

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Renan Vasconcelos da Graça Filho

PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO NA FILAMENTAÇÃO DE *Candida albicans* E SEUS IMPACTOS DURANTE A MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS

BELO HORIZONTE – MG
JULHO/2024

Renan Vasconcelos da Graça Filho

PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO NA FILAMENTAÇÃO DE *Candida albicans* E SEUS IMPACTOS DURANTE A MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob orientação do

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

**BELO HORIZONTE – MG
JULHO/2024**

- 043 Graça Filho, Renan Vasconcelos da.
Papel do metabolismo de triptofano na filamentação de *Candida albicans* e seus impactos durante a mucosite induzida por 5-fluorouracil em camundongos [manuscrito] / Renan Vasconcelos da Graça Filho. – 2024.
100 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Triptofano. 3. *Candida albicans*. 4. Mucosite. 5. Fluoruracila. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE RENAN VASCONCELOS DA GRAÇA FILHO

Nº REGISTRO: 2020713599

Às 09:00 horas do dia 09 de julho de 2024, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Frederico Marianetti Soriani (Departamento de Genética/ICB/UFMG), Rafael Wesley Bastos (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN), Ludmila de Matos Baltazar (Universidade Federal de Goiás) e o Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes (Orientador) para julgar o trabalho final **"PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO NA FILAMENTAÇÃO DE *Candida albicans* E SEUS IMPACTOS DURANTE A MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS"** do aluno Renan Vasconcelos da Graça Filho, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 09 de julho de 2024

Membros da Banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Pro. Dr. Frederico Marianetti Soriani

Prof. Dr. Rafael Wesley Bastos

Profa. Dra. Ludmila de Matos Baltazar

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
(Orientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Wesley Bastos, Usuário Externo**, em 11/07/2024, às 06:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2024, às 07:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/07/2024, às 07:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 11/07/2024, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ludmila de Matos Baltazar, Usuário Externo**, em 14/07/2024, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3299225 e o código CRC 82D5E55F.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço espiritualidade que caminha comigo, que até mesmo antes de conhecer, já me auxiliavam e guiavam para triunfar em meus sonhos e objetivos. Salve os encantados nossa terra! Laroyê ao povo que caminha pra todos os lados!

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela excelência em formação de seus discente, incluindo a mim. Por me proporcionar ótimas vivências acadêmicas, que sem dúvidas, foram fundamentais para minha formação.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa do Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Ao Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro (LIMHO) e ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (CPDF), pelo espaço para realização da pesquisa e aprendizado gerado.

Ao Professor Caio Tavares, primeiramente por sua disponibilidade para me receber como orientando, e segundo, por querer trabalhar com a famosa *Candida albicans*. Caio, você foi um excelente orientador, sempre contribuindo intelectualmente, discutindo resultados de forma minuciosa, se mostrando aberto para novos processos de metodológicos e de pesquisa e, me incentivando a explorar ao máximo o meu potencial. Muito obrigado!

À Professora Daniele da Glória, pelos ensinamentos, conversas, e por me proporcionar vivência em sala de aula no nível superior.

Aos meus amigos e colegas do LIMHO, que sem muitos de vocês, esse trabalho não seria metodologicamente executável, mas não quero agradecer apenas pela “mão de obra”, mas pelo companheirismo, pelos cafés na salinha, pelos almoços no bandejão, pelos rolês, e pelo “de volta pra minha terra” quando a bolsa atrasou.

À Professora Nalu Peres, por todas a conversas micológicas e conhecimentos passados durante aulas, treinamentos didáticos, conversas de corredor. Nalu, muito obrigado por tudo e por todo incentivo, você fez a diferença na minha formação!

Aos Matutos e agregados, que não pode chamar república, mas às vezes é. Foram muitas aventuras, histórias, comidas gostosas e litrinhos de cerveja quebrado na sala. Obrigado por todo companheirismo durante estes anos de doutorados.

À casa de Catimbó Mestre Junqueiro, não poderia deixar de agradecer a um dos meus grandes pontos de apoio em Belo Horizonte, que me ensinou o “*segredo da abelha, trabalhar sem ninguém ver*”. Meus irmãos e irmãs, muito obrigado, por tudo e por sempre estarem junto me apoiando e aguentando esse “renanzinho macumbeiro”. Aos meus sacerdotes, Pai Orestes Mineiro e Mãe Fran Peixoto, sou muito grato por todo apoio e orientação durante minha jornada, vocês me ensinaram muito e não existem palavras possam descrever o sentimento de gratidão a vocês!

E por último, mas não menos importante, aos meus familiares, que diante de todas as dificuldades sempre me incentivaram a seguir meus sonhos, a estudar e ser quem eu sou. Mãe, se hoje estou escrevendo uma tese é por que sigo o que a senhora sempre me ensinou “**Repete comigo: VAI DAR TUDO CERTO!**”. Muito obrigado, em especial, Rosane, Renan, Ryan, Rayanne, Rosier, Rosiene, Izaias, Rosieudo, Typhanne.

*“Quando a vida decepciona, qual a solução?
Continue a nadar! Continue a nadar!
Para achar a solução, nadar, nadar!”*

(Dory – Procurando Nemo, 2003)

RESUMO

Candida albicans é uma levedura polimórfica que faz parte de forma comensal da microbiota da maioria da população humana, podendo ser contratada em diversos sítios anatômicos, como o trato gastrointestinal (TGI). Em casos de desequilíbrios imunometabólicos, como mucosite intestinal causada por 5-fluorouracil (5-FU), *C. albicans* pode causar uma infecção oportunista e se favorecer dos nutrientes do hospedeiro, por exemplo, o triptofano (Trp). Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel do metabolismo de triptofano por *C. albicans* em um modelo de infecção oportunista em camundongos após quimioterapia. Para tanto, alguns parâmetros *in vitro* foram avaliados. Assim foram observados o crescimento, formação de biofilme e filimentação de *C. albicans* na presença e ausência de Trp. Como aminoácido controle foi usado tirosina. Foram usados dois meios de cultivos para estes testes, caldo sabouraud (SD) como meio de cultivo padrão e caldo *synthetic low dextrose* (SLD) como meio de cultivo quimicamente definido. Para os experimentos *in vivo*, foram usados animais C57BL/6j fêmeas de 7-8 semanas, estes receberam 1×10^7 de *C. albicans* na água de beber por 5 dias. Também durante esse modelo os animais foram tratados por via intraperitoneal com 5-FU (75 mg/Kg/dia) durante 3 dias. Assim, foram avaliados parâmetros clínicos, sobrevivência, análise histopatológica, carga fúngica e bacteriana no TGI, fezes, rim e fígado. Para estas análises foram feitas eutanásia no 5º ou 8º dia do protocolo experimental. Como análise estatística foram aplicados os testes de análise de variância (ANOVA) *Two-Way* seguido pelo teste de Tukey ou Sidak. Foi considerado $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo. Foi observado que *C. albicans* consegue crescer e formar biofilme na presença de Trp e que este aminoácido, mas não a tirosina, induz a filimentação desta levedura, de maneira concentração dependente. Quanto aos dados *in vivo*, *C. albicans* foi capaz de colonizar todos os órgãos do TGI em animais com mucosite, além de ter acentuado o quadro clínico dos animais, que apresentaram 100% de mortalidade. Houve também uma translocação bacteriana para o fígado e ceco em animais com mucosite com e sem *C. albicans*. Estes resultados sugerem que os sistemas *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos permitirão avaliar o impacto do metabolismo de triptofano para a infecção oportunista experimental por *C. albicans* após quimioterapia.

Palavras-Chave: Mucosite intestinal, Filimentação, Captação de aminoácidos; *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp.

ABSTRACT

Candida albicans is a polymorphic yeast that is a commensal part of the microbiota of the majority of the human population and can be contracted in several anatomical sites, such as the gastrointestinal tract (TGI). In cases of immunometabolic imbalances, such as intestinal mucositis caused by 5-fluorouracil (5-FU), *C. albicans* can cause an opportunistic infection and if it favors the host nutrients, for example tryptophan (Trp). This study aimed to evaluate the role of tryptophan metabolism by *C. albicans* in a model of opportunistic infection in mice after chemotherapy. Therefore, some in vitro parameters were evaluated. Thus, the growth, biofilm formation and filamentation of *C. albicans* were observed in the presence and absence of Trp. As a control amino acid tyrosine was used. Two culture media were used for these tests, Sabouraud broth (SD) as standard culture medium and synthetic low dextrose broth (SLD) as chemically defined culture medium. For in vivo experiments, animals C57BL/6j females of 7-8 weeks were used, these received 1×10^7 of *C. albicans* in drinking water for 5 days. Also during this model the animals were treated intraperitoneally with 5-FU (75 mg/kg/day) for 3 days. Thus, clinical parameters, survival, histopathological analysis, fungal and bacterial load in TGI, feces, kidney and liver were evaluated. Euthanasia was performed on the 5th or 8th day of the experimental protocol. Statistical analysis was applied to the two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey or Sidak test. It was considered $p \leq 0.05$ as statistically significant. It was observed that *C. albicans* can grow and form biofilm in the presence of Trp and that this amino acid, but not tyrosine, induces the filamentation of this yeast, in a dependent concentration. As for the in vivo data, *C. albicans* was able to colonize all TGI organs in animals with mucositis, besides having accentuated the clinical picture of the animals, which presented 100% mortality. There was also a bacterial translocation to the liver and cecum in animals with mucositis with and without *C. albicans*. These results suggest that the in vitro and in vivo systems developed will allow to evaluate the impact of tryptophan metabolism for experimental opportunistic infection by *C. albicans* after chemotherapy.

Keywords: Intestinal mucositis, Filamentation, Amino acid uptake; *Enterococcus* sp. , *Staphylococcus* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Colônias e morfologia microscópica de fungos do gênero <i>Candida</i>	16
Figura 2 — Diagrama esquemático da morfologia das células de <i>Candida albicans</i>	18
Figura 3 — Organização celular e da parede celular em <i>Candida albicans</i>	20
Figura 4 — Etapas de maturação de desenvolvimento do biofilme: 1- Adesão, 2- Formação de microcolônias, 3- Produção da matriz extracelular (MEC), 4- Maturação, 5- Dispersão	21
Figura 5 — Placa contendo meio para avaliação da produção de fosfolipases	23
Figura 6 — Estratificação de fungos patogênicos humanos quanto à importância epidemiológica segundo a World Health Organization.....	25
Figura 7- Etapas do desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos	27
Figura 8 — Metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal	29
Figura 9 — Pigmentação de <i>Candida albicans</i>	32
Figura 10 — Protocolo experimental para avaliação da infecção oportunista por <i>Candida albicans</i>	41
Figura 11 — Esquematização do processo para análise de carga fúngica e/ou bacteriana.....	44
Figura 12 — A colonização por <i>C. albicans</i> acentua a susceptibilidade de animais à quimioterapia com 5-FU	50
Figura 13 – Contagem total de leucócitos no sangue periférico.....	51
Figura 14 – Carga fúngica em diferentes tecidos dos animais colonizados com <i>C. albicans</i> SC5314 com e sem mucosite em dois tempos de avaliação	53
Figura 15 - Carga fúngica em diferentes tecidos dos animais colonizados com <i>C. albicans</i> BSC1 com e sem mucosite em dois tempos de avaliação	54
Figura 16 – Avaliação histológica do íleo de animais submetidos ou não a mucosite intestinal	56
Figura 17 — Tratamento com 5-FU leva a discreta alteração estrutural na microbiota fecal de camundongos independentemente da exposição a <i>C. albicans</i>	59
Figura 18 — Alterações na abundância relativa de OTUs na microbiota dos animais submetidos ao protocolo de quimioterapia pós exposição a <i>C. albicans</i>	60
Figura 19 — Aumento relativo da abundância de gêneros da microbiota bacteriana em relação ao grupo PBS	62
Figura 20 — Contagem diferencial de bactérias nas fezes, íleo e fígado nos grupos expostos ou não a <i>C. albicans</i>	63
Figura 21 — Tratamento com antimicrobianos no protocolo experimental da mucosite com <i>C. albicans</i>	65

Figura 22 — Razão entre metabólitos de triptofano e triptofano no íleo de plasma dos animais com mucosite intestinal.....	68
Figura 23 – Parâmetros de avaliação in vitro dos fenótipos de <i>Candida albicans</i> na presença de triptofano para linhagem SC5314 (próxima página)	68
Figura 24- Avaliação do crescimento e filamentação de <i>C. albicans</i> na presença de triptofano para linhagem BSC1.	71
Figura 25 — Comparação do crescimento e filamentação de <i>C. albicans</i> em meio quimicamente definido com uso de dois aminoácidos para linhagem SC5314.....	71
Figura 26 — Fenótipo de filamentação na presença de triptofano em linhagens mutantes para proteínas SPS da via de sensoriamento de aminoácidos em <i>Candida albicans</i>.	72
Figura 27 — Escore clínico e curva de sobrevivência com as linhagens mutantes para via SPS e aminopermeases	75
Figura 28 — Eutanásia dos camundongos no 5º dia do protocolo experimental com a linhagem mutante para gene <i>Gnp1</i>.	76

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	<i>Candida spp.</i>	16
1.1.1	<i>Candida albicans: aspectos morfológicos e estruturais</i>	17
1.1.2	<i>Virulência em Candida albicans</i>	19
1.1.3	<i>Infecções oportunistas por Candida albicans</i>	24
1.2	Mucosite gastrointestinal induzida por quimioterápicos	26
1.3	Metabolismo do triptofano	28
1.3.1	<i>Metabolismo do triptofano por Candida albicans e seu efeito na virulência</i> ...	29
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Geral	36
3.2	Específicos	36
4	METODOLOGIA	38
4.1	Meios de cultivo	38
4.2	Manutenção e preparo de inóculos das linhagens de <i>Candida albicans</i>	38
4.3	Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações de triptofano	38
4.4	Ensaio de formação de biofilme por <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações de triptofano	39
4.5	Ensaio de filamentação de <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações de triptofano	39
4.6	Ensaio para avaliar o comprimento da hifa de <i>Candida albicans</i> na presença de triptofano	40
4.7	Ensaio para avaliação da morfologia da colônia de <i>Candida albicans</i> na presença de triptofano	40

	4.8	Ensaio de produção e quantificação de proteases por <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações de triptofano.....	40
	4.9	Animais experimentais.....	41
	4.10	Estratégia experimental e parâmetros avaliados.....	41
	4.11	Tratamentos.....	42
	4.11.1	<i>Quimioterapia</i>	42
	4.11.2	<i>Antimicrobianos</i>	42
	4.12	Infecção experimental por <i>Candida albicans</i>	43
	4.13	Determinação do escore clínico após infecção por <i>Candida albicans</i>.....	43
	4.14	Carga fúngica e bacteriana.....	43
	4.14.1	<i>Avaliação da carga fúngica e/ou bacteriana nos órgãos</i>	44
	4.14.2	<i>Avaliação da carga fúngica e/ou bacteriana nas fezes</i>	44
	4.14.3	<i>Análise de sequenciamento metagenômico</i>	45
	4.14.4	<i>Razão Metabólitos/Triptofano</i>	45
	4.15	Análise histopatológica	46
	4.16	Análise estatística	46
5		RESULTADOS.....	48
	5.1	<i>Candida albicans</i> coloniza o trato gastrointestinal dos camundongos em quimioterapia e acentua o quadro de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	48
	5.2	A colonização por <i>C. albicans</i> acentua a lesão intestinal e altera a microbiota fecal de camundongos com mucosite induzida por 5-FU.....	55
	5.3	O aumento da disponibilidade de triptofano, mas não tirosina, favorece alterações morfológicas em <i>C. albicans</i>, promovendo a filamentação	66
	5.4	O fenótipo de filamentação por triptofano em <i>C. albicans</i> é dependente de proteínas da via SPS de sensoriamento de aminoácidos e mutantes para essa via são menos virulentos após infecção de animais sob quimioterapia.....	70
6		DISCUSSÃO.....	77

REFERÊNCIAS	83
ANEXOS.....	97
ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA 84/2022.....	97
ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA 275/2023.....	98
ANEXO 3 - CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO: MELHOR TRABALHO NA CATEGORIA ALUNO DE DOUTORADO NO X CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA	99

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Candida* spp.

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 150 espécies. Estas leveduras podem ser diploides ou haploides, pertencem ao Reino *Fungi*, sub-reino *Dikarya*, filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes* e a família *Debaryomycetaceae* (SCHOCH *et al.*, 2020). Quanto às suas características macroscópicas, possuem colônias glabras de coloração branca. Microscopicamente, são unicelulares, e grande parte das espécies apresentam pseudohifas em sua estrutura microscópica (Figura 1). Estas leveduras podem ser encontradas em diversos ambientes, incluindo a microbiota de seres humanos e são consideradas como agentes de infecções oportunistas e e muco-cutâneas (SIDRIM; ROCHA, 2004; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

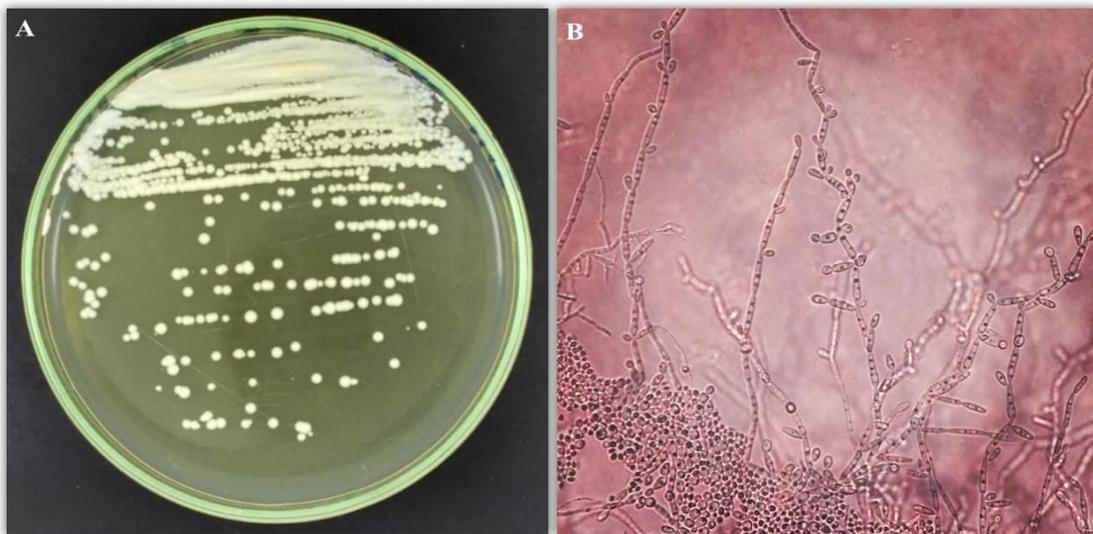


Figura 1 — Colônias e morfologia microscópica de fungos do gênero *Candida*. A- Colônias de leveduras do gênero *Candida* em ágar batata. B- Microcultivo de *Candida parapsilosis lato sensu* em ágar corn-meal acrescido de Tween 80%. Fonte: Próprio Autor, 2019.

As espécies do gênero *Candida* estão associadas a diversas infecções, sendo os principais e mais representativos organismos do reino *Fungi* associados a micoses. Dentre elas, estão as infecções sistêmicas, caracterizadas por acometer a corrente sanguínea. (GARCIA *et al.*, 2007; HILLER *et al.*, 2011; BADIEEL *et al.*, 2017). Assim, são relatadas na literatura cerca de 13 espécies do gênero causando doenças em animais (ou humanos). Dentre as espécies mais

comumente isoladas deste gênero, *Candida albicans* é a mais prevalente tanto em humanos como em animais. As espécies *C. famata*, *C. glabrata*, *C. auris*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* também estão associadas a infecções (HILLER *et al.*, 2011; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; OLIVEIRA, 2012; BADIEEL *et al.*, 2017).

1.1.1 *Candida albicans*: aspectos morfológicos e estruturais

Candida albicans é um microrganismo comumente comensal presente na microbiota de humanos e de alguns mamíferos. Esta espécie coloniza as superfícies mucosas de indivíduos saudáveis e é considerada como um componente normal da microbiota do trato gastrointestinal e das vias geniturinárias (KAM; XU 2002). *C. albicans* se reproduz, predominantemente, de forma assexuada, por formação de clones (PUJOL *et al.*, 1993; LOCKHART *et al.*, 1995; MATA *et al.*, 2000).

A espécie *C. albicans* difere das demais espécies de *Candida* por apresentar, principalmente, uma importante característica: pode existir em três fases morfológicas simultâneas: levedura, pseudo-hifa e hifa, fenômeno chamado de polimorfismo. Por conta desta plasticidade morfológica, *C. albicans* consegue adaptar-se a diversos ambiente microecológicos (CHEN *et al.*, 2020).

As células leveduriformes, morfologia padrão na maioria das condições *in vitro* e durante o comensalismo, são redondas ou ovóides, têm uma organização unicelular, podendo estar envolvidas na formação de biofilmes, permanecendo de forma comensal na pele, vagina ou cavidade oral, por exemplo (ANDES *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2020). Já as células encontradas como pseudo-hifas têm formas longas, elípticas e multicelulares, podendo ser induzidas a pH 6,0, temperatura de 35°C e em meio sólido pobre em nitrogênio (SOL; STASI; BEDELL, 1978; SUBDERY, 2001). Segundo Chen *et al.*, (2020), as pseudo-hifas de *C. albicans* podem variar vastamente quanto a sua largura e comprimento, de modo que, em um extremo, se assemelham a hifas e, em outro, assemelham-se a brotamentos alongados de blastoconídeos. Assim, as pseudohifas possuem largura de cada segmento do micélio inconstante, sendo mais larga no centro do que nas extremidades (Figura 2) (CHEN *et al.*, 2020).

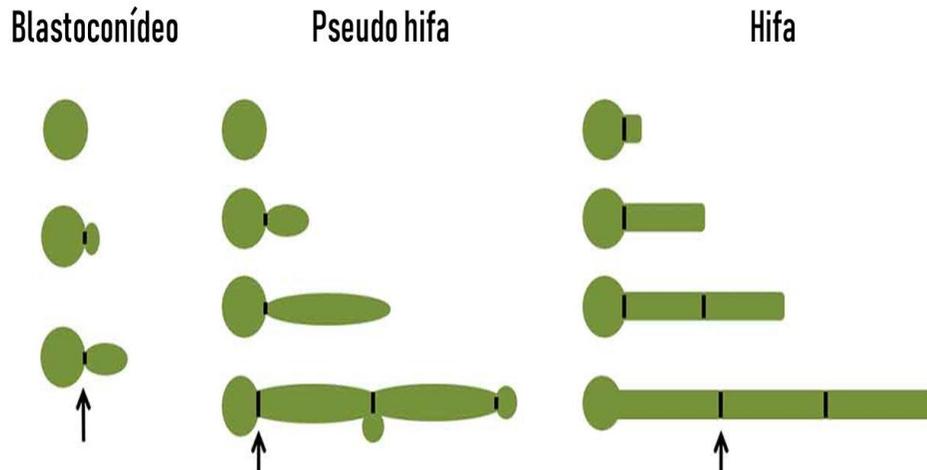


Figura 2 — Diagrama

esquemático da morfologia das células de *Candida albicans*. Blastoconídeo, pseudo hifa e hifa. As setas pretas indicam o anel de septina. Fonte: CHEN *et al.*, 2020, Adaptado.

As hifas de *C. albicans* assumem formas tubulares e multicelulares, que podem ser induzidas quando incubadas a 37°C, em contato com N-acetil-glucosamina, baixa disponibilidade de oxigênio, alta disponibilidade de CO₂ e pH alcalino, *in vitro* (CASSONE; SULLIVAN; PASTOR, 1985; SAPORITO-IRWIN *et al.*, 1995; NAMBA *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2016). A hifa se desenvolve a partir de uma célula de levedura não germinada, sem constrição do colo da célula mãe e com lados paralelos ao longo de seu comprimento (CHEN *et al.*, 2020).

Além disso, *C. albicans* se destaca das demais por apresentar clamidoconídios, que são células esféricas com parede celular dupla e relacionadas a resistência. Estas estruturas podem ser encontradas na região terminal das hifas ou aparecer de forma intercalada na estrutura hifal. Os clamidoconídios não possuem função biológica conhecida e descrita na literatura e pouco se sabe sobre seu desenvolvimento. Estas formas têm sido relatadas ocasionalmente em hospedeiros humanos sem indícios de uma participação direta no processo de infecção e patogenicidade de *C. albicans* (CHABASSE *et al.*, 1988; STAIB; MORSCHHÄUSER, 2007). Assim, estes microrganismos mostram-se altamente adaptáveis, podendo assim causar desde disfunções fisiológicas até infecções invasivas graves. (ALVARES; TIE; MEL, 2007; VARANO *et al.*, 2019).

1.1.2 Virulência em *Candida albicans*

Pode-se definir fatores de virulência como “arsenais” ou “maquinários” de microrganismos que estão envolvidos na patogenicidade, conferindo a eles mais capacidade de colonizar e burlar as defesas do hospedeiro e criar condições adequadas para a sua sobrevivência, propagação, crescimento e desenvolvimento nos tecidos infectados. Assim a virulência de um microrganismo se dá pelo resultado de uma multiplicidade de fatores que atuam concomitantemente para vencer as barreiras do hospedeiro (NAGLIK; ALBRECHT; BADER 2004; SCHALLER *et al.*, 2005).

Dentre esses fatores de virulência associados à espécie *C. albicans*, pode-se citar: aderência às células epiteliais, formação de biofilme, produção de proteases e fosfolipases, formação de hifa verdadeira, dimorfismo, penetração através do tecido, produção de candidalísina dentre outros (BRILHANTE *et al.*, 2015; CORDEIRO *et al.*, 2016; MOYES *et al.*, 2016; BRILHANTE *et al.*, 2018).

A adesão da levedura ao tecido se dá através de uma combinação de interações específicas e não específicas, bem como as interações eletrostáticas e hidrofóbicas da superfície celular com as estruturas dos tecidos hospedeiros (COTTER; KAVANAGH 2000; GONG *et al.*, 2020). As adesinas são componentes de *C. albicans* que auxiliam no reconhecimento e colonização de tecidos do hospedeiro, constituindo um importante fator na manutenção dos estados comensais e patogênicos (RAUCEO *et al.*, 2006; DEHULLU *et al.*, 2019).

As famílias de adesinas Hwp1, ALS e EPA são adesinas bem caracterizadas de *C. albicans* (KAPTEYN *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2004; KUMARI *et al.*, 2021). Já foi descrito uma afinidade de ligação para proteínas de matriz extracelular e componentes de células epiteliais para alguns membros da família ALS (sequência semelhante à aglutinina) (SUNDSTROM, 1999; HOYER 2001). Uma linhagem de *C. albicans* mutante para Als3 mostrou ligação ineficiente quando testadas em linhagens de células endoteliais (BEC e HUVEC) (ZHAO *et al.*, 2004). Outra importante adesina citada na literatura é a codificada pelo gene *Hwp1*, este é expresso diferencialmente entre os tubos germinativos e hifas, codificando uma manoproteína Hwp1 (STAAB *et al.*, 1999). Staab *et al.*, verificou em 1999 que *C. albicans* sem Hwp1 tem uma adesão instável a células epiteliais de humanos, além de ter uma capacidade reduzida de induzir a

candidíase sistêmica em camundongos. Além disso, a expressão de Hwp1 tem mais importância na candidíase de mucosas (KARTASOVA *et al.*, 1988; BALISH *et al.*, 2001).

As interações entre *C. albicans* e a superfície celular do hospedeiro são também mediadas por componentes da parede celular do fungo (DALLE *et al.*, 2003; BRAUNER *et al.*, 2018).

Do ponto de vista estrutural, a parede celular fúngica está encarregada de conferir proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos do meio, contribuindo para a patogenicidade, interação célula-hospedeiro, resposta imune e dinamismos durante o processo de crescimento e estresse celular. Os principais constituintes desta parede são: polissacarídeos, glicanos, mananas e quitinas (Figura 3) (NATHER; MUNRO, 2008). Manoproteínas e mananas são geralmente distribuídas ao longo da superfície da parede celular; já a camada mais interna é composta, principalmente, de quitina e glicanos (MACULLOUGH; ROSS; READE 1996). A quitina é um componente essencial para o desenvolvimento, crescimento e viabilidade de fungos patogênicos (LENARDON *et al.*, 2010) A plasticidade da parede celular é estabelecida pelas moléculas de glicanas, sendo estas moléculas também responsáveis pela interação hospedeiro-levedura, além de desempenhar um papel crucial no comensalismo e colonização e na resistência a medicamentos (POULAIN; JOUAULT 2004).

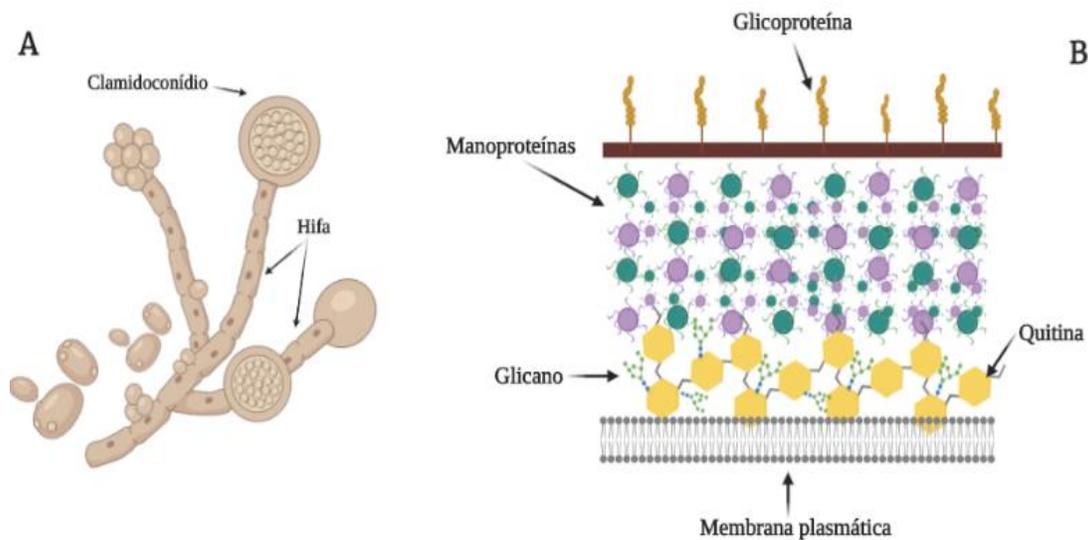


Figura 3 — Organização celular e da parede celular em *Candida albicans*. A- Hifas de *Candida albicans* com clamidoconídios. B- Esquema da parede celular de *Candida albicans*. Próprio Autor (Criado em biorender.com), 2022.

Acreditava-se que a maioria dos microrganismos vivia de uma maneira autônoma, tanto no ambiente como no hospedeiro, a chamada forma planctônica. Contudo, há mais de duas décadas, descobriu-se que microrganismos em seu hábitat natural podem viver em comunidades microbianas sésseis, chamadas de biofilme. Essa descoberta tornou-se particularmente importante, uma vez que foi atribuída à patogenicidade de muitas enfermidades (RAMAGE *et al.*, 2012, SUN *et al.*, 2013).

O biofilme fúngico é uma comunidade complexa e dinâmica de células aderidas a um substrato, biótico ou abiótico, e protegidas por uma matriz extracelular (MEC). As etapas de formação do biofilme são as seguintes: adesão, formação de microcolônias, produção de matriz extracelular, maturação e dispersão (Figura 4) (RAMAGE *et al.*, 2012).

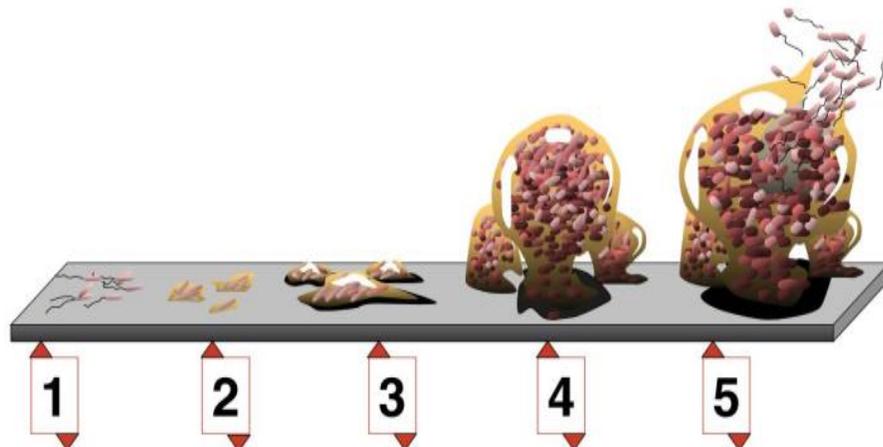


Figura 4 — Etapas de maturação de desenvolvimento do biofilme: 1- Adesão, 2- Formação de microcolônias, 3- Produção da matriz extracelular (MEC), 4- Maturação, 5- Dispersão. Fonte: MONROE, 2007. Imagem adaptada.

O seu principal atributo é a produção da matriz extracelular, cuja composição varia dependendo da espécie fúngica, reduzindo a capacidade de penetração, permitindo ao fungo montar estratégias de sobrevivência ou tolerância, podendo surgir, desse modo, as células persistentes. A resistência do biofilme fúngico é complexa e envolve vários mecanismos, dentre eles a superexpressão da bombas de efluxo codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, a interação com o sistema imunológico do hospedeiro e a expressão de proteínas que conduzem à filamentação (RAMAGE *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2013).

A produção de enzimas hidrolíticas como proteases e fosfolipases em fungos também é bastante relacionada à patogenicidade e virulência (KANTARCIOGLU; YUCEL, 2002; KUMAR *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Existem vários métodos para avaliação enzimática da produção dessas enzimas, como por exemplo a avaliação da produção de proteases *in vitro*. Este consiste na utilização de um meio de cultura contendo albumina sérica bovina (BSA – Sigma, USA), assim é observado a formação de uma zona de precipitação (Pz) ao redor da colônia, quando a atividade de proteases é positiva (AOKI *et al.*, 1994).

Uma importante família de hidrolases de *C. albicans* são as proteases aspárticas secretadas (SAPs), que inclui 10 membros, Sap1-10. Porém apenas as Sap1-8 são secretadas e liberadas no meio extracelular, enquanto Sap9 e Sap10 permanecem ligadas à superfície celular (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; ALBRECHT *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que Sap1-3 estão diretamente relacionadas a danos epiteliais *in vitro* e à virulência em modelo murino de candidíase sistêmica (LERMANN; MORSCHHÄUSER, 2008; CORREIA *et al.*, 2010). Borg-Von Zepelin *et al.*, (1998) observaram a expressão de *SAP4-5* induzida por macrófagos murinos após fagocitose. Estes dados reforçam que SAPs podem ser expressas em estágios diferentes de infecção por *C. albicans*, demonstrando assim ser um importante fator de virulência durante a patogênese.

No caso da avaliação da produção de fosfolipases, existe um método descrito por Price *et al.* (1982) que utiliza ágar Sabouraud dextrose acrescido de gema de ovo, a qual é rica em fosfolipídios. Assim o fungo é semeado neste meio e quando há atividade enzimática é possível observar uma densa zona de precipitação (Pz) ao redor da colônia (Figura 5). Estas enzimas alteram, danificam e até mesmo destroem a integridade da membrana plasmática das células do hospedeiro, interrompendo as atividades fisiológicas celulares. Leveduras como *C. albicans*, que são capazes de promover a filamentação, conseguem penetrar em tecidos, o que, possivelmente está associado com a eficácia destas enzimas hidrolíticas em promover a disseminação do fungo (RINALDI, 1993; CANABARRO *et al.*, 2009; CAMPOS; BARONI, 2010).

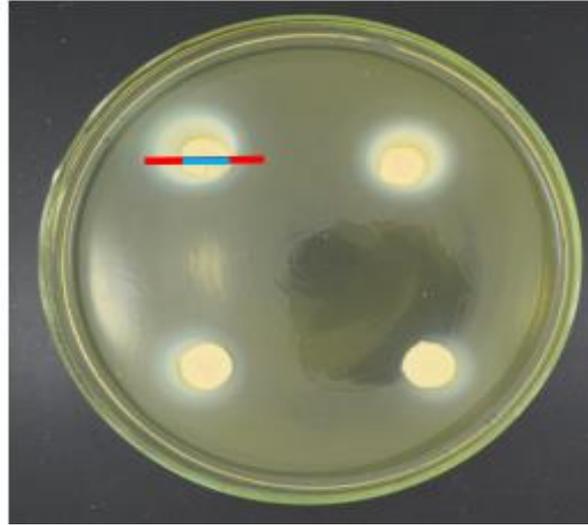


Figura 5 — Placa contendo meio para avaliação da produção de fosfolipases. Pode-se observar uma zona de precipitação esbranquiçada e opaca ao redor da colônia, sendo indicativo da produção enzimática. A linha azul expressa o diâmetro da colônia e a vermelha o diâmetro total. Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), 2017.

Outro importante fator de virulência de *C. albicans* é a sua plasticidade morfológica. Por conta desse polimorfismo, esta espécie cresce como levedura, pseudo-hifa e hifas verdadeiras (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). São diversos os estímulos que podem afetar a morfologia de *C. albicans*. Por exemplo, em pH baixo (<6), as células desta espécie crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto em pH alto (>7) o crescimento de hifas é induzido (ODDS, 1988). Outros fatores como quantidade de nutrientes disponíveis, presença de soro ou de N-acetilglucosamina, temperatura de 37°C e tensão de CO₂, também podem induzir a formação de hifas em *C. albicans* (SUDBERY, 2011). Essa transição entre as formas de crescimento de levedura e hifa é denominada de dimorfismo e ambas as formas são importantes para a patogenicidade (JACOBSEN *et al.*, 2012). Porém a forma filamentosa demonstrou ser mais invasiva que a forma de levedura (BERMAN; PETER, 2002). Por outro lado, acredita-se que a forma unicelular menor esteja envolvida na disseminação durante a patogênese (SAVILLE *et al.*, 2003).

Foi observado em experimentos *in vitro* que linhagens de *C. albicans* mutantes para *egf1* eram incapazes de formar hifas verdadeiras e esta condição atenuou a virulência em modelo murino (LO *et al.*, 1997). Ainda, a formação de hifas está ligada à expressão de um subconjunto de genes

que codificam fatores de virulência que podem não estar associados apenas a forma filamentosa da *C. albicans*, por exemplo, *hwp1*, *als3* e algumas SAPs citadas anteriormente (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

1.1.3 Infecções oportunistas por *Candida albicans*

Segundo Varano *et al.* (2019), a interação entre o hospedeiro e o fungo pode ser comensal ou parasitaria. As infecções podem se manifestar de duas formas, por vias endógenas, quando o hospedeiro se mostra vulnerável e as espécies da microbiota agem de forma oportunista; ou por via exógena, quando o hospedeiro adquire o microrganismo de uma fonte externa (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

As infecções oportunistas por fungos são uma causa crescente de morbidade em todo o mundo. *C. albicans* é uma das leveduras causadoras de doenças com maior prevalência nos seres humanos (KIRCHNER *et al.*, 2019). Segundo a *World Health Organization* (WHO) a candidíase invasiva causada por *C. albicans* tem uma mortalidade global que varia de 20% a 50% dos casos. Se levarmos em consideração ainda a disponibilidade de tratamento antifúngico, além do período de permanência hospitalar, estes quadros podem favorecer complicações secundárias que podem agravar os casos de candidíase (WHO, 2022). Por esses motivos em 2022, a WHO adicionou *C. albicans* ao grupo dos fungos de prioridade crítica para o desenvolvimento de novas terapias (Figura 6).

Para o desenvolvimento de uma micose por *C. albicans*, geralmente, é preciso que exista uma deficiência na imunidade do hospedeiro, incluindo aqueles indivíduos imunodeficientes, como hospedeiros infectados por HIV ou que tenham alteração na microbiota normal por conta do

tratamento com antibióticos, quimioterápicos, radioterápicos e terapias imunossupressoras (PUEL *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2014; GONCALVES *et al.*, 2016).

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figura 6 — Estratificação de fungos patogênicos humanos quanto à importância epidemiológica segundo a *World Health Organization*. Fonte: WHO, 2022.

Além destes fatores, alguns estudos descrevem variações genéticas dentro da espécie *C. albicans*, favorecendo uma diversidade fenotípica que modula sua patogenicidade nas superfícies epiteliais e sistemicamente (ODDS *et al.*, 2007; SCHÖNHERR *et al.*, 2017). Assim, a linha tênue entre comensalismo/doença no caso da interação com *C. albicans* é resultado de um equilíbrio entre potencial de virulência fúngica e mecanismos de defesa do hospedeiro (KIRCHNER *et al.*, 2019).

As infecções por *C. albicans*, como candidíase orofaríngea e gastrointestinal, são comuns em pacientes que fazem uso de quimioterápicos em altas doses (BERTOLINI *et al.*, 2019). A quimioterapia citotóxica também pode causar lesões na mucosa, que combinada com os efeitos mielossupressores da terapia, pode favorecer a translocação fúngica e bacteriana, que ultrapassam

as barreiras da mucosa, causando assim uma infecção sistêmica, sendo essa a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes que fazem uso de quimioterapia antineoplásica (COLE; HALAWA; ANAISSIE, 1996).

1.2 Mucosite gastrointestinal induzida por quimioterápicos

A mucosite pode ser definida como uma inflamação das membranas mucosas que revestem o trato gastrointestinal (TGI) que leva a alterações estruturais, funcionais e imunológicas. Como esse processo inflamatório não pode ser examinado visualmente, geralmente é diagnosticado por meio de sintomas clínicos ou biomarcadores relevantes (SOUGIANNIS *et al.*, 2021). O dano à mucosa intestinal é uma das principais causas para a redução da qualidade de vida, diminuição das taxas de sobrevida e início precoce da morte observada em paciente em uso de quimioterápicos citotóxicos (CINAUSERO *et al.*, 2017; BASILE *et al.*, 2019).

O TGI é responsável pela digestão e absorção de nutrientes, especificamente no intestino delgado. A destruição das vilosidades intestinais durante a mucosite intestinal reduz a superfície de absorção do intestino delgado (KEEFE, 2007; BASILE *et al.*, 2019). Vale ressaltar que o epitélio intestinal é um dos tecidos de maior atividade proliferativa, e assim, antineoplásicos como o 5-fluorouracil (5-FU) têm ação direta neste epitélio saudável, interrompendo a síntese de DNA e levando as células à apoptose (DELGADO; GRABINGER; BRUNNER, 2016).

A mucosite induzida por quimioterapia (MIQ) é comumente descrita por cinco fases: 1- início (0-2 dias), 2- regulação positiva e ativação de mensageiros (2-3 dias), 3- amplificação do sinal (2-5 dias), 4- ulceração com inflamação (5-14 dias) e 5- cicatrização (14-21 dias) (Figura 7) (SONIS *et al.*, 1990; 2004). Geralmente após o início é possível observar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de NF- κ B, que resultará em uma regulação positiva de aproximadamente 200 mediadores, principalmente TNF e citocinas pró-inflamatórias. Assim, TNF, IL-6, IL-1 β e COX2 podem ser detectadas durante a amplificação do sinal (2-5 dias). Ainda nesse período existe uma ativação de TLR por bactérias intestinais, levando a regulação positiva de NF- κ B por meio de múltiplas vias de sinalização, agravando mais a resposta inflamatória (REFAAT *et al.*, 2015).

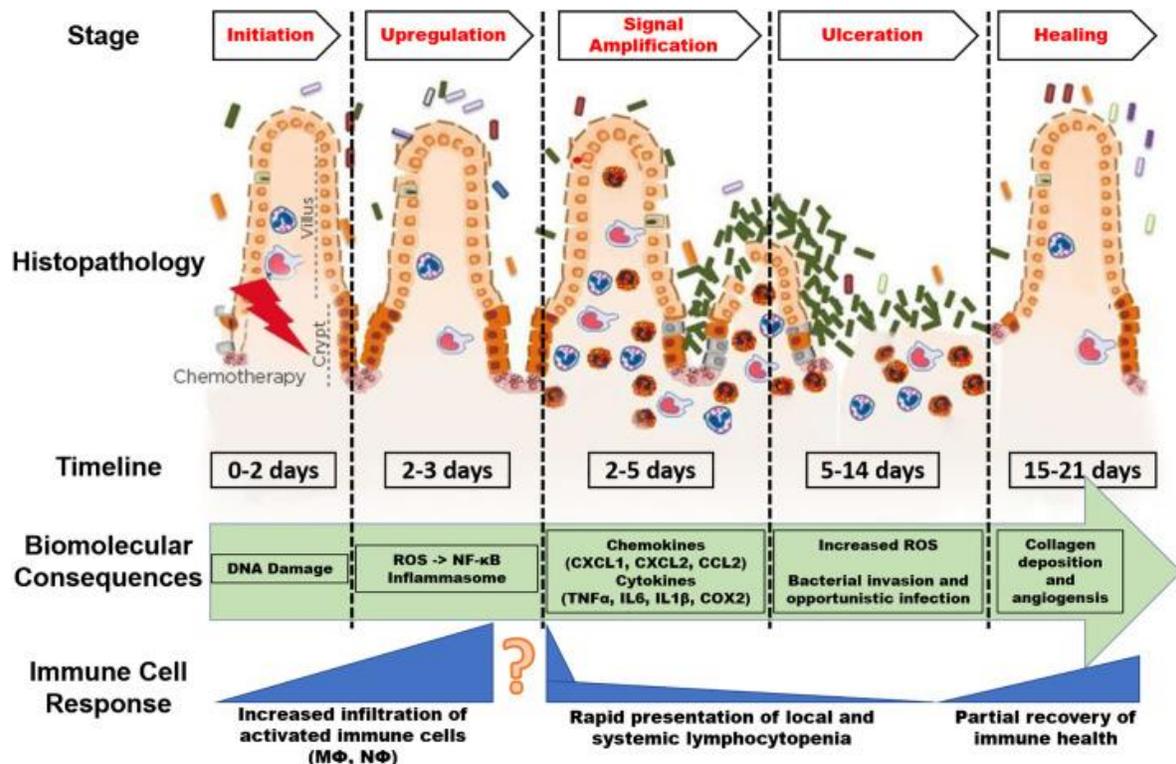


Figura 7- Etapas do desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos. Este modelo ilustra os diversos eventos envolvidos na mucosite em escala sequencial de dias. Fonte: MENEZES-GARCIA, 2018.

A produção de ROS também é responsável por mediar a ativação de inflamassomas durante a MIQ (SWANSON *et al.*, 2019), complexos responsáveis pelo controle da liberação de IL-1 β e IL-18. Foi observado que a produção de ROS após o tratamento com irinotecano aumentou a clivagem da caspase-1 e subsequentemente a liberação de IL-1 β e IL-18 (ARIFA *et al.*, 2014). Assim, foi demonstrado que essa rápida destruição da mucosa intestinal induz uma tempestade debilitante de citocinas que pode exacerbar os efeitos negativos desses quimioterápicos (RONALDO *et al.*, 2016; CINAUSERO *et al.*, 2017; BASILE *et al.*, 2019).

Assim, à medida que ocorre a liberação crescente de citocinas pró-inflamatórias, que é intensificada por 2 a 5 dias após tratamento com quimioterápico, a expressão aumentada de TNF e quimiocinas causam o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local do dano (KEEFE, 2007). Finalmente, a ulceração na camada epitelial (fase 4) é um evento final decorrente das lesões teciduais e da morte celular, levando ao aumento da liberação de ROS, o que acentua o dano à camada submucosa e intensifica os efeitos debilitantes ocasionados pela quimioterapia (YASUDA

et al., 2012). Todos estes eventos são mais intensos especialmente em pacientes que recebem múltiplas doses de quimioterapia (SOUGIANNIS *et al.*, 2021).

Alguns estudos relatam que a microbiota bacteriana oral e intestinal pode ser alterada pela quimioterapia citotóxica, essa alteração ou desequilíbrio é chamada de disbiose e favorece a infecção oportunista por *C. albicans* (BERTOLINI *et al.*, 2019; TEOH; PAVELKA, 2016). Em hospedeiros saudáveis, a microbiota bacteriana residente não disbiótica desempenha um importante papel no controle do crescimento e colonização de *C. albicans* em mucosas (XU; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2015). No entanto, quando o equilíbrio bacteriano é perturbado pela imunossupressão, algumas espécies bacterianas podem crescer em excesso e formar associações mutualísticas com *C. albicans* (BERTOLINI *et al.*, 2019; 2021). Este processo pode levar a uma disbiose contínua que amplifica o dano à mucosa. Estudos recentes demonstraram associações sinérgicas entre *C. albicans* com a microbiota bacteriana intestinal, como *Enterococcus faecalis*, em modelos de mucosite induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) (BERTOLINI *et al.*, 2019; 2021). Em 2021, Bartolini *et al.*, mostraram que fatores de modulação local, como a biodisponibilidade nutricional, alteram a interação bactéria-fungo (BERTOLINI *et al.*, 2021).

1.3 Metabolismo do triptofano

O triptofano (TRP) é um aminoácido apolar e o único aminoácido que contém um anel indol, sendo obtido pelo ser humano exclusivamente pelo catabolismo de proteínas da dieta, podendo ser encontrado em uma variedade de alimentos ricos em proteínas como carnes, peixes e ovos (ROAGER; LICHT, 2018). No hospedeiro humano, o triptofano pode ser metabolizado através da via das quinureninas, que é a via metabólica mais ativa no trato gastrointestinal. Essa via é realizada pelas enzimas indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO1) e triptofano-2,3-dioxigenase (TDO2), produzindo as quinureninas (KYN) (ZELANTE *et al.*, 2013; HUBBARD; MURRAY, PERDEW, 2015). Além disso, o triptofano pode também ser metabolizado pela via da serotonina (HUBBARD; MURRAY, PERDEW, 2015).

A microbiota intestinal tem também um importante papel no metabolismo do triptofano. As enzimas bacterianas triptofanase (TnA) são responsáveis pelo catabolismo do TRP, produzindo como produto o indol, que pode ser detectado no intestino de humanos e de camundongos em uma concentração que varia de 250-1100 μM (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015). Os

metabólitos gerados são absorvidos pelo epitélio intestinal e podem desempenhar papel imunoregulador, agindo como moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes, ou até mesmo exercer efeito citotóxico (Figura 8) (ROAGER; LICHT, 2018).

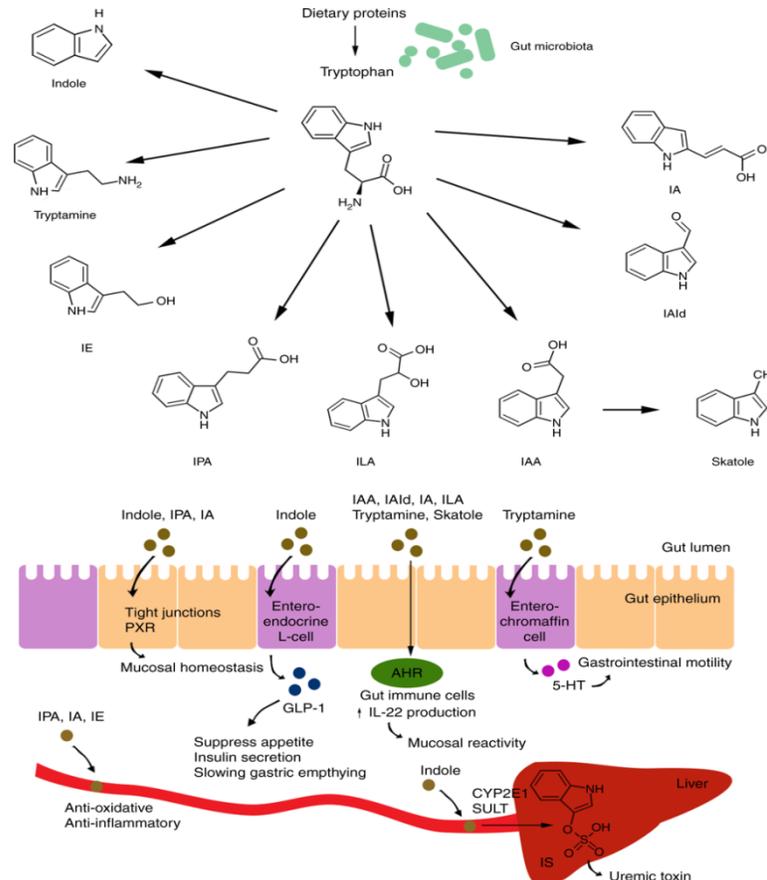


Figura 8 — Metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal. A degradação do TRP por enzimas diversas libera catabólitos como indol, triptamina, triptofol (IE), ácido indolpropiónico (IPA), ácido indoloilático (ILA), ácido indoloilacético (IAA), indolaldeído (IAId) e ácido indoloilacrílico (IA) que podem alterar ou afetar a fisiologia do hospedeiro por diversas maneiras. Fonte: ROAGER; LICHT, 2018.

1.3.1 Metabolismo do triptofano por *Candida albicans* e seu efeito na virulência

Os fungos desenvolveram diversas estratégias de detecção e meios reguladores para monitorar e utilizar aminoácidos extracelulares, por exemplo, a repressão do catabolismo de nitrogênio (NCR), a via do alvo da rapamicina (TOR) e a detecção mediada por sensores de aminoácidos (SPS). Muitos fungos utilizam preferencialmente amônio, glutamina e glutamato

como fontes de nitrogênio; por outro lado, nitratos, nitritos, purinas, amidas e outros aminoácidos são utilizados quando as fontes primárias são escassas (GARBE; VYLKOVA, 2019)

Assim vias alternativas são ativadas, como por exemplo a via de fatores de transcrição do tipo GATA, como Gat1 e Gln3. Estudos mostram que, em *Candida albicans*, essas vias secundárias de captação de aminoácidos são necessárias para ativação de fatores de virulência e sobrevivência no hospedeiro (LIMJINDAPORN *et al.*, 2003; DABAS; MORSCHHÄUSER, 2007; LIAO *et al.*, 2008,). Já a via TOR em *C. albicans* parece estar relacionada com a expressão de permeases de aminoácidos (AAPs) (BASTIDAS *et al.*, 2009). Estudos recentes sugerem que o metabolismo de aminoácidos por *C. albicans* intensifica a expressão de fatores de virulência e agravam a infecção por este fungo (BÖTTCHER *et al.*, 2020; MIRAMÓN *et al.*, 2020; GARBE *et al.*, 2022). Um dos métodos descritos de detecção de aminoácidos em *C. albicans* são os sensores SPS localizados na membrana plasmática. As linhagens sem sensores SPS tem capacidade reduzida na absorção de aminoácidos, na filamentação na presença de soro e são menos virulentas durante a infecção sistêmica em camundongos (BREGA; ZUFFEREY; MAMOUN, 2004; VYLKOVA; LORENZ, 2014). Estes achados fornecem um claro exemplo de como processos fisiológicos básicos, como aquisição de nitrogênio via aminoácidos, podem se tornar importantes para a virulência de *C. albicans*.

Pode-se citar como importantes sensores SPS o Ssy1, Ptr3 e Ssy5, que permitem que células detectem e respondam à presença de aminoácidos extracelulares (MARTÍNEZ; LJUNGDAHL, 2005; MIRAMÓN; LORENZ, 2016). Já foi demonstrado que a sinalização SPS controla a ativação de alguns fatores de transcrição que ativam genes de permeases para aminoácidos (AAP). Uma vez que os sensores SPS detectam os aminoácidos, cascatas bioquímicas são ativadas no citoplasma da célula fúngica juntamente com ativação de fatores de transcrição como Stp1 e Stp2; Estes, por sua vez, induzem e regulam diversos processos metabólicos na célula, incluindo a expressão de transportadores de oligopeptídeos e AAP (MARTÍNEZ; LJUNGDAHL, 2005; MIRAMÓN; LORENZ, 2016; BÖTTCHER *et al.*, 2020). Os genes relacionados com a absorção de nutrientes são frequentemente induzidos frente a condições associadas à virulência, como por exemplo a sobrevivência do fungo a macrófagos e neutrófilos (NIEMIEC *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2019).

Assim, após a detecção, a captação de aminoácidos é mediada por cerca de 24 AAPs, sendo apenas algumas destas caracterizadas funcionalmente. Em *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura com diversos genes bem descritos, Ssy1 é capaz de detectar abundantes aminoácidos

extracelulares, como arginina, ativando a via Stp2 (KRAIDLOVA *et al.*, 2011; SCHREVEVS *et al.*, 2018;; BIANCHI *et al.*, 2019); A funcionalidade desse processo é crucial para o crescimento fúngico em diversos aminoácidos e está correlacionada à patogenicidade, uma vez que mutante para Stp2 ou via SPS são atenuados *in vivo* (VYLKOVA;LORENZ, 2014, MIRAMON; LORENZ, 2016; VYLKOVA; LORENZ,2017). Além do Stp2, AAPs contribuem para o transporte de aminoácidos regulados pela via SPS, como por exemplo a Gnp1; Esta AAP está sujeita a via de repressão por catabólitos de nitrogênio (NCR) (ANDRÉASSON *et al.*, 2004). GARBE *et al.*, 2021 demonstrou em seus dados uma alta especificidade de Gnp2 para prolina em *C. albicans*; além disso, também apresentou dados supondo que Stp2 e Gnp1 poderiam ser importantes para a captação e uso de triptofano.

A literatura relata que as leveduras do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*, são capazes de metabolizar o triptofano, produzindo pigmentos fotossensíveis (Figura 9) (CHAKES; PHILLIPS, 1974). Estudos mostram que a assimilação de triptofano por *Candida albicans*, *in vitro*, facilita a filamentação desta espécie (BOZZA *et al.*, 2005). Porém, os mecanismos envolvidos neste efeito biológico do triptofano em *C. albicans* não são conhecidos.

Bozza *et al.*, (2005), também comprovaram, por meio de infecção de *C. albicans* em camundongos, que a inibição daIDO agravou o quadro da candidíase. Metabolitos gerados através da degradação do triptofano, como ácido indol-3-acético (IAA), podem alterar morfológicamente leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, desencadeando um importante papel na filamentação destes fungos, sendo que esta é uma característica diretamente relacionada a patogenicidade (RAO *et al.*, 2010). Além de utilizarem o IAA exógeno, algumas leveduras são capazes de produzir o IAA. Lintong; Koowadjanakul (2012) isolaram 114 cepas de leveduras ambientais, incluindo do gênero *Candida*, e 37.7% destas foram capazes de produzir IAA em um meio de cultura suplementado com triptofano.

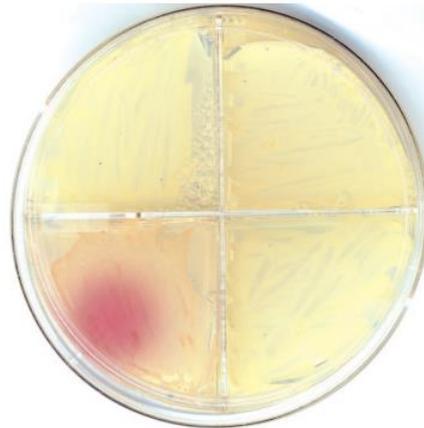


Figura 9 — Pigmentação de *Candida albicans*. Pode-se observar no quadrante inferior esquerdo a pigmentação produzida após a assimilação de triptofano e exposição a luz monocromática. Fonte: Chakes *et al.*, 2008.

Existem genes de leveduras associados a degradação de Trp, como *ARO8* e *ARO9*, que codificam aminotransferases aromáticas, enzimas que participam da primeira etapa do catabolismo de Trp via indoloilpiruvato (PANOZZO *et al.*, 2002; OHASHI *et al.*, 2017). Segundo Ohashi *et al.* (2017), estas enzimas reduzem os efeitos tóxicos de alguns metabólitos de Trp, permitindo a sua conversão em metabólitos menos citotóxicos. CHEN; FINK (2024) demonstram que metabólitos gerados por essas enzimas, como triptofol e tirosol, que também fazem parte do quórum-sensing do fungo, estão correlacionados com crescimento, morfogênese e biofilme. Estes dados demonstram que possivelmente o triptofano têm correlação com a virulência de leveduras.

Em um cenário de disbiose causado por quimioterápicos citotóxicos, por exemplo, a microbiota pode deixar de metabolizar alguns nutrientes, como o triptofano. Uma vez que ocorre a disbiose do trato gastrointestinal por conta do uso de quimioterápicos, o hospedeiro fica sujeito a mucosite e lesões no intestino. Um estudo feito em camundongos mostrou que o tratamento com metabólitos de triptofano, gerados pela microbiota indígena melhora as funções da barreira epitelial, limitando lesões e inflamações intestinais (SHIMADA *et al.*, 2013; SWIMM *et al.*, 2018; ALEXEEV *et al.*, 2018, BATISTA, 2023).

BATISTA, 2023, mostrou em um modelo de mucosite induzida por 5-FU que a concentração de triptofano e metabólitos derivados é alterada no tecido intestinal destes animais, apresentando também uma disfunção epitelial intestinal, sendo possível detectar mudanças nas concentrações de triptofano e seus metabólitos também no plasma dos animais com mucosite. Além

disso, também foi observado uma alteração na microbiota fecal dos animais tratados com 5-FU, onde o sequenciamento de 16S mostrou que após a quimioterapia, os animais apresentaram alterações estruturais da microbiota fecal (BATISTA, 2023). Estes dados sugerem que os tratamentos com quimioterápicos interferem diretamente no metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal e pelo epitélio intestinal, deixando assim o triptofano disponível para outros microrganismos.

No entanto, o papel do metabolismo de triptofano por *C. albicans* no contexto de quimioterapia não é completamente descrito. Resultados anteriores de outros grupos sugerem que a quimioterapia ou radioterapia prejudicam o catabolismo do triptofano pela microbiota intestinal (SWIMM *et al.*, 2018, BATISTA, 2023), e que o metabolismo alterado do triptofano também é encontrado em pacientes hematológicos favorecendo um maior risco de infecção fúngica invasiva (COSTANTINI *et al.*, 2021), aumentada durante a inflamação intestinal (AGUS *et al.*, 2018). Esses achados nos levam a supor que a alteração do metabolismo do triptofano durante a quimioterapia permitiria que *C. albicans* metabolize esse aminoácido, favorecendo sua virulência e infecção oportunista pelo fungo.

2 JUSTIFICATIVA

Candida albicans possui uma variedade de fatores de adaptação e virulência, como respostas robustas ao estresse, polimorfismo e rápida adesão aos tecidos do hospedeiro os quais, dentre outras características, explicam seu sucesso como microrganismo comensal e como patógeno (SWIMM *et al.*, 2018; COSTANTINI *et al.*, 2021). A capacidade de utilizar diversos nutrientes e se adaptar às mudanças ambientais recebe o nome de plasticidade metabólica, sendo esta uma outra adaptação fundamental do patógeno ao interagir com o hospedeiro (AGUS *et al.*, 2018). A composição e oferta nutricional difere significativamente nos diversos nichos do hospedeiro habitados por *C. albicans* e, frequentemente os açúcares são limitados nestes ambientes (MAYER *et al.*, 2013). Para tanto, fontes alternativas de nutrientes como lipídios, ácidos orgânicos e aminoácidos são exploradas por *C. albicans*.

Uma grande variedade dos tecidos do hospedeiro é rica em aminoácidos e peptídeos acessíveis, e *C. albicans* possui múltiplos mecanismos de utilização destes, como secreção de proteases, transportadores de oligopeptídeos e permeases de aminoácidos (AAPs) (MOYES *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstram o papel de alguns sensores e fatores de transcrição como *ssyl1* e *stp2*, respectivamente, para a captação de aminoácidos em *C. albicans* e estes também estão correlacionados com a expressão de algumas AAPs como, *gnp1* (VYLKOVA; LORENZ, 2014; KRAIDLOVA *et al.*, 2016; MIRAMÓN; LORENZ, 2016; GARBE *et al.*, 2022). Assim os aminoácidos não servem somente para a biossíntese de proteínas, mas também como uma valiosa fonte de nitrogênio e carbono, e ainda, afetam diretamente a virulência fúngica de várias maneiras, por exemplo, através da indução de filamentação (DUNKER *et al.*, 2021).

Como já citado anteriormente, em um processo de mucosite, é possível que nutrientes como o triptofano, se tornem disponíveis e possam ser usados como fontes nutricionais alternativas por *C. albicans*, tendo impacto direto na virulência do fungo, bem como no seu processo de infecção e intensificação dos danos à mucosa. Os modelos de investigação *in vivo* são uma boa ferramenta para estudos com microrganismos. Existem diversos métodos de experimentação para simular as infecções por microrganismos (ARVANITIS *et al.*, 2013; LIONAKIS *et al.*, 2017). Recentemente, os experimentos *in vivo* com fungos vêm crescendo em utilização, avaliando principalmente a patogenicidade e interação fungo-hospedeiro (BINDER; MAURER; LASS-FLORL, 2016; DAI *et al.*, 2018; SÁ *et al.*, 2018). O entendimento das diversas infecções fúngicas pode ajudar a esclarecer

novos alvos de terapia e levar ao desenvolvimento de agentes antifúngicos mais eficazes. Camundongos são os modelos mais utilizados para estudar infecções por fungos, isto se dá devido às semelhanças fisiológicas e imunológicas com seres humanos, entre outras características (ARVANITIS *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2019).

O tratamento com 5-Fluorouracil (5-FU) descrito por BATISTA, 2023, induz a mucosite intestinal em camundongos com um pico 5 dias após tratamento e uma melhora 8 dias após tratamento. Além disso, causa alterações estruturais na microbiota intestinal dos animais, gerando mudanças nas concentrações de triptofano e seus metabolitos no tecido intestinal.

Diante do exposto, este trabalho busca esclarecer se e como o metabolismo de triptofano por *C. albicans* no modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterápicos pode afetar a virulência deste fungo e facilitar o processo de infecção oportunista da mucosa e disseminação sistêmica. Assim, acredita-se que, o triptofano favoreça a filamentação da *C. albicans*, levando ao agravamento da mucosite e posteriormente óbito dos animais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se metabolismo de triptofano influencia na virulência de *Candida albicans* e seus impactos durante a infecção oportunista após quimioterapia em camundongos.

3.2 Específicos

1. Avaliar a susceptibilidade de animais tratados com 5-fluorouracil à infecção por *C. albicans*;
2. Determinar a carga fúngica nas fezes, trato gastrointestinal, fígado e rim de camundongos tratados com 5-fluorouracil e infectados com linhagens selvagens de *C. albicans*;
3. Investigar se camundongos tratados com 5-fluorouracil e infectados com *C. albicans* apresentam translocação bacteriana do trato gastrointestinal para o fígado.
4. Avaliar se o tratamento com anfotericina B ou fármacos antibacterianos protegem camundongos que receberam quimioterapia da morbidade causada pela exposição a *C. albicans*.
5. Avaliar se há alterações da disponibilidade de triptofano no trato gastrointestinal de animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.
6. Avaliar se diferentes concentrações de triptofano interferem no crescimento de *C. albicans* em meio contendo outras fontes de nitrogênio;
7. Averiguar se a disponibilidade de triptofano interfere na formação de biofilme, filamentação, atividade respiratória e produção de proteases por *C. albicans*;
8. Comparar o efeito de triptofano e tirosina, outro aminoácido aromático, no crescimento e na filamentação de *C. albicans*;
9. Avaliar como a disponibilidade de triptofano interfere no crescimento e na filamentação de linhagens de *C. albicans* mutantes para captação de aminoácidos;

10. Determinar se linhagens mutantes para a captação de aminoácidos hiporresponsivas ao triptofano são menos virulentas que as linhagens selvagens no modelo de infecção após quimioterapia, avaliando os mesmos parâmetros dos objetivos 1-3.

4 METODOLOGIA

4.1 Meios de cultivo

Foram utilizados dois caldos de cultivo para os experimentos: como cultivo padrão para fungos, caldo Sabouraud dextrose 2% (Caldo SD), e cultivo com meio quimicamente definido, caldo *Synthetic Low-Dextrose* (Caldo SLD) (0,17% YNB sem aminoácidos e sulfato de amônio, sulfato de amônio 0,5% e dextrose 0,1%) [20].

4.2 Manutenção e preparo de inóculos das linhagens de *Candida albicans*

As cepas selvagens (WT) de *Candida albicans* SC5314 e BSC1 utilizadas foram originalmente isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea (HERSKOWITZ, 1988; KRAIDLOVA *et al.*, 2016). As cepas mutantes de *C. albicans*, Δ *stp2* (VYLKOVA; LORENZ, 2014), Δ *ssy1* (MIRAMÓN; LORENZ, 2016), Δ *gnp1* (GARBE *et al.*, 2022), deficientes na absorção de aminoácidos, bem como as respectivas linhagens complementadas, foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Michael Lorenz da Universidade de Texas Health Houston. As linhagens de *C. albicans* foram cultivadas em caldo SD a 37°C por 18-24 horas antes de cada experimento. Para o preparo do inóculo, a cultura de *C. albicans* foi centrifugado a 8.000 RPM por 10 min. O sedimento foi então lavado com PBS 1x estéril e centrifugado novamente. Após, o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de PBS. Os inóculos foram ajustados com auxílio de uma câmara de Neubauer, assim foram utilizados inóculo de 1×10^6 células/mL para experimentos *in vitro* e 1×10^7 células/mL para experimentos *in vivo*.

4.3 Curva de crescimento de *Candida albicans* em diferentes concentrações de triptofano

Para esta avaliação, foi utilizado uma placa de 96 poços. Assim, foram distribuídos 100 μ L de caldo SLD e em seguida 100 μ L de triptofano (Trp) e/ou tirosina (Tyr) e feita uma diluição seriada obtendo-se as seguintes concentrações 160 μ g/mL, 80 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL e 10 μ g/mL, consecutivamente. Após, foi adicionado 100 μ L do inóculo de *C. albicans* em cada poço contendo Trp e ou Tyr. Para este ensaio foram utilizadas as linhagens SC5314 e BSC1. As placas

foram mantidas a temperatura de 37°C por 24 horas, sendo feita uma leitura em espectrofotômetro em 600nm a cada hora. Como controle, foram usados poços contendo apenas a levedura com SLD.

4.4 Ensaio de formação de biofilme por *Candida albicans* em diferentes concentrações de triptofano

O mesmo desenho do experimento descrito no item 4.3 foi utilizado para este. As placas foram incubadas por 6 e 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS-Tween (0,05% de Tween 20 em PBS). Subsequentemente, os poços foram cuidadosamente lavados com 100 µL de metanol 100% a 4°C. Após a secagem das placas, uma alíquota de 100 µL de cristal violeta a 0.3% foi adicionada em cada poço. Após 20 minutos, a solução corante foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com água destilada estéril. Por fim, 150 µL de uma solução de ácido acético a 33% foi adicionado em cada poço. Após 30 segundos, o volume foi, então, transferido para uma nova placa de 96 poços de fundo chato, para obtenção da absorbância a 600 nm em um espectrofotômetro para quantificar a biomassa destes biofilmes.

Para a quantificação de atividade metabólica dos biofilmes foi utilizado o ensaio colorimétrico de redução do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide - Invitrogen™). Foi utilizado o mesmo protocolo experimental com incubações de 1, 3, 6 e 24 horas. Após a incubação o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e adicionado 100 µL de MTT (5mg/mL) e incubados por 3 horas a 37°C ao abrigo da luz. Após esse período, a solução de MTT foi cuidadosamente removida dos poços, e foi adicionado 100µL de DMSO (Sigma-Aldrich). Finalmente, a placa foi lida com auxílio de um espectrofotômetro a 550nm.

4.5 Ensaio de filamentação de *Candida albicans* em diferentes concentrações de triptofano

Para esse ensaio, o inóculo fúngico foi cultivado na presença e ausência de Trp e/ou Tyr em diferentes concentrações (160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL) em caldo SLD. Após 1, 3, 6 e 24 horas de incubação, alíquotas de 10 µL cultura foram coletadas para quantificação de tubo germinativo e pseudohifas (como parâmetros de filamentação) e

blastoconídeos com auxílio da câmara de Neubauer. Os resultados foram ajustados e expressos em porcentagem.

4.6 Ensaio para avaliar o comprimento da hifa de *Candida albicans* na presença de triptofano

Para este ensaio foi seguida a metodologia descrita no tópico 4.5 com alterações. Assim foi utilizado apenas a concentração de 160 µg/mL de Trp e/ou Tyr. Após 6 e 24 horas de incubação, alíquotas de 10 µL foram coletadas e levadas a câmara de Neubaer e observadas ao microscópio LEICA 480, onde foram feitas capturas de de 10 campos com a mesma calibração. As imagens foram levadas ao aplicativo ImageJ e comprimento de 50 hifas foi aferido.

4.7 Ensaio para avaliação da morfologia da colônia de *Candida albicans* na presença de triptofano

Para esse ensaio utilizou-se placas de Petri contendo ágar SLD adicionado ou não de triptofano a 160 µg/mL. Alíquotas de 10 µL do inóculo foram adicionadas a superfície do meio de cultura, a placa foi mantida de forma estática até que a gota secasse por completo. Após foi incubado em câmara úmida a 37°C por 4 dias.

4.8 Ensaio de produção e quantificação de proteases por *Candida albicans* em diferentes concentrações de triptofano

Inóculos iniciais na concentração de 1×10^6 células/mL de *C. albicans* foram incubados em diferentes concentrações de Trp (160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL) em caldo SLD, em microplacas de 96 poços a 37°C por até 24 horas. Com 1, 3, 6 e 24 horas de incubação as placas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. O Sobrenadante foi então coletado e homogeneizado com 200 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) estéril a 1% e incubado a 37°C por 3 horas. Finalmente, após a incubação a reação proteolítica foi avaliada com auxílio de um teste colorimétrico (Kit Albumina Monoreagente da Bioclin) conforme instruções do fabricante e lida em espectrofotômetro em OD a 630 nm.

4.9 Animais experimentais

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6j selvagens entre 7-8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em microisoladores (Alesco) autoclavados com cama de maravalha estéril, e com livre acesso à ração e água filtrada, sendo armazenados em estantes ventiladas individualmente e com temperatura controlada (23°), localizada em uma sala com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os procedimentos experimentais com animais propostos neste estudo foram submetidos ao comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA) e aprovados sob o número de protocolo 84/2022 e 275/2023.

4.10 Estratégia experimental e parâmetros avaliados

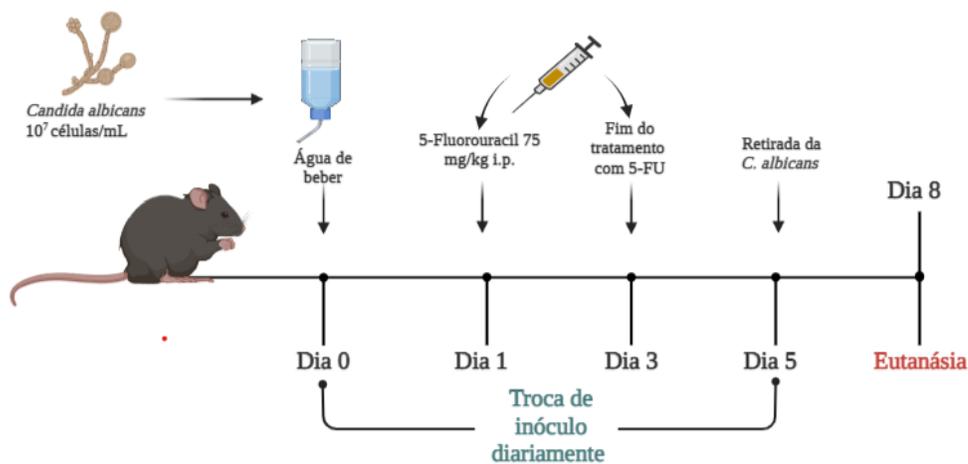


Figura 10 — Protocolo experimental para avaliação da infecção oportunista por *Candida albicans*. Determinação do modelo usado para indução da mucosite com 5-FU, colonização e posterior infecção oportunista por *C. albicans*. Fonte: Próprio Autor (Criado em biorender.com), 2022.

Nos vários experimentos realizados conforme o desenho experimental demonstrado na figura 10, foram analisados diversos parâmetros. Antes do início do tratamento com quimioterápico (Dia 1), os camundongos foram pesados para determinar, posteriormente, a variação de peso corporal em momentos estabelecidos. Nos tempos previstos, também foram coletadas amostras de fezes para avaliação do escore clínico e cultivos em meios de cultura. Um dia antes do tratamento com 5-FU (Dia 0), os animais receberam as linhagens de *Candida albicans* em sua água de beber para

a colonização, sendo este inóculo renovado diariamente e sendo retirado no Dia 5 após início do tratamento com quimioterápico. As análises subsequentes procederam a partir de amostras obtidas após a eutanásia. O sangue foi coletado para contagem de leucócitos totais. Fragmentos do estômago, intestino, ceco, colón, fígado e rim foram destinados para determinação da carga fúngica e/ou bacteriana, bem como análise histopatológica. Os parâmetros que foram avaliados estão detalhados a seguir:

- i. Taxa de sobrevivência, monitorada diariamente por 21 dias após o início da colonização por *C. albicans*;
- ii. O escore clínico dos animais, analisados de acordo com a consistência e a presença de sangue oculto nas fezes, perda de peso corporal e sinais de morbidade;
- iii. A carga fúngica e/ou bacteriana nas fezes, estômago, intestino, ceco, colón, fígado e rim;
- iv. A histopatologia do intestino delgado, avaliados para determinar a lesão tecidual após a infecção;

4.11 **Tratamentos**

4.11.1 *Quimioterapia*

O protocolo de indução da mucosite intestinal com o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) consistiu em uma dose diária de 75 mg/kg administrada durante 3 dias consecutivos pela via intraperitoneal (i.p.). Foram utilizados animais como controle negativo, sendo administrado PBS estéril pela via i.p. nos animais deste grupo.

4.11.2 *Antimicrobianos*

O tratamento com antimicrobianos, anfotericina B (AMB), vancomicina (VAN) e imipeném (IMP), foi feito via i.p. A AMB teve início no 4º dia do protocolo experimental de mucosite em doses diárias de 1mg/kg, e finalizou no 6º dia do protocolo. Para VAN e IMP o tratamento também

foi feito via i.p. com doses de 12mg/kg a cada 12 horas com início no 4º dia do protocolo experimental e finalizando no 6º dia do protocolo experimental.

4.12 Infecção experimental por *Candida albicans*

A obtenção do inóculo seguiu-se como descrito no tópico 4.2. Assim, uma suspensão de 1×10^7 células de *C. albicans* foi preparada em 50 mL de água filtrada autoclavada e dada aos animais (Dia 0). Esse procedimento foi repetido diariamente até o dia 4 pós tratamento com 5-FU. O inóculo foi retirado no dia 5 pós tratamento e o animais receberam uma nova garrafa de água filtrada autoclavada sem acréscimo do inóculo. Tanto grupos que receberam quimioterapia quanto grupos que receberam PBS foram expostos ao inóculo de *C. albicans*.

4.13 Determinação do escore clínico após infecção por *Candida albicans*

A análise do escore clínico dos animais foi baseada na consistência fecal (0= normal, 1= pastosa ou 2= líquida) e presença de sangue oculto nas fezes (0= ausente, ou 2= presente), por meio do teste colorimétrico usando o reagente de Meyer e posterior adição de peróxido de hidrogênio a 3%, que permite avaliar a atividade de peroxidase eritrocitária. A reação foi lida com auxílio de um espectrofotômetro a 540 nm;

Também foi feita avaliação da perda percentual de peso corporal (0= perda de até 5% do peso corporal, 1= perda de até 10% do peso corporal, 2= perda de até 15% do peso corporal, 3= perda de até 20% do peso corporal e 4= perda de peso corporal superior a 20%) e de sinais de morbidade (0= sem sinais de morbidade, 1= pelos arrepiados, 2= pelos arrepiados e postura arqueada e 3= pelos arrepiados, postura arqueada e inatividade).

4.14 Carga fúngica e bacteriana

Para essa avaliação foram feitas eutanásias no dia 5 e 8 pós tratamento com 5-FU, os órgãos foram retirados assepticamente para avaliação da carga fúngica e/ou bacteriana (Figura 11).

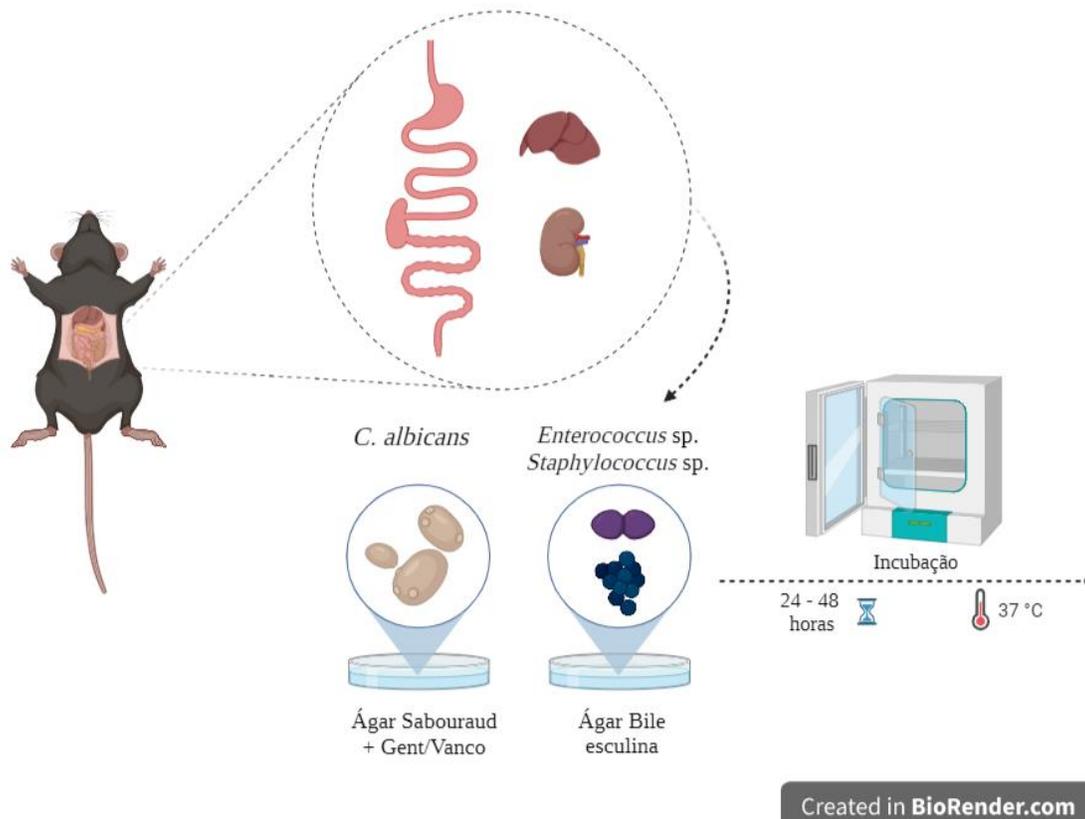


Figura 11 — Esquemática do processo para análise de carga fúngica e/ou bacteriana. Fonte: Próprio Autor (Criado em biorender.com), 2022.

4.14.1 Avaliação da carga fúngica e/ou bacteriana nos órgãos

Após a eutanásia dos animais, foram retiradas partes do estômago, intestino delgado, ceco, colón, fígado e rim para inóculo em ágar SD acrescido de gentamicina 0,1 mg/L e vancomicina 0,01 mg/mL para determinação da carga fúngica. Para a quantificação de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Staphylococcus* foi utilizado o ágar diferencial bile esculina acrescido de nistatina 1 mg/mL. Para tanto, os órgãos foram homogeneizados a uma proporção de 100mg/ml em solução PBS estéril, diluídos serialmente em PBS, e alíquotas de 10 μ L das diluições foram utilizadas para plaqueamento, em microgotas em triplicata. Todas as placas foram mantidas a 37°C por até 48 horas. Este mesmo processo foi realizado para plaqueamento do fígado em ágar BHI acrescido de nistatina para quantificação de bactérias totais.

4.14.2 Avaliação da carga fúngica e/ou bacteriana nas fezes

As fezes foram coletadas em tempos determinados. Todo o material colhido foi previamente homogeneizado a uma proporção de 100mg/ml em PBS estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas e três alíquotas de 10µL de cada diluição foram plaqueadas em ágar sabouraud dextrose acrescido de gentamicina 0,1 mg/L e vancomicina 0,01 mg/mL para determinação da carga fúngica e em ágar diferencial bile esculina acrescido de nistatina 1 mg/mL para quantificação de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Staphylococcus*. As placas foram mantidas a 37° por 48h para a posterior contagem de UFC.

4.14.3 *Análise de sequenciamento metagenômico*

Foi extraído o DNA fecal com auxílio do kit *Quick-DNA Fcal/Soil Microtube 96* (ZymoResearch, Irvine, CA). Em seguida, as regiões V3-V4 do RNA ribossomo mal 16S foi amplificada pelo sequenciador MiSeq Illumina, seguindo o protocolo *Earth Microbiome Project* com alterações (VERSCHUREN *et al.*, 2018). Para tanto, foi utilizado o espaço do CELAM (Centro de Laboratórios Multiusuários) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Após o sequenciamento da região 16S do rRNA, foram obtidas sequências no formato *fastq* e estas, foram analisadas usando o *software* QIIME2 (2021.2) (BOLYEN *et al.*, 2018). As sequências foram demultiplexadas e filtradas por qualidade através do método Dada2, utilizando os parâmetros padrões do QIIME2 para detectar e corrigir os dados gerados a partir do sequenciamento Illumina, sendo gerada uma tabela de artefatos QIIME 2, tabela de OTU (Operacional Taxonomic Unit) ou arquivo BIOM. Em seguida, foram removidos os quimeras e as OTUs foram que representaram mais de 0,005% do número total de *reads* foram mantidas (BOKULICH *et al.*, 2013). As OTUs foram então catalogadas com auxílio do banco de dados referencia 16S silva138 (QUAST *et al.*, 2013). Finalmente, os dados gerados foram carregados na biblioteca Phyloseq (1.34.0) do R, na qual foram feitas análise estatísticas e de abundância taxonômica.

4.14.4 *Razão Metabólitos/Triptofano*

A quantificação de de triptofano e seus metabólitos foi realizada segundo o protocolo descrito por BATISTA, 2023. Resumidamente, a aquisição foi feita no sistema UPLC-MS/MS

ACQUITY Ultra Performace LCTM, Waters, composto por bomba binária, amostrador automático, degasser em linha e detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massa ACQUITT TQ, Waters, Milford, Massachusetts, EUA, equipado a fonte de ionização por electrospray – Z-spray (ESI) e analisador triplo quadrupolo. Os cromatogramas e espectros foram obtidos e processados de forma online utilizando o *software* Mass Lynx™ (4.1, Waters). Após a obtenção de dados, tanto no intestino quanto no plasma dos animais, foi feita uma razão entre os Metabólitos detectados, KYN, I3S, Iald e IAA, e triptofano.

4.15 **Análise histopatológica**

Com finalidade de avaliar a lesão e a invasão tecidual e morfologia da *Candida albicans* após infecção, o intestino delgado dos animais foi removido e fixado em formol tamponado a 10% pelo período de 48h. Depois da fixação, os órgãos foram desidratados gradualmente em etanol, embebidos em parafina, cortados, fixados em lâminas histológicas e corados com H&E (Hematoxilina e Eosina).

Para a análise histopatológica, as lâminas foram examinadas com auxílio de um microscópio ótico. O escore histopatológico foi determinado de acordo com os parâmetros a seguir: Infiltrado inflamatório: 0 - ausente; 1 - leve; 2 - moderado; 3 - intenso; 4 - muito intenso. Criptas: 0 - sem alterações; 1 - perda parcial da arquitetura; 2 - perda total da arquitetura. Células caliciformes: 0 - sem alterações; 1 - redução/ausência. Edema: 0 - ausente; 1 - presente; Erosão: 0 - ausente; 1 - presente; 2 - erosão com ulcerações; 3 - ulcerações. Hemorragia: 0 - ausente; 1 - moderada; 2 - intensa. Hiperemia: 0 - ausente; 1 - presente. Após avaliação destes parâmetros, é feito um somatório de todos e classificado o escore histopatológico como Ausente: 0 - 1; Leve: 1 - 4, Moderado: 4 - 7 e Severo: 7- 13.

4.16 **Análise estatística**

Para avaliação dos dados obtidos *in vitro*, foi aplicado o teste Análise de variância (ANOVA) Two-Way seguido pelo teste de Tukey, para comparação de média entre os grupos e diferentes tempos avaliados. Para análise dos dados *in vivo*, foi aplicado o teste ANOVA Two-Way para todas as amostras obtidas, seguido pelo teste de Tukey para os dados de escore clínico, peso e

carga microbiana nas fezes. Para carga fúngica e bacterianas nos órgãos do trato gastrointestinal, fígado e rim também foi aplicado o teste de ANOVA Two-Way seguido pelo teste de Sidak. Foi considerado valor de $p \leq 0,05$ como diferença estatística entre os grupos. As curvas de sobrevida foram comparadas usando o teste de Log-rank. Foi utilizado o *software GraphPad Prism 8.1* para confecção dos gráficos e análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 *Candida albicans* coloniza o trato gastrointestinal dos camundongos em quimioterapia e acentua o quadro de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Inicialmente, nos propusemos a padronizar um modelo de infecção gastrointestinal por *C. albicans* em animais tratados com 5-FU, mimetizando o que acontece em pacientes submetidos a quimioterapia antineoplásica. Para isso, os animais foram expostos ao inóculo de *C. albicans* na água de beber e submetidos o protocolo de quimioterapia previamente padronizado por BATISTA 2023. Foram utilizados grupos expostos a linhagens diferentes de *C. albicans*, SC5314 ou BSC1. Após o tratamento com o quimioterápico 5-FU, os animais foram monitorados a cada dois dias para avaliação da evolução ponderal, dos sinais clínicos, e da taxa de sobrevida e determinação da carga fúngica nas fezes.

Os resultados da figura 12 mostraram que os grupos que foram expostos a *C. albicans* apresentaram carga fúngica fecal semelhantes, independentemente de receberem ou não a quimioterapia (Figura 12 A e B). Para SC5314 foi possível observar um aumento gradativo da carga fúngica que enquanto os animais estavam expostos ao inóculo de *C. albicans*, e, após a retirada do inóculo, a carga fúngica teve uma redução significativa no 8º dia sem relação ao 1º dia para ambos os grupos analisados (Figura 12 A). Para a linhagem BSC1 a carga fúngica também apresentou aumento gradativo até o 5º dia assim como visto pra SC5314. Por outro lado, a carga fúngica tem uma redução acentuada, principalmente no grupo sem quimioterapia. Já no grupo que recebeu 5-FU após exposição ao inóculo de BSC1 existe um aumento significativo da carga fúngica fecal no 10º dia (Figura 12 B).

Apesar da colonização eficiente pelas linhagens de *C. albicans*, os animais que receberam apenas *C. albicans* não apresentaram perda de peso (Figura 12 C e D), escore clínico elevado (Figura 12 E e F) ou mortalidade (Figura 12 G), quando comparados ao grupo PBS (Veículo), demonstrando que camundongos saudáveis não manifestam doença após exposição a *C. albicans*.

Quanto aos parâmetros avaliados para escore clínico, foi observado que os animais que receberam quimioterapia e *C. albicans* apresentaram uma acentuação da mucosite, sendo isso demonstrado em animais expostos a ambas as linhagens, porém com uma acentuação mais tardia no

grupo 5-FU+BSC1 (Figura 12 A-D). Assim, animais que receberam 5-FU apresentaram perda de peso e alterações clínicas com pico no 5º dia do protocolo experimental e remissão destas alterações a partir do 8º dia do protocolo experimental, como previamente encontrado por BATISTA (2023). Em contrapartida, animais expostos ao fungo e que receberam quimioterapia apresentaram agravamento da perda de peso e do escore clínico a partir do oitavo dia do protocolo experimental.

Dentre os animais que receberam apenas quimioterapia foi registrada uma taxa de sobrevivência de 60%. Já os grupos que receberam quimioterapia e *C. albicans* tiveram mortalidade de 100%, iniciando no 5º dia após tratamento, para SC5314, ou no 10º dia após tratamento, para BSC1, mostrando uma maior susceptibilidade à quimioterapia quando comparado aos camundongos que receberam apenas quimioterapia (Figura 12 G).

Levando esses resultados em conta, um novo experimento foi realizado de modo a conduzir-se a eutanásia dos animais dos diversos grupos no 5º e 8º dia do protocolo experimental para coleta de amostras para avaliação da contagem de leucócitos circulantes, parâmetro que afeita o efeito mieloabrador da quimioterapia nos diferentes grupos, e da disseminação de *C. albicans* pelo TGI e sistemicamente.

Quanto a contagem de leucócitos totais no sangue periférico, foi possível observar uma leucopenia, em animais que receberam apenas 5-FU, bem como em animais expostos a *C. albicans*, com ou sem associação à quimioterapia (Figura 13 A e B). Quando observado a contagem dos grupos com *C. albicans* no 5º e 8º, nota-se uma sutil queda na média de células circulantes em animais expostos a qualquer uma das duas linhagens. Assim todos os grupos analisados tiveram diferença em relação ao controle, mas não entre si.

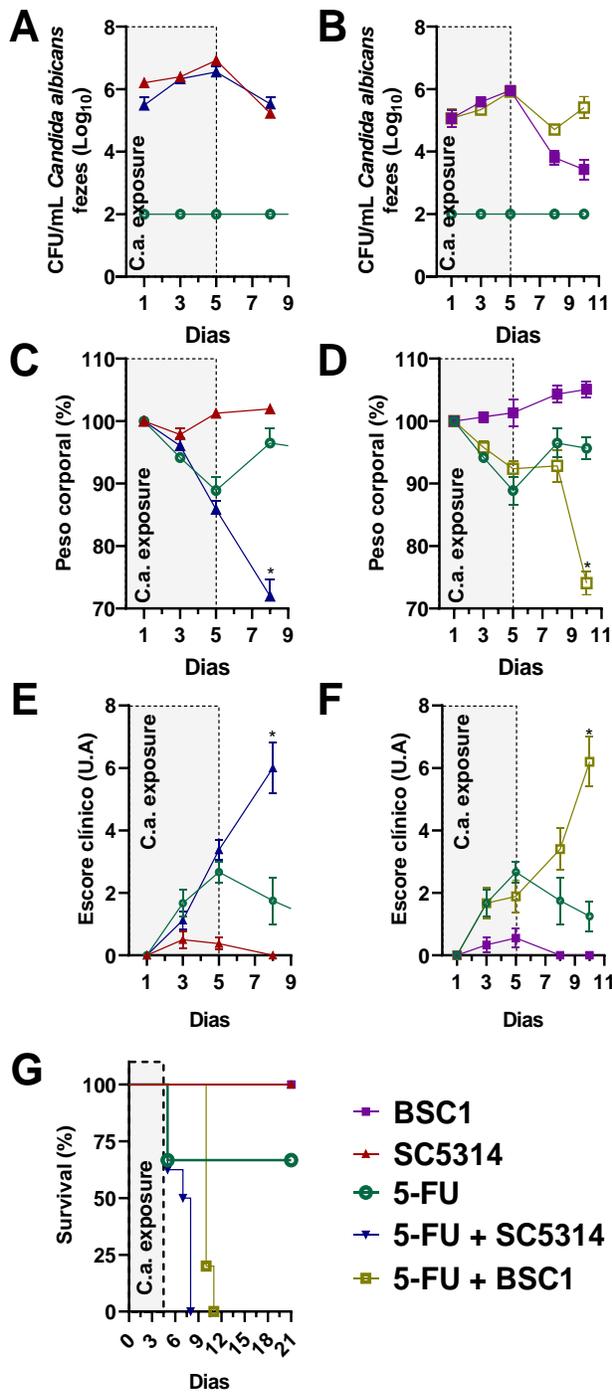


Figura 12 — A colonização por *C. albicans* acentua a susceptibilidade de animais à quimioterapia com 5-FU. Para estas avaliações os animais receberam inóculo de diferentes linhagens de *C. albicans* por 5 dias e foram tratados com 5-FU por 3 dias. (A, B) A carga fúngica nas fezes foi acompanhada em diferentes dias após o início do protocolo experimental. Para tanto as fezes foram homogeneizadas em solução salina 0,9% estéril e plaqueada em ágar Sabouraud. Além disso, foi monitorado o peso corporal (C, D) e os sinais clínicos (E, F), além da tava de sobrevivência (G) pós início do protocolo experimental. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Tukey. *: diferença em relação ao grupo que recebeu apenas 5-FU no mesmo dia. N= 5-21

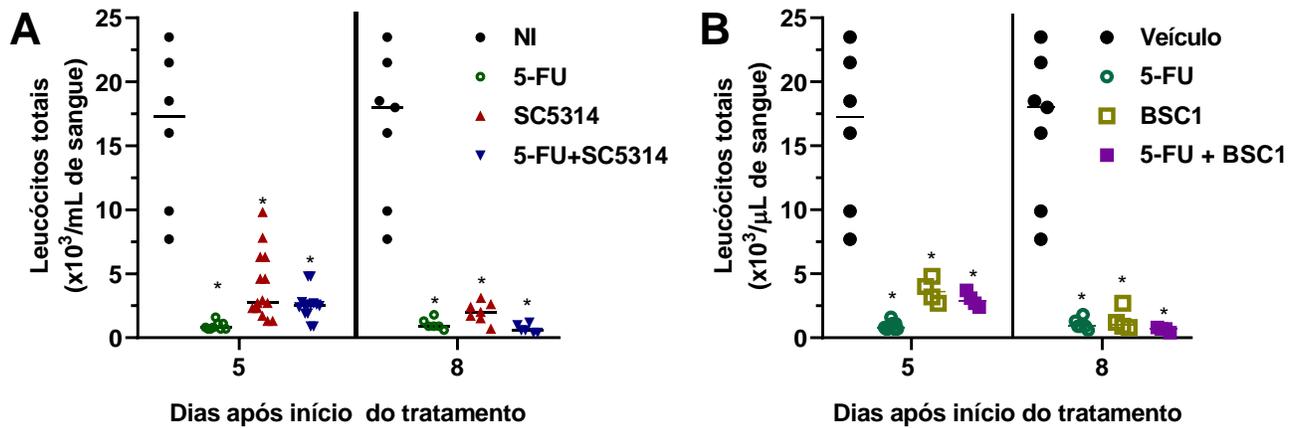


Figura 13 – Contagem total de leucócitos no sangue periférico. No 5º e 8º após a indução de mucosite intestinal por 5-FU os animais foram eutanasiado e o sangue periférico coletado do plexo braquial para contagem total de leucócitos. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Sidak. *: diferença em ao primeiro tempo avaliado. **A-** Análise no 5º e 8º dia dos animais tratados ou não com SC5314 (N=8); **B-** Análise no 5º e 8º dia dos animais tratados ou não com BSC1 (N=4).

De forma semelhante a carga fúngica nas fezes, quando avaliada a carga fúngica em diversos tecidos dos animais que receberam o inóculo de *C. albicans* e tratados ou não com 5-FU foi possível observar a permeância do fungo em dois tempos avaliados, 5 e 8 dias após tratamento com quimioterápico. Notavelmente, a média entre os grupos expostos a *C. albicans* e os grupos tratados com 5-FU e expostos a *C. albicans* foi semelhante em vários tecidos do trato gastrointestinal (Figura 14 e 15). Ainda, em animais infectados com qualquer uma das linhagens foi possível notar disseminação de *C. albicans* para órgãos remotos (especialmente o rim) apenas no quinto dia do protocolo experimental, sugerindo assim uma infecção sistêmica, porém transitória (Figuras 14 e 15).

Para os animais expostos a SC5314 foi possível observar uma maior carga fúngica no ceco e colón, 8 dias após o tratamento com quimioterápico em relação ao grupo que não recebeu 5-FU (Figura 14 C e D). Assim animais que apenas receberam SC5314 tiveram a carga fúngica reduzida nestes tecidos no oitavo dia do protocolo experimental. De maneira importante, houve recuperação de *C. albicans* nos rins dos animais expostos ao inóculo de SC5314 com ou sem quimioterapia, no 5º dia do protocolo experimental, mas não no fígado) (Figuras 14 E e F).

A linhagem BSC1 também foi capaz de colonizar o TGI de animais com e sem mucosite, por outro lado a recuperação de fungos no tecido foi consideravelmente baixa 8 dias após tratamento com quimioterápico. Assim em todos os tecidos avaliados a maior recuperação e retenção de *C. albicans* foi no 5º dia do protocolo de avaliação (Figura 15). Assim o íleo foi o único órgão do TGI que apresentou diferença entre os grupos com e sem quimioterapia (Figura 15 B). Houve também recuperação de carga fúngica nos rins apenas dos animais que receberam quimioterapia, no quinto dia do protocolo experimental (Figura 15 F).

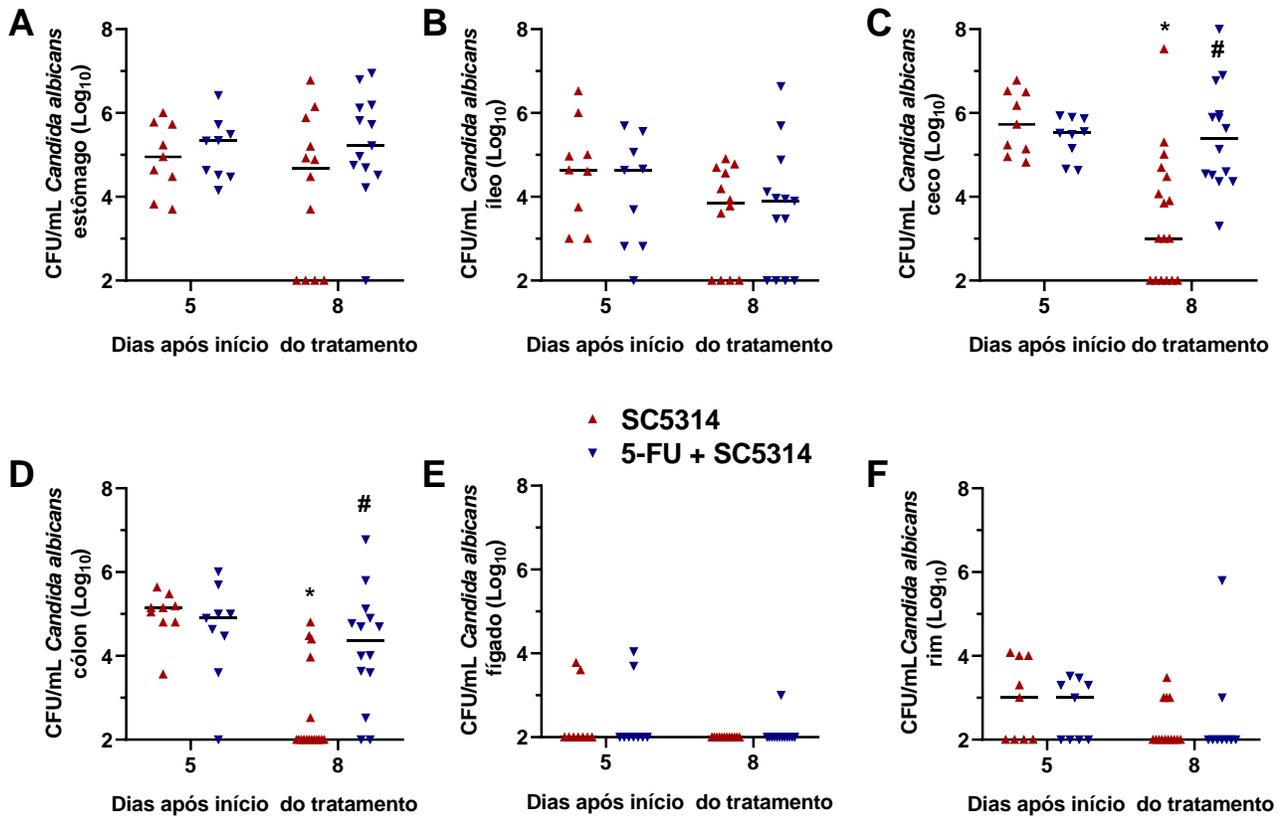


Figura 14 – Carga fúngica em diferentes tecidos dos animais colonizados com *C. albicans* SC5314 com e sem mucosite em dois tempos de avaliação. Foram feitas eutanásias no 5º e 8º dia após indução da mucosite afim de determinar a carga fúngicas no trato gastrointestinal, fígado e rim dos animais. Para essa avaliação, os tecidos foram homogeneizados em salina 0,9 e semeados em ágar sabouraud. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Sidak. *: diferença em relação ao dia 5. #: diferença entre os grupos comparados no mesmo dia. (N=9-13) **A-** Carga fúngica no estômago; **B-** Carga fúngica no íleo; **C-** Carga fúngica no ceco; **D-** Carga fúngica no cólon; **E-** Carga fúngica no fígado; **F-** Carga fúngica no rim.

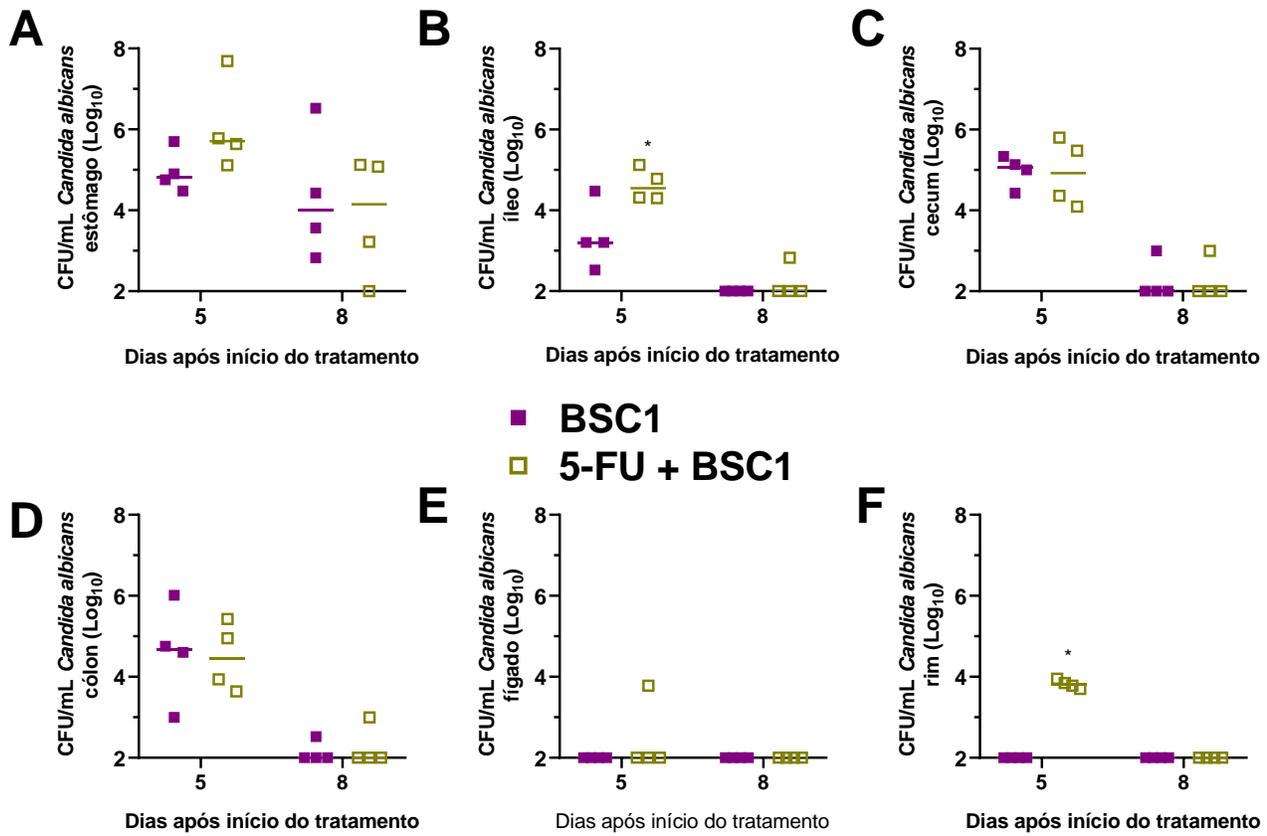


Figura 15 - Carga fúngica em diferentes tecidos dos animais colonizados com *C. albicans* BSC1 com e sem mucosite em dois tempos de avaliação. Foram feitas eutanásias no 5º e 8º dia após indução da mucosite afim de determinar a carga fúngicas no trato gastrointestinal, fígado e rim dos animais. Para essa avaliação, os tecidos foram homogeneizados em salina 0,9 e semeados em ágar sabouraud. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Sidak. *: diferença em relação ao grupo que não recebeu quimioterapia. (N=4) **A-** Carga fúngica no estômago; **B-** Carga fúngica no íleo; **C-** Carga fúngica no ceco; **D-** Carga fúngica no cólon; **E-** Carga fúngica no fígado; **F-** Carga fúngica no rim.

5.2 A colonização por *C. albicans* acentua a lesão intestinal e altera a microbiota fecal de camundongos com mucosite induzida por 5-FU

Até então, foi observado que a *C. albicans*, independente da linhagem testada, agrava a condição clínica dos camundongos em quimioterapia e isso está associado a colonização mais duradoura do trato gastrointestinal, incluindo o íleo e infecção sistêmica pelo fungo. Por isso, os próximos resultados serão apresentados apenas para a linhagem SC5314.

Foram, então, conduzidos experimentos para examinação histológica do íleo, tecido alvo da mucosite intestinal. Quanto aos animais que receberam apenas *C. albicans*, não se detectou qualquer dano ao epitélio intestinal, caracterizando um escore histológico ausente, semelhante aos animais que receberam apenas PBS (Figura 16 A, C e E). Foi possível observar um maior dano ao epitélio intestinal nos animais que receberam quimioterapia de *C. albicans* no 5º dia após indução da mucosite intestinal, graduado como um escore histológico moderado. Neste grupo, foi notória a degradação das vilosidades intestinais, com diminuição do seu tamanho e indícios de ulcerações. Ademais, as vilosidades intestinais apresentaram células vacuolizadas, indicando apoptose celular (Figura 16 D e E). Já nos animais que receberam apenas quimioterapia, as alterações histológicas, como já demonstrado no modelo, apresentaram uma menor redução das vilosidades e menores danos ao epitélio em comparação ao grupo que recebeu 5-FU e *C. albicans*, apresentando também um escore histológico médio a moderado (Figura 16 B e E).

Quando avaliado os aspectos histológicos no 8º dia do protocolo experimental, é observado uma melhora significativa em relação ao 5º dia do protocolo (dados não mostrados), ficando assim, a grande parte dos animais em todos os grupos com escore ausente (Figura 16 F).

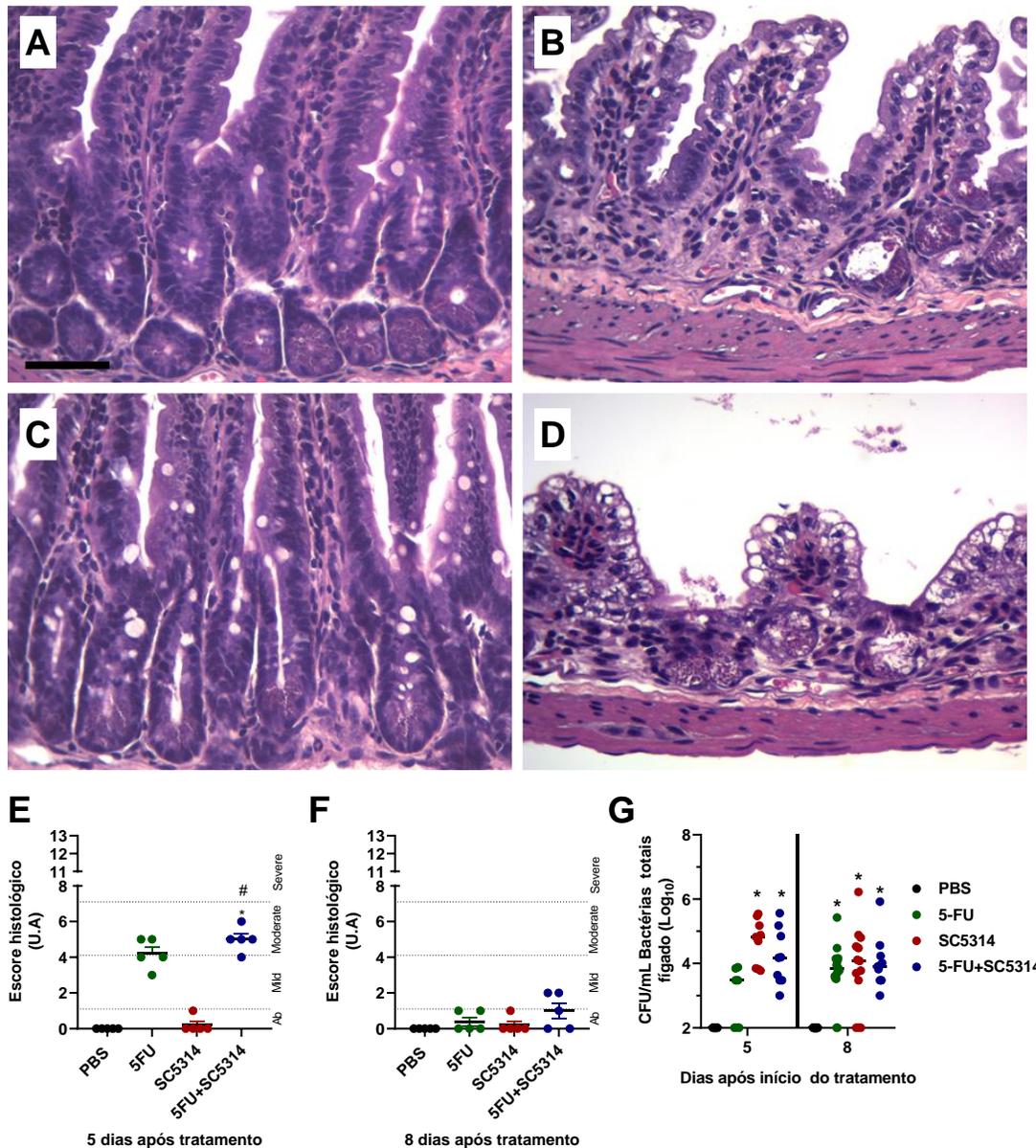


Figura 16 – Avaliação histológica do íleo de animais submetidos ou não a mucosite intestinal. Após protocolo experimental descrito na Figura 17, o íleo dos animais foi coletado e processado histologicamente, após o processamento foram preparadas lâminas com amostras do tecido e estas foram coradas utilizando o corante de hematoxilina e contra corado com eosina (HE). Foram utilizadas as regiões representativas de cada grupo para expressar a imagem. Ambas da imagem foram adquiridas com auxílio de um microscópio LEICA DM500 calibrado no aumento de 40x. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Sidak. *: diferença em relação ao grupo PBS. #: diferença em relação ao grupo 5FU+SC5314. **A-** Íleo do grupo submetido ao tratamento com veículo (PBS) no 5º dia do protocolo experimental; **B-** Íleo do grupo submetido ao tratamento com 5-FU no 5º dia do protocolo experimental; **C-** Íleo do grupo submetido ao tratamento com SC5314 no 5º dia do protocolo experimental; **D-** Íleo do grupo submetido aos tratamentos com 5-FU e SC5314 no 5º dia do protocolo experimental; **E-** Escore histológico de todos os grupos testados no 5º dia do protocolo experimental (N=5). **F** - Escore histológico de todos os grupos testados no 8º dia do protocolo experimental (N=5). **G-** Translocação bacteriana para fígado de todos os grupos testados no 5º e 8º dia do protocolo experimental (N=10).

As análises histológicas sugeriram uma potencial disfunção epitelial e prejuízo da função de barreira intestinal nos animais expostos a *C. albicans* que receberam quimioterapia. Assim, as próximas análises envolveram análise da translocação bacteriana e de composição da microbiota intestinal por sequenciamento de amplicon de bibliotecas do gene do rRNA 16S.

O cultivo de amostras de fígado em meio não seletivo demonstrou que a exposição a *C. albicans* favorece a translocação bacteriana já no 5º dia do protocolo experimental, independentemente da quimioterapia. Animais que receberam apenas 5-FU não apresentam carga bacteriana detectável no fígado nesse timepoint. No 8º dia do protocolo experimental, todos os grupos, exceto o que recebeu apenas PBS, apresentaram carga bacteriana detectável (Figura 16 G).

O sequenciamento de DNA bacteriano da região variável do gene 16S da microbiota fecal permitiu observar uma alteração da estrutura e composição da microbiota induzida por 5-FU e exposição ao inóculo de *C. albicans*. A alfa diversidade variou sutilmente entre os grupos 8 dias após indução da mucosite, sem mostrar alteração significativamente estatística. Nos animais com mucosite e SC5314 foi possível observar uma maior variação na riqueza e uniformidade microbiana em 2 dos três animais do grupo, quando comparado ao grupo controle. Assim, o grupo 5-FU+SC5314 parece apresentar uma redução na diversidade da microbiota fecal bacteriana, quando observados os índices de Shannon e Simpson (Figura 17 A). Quanto a beta diversidade, foi possível observar dois agrupamentos distintos, agrupamento A: PBS e SC5314 e agrupamento B: 5-FU e 5-FU+SC5314, mostrando que a dissimilaridade entre esses indivíduos é pequena (Figura 17 B).

Embora as alterações estruturais na microbiota pareçam ser pequenas, os grupos 5-FU ou 5-FU+SC5314 apresentaram uma notória alteração da composição da microbiota e distinção das unidades taxonômicas microbianas (OTUs). A análise de abundância relativa dos grupos no 8º dia do protocolo experimental permitiu observar uma redução das famílias *Muribaculaceae* e *Prevotellaceae* nos grupos que receberam tratamento com 5-FU (B e D) (Figura 18 A). A abundância de famílias bacterianas da microbiota do grupo que recebeu apenas *C. albicans* (C) não variou de forma expressiva em relação ao controle (A). Quando observado o grupo 5-FU+SC5314 (D), houve um aumento expressivo da família *Bacteroidaceae* e *Akkermansiaceae*, o que também foi observado no grupo apenas com 5-

FU, porém de forma menos expressiva (Figura 18 A). Ainda em relação a abundância, com as análises foi possível observar a distinção de 8 *clusters* distintos (Figura 18 B). Quando observados os *clusters* 1, 2, 3 e 5, por exemplo, fica claro a alteração na abundância de algumas OTUs da microbiota induzida pela quimioterapia com 5-FU em relação ao grupo PBS. As OTUs dos *clusters* 1, 2 e 5 estão também mais abundantes no grupo 5-FU+SC5314 em relação aos grupos sem quimioterapia. O *cluster* inclui OTUs cuja abundância estava maior apenas em animais que receberam quimioterapia associada à infecção, ao passo que o *cluster* inclui OTUs que estavam mais abundantes apenas no grupo que foi exposto a SC5314. Por fim, houve redução da abundância de OTUs dos *clusters* 7 e 8 pela exposição à quimioterapia ou ao fungo, quando comparado ao grupo que recebeu apenas PBS.

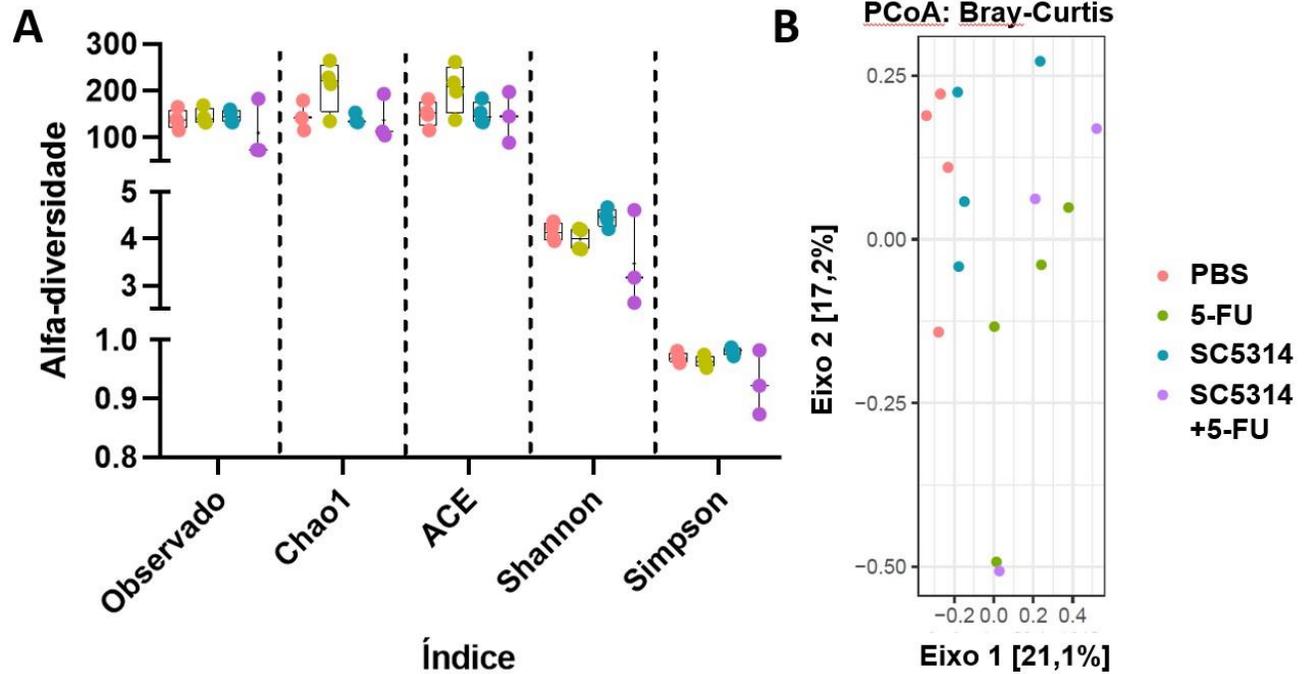


Figura 17 — Tratamento com 5-FU leva a discreta alteração estrutural na microbiota fecal de camundongos independentemente da exposição a *C. albicans*. As fezes dos camundongos foram coletadas no 8º dia do protocolo experimental para análise da microbiota intestinal. Os dados foram obtidos através do sequenciamento de DNA 16S. **A**- Alfa diversidade da microbiota fecal 8 dias após indução da mucosite intestinal (N=3-4); **B**- Beta diversidade da microbiota fecal 8 dias após indução da mucosite intestinal (N=3-4).

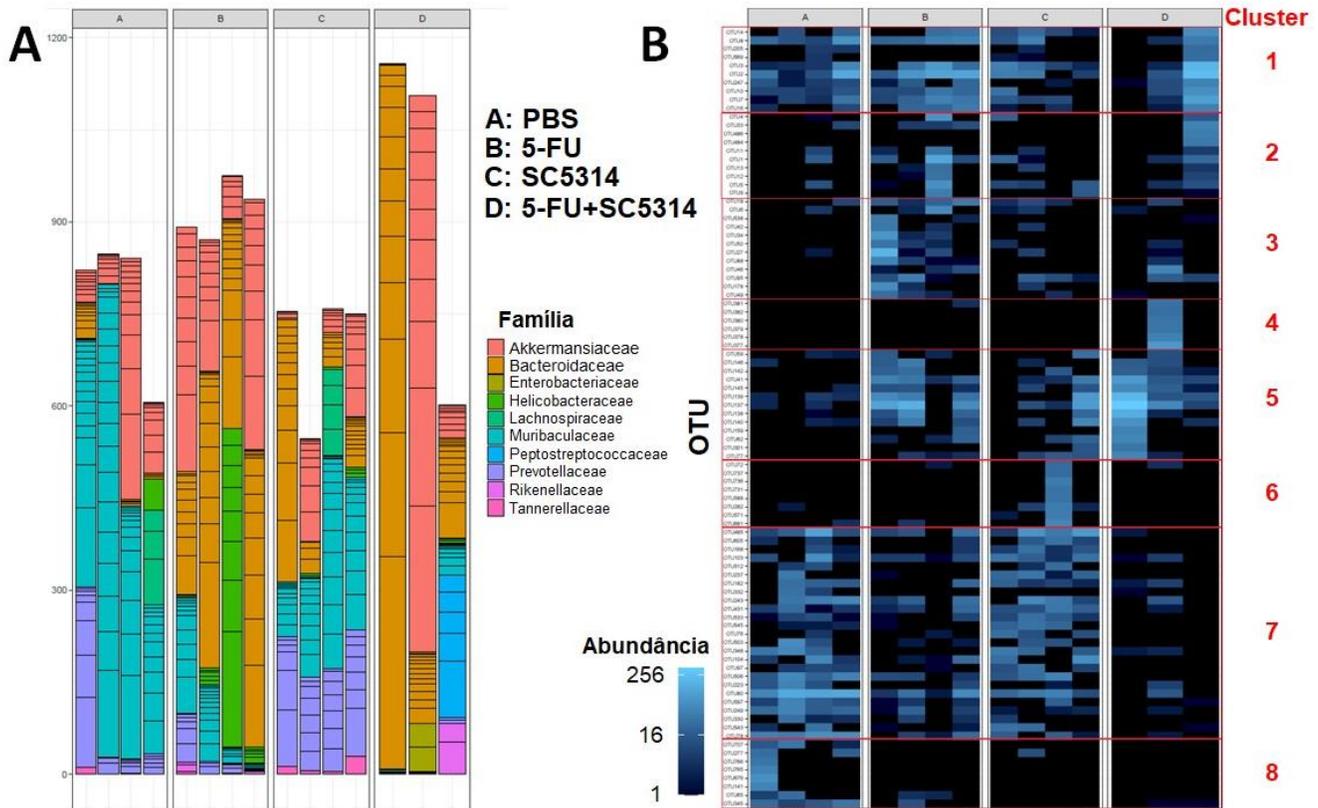


Figura 18 — Alterações na abundância relativa de OTUs na microbiota dos animais submetidos ao protocolo de quimioterapia pós exposição a *C. albicans*. As fezes dos camundongos foram coletadas no 8^o dia do protocolo experimental para análise da microbiota intestinal. Os dados foram obtidos através do sequenciamento de DNA 16S. **A**- Abundância relativa demonstrando as famílias bacterianas (N=3-4); **B**- Abundância relativa de OTUs bacterianos com maior variação entre os grupos analisados (N=3-4).

Algumas dessas OTUs puderam ser identificadas a nível de gênero e a variação de abundância relativa àquela observada na microbiota de animais controle está demonstrada na figura 19. A quimioterapia com 5-FU leva a aumento da abundância de *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Helicobacter*, e do grupo RC9 da família *Rickenellaceae*, ao passo que levou à redução de membros da família *Lachnospiraceae* e *Muribaculaceae* (Figura 19 A). Em contrapartida, a exposição a *C. albicans* levou a aumento da abundância de gêneros *Bacteroides* e *Alloprevotella*, com queda da abundância de *Akkermansia*, *Helicobacter*, *Muribaculum* e de gêneros da família *Rickenellaceae* e *Muribaculaceae* (Figura 19 B). Em contrapartida, a quimioterapia associada à exposição a SC5314 levou a aumento relativo de *Allistipes*, e gêneros da família *Enterobacteriaceae* e *Peptostreptococcaceae*, além dos aumentos de *Bacteroides* e quedas de *Alloprevotella* e de gêneros da família *Muribaculaceae* (Figura 19 C). Estes dados sugerem que este grupo apresenta uma composição de microbiota alterada em relação aos demais grupos experimentais.

Após demonstração de que a exposição a *C. albicans* induz alteração da microbiota intestinal e translocação bacteriana em camundongos com mucosite induzida por 5-FU, foi feita uma contagem diferencial de bactérias do gênero *Enterococcus* e *Staphylococcus*, comumente encontradas em biofilmes mistos com *C. albicans* (BERTOLINI *et al.*, 2021). Primeiramente, foram avaliadas as fezes dos animais em diferentes tempos, sendo observado que existe um aumento significativo na carga de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. no 8º dia nos animais com mucosite (Figura 20), fato não observado em animais que foram também expostos a linhagem SC5314 (Figura 20 A e D).

Quando avaliada a contagem diferencial de bactérias no íleo, também foi observado que parece haver um aumento das contagens de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. no 8º dia do protocolo experimental nos animais que receberam quimioterapia, com e sem exposição a *C. albicans* (Figura 20 B e E). Porém, quando avaliada a carga bacteriana no fígado, é possível notar que existe uma translocação expressiva de *Enterococcus* sp., mas não de *Staphylococcus* para este tecido no 8º dia do protocolo apenas no grupo apenas com mucosite (Figura 20 C e F). Em contrapartida, é possível observar que animais que receberam *C. albicans* com e sem mucosite apresentaram translocação apenas de *Staphylococcus* sp. para este tecido no 8º dia do protocolo experimental (Figura 20 C e F).

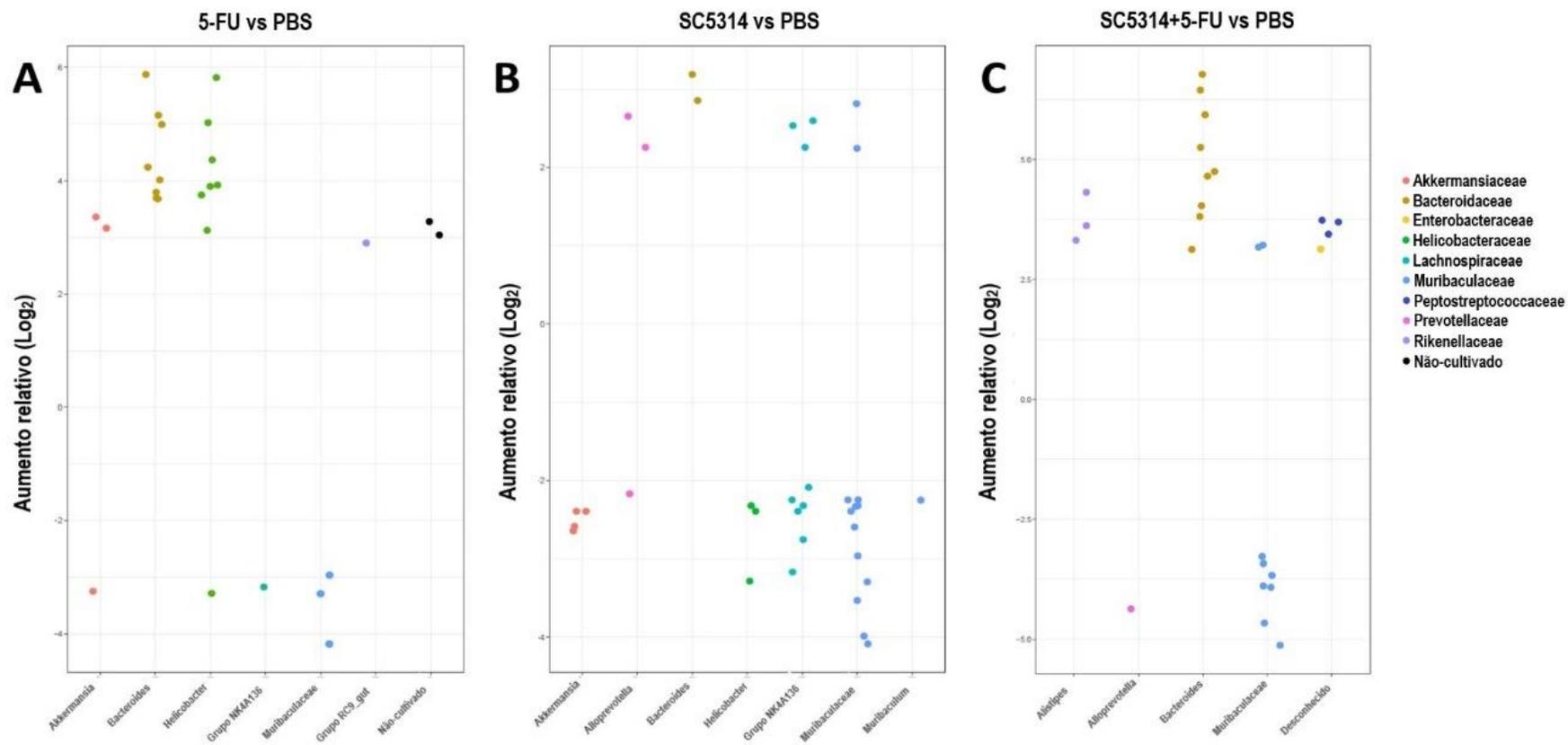


Figura 19 — Aumento relativo da abundância de famílias da microbiota bacteriana em relação ao grupo PBS. As fezes dos camundongos foram coletadas no 8º dia do protocolo experimental para análise da microbiota intestinal. Os dados foram obtidos através do sequenciamento de DNA 16S. **A**- PBS vs 5-FU (N=3-4); **B**- PBS vs SC5314 (N=3-4); **C**- PBS vs SC5314+5-FU (N=3-4).

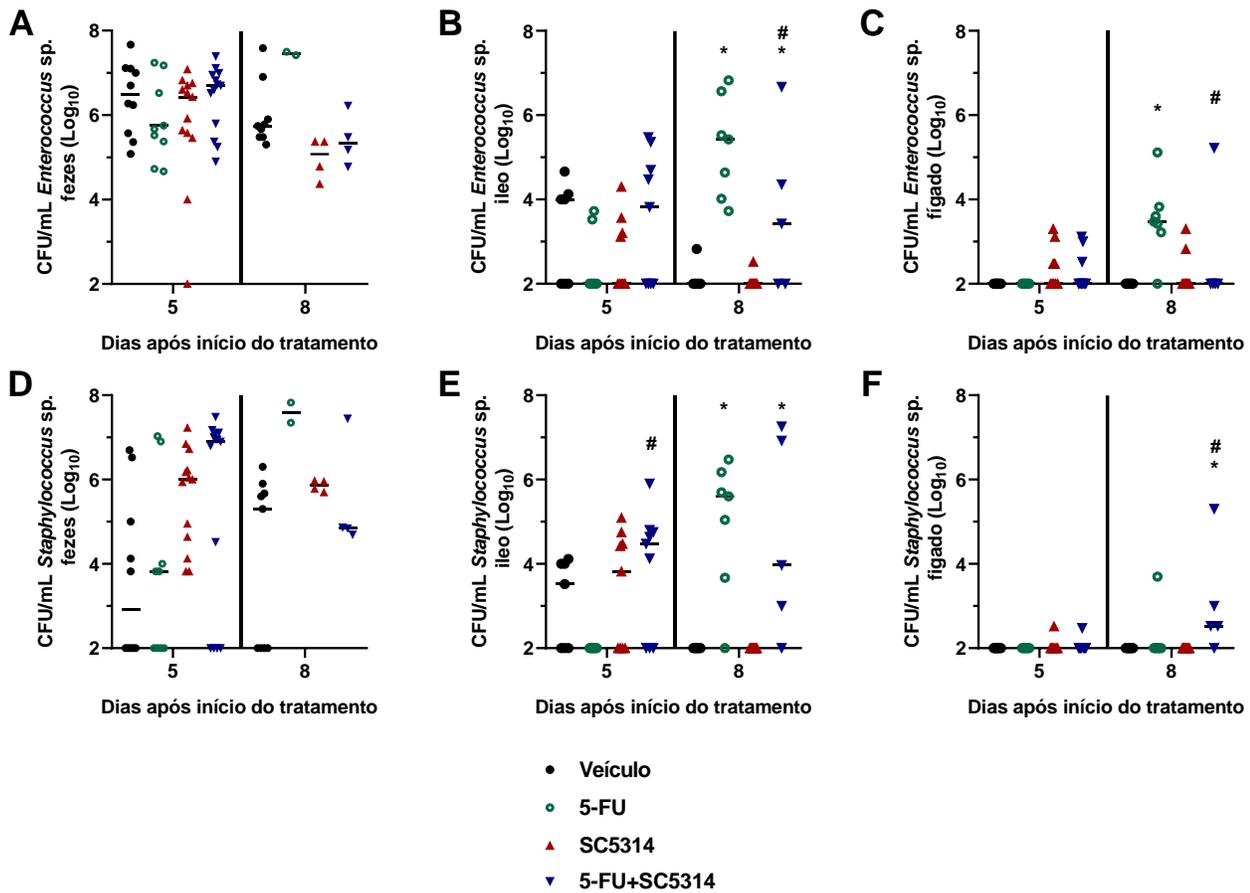


Figura 20 — Contagem diferencial de bactérias nas fezes, íleo e fígado nos grupos expostos ou não a *C. albicans*. Após a colonização por *C. albicans* a carga bacteriana diferencial foi acompanhada nas fezes em diferentes tempos até o período de eutanásia. Para tanto as fezes foram homogeneizadas em solução salina 0,9% estéril e plaqueada em ágar bile esculina. Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Tukey. *: diferença em relação ao grupo PBS no mesmo dia avaliado. #: diferença em relação ao grupo 5-FU no mesmo dia avaliado. N=2-10 **A, B e C**- Contagem de *Enterococcus* sp. nas fezes, íleo e fígado respectivamente; **D, E e F**- Contagem de *Staphylococcus* sp. nas fezes, íleo e fígado respectivamente.

Os resultados anteriores demonstram que há infecção sistêmica por *C. albicans* e por bactérias do gênero *Staphylococcus* no grupo exposto ao fungo que recebeu quimioterapia. Assim, foram feitos tratamentos com antifúngico ou antibacterianos durante o protocolo experimental da mucosite, afim de elucidar o motivo do óbito dos animais com mucosite e infectados com *Candida albicans* (Figura 21). Neste experimento foi observado que a administração dos antibacterianos, vancomicina ou imipenem para os animais apenas com mucosite levou a discreto aumento da perda de peso corporal (Figura 21 A) e do escore clínico (Figura 21 B), mas não teve influência na taxa de sobrevivência destes (Figura 21 C). Porém, quando administrados em animais com mucosite e infectados com SC5314, tais tratamentos não apresentaram qualquer efeito nos parâmetros avaliados (Figura 21 A e B), sendo ineficazes em reduzir a mortalidade dos animais que receberam a infecção e quimioterapia (Figura 21 C).

O grupo de animais com mucosite que recebeu *C. albicans* e foi tratado com antifúngico (anfotericina B (AMB)) levou a redução da perda de peso (Figura 21 A) e das manifestações clínicas (Figura 21 B) induzidas pela quimioterapia. De maneira marcantes, este grupo teve uma sobrevivência de 83% até o 10º dia do protocolo experimental, ao passo que os animais com mucosite mais *C. albicans* que não receberam antifúngico, tiveram uma letalidade de 100% até o 8º dia do protocolo experimental (Figura 21 C). Estes dados sugerem que *C. albicans* acentua a mucosite e causa letalidade nos animais.

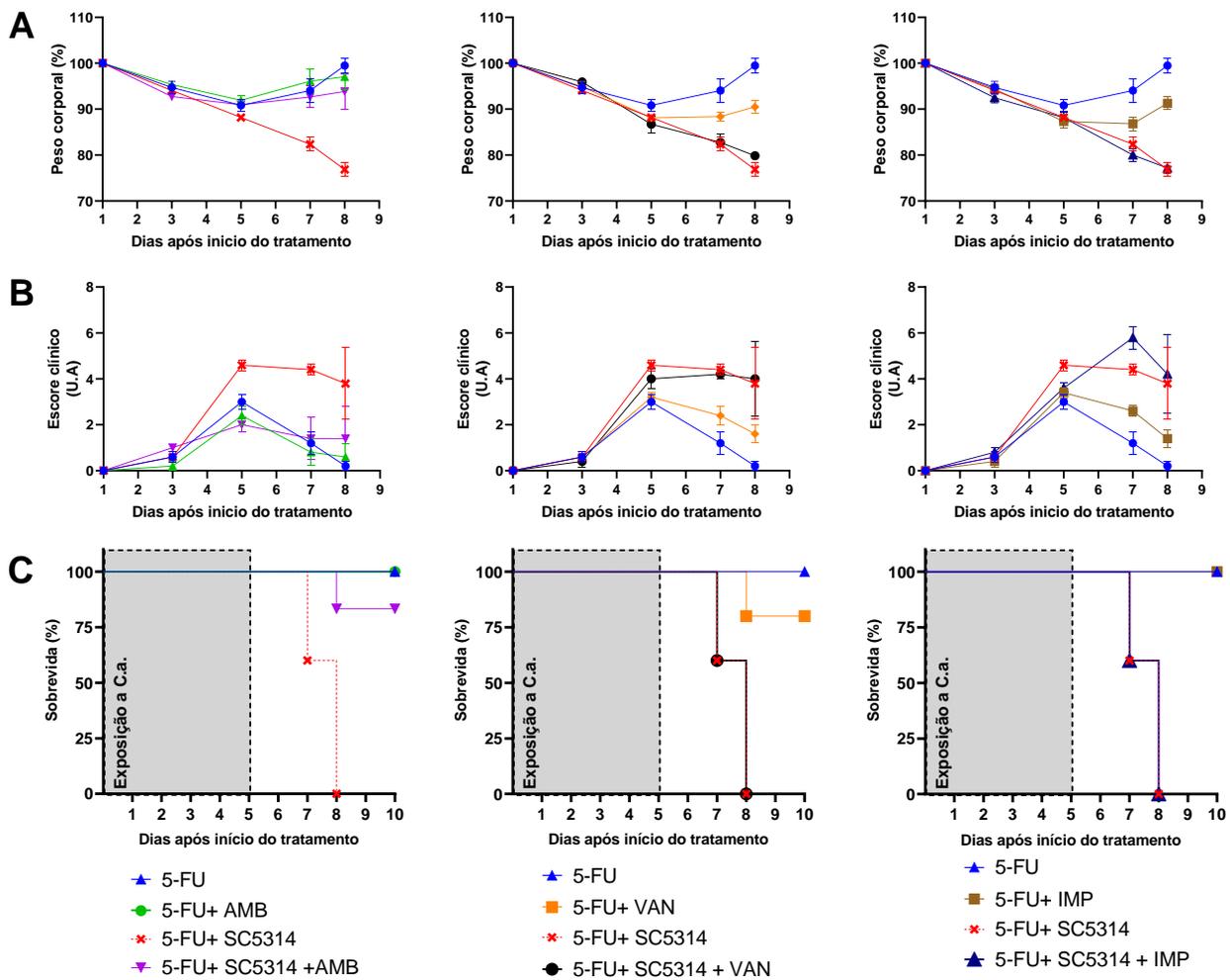


Figura 21 — Tratamento com antimicrobianos no protocolo experimental da mucosite com *C. albicans*. O protocolo da mucosite foi repetido como já descrito. O tratamento com antimicrobianos (Vancomicina (VAN), Imipeném (IMP) e Anfotericina B (AMB)) iniciou-se no 4º dia do protocolo experimental e durou até o 6º dia do protocolo experimental. Os antibacterianos foram administrados a cada 12 horas e o antifúngico foi administrado em dose única a cada dia. **A** – Peso corporal (N=5); **B**- Escore clínico (N=5); **C**- Curva de sobrevivência (N=5).

5.3 O aumento da disponibilidade de triptofano, mas não tirosina, favorece alterações morfológicas em *C. albicans*, promovendo a filamentação

Os resultados até aqui demonstram que a lesão intestinal, disbiose e translocação microbiana, incluindo de *Staphylococcus* sp. e de *C. albicans* são acentuadas em animais em quimioterapia e expostos ao fungo, o que favorece uma maior letalidade deste grupo.

BATISTA 2023 demonstrou que havia queda da expressão de *Ido1* e alteração da microbiota fecal após a quimioterapia, o que estava associada a queda da concentração de catabólitos de triptofano no intestino de animais com mucosite. Assim, hipotetizamos que essas alterações poderiam tornar aminoácidos como o triptofano disponíveis para patógenos como *C. albicans*. Para validar que há menor catabolismo de triptofano durante a quimioterapia, foi feita uma razão entre a concentração dos metabólitos de triptofano, tanto do hospedeiro, como da microbiota, e de triptofano no plasma e íleo dos animais com mucosite induzida por 5-FU usando os dados obtidos por BATISTA, 2023. Assim foi observado que existe uma queda expressiva na razão no plasma e íleo dos animais com mucosite no 5º do protocolo experimental (Figura 22 A, B, C). Estes dados reforçam, que que os tecidos animais têm uma maior disponibilidade de triptofano após o protocolo de indução da mucosite intestinal.

Assim, conduzimos experimentos *in vitro* com exposição de *C. albicans* a concentrações crescentes do aminoácido, de modo a mimetizar uma maior disponibilidade do triptofano para o fungo. Após o cultivo das linhagens de *Candida albicans* (SC5314 e BSC1) juntamente com triptofano (Trp) em meio quimicamente definido (SLD) foi possível observar que as diferentes concentrações de Trp induzem pouca (Figuras 23 A e B) ou nenhuma (Figura 24 A) influência no crescimento planctônico do fungo.

Em contrapartida, foi possível observar que o Trp parece ter efeito promotor da filamentação de maneira concentração dependente de ambas as linhagens (figuras 23 B-E e 24 B). Para a linhagem SC5314, a concentração de 80 µg/mL de triptofano acentuou a filamentação com 6 horas de incubação e a concentração de 160 µg/mL, com 1, 3 e 6 horas de avaliação. As concentrações de 10-80 µg/mL inibiram a filamentação após 24 horas de incubação (Figura 23 B). O efeito foi ainda mais aparente na linhagem BSC1. Assim as concentrações de 80 e 160 µg/mL induziram a filamentação mais precoce com, 3 e 6 horas

de incubação (Figura 24 B). A concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$ não só adiantou a filamentação, mas também foi capaz de influenciar em hifa com maiores comprimentos em 24 horas de incubação, efeito também exercido pela concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, ainda que em menor intensidade (Figura 23 D e E). A promoção da filamentação pela alta disponibilidade de triptofano foi corroborado pela alteração da morfologia da colônia de *C. albicans* cultivadas na presença de 160 $\mu\text{g/mL}$ do aminoácido (Figura 23 F).

Apesar dos efeitos na filamentação, as diferentes concentrações de Trp parecem não alterar de forma quantitativa o crescimento séssil em biofilme do fungo (Figura 23 G), embora a maior concentração usada tenha reduzido significativamente em cerca de 50% a atividade respiratória em relação ao controle com SLD sem adição de Trp (Figura 23 H). Apesar dos efeitos na atividade respiratória, indicando mudança metabólica, e na filamentação pela presença de elevadas concentrações de triptofano, o mesmo parece não ter ligação com alteração de pH (Figura 23 I).

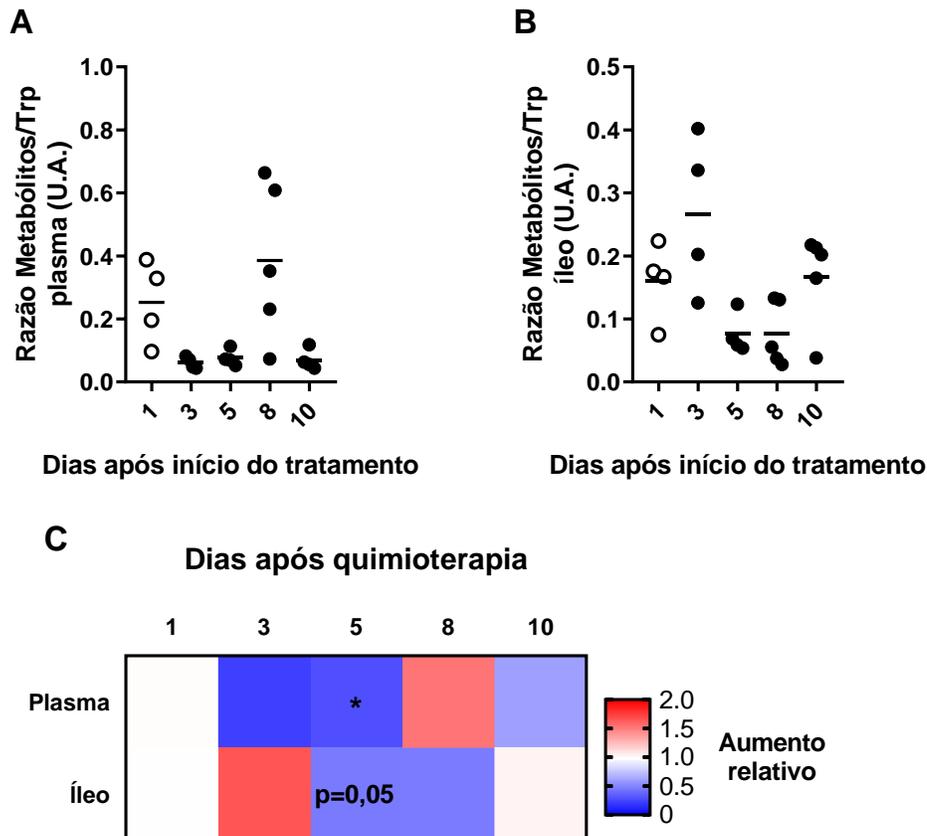
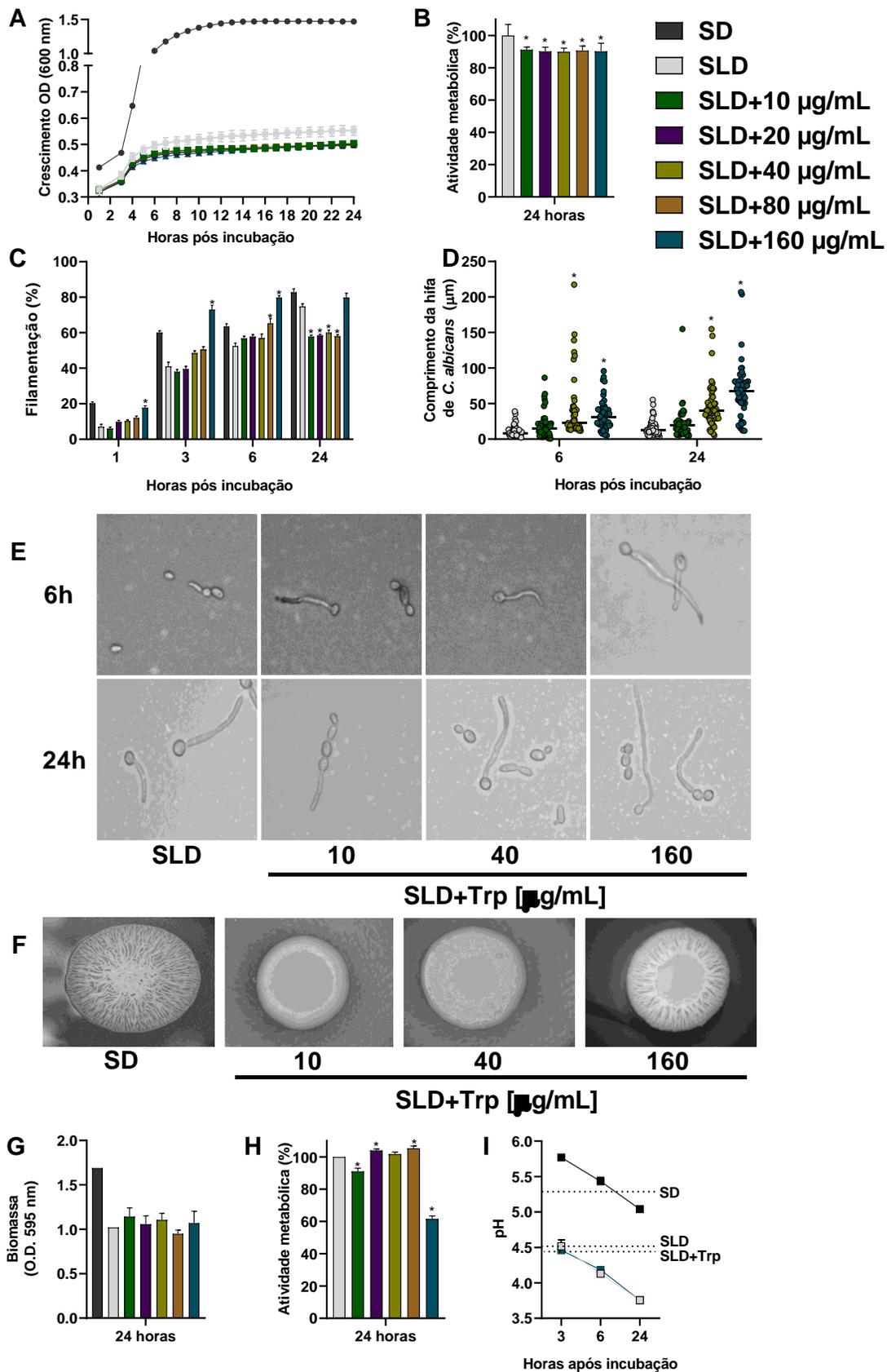


Figura 22 — Razão entre metabólitos de triptofano e triptofano no íleo de plasma dos animais com mucosite intestinal. Foi feita uma cinética de 10 dias junto ao protocolo de indução da mucosite intestinal, com coletadas diárias, de íleo de plasma dos animais para quantificar triptofano e seus metabólitos por UPLC. A- Razão metabólitos/triptofano no plasma (N=4-5); B- Razão metabólitos/triptofano no íleo (N=4-5). C- Heatmap da razão metabólitos/triptofano no plasma e íleo

Figura 23 – Parâmetros de avaliação *in vitro* dos fenótipos de *Candida albicans* na presença de triptofano para linhagem SC5314 (próxima página). De forma geral, para esses experimentos foram utilizados dois meios para cultivo SD (caldo sabouraud) ou SLD (caldo quimicamente definido) acrescido ou não de triptofano em diferentes concentrações. O crescimento planctônico de *C. albicans* foi avaliado pela medida da densidade óptica a 600nm com leituras pontuais a cada hora (0-24 horas) após incubação a 37°C. Para filamentação, *C. albicans* foi incubada na presença e ausência de Trp e em tempos selecionados alíquotas foram retiradas para contagem em lâmina com auxílio do microscópio. Foram aplicados os testes estatísticos ANOVA Two-Way teste de Tukey. **A-** Concentração resposta de triptofano no crescimento planctônico ao longo de 24 horas (N=5); **B-** Concentração resposta para biofilme em 24 horas % (N=5); **C-** Concentração resposta para a filamentação em 1, 3, 6 e 24 horas (N=6); **D-** Concentração resposta para tamanho da hifa em 6 e 24 horas (N=50); **E** Morfologia da colônia na presença ou não de triptofano incubada a 37°C por 4 dias; **F-** Hifas na presença ou não de triptofano com 6 e 24 horas de incubação; **G-** Concentração resposta para biomassa em O.D. (N=6); **H-** Concentração resposta para atividade metabólica em 24 horas (N=6); **I-** Concentração resposta para pH em 3, 6 e 24 horas após incubação com 160µg/mL de triptofano.



Com base nos dados obtidos até então, foi escolhida a concentração de 160µg/mL para os demais testes, e, como um controle adicional foi utilizado a tirosina, que assim como o triptofano é um aminoácido aromático. Nestas condições, foi possível observar que ambos os aminoácidos testados não interferiram significativamente no crescimento planctônico da linhagem SC5314 (Figura 25 A). Além disso, o efeito acentuado na filimentação se mantém apenas para o triptofano em 1, 3, e 6 horas após incubação (Figura 25 B). Quanto ao comprimento das hifas, a tirosina a 160 µg/mL não é capaz de estimular um maior comprimento das hifas, como observado no triptofano após 6 e 24 horas de incubação (Figura 25 C).

5.4 O fenótipo de filimentação por triptofano em *C. albicans* é dependente de proteínas da via SPS de sensoriamento de aminoácidos e mutantes para essa via são menos virulentos após infecção de animais sob quimioterapia

Resumidamente, a via de sensoriamento de aminoácidos é composta basicamente por proteínas de membrana, como as da via SPS (Ssy1-Ptr3-Ssy5), que se comunicam com outra proteína intracelulares e fatores de transcrição, como Stp2, que levam a expressão de aminopermeases como Gap2 e Gnp1. Assim, foram utilizadas linhagens deficientes para proteínas Ssy1, Stp2 e Gnp1 bem como as suas respectivas complementares. Para comprovar que estas linhagens não teriam problema na filimentação por conta da deleção do gene, utilizamos o caldo SD como controle de filimentação e todas foram capazes de filimentar com 3 e 6 horas nesta condição. Porém, as três linhagens, Δ ssy1, Δ stp2 e Δ gnp1, não foram capazes de filimentar com 3 e 6 horas pós incubação na presença de triptofano, como fenótipo já visto e relatado para linhagem SC5314 (Figura 26 A, B e C).

De forma adicional, utilizamos a linhagem complementadas na presença de triptofano, e a complementação dos respectivos mutantes com STP2 e GNP1 permitiu a filimentação após 3 e 6 horas na presença de triptofano (Figura 26 B e C). A linhagem Ssy1 complementada, parece não conseguir utilizar triptofano para filimentação (Figura 26 A). Isso nos leva a acreditar que as proteínas Ssy1, Stp2 e Gnp1 são utilizadas não somente para captação de triptofano pelo fungo, mas também importantes na utilização deste aminoácido no processo de filimentação (Figura 26 A, B e C).

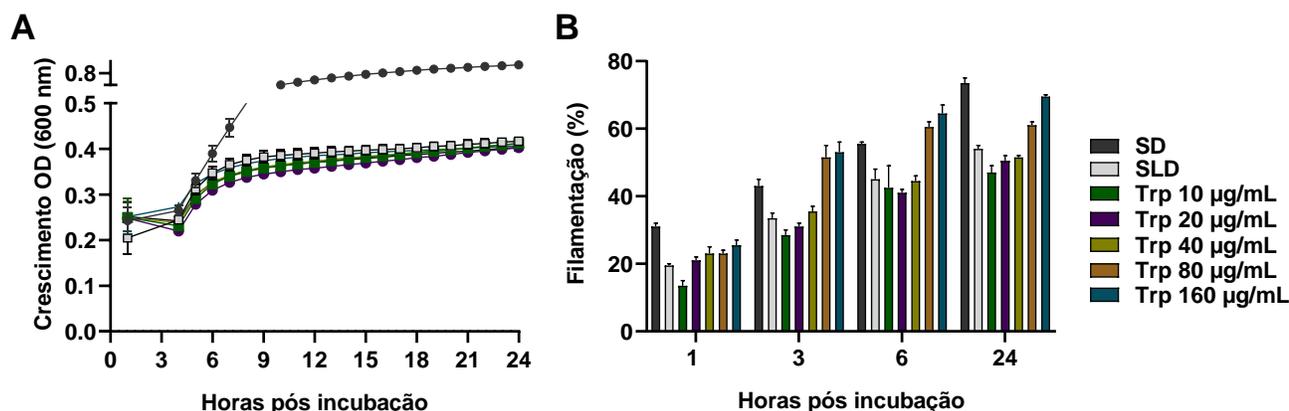


Figura 24- Avaliação do crescimento e filamentação de *C. albicans* na presença de triptofano para linhagem BSC1. Para avaliação da formação de produção de biofilme e biomassa deste, *C. albicans* foi adicionada a poços contendo meio SLD acrescido ou não diferentes concentrações de Trp, as placas foram mantidas a 37°C por 24 horas. Para filamentação, *C. albicans* foi incubada na presença e ausência de Trp e em tempos selecionados alíquotas foram retiradas para contagem em lâmina com auxílio do microscópio. **A-** Concentração resposta de triptofano no crescimento plancônico ao longo de 24 horas (N=5); **B-** Concentração resposta para a filamentação em 1, 3, 6 e 24 horas (N=6).

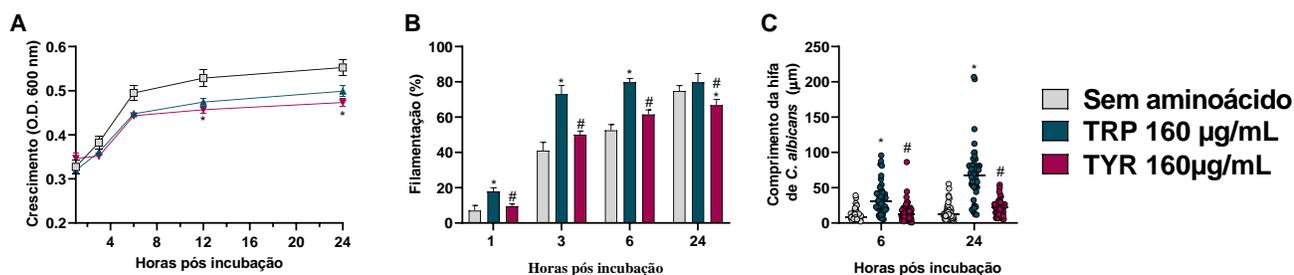


Figura 25 — Comparação do crescimento e filamentação de *C. albicans* em meio quimicamente definido com uso de dois aminoácidos para linhagem SC5314. Para esse experimento foram utilizados os mesmos parâmetros da figura 12. Adicionalmente foram medida o comprimento da hifa com auxílio do *software ImageJ* Foram aplicados os testes ANOVA Two-Way seguido de Tukey (**** = $p > 0.0001$; # = $p > 0.05$). **A-** Comparação do crescimento entre triptofano e tirosina ao longo de 24 horas (N=5); **B-** Comparação da filamentação para triptofano e tirosina (N=6); **C-** Comparação do comprimento da hifa entre triptofano e tirosina (N=50). **D-** Comparação da biomassa entre triptofano e tirosina (N=6). **E-** Comparação da atividade metabólica entre triptofano e tirosina (N=6).

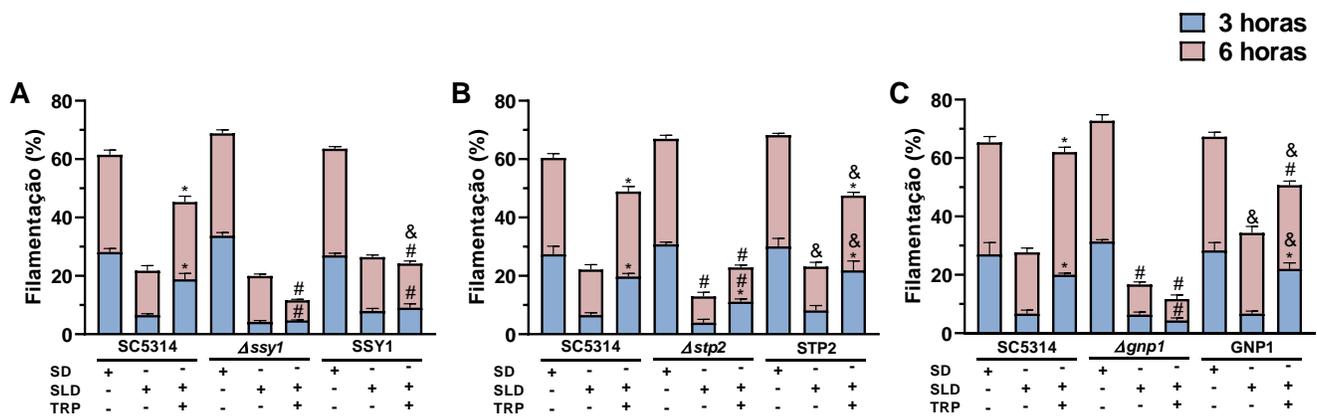


Figura 26 — Fenótipo de filimentação na presença de triptofano em linhagens mutantes para proteínas SPS da via de sensoriamento de aminoácidos em *Candida albicans*. Foram utilizados os mesmos parâmetros de filimentação citados na Figura 12. **A**- Desafio de filimentação com linhagem Δ ssy1 na presença de triptofano a 160 μ g/mL; **B**- Desafio de filimentação com linhagem Δ gnp1 na presença de triptofano a 160 μ g/mL; **C**- Desafio de filimentação com linhagem Δ stp2 na presença de triptofano a 160 μ g/mL.

O nosso próximo passo foi avaliar se as linhagens mutantes incapazes de filantar na presença de triptofano agravariam o quadro de mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Ao testar as linhagens mutantes de *Candida albicans* para captação de aminoácidos ($\Delta ssy1$, $\Delta stp2$ e $\Delta gnp1$) no protocolo experimental *in vivo* foi possível observar, em linhas gerais, doença mais branda (Figura 27 A) e proteção da taxa de mortalidade dos camundongos que receberam também 5-FU (Figura 27 B). Quando observamos as linhagens isoladamente, foi possível observar uma sobrevida aproximada de 20% para $\Delta ssy1$, 40% para $\Delta stp2$ e 42% para $\Delta gnp1$ (Figura 27 B). De forma interessante, os animais com mucosite que receberam a linhagem $\Delta gnp1$ além de ter a letalidade atrasada, ainda apresentaram um escore clínico abaixo das demais linhagens, incluindo dos animais que receberam apenas 5-FU, nos levando a acreditar que a aminopermease GNP1 em *C. albicans* é importante para acentuar a mucosite induzida por 5-FU.

Como a linhagem mutante para GNP1 atrasou e reduziu a letalidade dos animais com mucosite, foram conduzidos novos experimentos para condução da eutanásia dos animais no 5º dia após indução da mucosite, afim de averiguar outros parâmetros, como carga fúngica. Assim foi observado que os animais com mucosite que receberam a linhagem $\Delta gnp1$ e sua complementar (GNP1) tiveram perda de peso e escore clínico semelhante aos animais do grupo 5-FU + SC5314, como observado no experimento de sobrevida (Figura 28 A e B). Quanto a contagem de leucócitos totais no sangue, os animais que receberam apenas 5-FU e os animais do grupo 5-FU e inoculados com as diferentes linhagens desenvolveram leucopenia (Figura 28 C). Curiosamente, os animais do grupo 5-FU + $\Delta gnp1$ apresentaram contagens de leucócitos mais altas que os demais grupos que receberam 5-FU (Figura 28 C).

Quanto aos dados de carga fúngica no tecido dos animais com mucosite induzida por 5-FU, foi possível observar uma redução significativa da contagem de leveduras no íleo dos animais que receberam a linhagem $\Delta gnp1$ (Figura 28 D). Quando averiguada a translocação fúngica, para tecidos como fígado e rim, os animais que receberam a linhagem SC5314 apresentaram carga fúngica significativa nestes órgãos, já os animais com a linhagem $\Delta gnp1$ e GNP1 não apresentaram translocação fúngica (Figura 28 E e F).

Estes dados demonstram que a via SPS é importante para o uso do triptofano durante o processo de filantação de *C. albicans*, e que mutantes para essa via, especialmente para o

gene *Gnp1*, induzem menores impactos durante o processo de mucosite e atenuando a patogenicidade da *C. albicans* neste cenário.

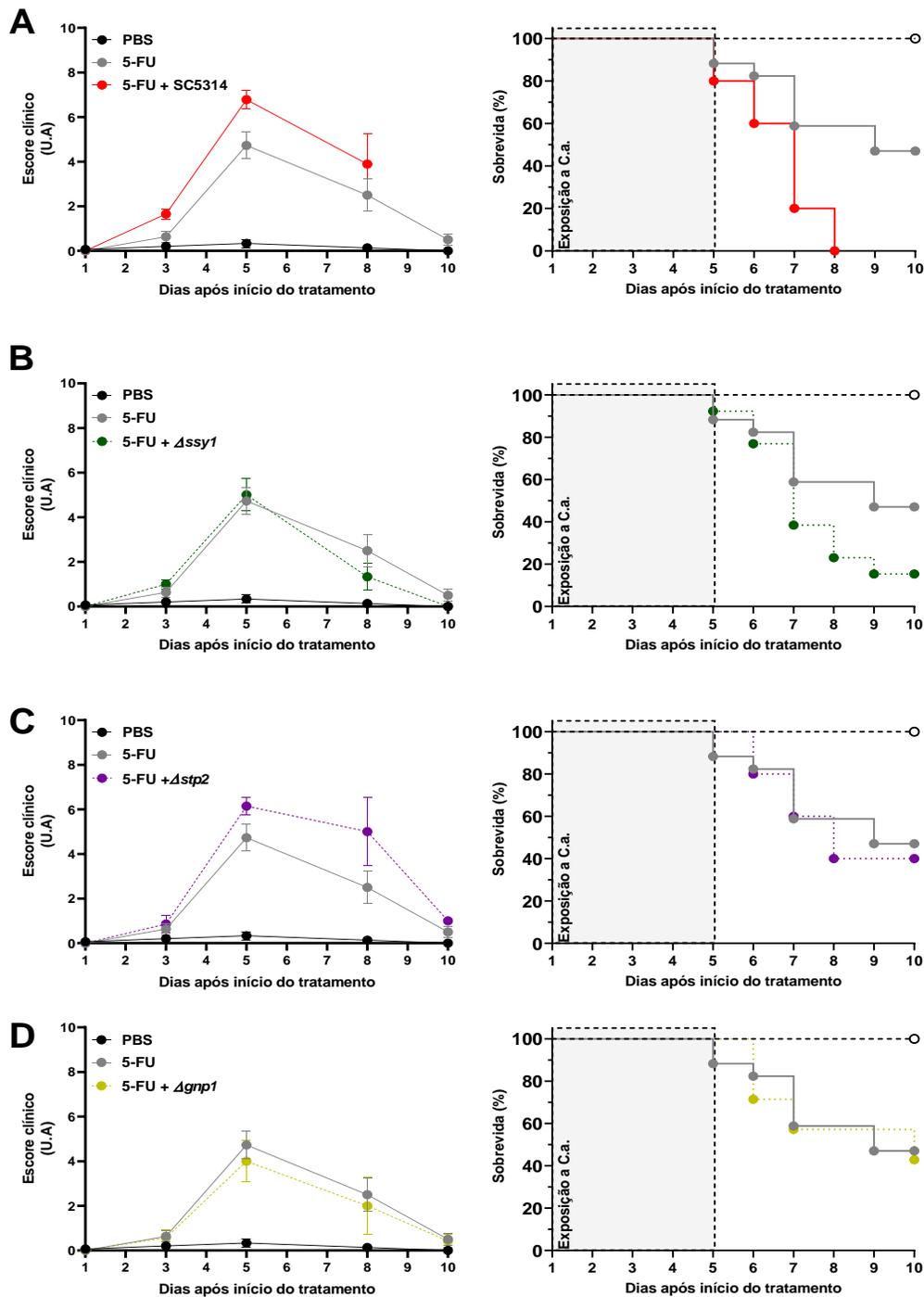


Figura 27 — Escore clínico e curva de sobrevividas com as linhagens mutantes para via SPS e aminopermeases. Os camundongos foram submetidos ao protocolo experimental e receberam as linhagens mutantes para *Δssy1*, *Δstp2* e *Δgnp1*. Os animais foram acompanhados por 10 dias após indução da mucosite e foi avaliado escore clínico e sobrevivida destes animais. **A**- Escore clínico das linhagens SC5314, *Δssy1*, *Δstp2* e *Δgnp1* respectivamente (N=6); **B**- Curva de sobrevivida das linhagens SC5314, *Δssy1*, *Δstp2* e *Δgnp1* respectivamente (N=6).

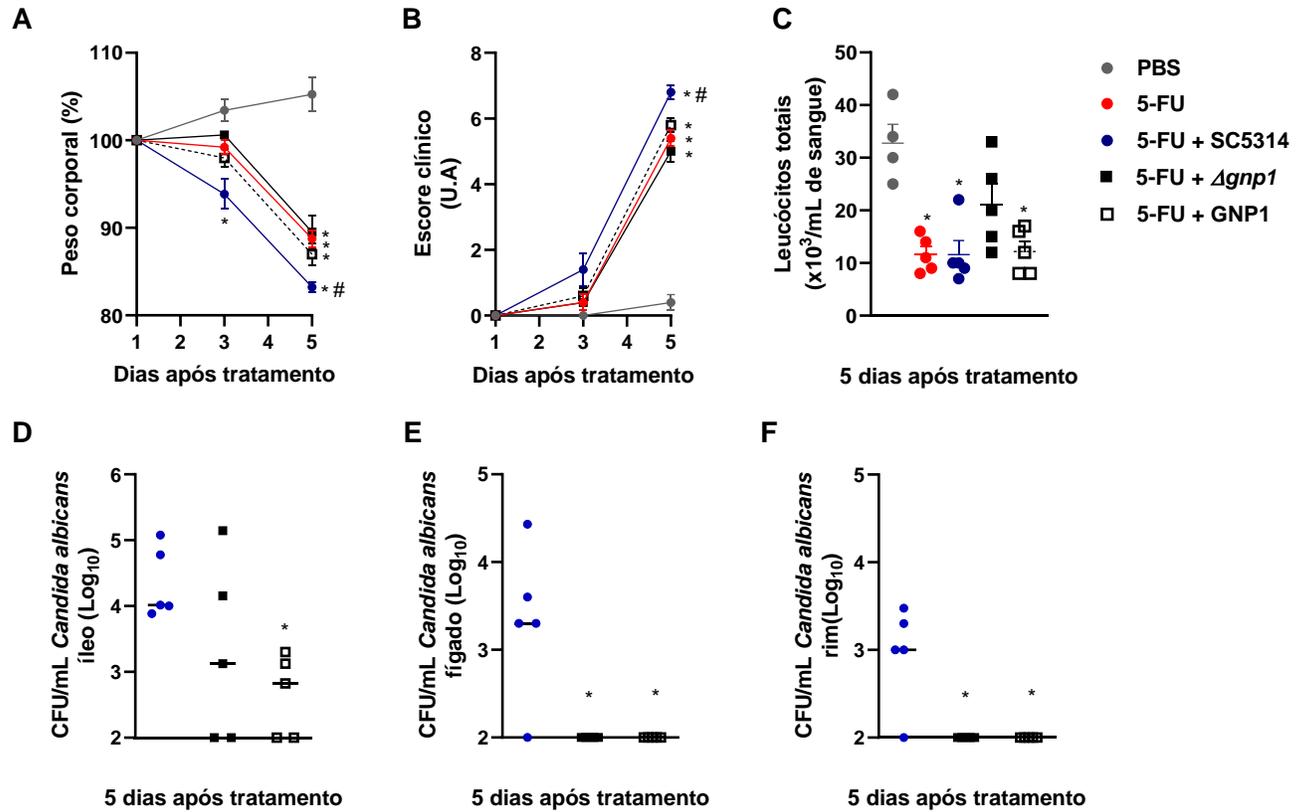


Figura 28 — Eutanásia dos camundongos no 5º dia do protocolo experimental com a linhagem mutante para gene *Gnp1*. Protocolo igual aos descrito anteriormente, com eutanásia dos animais 5 dias após indução da mucosite. **A**- Peso corporal (N=4-5); **B**- Escore Clínico (N=4-5); **C**- Contagem de leucócitos totais no sangue (N=4-5); **D**, **E** e **F**- Carga fúngica no íleo, fígado e rim respectivamente (N=5).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi padronizado um modelo de infecção oportunista por *C. albicans* em um cenário de mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Assim, foi notório que o modelo em estudo é oportunista, uma vez que os animais que apenas receberam *C. albicans* sobreviveram; também vale ressaltar que esta levedura não faz parte da microbiota de camundongos C57BL/6j e a mesma foi capaz de colonizar os animais sem causar danos aparentes. Nossos dados sugerem que *C. albicans* acentua o quadro de mucosite, uma vez que cerca de 60% dos animais que receberam apenas quimioterápico sobrevivem e quando este grupo é infectado por *C. albicans*, 100% dos animais falecem.

Um estudo anterior avaliou a colonização gástrica por *C. albicans* (SC5314) em camundongos C57BL/6j pós-tratamento com antibióticos com inóculo de 2×10^8 cedido por gavagem, mostrando que esta levedura é capaz de ser detectada no estômago, até o 21º dia pós-gavagem (MASON *et al.*, 2012). De forma semelhante, nossos dados também mostram uma colonização por *C. albicans*, não só no estômago, mas em todo o TGI até 10º dia e fezes até o 21º dia (dados não apresentados), sugerindo uma colonização duradoura. Isso tudo com uma abordagem mesmo invasiva, onde foi cedido um inóculo menor (1×10^7) disponível na água de beber dos animais, e tanto animais com e sem mucosite foram colonizados, o que nos permitiu avaliar somente os impactos causados por *C. albicans*.

Achados na literatura mostram que o 5-FU também causa uma disbiose associada à mucosite, isso tudo leva a uma alteração e disfunção na absorção dos recursos nutricionais, bem como permeabilidade e integridade intestinal (LAMONT; HAJISHENGALLIS, 2015; BATISTA, 2023). BATISTA, 2023 relata em seus dados que o tratamento por 5-FU leva a alterações na composição e estrutura da microbiota fecal de camundongos no 8º dia do protocolo experimental (mesmo utilizado neste trabalho). Os dados achados no presente trabalho estão de acordo e de forma adicional, foi possível observar que os animais com mucosite e expostos a *C. albicans* sofreram uma alteração na microbiota bacteriana que difere em relação àquela vista nos animais que receberam apenas 5-FU.

Sobre a quantificação de triptofano e seus metabólitos, achados na literatura mostram que o tratamento com 5-FU induz uma alteração da contração de TRP e seus metabólitos como, quinurenina, ácido indolacético e indolcarboxialdeído, tanto no plasma quanto no íleo

dos animais com mucosite induzida por 5-FU (BATISTA, 2023). Os dados apresentados aqui, mostram que existe uma alteração na razão entre TRP e seus metabólitos no íleo e plasma dos animais. Mostrando que além da disbiose, existe uma alteração na biodisponibilidade deste aminoácido em questão.

Além disso, em casos de mucosite oral induzida por 5-FU, *C. albicans* é capaz de causar uma infecção oportunista, levando a alterações na composição da microbiota, favorecendo que outras bactérias possam colonizar este ambiente, por exemplo, *Enterococcus faecalis*. Esta espécie bacteriana é capaz de acentuar a patogenicidade de *C. albicans*, causando uma infecção mais severa (MASON *et al.*, 2012; BERTOLINI *et al.*, 2019). Tanto o *E. faecalis* quanto a *C. albicans* são encontrados como comensais no TGI de humanos, no entanto ambos são oportunistas, e as coinfeções com estas espécies são comuns (WADE *et al.*, 1995; PECIULIENE *et al.*, 2001;) indicando assim, que as condições que favorecem a infecção por estes microrganismos são semelhantes.

Alguns estudos mostram que a proteína EntV secretada por *E. faecalis* inibe a formação de biofilme e hifas em *C. albicans* (CRUZ *et al.*, 2013; GRAHAM; CRUZ; LORENZ, 2017). De forma sugestiva, esse efeito de inibição de *E. faecalis* sob *C. albicans*, pode explicar o motivo da redução da carga fúngica no ceco do 5º para o 8º dia de protocolo experimental nos animais sem mucosite; também sugerimos que a permanência do fungo neste tecido esteja ligada aos desequilíbrios imunometabólicos causados pela mucosite intestinal. Isso também pode explicar o motivo dos animais sem mucosite e colonizados por *C. albicans* não apresentarem nenhum sinal clínico de infecção.

Quanto a translocação de *Staphylococcus* sp., este gênero de bactéria também tem associação a coinfeções com *C. albicans*, possuindo assim diversas interações físicas e moleculares sinérgicas, tornando esse tipo de coinfeção letal (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DYCK, 2019). Já existem trabalhos elucidando como essa interação ocorre, assim a proteína de adesão expressa por *C. albicans* durante a formação de hifas, Als3, funciona como receptor para *S. aureus*. Neste relato os autores usaram um modelo murino de infecção na língua, cujo a infecção somente com a bactéria em questão era limitada a camada superficial do tecido, não invadindo o tecido; por outro lado quando associado a *C. albicans* neste modelo, ambos os microrganismos invadiam o tecido (PETERS *et al.*, 2012). Outro trabalho mais recente mostrou que estas proteínas de adesão não só ajudam interação

bactéria-fungo, mas também promovem disseminação bacteriana para o fígado, como foi relatado por Van Dyck *et al.*, em 2021.

Nossos achados mostram que já no 5º dia de protocolo experimental existe uma expansão de *Staphylococcus* sp. no ceco, quando observado o 8º dia, essa translocação é reduzida nos animais sem mucosite e com *C. albicans*, e nesse grupo como já foi discutido anteriormente, a cagar fúngica também reduz 8 dias após indução da mucosite. Podemos sugerir que neste modelo possa ocorrer uma interação sinérgica entre *C. albicans* e *Staphylococcus* sp. ao passo que também possa ocorrer um controle do fungo por *Enterococcus* sp. Assim, é possível sugerir que a infecção por *C. albicans* favorece a translocação de *Staphylococcus* durante a mucosite intestinal induzida do 5-FU.

Candida albicans é uma levedura com uma grande flexibilidade metabólica, o que lhe permite usar diversas fontes nutricionais em seus ciclos celulares. Assim, em situação de estresse em meio com baixas disponibilidade de nutrientes, essa levedura busca diferentes recursos para se manter viável. No presente trabalho, foi utilizado um caldo de cultivo com baixa disponibilidade de fontes nutricionais e quimicamente definido (SLD), a fim de observar o efeito dos aminoácidos aromáticos triptofano ou tirosina nos diferentes padrões de crescimento de *C. albicans*. As duas linhagens testadas, SC5314 e BSC1, demonstram que os aminoácidos testados não alteraram significativamente o crescimento fúngico planctônico ou sésil dessa espécie fúngica.

Os achados em relação ao crescimento neste trabalho estão de acordo com dados na literatura para o uso de aminoácidos e proteínas extracelulares, pois tanto no hospedeiro quanto *in vitro* *C. albicans* é capaz de adquirir diversas fontes de carbono e nitrogênio de forma extracelular por ativação de SAPs (STAIB *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2005; GARBE *et al.*, 2022). Aprofundando mais os mecanismos de detecção e captação de aminoácidos, outros autores também relatam outras vias além da SAPs, como repressão catabólica de nitrogênio (NCR), via do alvo da rapamicina (TOR), sensores de aminoácidos (SPS) e Aminopermeases (AAP) (DABAS; MORSCHHÄUSER, 2007; ZANG *et al.*, 2018; RIES *et al.*, 2018). Alguns fatores de transcrição estão relacionados em muitas destas vias, como para via NCR, em situações de privação de nitrogênio esta é mediada pelos fatores de transcrição do tipo GATA, como por exemplo *Gat1* e *Gln3*, que irão regular positivamente a expressão

de permeases e enzimas catabólicas específicas desta via (HOFMAN-BANG, 1999; MAGASANIK; KAISER, 2002; REIS *et al.*, 2018).

Outra via muito importante que acreditamos estar envolvida na captação de triptofano e que possivelmente nos ajudará a entender a via de metabolização deste aminoácido por *C. albicans* é o sistema SPS (Ssy1-Ptr3-Ssy5), que é um elemento chave para monitorar as concentrações de aminoácidos extracelulares. Esta via contém uma AAP ligada à membrana que é ativada ao entrar em contato com aminoácidos. Assim, com testes na linhagem mutante para esta via (Δ ssy1) e para o fator de transição Δ stp2, acreditamos responder parte do mecanismo de captação de triptofano, pois acreditamos que estas vias estão envolvidas com sua assimilação e posterior metabolização.

Quanto ao *stp2* este é clivado e ativado pela via SPS e está envolvido em diversos processos de regulação bioquímica, incluindo expressão de AAPs, e morfogênese de *C. albicans* (MATTINEZ; LJUNGADHL, 2004). Já é relatado na literatura que algumas AAP, como GAP2, tem potencial de assimilar um gama de aminoácidos como fenilalanina, metionina, valina, leucina, tirosina e triptofano (KRAIDLOVA *et al.*, 2016). Isso fortalece a hipótese que a ativação de *stp2* esteja envolvida na assimilação de triptofano no caso deste aminoácido ter sua biodisponibilidade acentuada. Em 2022, Garbe *et al.*, demonstraram que a captação do aminoácido prolina é importante para a filamentação de *C. albicans*, bem como para a sobrevivência e fuga deste fungo de células do sistema imune inato (GARBE *et al.*, 2022).

Quanto ao biofilme, foi possível observar que existe uma redução da biomassa deste após 24 horas de incubação. Alguns achados na literatura mostram que quando o sobrenadante de biofilme contendo moléculas de quórum sensing, como farnesol e tirosol, são adicionadas em uma cultura de células planctônicas há inibição da formação de biofilme e morfogênese de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (MARTINS *et al.*, 2007) e quando estas moléculas são adicionadas em biofilmes já formados ou para formação, ambas reduzem a biomassa (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019). Assim, pode ser que a redução da biomassa no tempo mais tardio ocorra por conta da geração de moléculas de *quórum sensing* como, triptofol e tirosol, que alterariam a formação de biofilme.

Em 2002, Tripathi *et al.*, mostram que, quando a *C. albicans* é privada de aminoácidos ela é capaz de formar pseudo-hifas, mas não consegue formar hifas verdadeiras. Outro estudo

mostra que, quando deletado sensores de aminoácidos, *C. albicans* fica apenas na forma de leveduras e não consegue transitar para forma hifal (BREGA; ZUFFEREY; MAMOUN, 2004). Os resultados deste trabalho, sugerem que existe um efeito agudo do triptofano na filamentação de *C. albicans*, e que este é, concentração dependente.

Os fungos podem secretar diversas proteases envolvidas na utilização de nutrientes, como os contidos nos tecidos do hospedeiro. Assim essas proteases ou SAPs, possuem uma expressão diferencial na presença de albumina sérica bovina (BSA) e estas contribuem para a patogenicidade de *C. albicans* (REUß; MORSCHHÄUSER, 2006; RAMACHANDRA *et al.*, 2014). Assim, foi descrito que a utilização de alguns aminoácidos, como prolina, promove a patogênese da infecção por *C. albicans*, de modo que o catabolismo de prolina induz a morfogêneses de hifas via ativação de cAMP/PKA. Adicionalmente, esse estudo também sugere que a captação de arginina induza a filamentação através da mesma via, uma vez que a arginina intracelular é convertida em prolina (SILAO, *et al.*, 2019). Foi demonstrado também em *C. albicans* que *gln3*, que regula positivamente a captação de nitrogênio, é necessário para filamentação induzida por privação de nitrogênio e virulência desta levedura em modelo murino (LIMJINDAPORN; KHALAF; FONZI, 2003; LIAO; RAMON; FONZI, 2006). Além disso, a via de sensor SPS e o fator de transcrição *stp2* além de mediar a aquisição nutricional, também são responsáveis pela sobrevivência no fagossomo e posterior evasão imune (MIRAMÓN; LORENZ, 2016).

Estes achados na literatura ajudam a entender como o catabolismo de aminoácidos por *C. albicans* contribuem para virulência e infecção por esta levedura em ambientes com desregulação imunometabólica, como por exemplo na mucosite intestinal. Assim, vamos analisar *in vitro*, de forma detalhada a expressão de fatores de virulência de *C. albicans* na presença de triptofano e, além disso, observar como as linhagens mutantes para a captação de aminoácidos se comportam na presença de Trp. Isso nos ajudará a entender o processo de catabolismo deste aminoácido por *C. albicans* e como isso poderá contribuir para o processo de infecção oportunista em camundongos com mucosite.

Diante do exposto, algumas perspectivas foram traçadas, como análise transcricional do fungo na presença de triptofano e, eventualmente do triptofol, além da dosagem de metabólitos produzidos pelo fungo neste sistema *in vitro*, incluindo triptofol. Para os dados

in vivo, análises de parâmetros histológicos e inflamatórios em experimentos com linhagens mutantes e complementares no 5º dia do protocolo experimental.

Em suma, os dados observados aqui, sugerem que *C. albicans* acentua o quadro de mucosite induzida por quimioterapia, levando a lesões intestinais severas, alterações na composição e estrutura da microbiota fecal e translocação bacteriana e fúngica. Neste cenário, o acúmulo de triptofano induzido pela quimioterapia parece desempenhar papel chave, pois a assimilação deste aminoácido por meio da via SPS envolvendo STP2 e GNP1 dispara um programa de virulência neste fungo. Ainda, os dados aqui relatados nos levam a acreditar que graças à interação bactéria-fungo, há translocação concomitante destes microrganismos, caracterizando uma infecção sistêmica polimicrobiana neste modelo. Por fim, os dados aqui apresentados sugerem que modular a disponibilidade de triptofano pode interferir na susceptibilidade de pacientes em quimioterapia à infecção por *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien; SOKOL, Harry. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 716-724, 2018.
- ALBRECHT, Antje *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 688-694, 2006.
- ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 319-327, 2007.
- ANDRÉASSON, Claes *et al.* Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. **Yeast**, v. 21, n. 3, p. 193-199, 2004.
- AOKI, Shigeji *et al.* Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, n. 3, p. 143-150, 1994.
- ARIFA, Raquel DN, *et al.* "Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice." **The American Journal of Pathology** 184.7 (2014): 2023-2034.
- BADIEE, Parisa *et al.* Antifungal susceptibility patterns of colonized *Candida* species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. **Iranian journal of microbiology**, v. 9, n. 6, p. 363, 2017.
- BALISH, E. *et al.* Oroesophageal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. **Medical mycology**, v. 39, n. 3, p. 261-268, 2001.
- BARÓ, Teresa *et al.* Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1170-1172, 1999.
- BASILE, Debora *et al.* Mucosal injury during anti-cancer treatment: From pathobiology to bedside. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 857, 2019.
- BASTIDAS, Robert J.; HEITMAN, Joseph; CARDENAS, Maria E. The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 2, p. e1000294, 2009.
- BATISTA, Rafaela R.A. Impactos do metabolismo de triptofano na mucosite intestinal induzida por quimioterapia. **Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais**. Instituto de Ciências Biológicas: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2023.
- BATRA, Lekh R.; BATRA, Suzanne WT; BOHART, G. E. The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). **Mycopathologia et Mycologia applicata**, v. 49, n. 1, p. 13-44, 1973.

BECATTINI, Simone; TAUR, Ying; PAMER, Eric G. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 6, p. 458-478, 2016.

BERMAN, Judith; SUDBERY, Peter E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918-931, 2002.

BERTOLINI, M. *et al.* Mucosal bacteria modulate *Candida albicans* virulence in oropharyngeal candidiasis. **Mbio**, v. 12, n. 4, p. e01937-21, 2021.

BERTOLINI, Martinna *et al.* *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007717, 2019.

BIANCHI, Frans *et al.* Regulation of amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 4, p. 10.1128/mmbr. 00024-19, 2019.

BLACHER, Eran *et al.* Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 2, p. 572-580, 2017.

BOKULICH, Nicholas A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature methods**, v. 10, n. 1, p. 57-59, 2013.

BOLYEN, Evan *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

BORG-VON ZEPELIN, M. *et al.* The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 543-554, 1998.

BÖTTCHER, Bettina *et al.* The transcription factor Stp2 is important for *Candida albicans* biofilm establishment and sustainability. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 794, 2020.

BOZZA, Silvia *et al.* A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2910-2918, 2005.

BRAUNER, Annelie *et al.* Psoriasin, a novel anti-*Candida albicans* adhesin. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 6, p. 537-545, 2018.

BREGA, Elisa; ZUFFEREY, Rachel; MAMOUN, Choukri Ben. *Candida albicans* Csy1p is a nutrient sensor important for activation of amino acid uptake and hyphal morphogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 1, p. 135-143, 2004.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira *et al.* Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 903-914, 2018.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira *et al.* *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**, v. 192, p. 213-219, 2016.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira *et al.* *Vibrio* spp. from Macrobrachium amazonicum prawn farming are inhibited by Moringa oleifera extracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 11, p. 919-922, 2015.

BROWN, Gordon D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BUTS, Jean-Paul. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. **Digestive diseases and sciences**, v. 54, n. 1, p. 15-18, 2009.

CAFARCHIA, C. *et al.* Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Sabouraudia**, v. 46, n. 5, p. 429-434, 2008.

CAMPOS, Felipe Lopes; BARONI, Francisco De Assis. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 83-90, 2010.

CANABARRO, Antonio *et al.* Fungos na periodontite crônica: revisão da literatura. **Archives of Oral Research**, v. 5, n. 2, 2009.

CAROLUS, Hans; VAN DYCK, Katrien; VAN DIJCK, Patrick. *Candida albicans* and *Staphylococcus* species: a threatening twosome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2162, 2019.

CHABASSE, D. *et al.* CHLAMYDOSPORES FROM *CANDIDA-ALBICANS* OBSERVED INVIVO IN A PATIENT WITH AIDS. In: **ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE**. 141 RUE JAVEL, 75747 PARIS CEDEX 15, FRANCE: EDITIONS SCIENTIFIQUES ELSEVIER, 1988. p. 817-818.

CHASKES, Stuart *et al.* Growth and pigment production on D-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 1, p. 255-264, 2008.

CHASKES, Stuart; PHILLIPS, Arthur W. Pigmentation and autofluorescence of *Candida* species after growth on tryptophan media. **Canadian journal of microbiology**, v. 20, n. 4, p. 595-603, 1974.

CINAUSERO, Marika *et al.* New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 354, 2017.

COHEN, R *et al.* Fungal Flora of the Normal Human Small and Large Intestine. **New England Journal of Medicine**, 280(12), 638-641, 1969.

COLE, Garry T.; HALAWA, Abdul A.; ANAISSIE, Elias J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. Supplement_2, p. S73-S88, 1996.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

CORDEIRO, Rossana *et al.* Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309-317, 2016.

COSTANTINI, Claudio *et al.* Pharyngeal microbial signatures are predictive of the risk of fungal pneumonia in hematologic patients. **Infection and immunity**, v. 89, n. 8, p. e00105-21, 2021.

COTTER, Gary; KAVANAGH, Kevin. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **British journal of biomedical science**, v. 57, n. 3, p. 241, 2000.

CRUZ, Melissa R. *et al.* Enterococcus faecalis inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 81, n. 1, p. 189-200, 2013.

CURTIS, Meredith M. *et al.* The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. **Cell host & microbe**, v. 16, n. 6, p. 759-769, 2014.

CURTIS, Meredith M.; SPERANDIO, Vanessa. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 2, p. 133-138, 2011.

DABAS, Neelam; MORSCHHÄUSER, Joachim. Control of ammonium permease expression and filamentous growth by the GATA transcription factors GLN3 and GAT1 in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 5, p. 875-888, 2007.

DALLE, Frederic *et al.* Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248-271, 2010.

DALLE, Frédéric *et al.* β -1, 2- and α -1, 2-Linked Oligomannosides Mediate Adherence of *Candida albicans* Blastospores to Human Enterocytes In Vitro. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 7061-7068, 2003.

DE ANGELIS, Maria *et al.* Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76993, 2013.

DEHULLU, Jérôme *et al.* Fluidic force microscopy demonstrates that homophilic adhesion by *Candida albicans* Als proteins is mediated by amyloid bonds between cells. **Nano letters**, v. 19, n. 6, p. 3846-3853, 2019. Delgado, Maria Eugenia, Thomas Grabinger, and Thomas Brunner. "Cell death at the intestinal epithelial front line." *The FEBS journal* 283.14 (2016): 2701-2719.

DUNKER, Christine *et al.* Rapid proliferation due to better metabolic adaptation results in full virulence of a filament-deficient *Candida albicans* strain. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-20, 2021.

ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

FERREYRA, Jessica A. *et al.* Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance. **Cell host & microbe**, v. 16, n. 6, p. 770-777, 2014.

FLEET, Graham H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 170-175, 2007.

FRYKMAN, Philip K. *et al.* Characterization of bacterial and fungal microbiome in children with Hirschsprung disease with and without a history of enterocolitis: a multicenter study. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124172, 2015.

FUNG, Thomas C.; ARTIS, David; SONNENBERG, Gregory F. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. **Immunological reviews**, v. 260, n. 1, p. 35-49, 2014.

GARBE, Enrico *et al.* GNP2 Encodes a High-Specificity Proline Permease in *Candida albicans*. **Mbio**, v. 13, n. 1, p. e03142-21, 2022.

GARBE, Enrico; VYLKOVA, Slavena. Role of amino acid metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 6, n. 3, p. 108-119, 2019.

GONÇALVES, Bruna *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GONG, Jiao *et al.* The Als3 cell wall adhesin plays a critical role in human serum amyloid A1-induced cell death and aggregation in *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00024-20, 2020.

GRAHAM, Carrie E. *et al.* Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, p. 4507-4512, 2017.

HERSKOWITZ, Ira. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 4, p. 536-553, 1988.

HILLER, Ekkehard *et al.* Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host—Focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 384-389, 2011.

HOFMAN-BANG, Jacob. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 35-71, 1999.

HOYER, Lois L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 176-180, 2001.

HUBBARD, Troy D.; MURRAY, Iain A.; PERDEW, Gary H. Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1522-1535, 2015.

JACOBSEN, Ilse D. *et al.* *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.

KAM, Angela P.; XU, Jianping. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 1, p. 19-28, 2002.

KANTARCIOGLU, A. Serda; KIRAZ, Nuri; AYDIN, Ahmet. Microbiota–gut–brain axis: Yeast species isolated from stool samples of children with suspected or diagnosed autism spectrum disorders and in vitro susceptibility against nystatin and fluconazole. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1, p. 1-7, 2016.

KANTARCIOĞLU, A. Serda; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains: Phospholipase-and Protease-Aktivitat bei klinischen *Candida*-Isolaten mit Bezug zur Herkunft der Stämme. **Mycoses**, v. 45, n. 5-6, p. 160-165, 2002.

KAPTEYN, J. C. *et al.* The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 3, p. 601-611, 2000.

KARTASOVA, Tonja *et al.* Novel protein in human epidermal keratinocytes: regulation of expression during differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 8, n. 5, p. 2204-2210, 1988.

KEEFE, Dorothy M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current opinion in oncology**, v. 19, n. 4, p. 323-327, 2007.

KOH, Ara *et al.* From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332-1345, 2016.

KRAIDLOVA, Lucie *et al.* Characterization of the *Candida albicans* amino acid permease family: Gap2 is the only general amino acid permease and Gap4 is an S-adenosylmethionine (SAM) transporter required for SAM-induced morphogenesis. **MSphere**, v. 1, n. 6, p. e00284-16, 2016.

KRAIDLOVA, Lucie *et al.* Characterization of the *Candida albicans* amino acid permease family: Gap2 is the only general amino acid permease and Gap4 is an S-adenosylmethionine (SAM) transporter required for SAM-induced morphogenesis. **msphere**, v. 1, n. 6, p. 10.1128/msphere.00284-16, 2016.

KRAIDLOVA, Lucie *et al.* The *Candida albicans* GAP gene family encodes permeases involved in general and specific amino acid uptake and sensing. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1219-1229, 2011.

KUMAMOTO, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Current Opinion in Microbiology**, 14(4), 386–391, 2011.

KUMAR, C. P.; KUMAR, S.; MENON, Thangam. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 213-218, 2006.

KUMARI, Amrita *et al.* Adhesins in the virulence of opportunistic fungal pathogens of human. **Mycology**, v. 12, n. 4, p. 296-324, 2021.

- KURTZMAN, Cletus P.; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, 2011.
- LACAZ, C. da S. *et al.* Tratado de micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 297-298, 2002.
- LAMONT, Richard J.; HAJISHENGALLIS, George. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. **Trends in molecular medicine**, v. 21, n. 3, p. 172-183, 2015.
- LANGDON, Amy; CROOK, Nathan; DANTAS, Gautam. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2016.
- LATGÉ, Jean-Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.
- LENARDON, Megan D. *et al.* Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. **Journal of cell science**, v. 123, n. 13, p. 2199-2206, 2010.
- LEY, Ruth E.; PETERSON, Daniel A.; GORDON, Jeffrey I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006.
- LIAO, Wei-Li; RAMÓN, Ana M.; FONZI, William A. GLN3 encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 4, p. 514-526, 2008.
- LIMJINDAPORN, Thawornchai; KHALAF, Roy A.; FONZI, William A. Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1. **Molecular microbiology**, v. 50, n. 3, p. 993-1004, 2003.
- LIMTONG, S.; KOOWADJANAKUL, N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(12), 3323-3335, 2012.
- LO, Hsiu-Jung *et al.* Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939-949, 1997.
- LOCKHART, Shawn R. *et al.* Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1501-1509, 1995.
- LUND, A. Yeasts and Molds in Bovine Rumen. **J. Gen. Microbiol.** 81;2, 453-462, 1974.
- LUND, A. Yeasts in the rumen contents of musk oxen. **J Gen. Microbiol.**, 121;1, 273-276, 1980.
- MAGASANIK, Boris; KAISER, Chris A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

MARTÍNEZ, Paula; LJUNGDAHL, Per O. Divergence of Stp1 and Stp2 transcription factors in *Candida albicans* places virulence factors required for proper nutrient acquisition under amino acid control. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 21, p. 9435-9446, 2005.

MARTINS, Margarida *et al.* Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2429-2436, 2007.

MASON, Katie L. *et al.* Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 150-158, 2012.

MATA, A.L *et al.* Clonal variability among oral *Candida albicans* assessed by allozyme electrophoresis analysis. **Oral Microbiol Immunol** 15, 350–354, 2000.

MAYER, François L., DUNCAN Wilson, and Bernhard HUBE. "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms." **Virulence** 4.2: 119-128, 2013.

MCCULLOUGH MJ, ROSS BC, READE PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 25(2):136-144, 1996.

MIRAMÓN, Pedro *et al.* The paralogous transcription factors Stp1 and Stp2 of *Candida albicans* have distinct functions in nutrient acquisition and host interaction. **Infection and immunity**, v. 88, n. 5, p. e00763-19, 2020.

MIRAMÓN, Pedro, and Michael C. LORENZ. The SPS amino acid sensor mediates nutrient acquisition and immune evasion in *Candida albicans*. **Cellular microbiology** 18.11: 1611-1624, 2016.

MOLNAR, O.; WUCZKOWSKI, M.; PRILLINGER, H. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. **Mycol. Prog.**, 7;2, 111-123, 2008.

MORACE, G.; BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. **Minerva Anestesiologica**, v. 76, n. 11, p. 950, 2010.

MORGAN J *et al.* Excess mortality, hospital stay and cost due to Candidemia: a case-control study using data from Population-based Candidemia Surveillance. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 26(6):540-547, 2005.

MOYES, David L. *et al.* *Candidalysin* is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64-68, 2016.

MOYES, David L. *et al.* *Candidalysin* is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64-68, 2016.

MUKAMURANGWA, P., C. RAES-WUYTACK, C. DE VROEY. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. **J. Med. Vet. Mycol.** 33:419–420, 1995.

MUÑOZ, José F. *et al.* Coordinated host-pathogen transcriptional dynamics revealed using sorted subpopulations and single macrophages infected with *Candida albicans*. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1607, 2019.

N. MARTINS *et al.* Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment, **Mycopathologia** 177 5:223–240, 2014.

NAGLIK J, ALBRECHT A, BADER O. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 915-26, 2004.

NAGLIK, Julian R., *et al.* *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection** 13.12-13: 963-976, 2011.

NAGLIK, Julian R., Stephen J. CHALLACOMBE, and Bernhard HUBE. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews** 67.3: 400-428, 2003.

NATHER K, MUNRO CA. Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. **FEMS Microbiol Lett.** 285(2):137-145, 2008.

NDORICYIMPAYE EL *et al.* *Candida albicans* infection among HIV positive and HIV negative women- Case study at Butare University Teaching Hospital (CHUB), Southern province of Rwanda. **E Afr Sci.** 1(2):75-79, 2020.

NGUYEN, N.H.; SUH, S.O.; BLACKWELL, M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. **Mycologia**, 99;6, 842-858, 2007.

NIEMIEC, Maria J. *et al.* Dual transcriptome of the immediate neutrophil and *Candida albicans* interplay. **BMC genomics**, v. 18, p. 1-21, 2017.

ODDS FC *et al.* Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. **Eukaryot Cell.** 6:1041–52. 2017.

ODDS, Frank C. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. **Bailliere Tindall**, 1988.

OHASHI, K *et al.* Kynurenine aminotransferase activity of Aro8/Aro9 engage tryptophan degradation by producing kynurenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, 7(1), 1-8. 2017

OLIVEIRA LP. Avaliação da presença de *Candida* spp. e *Streptococcus* spp. na dentina cariada de crianças com cárie precoce da infância [Trabalho de Conclusão de Curso]. Londrina (SP): **Universidade Estadual de Londrina**; 2012.

PAL, Morbidity. Morbidity and mortality due to fungal infections. **J. Appl. Microbiol. Biochem**, v. 1, n. 1, p. 2, 2017.

PANOZZO, C. *et al.* Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.** 517, 97–102, 2002.

PECIULIENE, V., *et al.* "Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **International endodontic journal** 34.6: 429-434, 2001.

PETERS, Brian M., *et al.* "Staphylococcus aureus adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p." **Microbiology** 158.Pt 12:2975, 2012

POULAIN D, JOUAULT T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. **Curr Opin Microbiol.** 7(4):342-349, 2004.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 22, p. 201-207, 1982.

PRILLINGER, H. *et al.* Yeasts associated with termites: A phenotypic and genotypic characterization and use of coevolution for dating evolutionary radiations in asco- and basidiomycetes. **Syst. Appl. Microbiol.**, 19;2, 265-283, 1996.

PUEL, A *et al.* Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** 12:616–22, 2012.

PUJOL, C *et al.* The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. **Proc Natl Acad Sci USA** 90, 9456–9459, 1993.

RAMACHANDRA, Shruthi, *et al.* Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans*. **PLoS One** 9.3: e92734, 2014

RAMAGE, G *et al.* Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

RAUCEO JM *et al.* Threonine Rich Repeats Increase Fibronectin Binding in the *Candida albicans* Adhesin Als5p . **Eukaryot Cell.** V. 5, no. 10, p. 1664–1673, 2006.

REFAAT, Bassem, *et al.* Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** 34.1: 1-15, 2015.

REUß, Oliver, and Joachim MORSCHHÄUSER. A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. **Molecular microbiology** 60.:3 795-812, 2006.

RIBEIRO, Ronaldo A., *et al.* Irinotecan-and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer chemotherapy and pharmacology** 78.5: 881-893, 2016.

RIES, Laure Nicolas Annick, *et al.* Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Molecular microbiology** 107.3: 277-297, 2018.

RINALDI, M. G. Biology and pathogenicity of *Candida* species, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Raven Press**, p. 1-20, 1993.

ROAGER H.M.; LICHT T.R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. **Nat Commun.** 17;9(1):3294, 2018.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 600–600, 2009.

SAGHROUNI F. , BEN ABDELJELIL J. , BOUKADIDA J. *et al.* Métodos moleculares para tipagem de linhagens de *Candida albicans*: uma revisão . **J Appl Microbiol.** 114 (6): 1559 – 1574, 2013.

SAVILLE, Stephen P., *et al.* Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryotic cell** 2.5 :1053-1060, 2003.

SCHALLER M *et al.* *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinases Modify the Epithelial Cytokine Response in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis. **Infection and Immunity.** v. 73, no 5, p. 2758-2765, 2005.

SCHOCH CL *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database (Oxford).** Jan 1;2020:baaa062, 2020.

SCHÖNHERR FA *et al.* The intraspecies diversity of *C. albicans* triggers qualitatively and temporally distinct host responses that determine the balance between commensalism and pathogenicity. **Mucosal Immunol.** 10:1335–50, 2017.

SCHREVEENS, Sanne *et al.* Methionine is required for cAMP-PKA-mediated morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 108, n. 3, p. 258-275, 2018.

SCHROEDER B.O.; BÄCKHED F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nat Med.** 22(10):1079-1089, 2016.

SEBAA, Sarra, Zahia BOUCHERIT-OTMANI, and Philippe COURTOIS. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Molecular medicine reports** 19.4: 3201-3209, 2019.

SIDRIM, J.J.C. *et al.* *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): in vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 324-328, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2004.

SILVA, J.O.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. Enzymatic activity, slime production and antifungal agent sensitivity of *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 354-5, 2007.

SOLL DR , STASI H , BEDELL L . Regulação da migração e divisão nuclear durante o crescimento de pseudo-micélio na levedura dimórfica *Candida albicans* . **Exp Cell Res.** 116 (1): 207 – 215, 1978.

SONIS, Stephen T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer** 4.4: 277-284, 2004.

SONIS, Stephen T., *et al.* An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology** 69.4: 437-443, 1990.

SONIS, Stephen T., *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society** 100.S9, 1995-2025, 2004.

SOUGIANNIS, Alexander T., *et al.* Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology** 320.5, G712-G719, 2021

STAIB P, MORSCHHÄUSER J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. **Mycoses.** 2007;50(1):1-12, 2007.

STAIB, Peter, *et al.* Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97.11:6102-6107, 2000.

SUDBERY PE . The germ tubes of the hyphae and pseudo-hyphae of *Candida albicans* show different localization patterns of the septin ring. **Mol Microbiol.** ; 41 (1): 19 – 31, 2001.

SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology** 9.10 :737-748, 2011.

SUN, F *et al.* Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v. 8, p. 877-886, 2013.

SUNDSTROM, Paula. Adhesins in *Candida albicans*. **Current opinion in microbiology** 2.4 353-357, 1999.

SWANSON, Karen V., Meng DENG, and Jenny P-Y. TING. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology** 19.8 477-489, 2019,

SWIMM, Alyson *et al.* Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 132, n. 23, p. 2506-2519, 2018.

TANIGUCHI, L. *et al.* Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. **Journal of Microbiological Methods**, 78(2), 171–174, 2009.

TAYLOR, Brad N *et al.* Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. **Infection and immunity** 73.3: 1828-1835, 2005.

TEOH, Flora, and Norman PAVELKA. How chemotherapy increases the risk of systemic candidiasis in cancer patients: current paradigm and future directions. **Pathogens** 5.1: 6, 2016.

THOMSON, DD *et al.* A assimetria apical induzida por contato conduz as respostas trigométricas das hifas de *Candida albicans*. **Cell Microbiol.** 17 (3): 342 – 354. 2015.

TREMAROLI, V., BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature** 489, 242–249, 2012.

TRIPATHI, Gyanendra, *et al.* Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. **The EMBO Journal** 21.20, 5448-5456, 2002.

URUBSCHUROV, V, JANCZYK, P. Biodiversity of yeasts in the gastrointestinal ecosystem with emphasis on its importance for the host. In: The dynamical processes of biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution. **IntechOpen**, 2011.

VAN DYCK, Katrien, *et al.* Adhesion of *Staphylococcus aureus* to *Candida albicans* during co-infection promotes bacterial dissemination through the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology** 10: 624839, 2021.

VARANO, N *et al.*, *Candida* spp. infections in immunocompromised patients. **Journal of Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2019.

VERSCHUREN, Lisanne MG *et al.* Fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex. **Journal of animal science**, v. 96, n. 4, p. 1405-1418, 2018.

VIEIRA-SILVA, S. *et al.* Species–function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. **Nat. Microbiol.** 1, 16088, 2016.

VYLKOVA, Slavena, and Michael C. LORENZ. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. **PLoS pathogens** 10.3: e1003995, 2014.

WADE, Jim J., *et al.* Bacterial and fungal infections after liver transplantation: an analysis of 284 patients. **Hepatology** 21.5: 1328-1336, 1995.

WINTER, S. E, BÄUMLER, A. J. Dysbiosis in the inflamed intestine: Chance favors the prepared microbe. **Gut Microbes**, 5, 1, 71–73, 2014.

WINTER, S. E, LOPEZ, C. A.; BÄUMLER, A. J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports**, 14, 4, 319–327, 2013.

WOOLFOLK, S.W, INGLIS, G.D. Microorganisms associated with field-collected *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults with emphasis on yeast symbionts. **Biol Control**, 29, 2; 155-168, 2004.

XU, H., and A. DONGARI-BAGTZOGLU. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Current opinion in microbiology* 26: 65-70, 2015.

XU, J, *et al.* Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol.* 5:7, 2007.

XU, Z.-L, *et al.* *Candida albicans*-induced acute lung injury through activating several inflammatory signaling pathways in mice. *International Immunopharmacology*, 72, 275–283, 2019.

YASUDA, Masashi, *et al.* Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302.10: G1133-G1142, 2012.

ZELANTE, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 39:2, 372-385, 2013.

ZENG, Y. *et al.* Targeted metabolomics analysis of aromatic amino acids and their gut microbiota-host co-metabolites in rat serum and urine by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, p. 1–32. 2017.

ZHANG, Weiping, *et al.* Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82.1: e00040-17, 2018.

ZHAO, Xiaomin, *et al.* ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* 150.7: 2415-2428, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA 84/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Papel do metabolismo de triptofano na virulência de *Candida albicans* e seus impactos na infecção oportunista após quimioterapia", protocolo do CEUA: 84/2022 sob a responsabilidade de Caio Tavares Fagundes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 09/05/2022.

Vigência da Autorização	09/05/2022 a 08/05/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6J
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6J
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6J
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6J
Nº de animais	16
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6J
Nº de animais	16

ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA 275/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

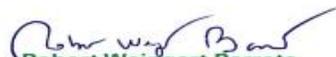
Certificamos que o projeto intitulado "Papel da via SPS no metabolismo de triptofano e virulência de *Candida albicans* e seus impactos na infecção oportunista após quimioterapia", protocolo do CEUA: 275/2023 sob a responsabilidade de Caio Tavares Fagundes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/11/2023.

Vigência da Autorização	06/11/2023 a 05/11/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL6
Nº de animais	12

ANEXO 3 - CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO: MELHOR TRABALHO NA CATEGORIA ALUNO DE DOUTORADO NO X CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA



A Sociedade Brasileira de Micologia, concede a **Renan Vasconcelos da Graça-filho**, o Prêmio Prêmio Pe. Johannes Rick de melhor trabalho, intitulado, **PAPEL DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO POR Candida albicans E SEUS IMPACTOS DURANTE A MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**, no X Congresso Brasileiro de Micologia, evento realizado de 19 a 23 de fevereiro de 2024, na cidade de Belo Horizonte – MG.


Robert Weingart Barreto
Presidente da SBMic


Aristóteles Góes Neto
Presidente do X CBMic

