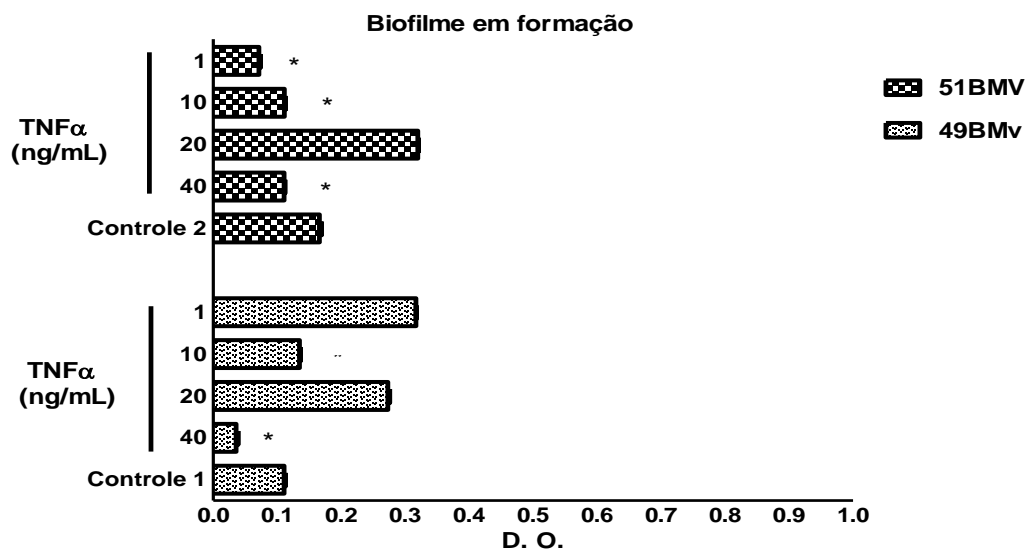


Gráfico 2 - Biofilme em formação de *C. albicans* na ausência (controle) e na presença de TNF- $\alpha$  (1, 10, 20 e 40 ng/mL): cepas fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv). A atividade metabólica foi quantificada por espectrofotômetro sob a absorvância de 492 nm. Os resultados foram representados com média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$ .



### **8.3 Efeito do TNF- $\alpha$ frente ao biofilme maduro de *C. albicans***

O biofilme maduro das cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006) não apresentou qualquer alteração significativa na presença do TNF- $\alpha$ , conforme mostra o gráfico 3. Entretanto, o biofilme maduro das cepas fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv) apresentou uma discreta interferência, como apresentado no gráfico 4.



Gráfico 3 - Biofilme maduro de *C. albicans* na ausência (controle positivo) e na presença de TNF- $\alpha$  (0,1, 0,5, 1, 10, 20 e 40 ng/mL): Cepas fortemente produtoras de biofilme (ATCC 10231 e CEMM 01.05.006). A atividade metabólica foi quantificada por espectrofotômetro sob a absorvância de 492 nm. Os resultados foram representados com média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$ .

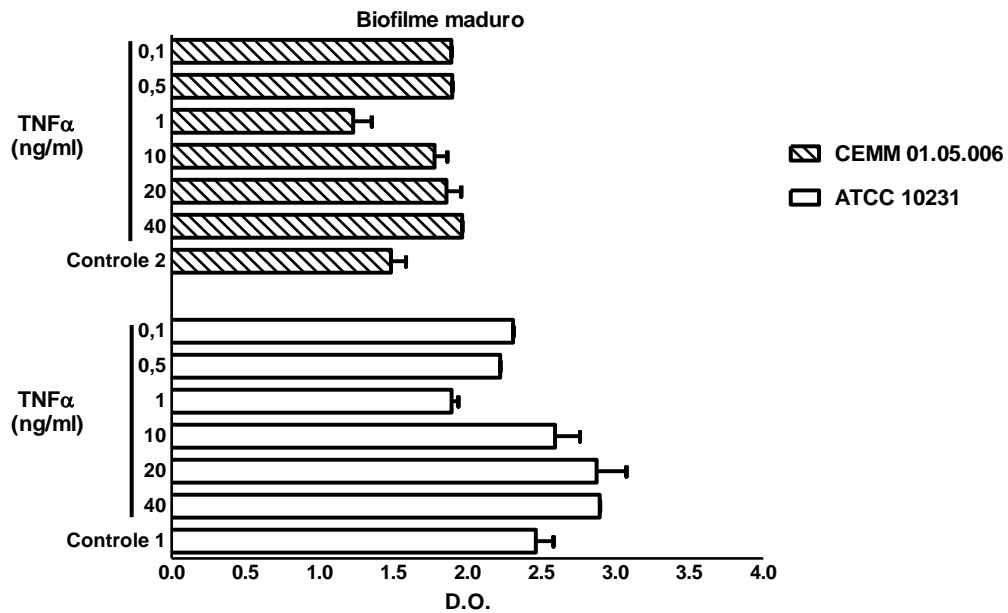
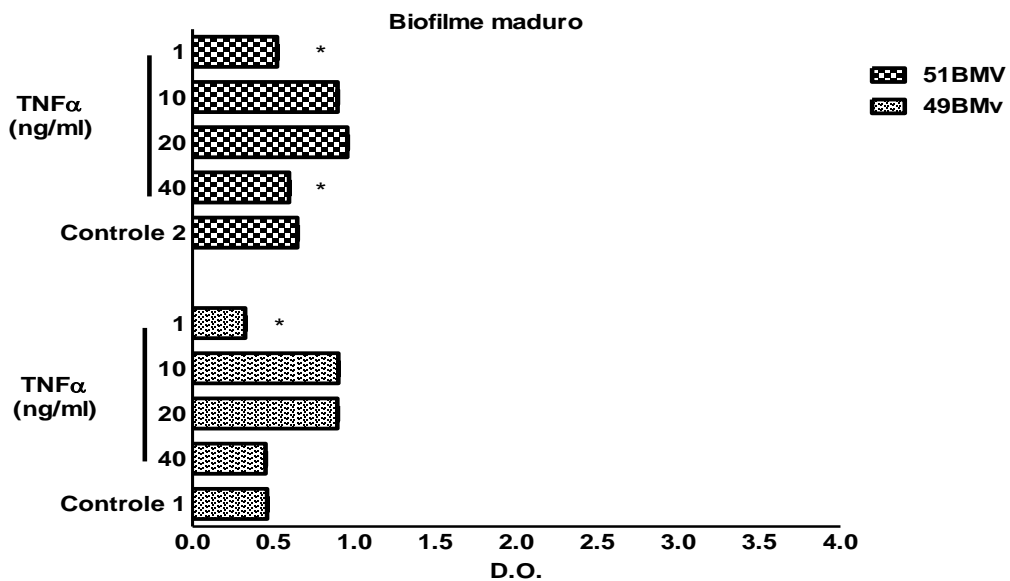


Gráfico 4 - Biofilme maduro de *C. albicans* na ausência (controle positivo) e na presença de TNF- $\alpha$  (1, 10, 20 e 40 ng/mL): Cepas fracamente produtoras de biofilme (49BMv e 51BMv). A atividade metabólica foi quantificada por espectrofotômetro sob a absorvância de 492 nm. Os resultados foram representados com média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$ .



#### **8.4 Análise da relação hifa/blastocóndio no biofilme em formação de *C. albicans***

Foi analisada a relação hifa/blastocóndio do biofilme em formação de *C. albicans* ATCC 10231, na presença do TNF- $\alpha$  (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL). A observação microscópica mostrou que o TNF- $\alpha$  inibe a transição de leveduras para hifas e pseudo-hifas (Figura 3). O controle positivo (ausência de TNF- $\alpha$ ) constitui-se principalmente por hifas e pseudo-hifas aglomeradas e algumas células de leveduras, como mostra a figura 3A. A concentração de TNF- $\alpha$  a 10 ng/mL reduziu o número da forma filamentosa, quando comparado ao controle positivo (Figura 3C). Porém, a dose mais elevada de TNF- $\alpha$  testada (20 ng/mL) resultou em um desaparecimento quase total de hifas e pseudo-hifas, com predomínio de leveduras (Figura 3B). A redução da forma micelial foi dependente da dose de TNF- $\alpha$ , aumentando proporcionalmente com o aumento da concentração da citocina. O gráfico 5 permite uma visualização quantitativa da relação das formas filamentosas no controle positivo e em todas as concentrações de TNF- $\alpha$  (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL), no qual observamos uma redução significativa de hifas e pseudo-hifas nas concentrações de 20 e 10 ng/mL.

Figura 3 - Biofilme em formação de *C. albicans* (ATCC 10231). Controle positivo (A), concentração de TNF- $\alpha$  20 ng/mL (B), 10 ng/mL (C), 1 ng/mL (D) e 0,5 ng/mL (E). As barras brancas representam um comprimento de 50 $\mu$ m. Aumento 200x.

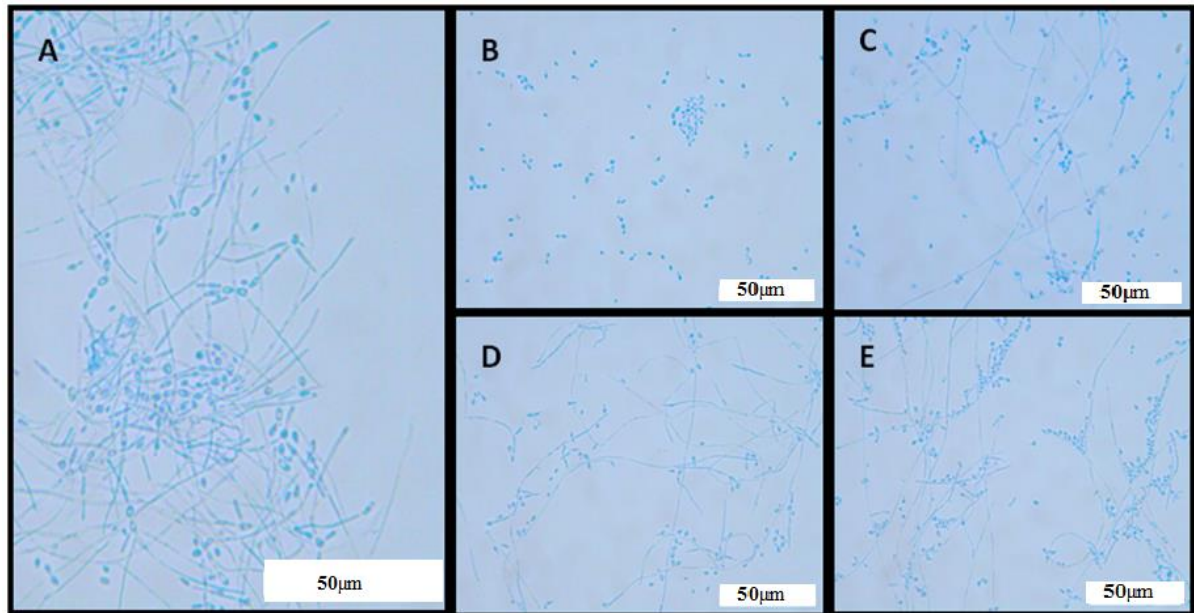
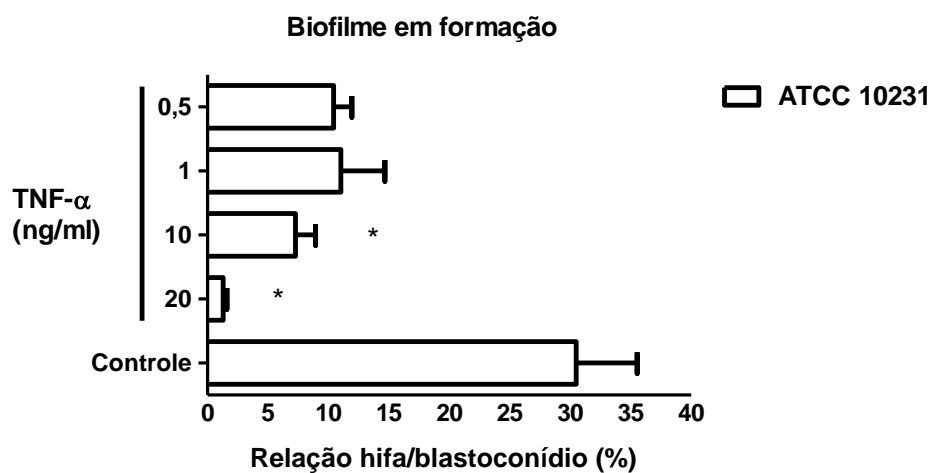


Gráfico 5 - Relação das formas filamentosas do biofilme em formação de *C. albicans* (ATCC 10231) na ausência (controle positivo) e na presença de TNF- $\alpha$  (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL); \* p < 0,05.



### 8.5 Análise da relação hifa/blastoconídeo no biofilme maduro de *C. albicans*

O efeito do TNF- $\alpha$  (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL) no biofilme maduro de *C. albicans* ATCC 10231 não resultou em alterações significativas, conforme mostra a figura 4. O gráfico 6 permite uma visualização quantitativa da relação das formas filamentosas no controle

positivo e em todas as concentrações de TNF- $\alpha$  testadas, no qual observamos que não houve redução significativa de hifas e pseudo-hifas nas concentrações utilizadas de TNF- $\alpha$ , quando comparadas ao controle positivo.

Figura 4 - Biofilme maduro de *C. albicans* (ATCC 10231). Controle positivo (A), concentração de TNF- $\alpha$  20 ng/mL (B), 10 ng/mL (C), 1 ng/mL (D) e 0,5 ng/mL (E). As barras brancas representam um comprimento de 50  $\mu$ m. Aumento 200x

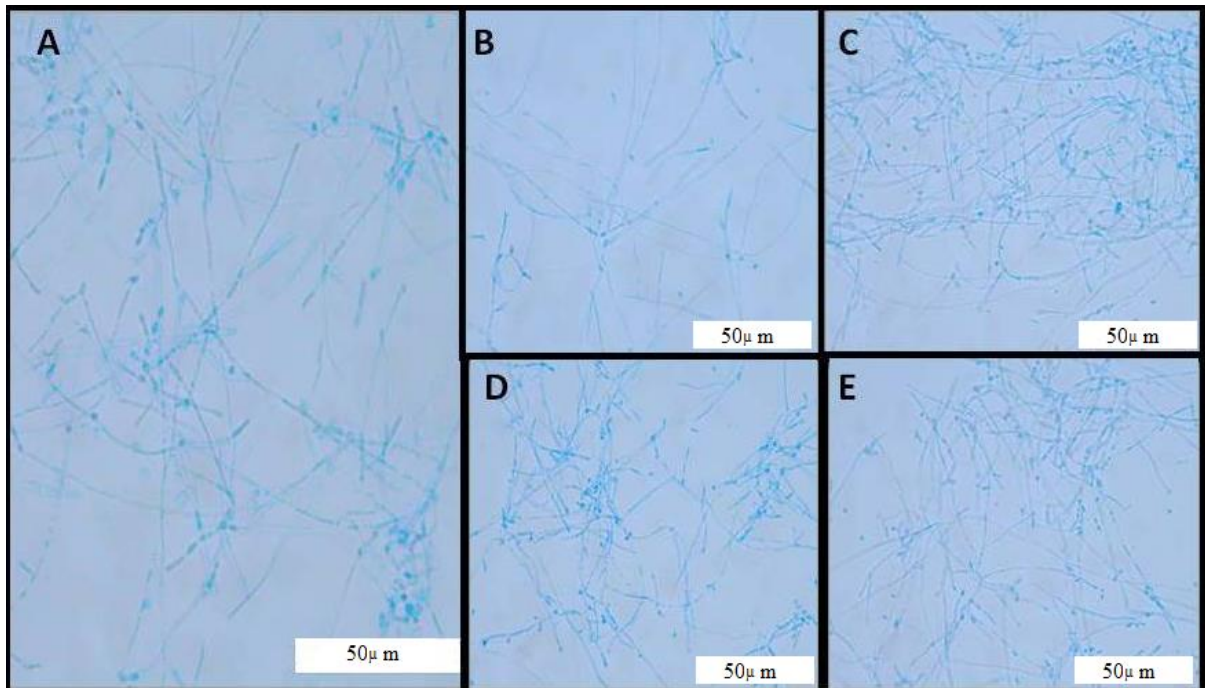
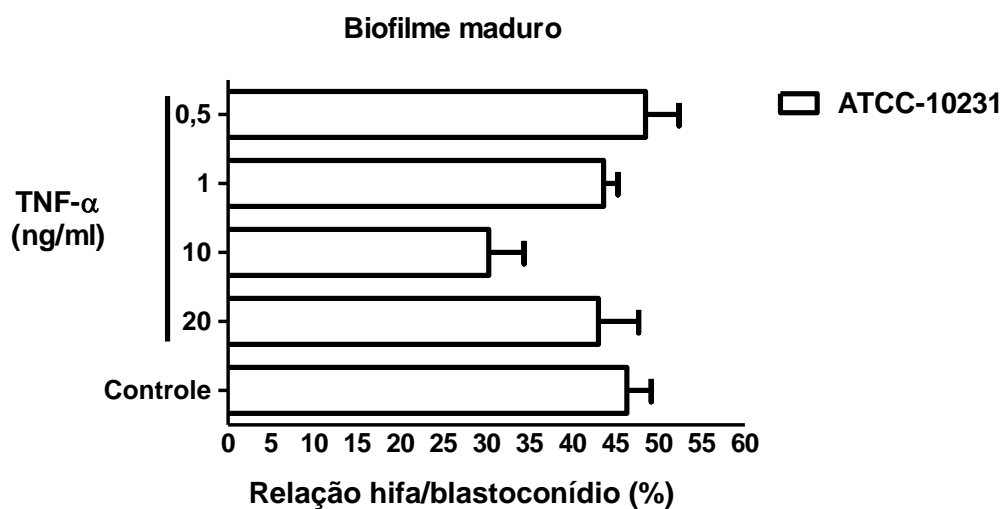


Gráfico 6 - Relação das formas filamentosas do biofilme maduro de *C. albicans* (ATCC 10231) na ausência (Controle positivo) e na presença do TNF- $\alpha$  (0,5, 1, 10 e 20 ng/mL); \* p < 0,05.



## 9 DISCUSSÃO

A levedura *C. albicans* é a principal responsável por infecções fúngicas que acometem indivíduos, principalmente imunocomprometidos, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade, bem como elevados custos à saúde pública (MATHÉ; DIJCK, 2013; CHILDERS *et al.*, 2015). Grande parte das infecções causadas por *C. albicans* está relacionada à capacidade do fungo em formar biofilmes (TAFF *et al.*, 2012; SIDRIM *et al.*, 2015). A falha no tratamento de infecções por *Candida* é um problema bastante comum e está fortemente associado à alta resistência dos fungos aos agentes antimicrobianos (SILVA-DIAS *et al.*, 2015). Quando esses microrganismos se encontram agrupados, formando comunidades microbianas, denominadas biofilmes, há uma resistência ainda maior a antifúngicos, resultando conseqüentemente no difícil combate de tais patógenos (WIBAWA *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi investigado o efeito do TNF- $\alpha$  frente a cepas forte e fracamente produtoras de biofilme de *C. albicans* sob as formas de biofilme em formação e maduro e forma planctônica. O efeito de mediadores inflamatórios, como citocinas, frente a agentes microbianos é bastante conhecido, entretanto a possível ação de tais substâncias diretamente sobre microrganismos, ou seja, sem o intermédio de células da resposta inflamatória ainda permanece desconhecida.

Foi observado que a molécula de TNF- $\alpha$  inibiu significativamente a formação do biofilme de *C. albicans* de forma direta e dose dependente. No entanto, o biofilme maduro apresentou apenas uma discreta suscetibilidade à citocina, provavelmente, devido ao fato dos biofilmes maduros serem bem mais resistentes. O crescimento planctônico não foi afetado por nenhuma das concentrações utilizadas de TNF- $\alpha$ , o que evidencia a ausência de efeito sobre a viabilidade celular de *C. albicans*.

Os resultados obtidos, quando analisada a relação hifa/blastoconídio do biofilme na presença do TNF- $\alpha$ , demonstraram a supressão da transição da forma leveduriforme para a forma filamentosa (hifas e pseudo-hifas) do fungo no biofilme em formação. Esses achados foram consistentes com relatos prévios que demonstram o efeito do TNF- $\alpha$  em um modelo experimental de candidíase oral em camundongos e na transformação morfológica de *C. albicans* a partir de blastoconídios induzida por CO<sub>2</sub>. No estudo, o TNF- $\alpha$  suprimiu de forma direta e dose-dependente a formação de formas filamentosas a partir de blastoconídios, ao

passo que, *in vivo*, a administração oral da citocina reduziu significativamente as unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. albicans* em tecidos da língua dos animais tratados. Ainda no mesmo trabalho, a presença do TNF- $\alpha$ , de forma direta, não foi capaz de inibir o crescimento celular de *C. albicans* (OHTA *et al.*, 2007), resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Além disso, outros estudos demonstraram a potente capacidade de *C. albicans* em estimular a síntese de TNF- $\alpha$  por células NK e monócitos humanos (DJEU *et al.*, 1988). GARNER *et al.* (1994) relatam que mananas, polissacarídeos presentes na superfície de *C. albicans*, estimulam a secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos. Em um modelo experimental de candidíase sistêmica em camundongos, provocada por meio da inoculação de cepas de *C. albicans*, foi demonstrado o aumento considerável dos níveis de TNF- $\alpha$  sérico. A citocina apresentou um efeito protetor, aprimorando a capacidade do hospedeiro em inibir o crescimento deste patógeno (LOUIE *et al.*, 1994).

O processo de filamentação constitui uma importante estratégia de virulência para os fungos dimórficos, uma vez que funciona como um mecanismo essencial para a invasão do patógeno nos tecidos, facilita a instalação da infecção, além de dificultar a fagocitose do microrganismo por meio das células do sistema imunológico, devido a morfologia alongada (TSANG *et al.*, 2012).

A morfogênese de *C. albicans* é determinada por sinalização ambiental. Temperatura, pH, soro, N-acetilglucosamina, diferentes fontes de carbono, entre outros fatores podem desencadear a conversão de levedura para a forma filamentosa (HAN *et al.*, 2011; NADÁS *et al.*, 2013). No entanto, há uma falta de compreensão sobre como *C. albicans* regula sua morfogênese em resposta a estas mudanças ambientais. Adicionalmente, dentro das células, sinais químicos parecem, também, influenciar estas alterações morfológicas. Fungos dimórficos são conhecidos por produzir vários metabólitos de sinalização (HAN *et al.*, 2011). O farnesol e o tirosol são as principais moléculas de *quorum sensing* produzidas por *C. albicans*, os quais apresentam atividades antagônicas quanto à morfologia celular do fungo (ALEM *et al.*, 2006; FELDMAN *et al.*, 2014). O farnesol bloqueia a conversão levedura-hifa e, conseqüentemente, a formação de biofilme, enquanto o tirosol está associado ao aumento de biomassa do biofilme, provavelmente ao estimular a produção de hifas (ALEM *et al.*, 2006; FELDMAN *et al.*, 2014).

O TNF- $\alpha$  pode apresentar propriedades similares àqueles metabólitos de auto-regulação, visto que seus efeitos são bem semelhantes aos da molécula de farnesol, que está fortemente relacionada a supressão da conversão levedura-hifa por parte de *C. albicans*. Da mesma forma observada em nosso estudo, a densidade e a morfologia do biofilme de *C. albicans* foram drasticamente alteradas por altas concentrações de farnesol, provavelmente como uma consequência direta do seu efeito no processo morfológico do microrganismo (RAMAGE *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados em nossa pesquisa indicam fortemente que a presença do TNF- $\alpha$  suprimiu a transformação morfológica de *C. albicans* a partir de blastoconídios para formas alongadas (hifas e pseudo-hifas), resultando, conseqüentemente, na inibição da formação do biofilme. Segundo Nobile *et al.* (2006) a formação de hifas é considerada uma etapa crucial para a formação do biofilme e a inativação de genes responsáveis pela estimulação do crescimento filamentosos promove a inibição da formação de tais comunidades microbianas.

Existem duas grandes vias de sinalização que regulam a morfogênese de *C. albicans*: cAMP - Protein Kinase A (PKA) e Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), através dos reguladores de transcrição EFG1 e CPH1, respectivamente (FELDMAN *et al.*, 2014). Ambas as vias são fortemente moduladas por uma GTPase ligada a membrana (RAS1) (TSANG *et al.*, 2012).

A via cAMP-PKA ativa um importante fator de transcrição EFG1, responsável pela indução da expressão de genes específicos de hifas, tais como HWP1, HYR1 e ALS (HAN *et al.*, 2011). Han *et al.* (2011) apresentam inúmeros genes que influenciam na morfogênese de *C. albicans*, muitos envolvidos na indução do crescimento filamentosos do fungo, como os exemplos supracitados, como também genes responsáveis pela supressão do processo de filamentação, como TUP1, SSN6, NRG1, MIG1 e HOG1. No mesmo trabalho, os autores mostram que a ação inibitória do crescimento filamentosos e conseqüente inibição do biofilme de *C. albicans* por parte da molécula de *quorum sensing* farnesol ocorre por meio da inibição das duas principais vias envolvidas: cAMP-PKA e MAPK. O metabólito suprime o RAS1, bem como SHO1, HST7, CEK1, PDE2 HWP1, todos envolvidos na estimulação da filamentação do fungo, ao mesmo tempo que regula positivamente genes supressores de filamentação, como TUP1 e HOG1.

Feldman *et al.* (2014) demonstraram que a substância thiazolidinedione-8 (S-8), inibiu a transição levedura-hifa em *C. albicans*. O agente suprimiu a expressão de genes que desempenham papel importante na formação de biofilme, aderência e filamentação, como HWP1, ALS3 e EAP1. Os níveis de UME6, regulador de transcrição responsável pela formação e manutenção das hifas, também foram significativamente reduzidos e o regulador RAS1 foi fortemente inibido. Além disso a expressão de CST20, HST7 e CPH1, envolvidos na via MAPK, foi reprimida. Adicionalmente, a expressão de TUP1 e NRG1, repressores de filamentação, foi estimulada pelo S-8.

Outros relatos mostraram que a purpurina, pigmento natural extraído das raízes de ruiva (*Rubia tinctorum* L.), inibiu a formação do biofilme, bem como reduziu a atividade metabólica do biofilme maduro de *C. albicans*. Os resultados mostraram que o corante bloqueou a conversão levedura-hifa e biofilmes tratados apresentaram morfologia constituída basicamente por aglomerados de blastoconídios. As análises indicaram que a purpurina regulou negativamente a expressão de genes envolvidos na formação de hifas, tais como ALS3, ECE1, HWP1 e HYR1, bem como um dos principais componentes da via de sinalização de formação de hifas, RAS1 (TSANG *et al.*, 2012).

Considerando todos os estudos citados acima, é razoável supor que o TNF- $\alpha$  esteja exercendo sua ação por meio da supressão da expressão de componentes estimuladores da conversão levedura-hifa e/ou regulação positiva de genes supressores do crescimento filamentosos. No entanto, maiores investigações são necessárias para que se possa estabelecer qual mecanismo de ação do TNF- $\alpha$  leva ao bloqueio da conversão levedura-hifa e inibição da formação do biofilme, bem como elucidar quais genes são estimulados e/ou suprimidos pelo TNF- $\alpha$  e se esta molécula poderia ser utilizada como uma droga antimicrobiana. Vale ressaltar que estudos ultraestruturais, moleculares e bioquímicos bem mais detalhados são necessários para o esclarecimento do efeito inibitório do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*.



## 10 CONCLUSÕES

Dentre as concentrações de TNF- $\alpha$  utilizadas, não foi possível identificar uma concentração inibitória mínima em *C. albicans*.

O TNF- $\alpha$  apresentou efeito inibitório, *in vitro*, frente ao biofilme em formação de *C. albicans*.

O TNF- $\alpha$  apresentou um leve efeito inibitório, *in vitro*, frente ao biofilme maduro de *C. albicans*.

O TNF- $\alpha$  interferiu, *in vitro*, na relação hifa/blastocóndio do biofilme em formação de *C. albicans*.

O TNF- $\alpha$  não interferiu, *in vitro*, na relação hifa/blastocóndio do biofilme maduro de *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap.12, p. 267-301.
- ALEM, M. A.; OTEEF, M. D.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770-1779, 2006.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.999-1008, 2006.
- AYBAY, C.; IMIR, T. Tumor Necrosis Factor (TNF) Induction from Monocyte/Macrophages by *Candida* Species. **Immunobiol**, v. 196, p. 363-374, 1996.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, n.7, p.671-679, 1999.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v.214, p.149-160, 2008.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.889-895, 2013.
- CHILDERS, D. S.; KADOSH, D. Filament Condition-Specific Response Elements Control the Expression of NRG1 and UME6, Key Transcriptional Regulators of Morphology and Virulence in *Candida albicans*. **Plos One**, mar, 2015.
- CLSI.CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standart. CLSI Document M27-A3. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- COLLETTE, J. R.; ZHOU, H.; LORENZ, M. C. *Candida albicans* Suppresses Nitric Oxide Generation from Macrophages via a Secreted Molecule. **Plos One**, v.9, n.4, abril, 2014.
- DJEU, J. Y.; BLANCHARD, D. K.; RICHARD, A. L.; FRIEDMAN, H. Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. **Journal of Immunology**, v.141, p.4047- 4052, 1988.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.1, p. 30-36, jan, 2003.
- EKSI, F.; GAYYURHAN, E. D.; BALCI, I. In Vitro Susceptibility of *Candida* Species to Four Antifungal Agents Assessed by the Reference Broth Microdilution Method. **Article**, 2013.

FELDMAN, M.; AL-QUNTAR, A.; POLACHECK, I.; FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. Therapeutic Potential of Thiazolidinedione-8 as an Antibiofilm Agent against *Candida albicans*. **Plos One**, v.9, n.5, mai, 2014.

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

GARNER, R. E.; RUBANOWICE, K.; SAWYER, R. T.; HUDSON, J. A. Secretion of TNF- $\alpha$  by alveolar macrophages in response to *Candida albicans* mannan. **Journal of Leukocyte Biology**, v.55, fev, 1994.

HAN, T.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p.747–763, 2011.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. TNF- $\alpha$  and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). **Microscopy Research Technique**, v.50, P.184-195, 2000.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of ethnopharmacology**, v.140, p.416-423, 2012.

KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **Journal of Dental Research**, v.92, p.1065-1073, 2013.

LACAILLE, D. *et al.* Use of nonbiologic disease-Modifying Antirheumatic drugs and risk and infection in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.59, n.8, p.1074-1081, 2008.

LIS, K.; KUZAWINSKA, O.; BALKOWIEC-ISKRA, E. Tumor necrosis factor inhibitors-state of knowledge. **Archives of Medical Science**, v.10, n.6, p. 1175-1185, 2014.

LOPEZ-RIBOT, J. L. Large-scale biochemical profiling of the *Candida albicans* biofilm matrix: new compositional, structural, and functional insights. **Mbio**, v.5, n.5, 2014.

LOUIE, A. *et al.* Tumor Necrosis Factor Alpha Has a Protective Role in a Murine Model of Systemic Candidiasis. **Infection and Immunity**, v.62, n.7, p. 2761-2772, jul,1994.

LU, Y.; SU, C.; WANG, A.; LIU, H. Hyphal Development in *Candida albicans* Requires Two Temporally Linked Changes in Promoter Chromatin for Initiation and Maintenance. **Plos Biology**, v.9, n.7, jul, 2011.

MARTINS, M. *et al.* Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v.169, n.5, mai, 2010.

MATHÉ, L.; DIJCK, P. V. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance Mechanisms. **Curr Genet**, v. 59, p. 251–264, 2013.

MORICONI, F. *et al.* The anti-TNF- $\alpha$  antibody infliximab indirectly regulates PECAM-1 gene expression in two models of in vitro blood cell activation. **Laboratory Investigation**, v.92, p. 166-177, 2012.

NADÃS, G. C. *et al.* The interplay between NSAIDs and *Candida albicans* on the gastrointestinal tract of guinea pigs. **Mycopathology**, v.175, p.221–230, 2013.

NETT, J. *et al.* Putative Role of  $\beta$ -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilme Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, fev. 2007.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cell Microbiol**, v.8, n.9, p.1382–1391, 2006.

OHTA *et al.* Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Tumor Necrosis Factor-alpha and Potential for Treatment of Oral Candidiasis. **In vivo**, v 21, p. 25-32, 2007.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, J.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; WICKES, B. L.; LOPES-RIBOTE, J. L. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol a Quorum-Sensing Molecule. **Microbiology**, v.68, n.11, p. 5459–5463, nov, 2002.

RIIPI, L.; CARLSON, E. Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Induced in Mice by *Candida albicans*: Role of TNF in Fibrinogen Increase. **Infection and immunity**, v.58, n.9, p.2750-2754, set, 1990.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G. D.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P., BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. **Journal of Immunology**, v. 168, p.4620-4627, 2002.

SARDI, J. C. O.; PITANGUIA, N. S.; RODRIGUES-ARELLANES, G.; TAYLOR, M. L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINIA, M. J. S. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, n.1, p.22–29, 2014.

SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; REYNA-LÓPEZ, G. E.; MARTINEZ-GAMEZ, M. A.; VEGA-GONZALEZ, A.; CUELLAR-CRUZI, M. Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. **BioMed Research International**, 2015.

SIDRIM, J. J. C. *et al.*  $\beta$ -Lactam antibiotics and vancomycin inhibit the growth of planktonic and biofilm *Candida* spp.: An additional benefit of antibiotic-lock therapy?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2015.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. cap. 25, p. 266-267.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; RANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v.6, mar, 2015.

SONG, M. Y. *et al.* Characterization of a novel anti-human TNF-alpha murine monoclonal antibody with high binding affinity and neutralizing activity. **Experimental and Molecular Medicine**, v.40, n.1, p.35-42, fev, 2008.

SUGITA, S. *et al.* Role of IL-22- and TNF- $\alpha$ -Producing Th22 Cells in Uveitis Patients with Behçet's Disease. **Journal of immunology**, v.190, n.11, p. 5799-5808, jun, 2013.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v.8, n. 7, p. 877-886, 2013.

TAFF *et al.* A *Candida* Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. **Plos Pathogens**, v.8, n.8, ago, 2012.

TSANG, P. W.; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, W. Purpurin Suppresses *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Development. **Plos One**, v.7, n.11, nov, 2012.

WIBAWA, T.; NURROKHMANN, B. I.; DAELI, P. R.; KARTASASMITA, G.; WIJAYANTI, N. Cyclosporine A decreases the fluconazole minimum inhibitory concentration of *Candida albicans* clinical isolates but not biofilm formation and cell growth. **Tropical Biomedicine**, v. 32, n.1, p.176–182, 2015.

ZARNOWSKI, R. *et al.* Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **Mbio**, v.5, n.4, jul/ago, 2014.

ZHANG, W. *et al.* Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.5, mai, 2015.