



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THALITA CAROLINE HEREK

**FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* POR ISOLADOS
SANGUÍNEOS DE *Candida parapsilosis* stricto sensu E
*Candida tropicalis***

THALITA CAROLINE HEREK

**FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* POR ISOLADOS
SANGUÍNEOS DE *Candida parapsilosis* stricto sensu E
*Candida tropicalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Cristina
Furlaneto.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Herek, Thalita Caroline.

Formação de biofilme in vitro por isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis* / Thalita Caroline Herek. - Londrina, 2015.
83 f.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. *Candida parapsilosis* stricto sensu - Teses. 2. *Candida tropicalis* - Teses. 3. Candidemia - Teses. 4. Biofilme - Teses. I. Furlaneto, Marcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

THALITA CAROLINE HEREK

**FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* POR ISOLADOS SANGUÍNEOS
DE *Candida parapsilosis* stricto sensu E *Candida tropicalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof^a Dr^a Emanuele Julio Galvão de França
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina 13 de março de 2015.

Dedico

A minha família, ao meu amor e todos que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos,

À Deus que me concedeu proteção, forças e principalmente saúde para superar todas as dificuldades;

Minha mãe Jacira e meu pai Romildo, que apesar de todas as dificuldades, sempre me apoiaram, incentivaram e compreenderam todas as etapas. Agradeço também a todos os ensinamentos de vida e orações que contribuíram para eu conseguir finalizar este trabalho;

Meus irmãos Thiago e Jamille por estarem sempre ao meu lado;

Meu namorado Vinícius Menegazzo por toda paciência, companhia e conhecimento. Além de todas as idas ao laboratório, por me ceder forças e sempre ser meu apoio. Por você e com você que luto pelo futuro.

À professora Dr^a. Marcia Cristina Furlaneto pela orientação deste trabalho e pelos inúmeros conhecimentos repassados e pela dedicação. Em especial, agradeço também pela paciência em todas as dificuldades apresentadas ao longo da elaboração deste trabalho. Guardarei uma imensa admiração e gratidão por tudo que aprendi;

Aos membros da banca examinadora, à professora Dr^a Luciana Furlaneto – Maia, por contribuir grandemente com este trabalho e à Emanuele Julio Galvão de França, por todo auxílio e ser exemplo de profissional que guardarei em meu coração;

À Alane Moralez, Aline Tancler Stipp, Hugo Perini e Mayara Ogaki por sempre estarem dispostos a me ajudar em todas as dificuldades apresentadas ao longo deste trabalho e principalmente pela amizade;

À minha companheira de profissão e amiga de longa data, Fernanda Ogo por sempre estar disposta a dar o sangue, literalmente, neste trabalho.

À todos os amigos do laboratório, Amanda Figueiredo, Danielle Ohashi, Helena Peggau, Mariana Shibayama, Louhana Lima, Marcela Schmitt e Thiago Saito pelos anos de convivência, companhia e troca de experiências;

Ao técnico e amigo Osvaldo Lopes, pela colaboração e inúmeros momentos de alegria no laboratório;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina e a CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

“Ama e faz o que quiseres. Se calares, calarás com amor; se gritares, gritarás com amor; se corrigires, corrigirás com amor; se perdoares, perdoarás com amor. Se tiveres o amor enraizado em ti, nenhuma coisa senão o amor serão os teus frutos”

-Santo Agostinho

HEREK, Thalita Caroline. **Formação de biofilme *in vitro* por isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis***. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções humanas, principalmente infecções sanguíneas. Estudos apontam a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans*, dentre elas *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis*. Um importante fator de virulência destas espécies é a produção de biofilmes resultando em reservatório de importantes infecções. Além disso, a utilização de dispositivos médicos e a administração de nutrição parenteral total (NPT) aumentam os riscos de infecções nosocomiais da corrente sanguínea, principalmente por *C. parapsilosis*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a formação de biofilme *in vitro* por isolados sanguíneos dessas espécies. A análise de biomassa total foi realizada pela coloração por cristal violeta e a atividade metabólica das células do biofilme foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico resultante da redução do XTT. *C. tropicalis* foi maior produtor de biofilme, tanto de biomassa total quanto células viáveis, comparativamente a *C. parapsilosis* stricto sensu. Neste estudo foi também avaliada a morfologia das células constituintes do biofilme. Biofilmes de *C. tropicalis* apresentaram maior quantidade de formas filamentosas comparativamente aos biofilmes de *C. parapsilosis* stricto sensu. A formação de biofilmes também foi avaliada em presença de diferentes carboidratos. Não foram observadas diferenças significativas na produção de biofilme em função dos carboidratos testados; no entanto, a maioria dos carboidratos testados promoveu diferenciação celular (filamentação), particularmente em isolados de *C. tropicalis*. Além desses fatores, foi também avaliada a possível associação de biofilme com produção de proteases ácidas secretadas e de fator hemolítico. Para isolados de *C. parapsilosis* altamente produtores de biofilme a produção de Saps foi significativamente superior a partir de células de biofilme comparativamente a de células livres, sugerindo a ocorrência de associação entre esses fatores de virulência. Quanto aos isolados de *C. tropicalis* esta associação não foi observada. A produção de fator hemolítico foi independente da capacidade de formação de biofilme para isolados de ambas espécies, além do fato de que o meio de cultivo influenciou significativamente a capacidade hemolítica. A produção de biofilme por *C. parapsilosis* stricto sensu em soluções equivalentes a de NPT foi superior em presença de 30 e 25% de glicose comparativamente as demais concentrações testadas; sendo que os menores valores de biomassa total foram observados em presença de 15% de glicose para a maioria dos isolados. Quanto a morfologia de células do biofilme, 67% apresentou aumento significativo de formas filamentosas em presença de 30% de glicose comparativamente ao observado no cultivo sem suplementação.

Palavras-chaves: *Candida parapsilosis* stricto sensu. *Candida tropicalis*. Biofilme. Biomassa Total. Atividade metabólica. Formas filamentosas. Saps. Fator Hemolítico.

HEREK, Thalita Caroline. **In vitro biofilm formation by blood isolates of *Candida parapsilosis* stricto sensu and *Candida tropicalis***. 2015. 83 p. Dissertation (Mater's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

Species of the genus *Candida* are the principal fungal pathogen involved in human infections, mainly blood infections. Studies show the increase of species of non-*albicans* *Candida*, among them *Candida parapsilosis* and *C. tropicalis*. Biofilm production by these species is considered an important virulence factor and results in infections reservoir. Besides, the use of medical devices and total parenteral nutrition (TPN) infusion increase the risk of nosocomial bloodstream infections mainly for *C. parapsilosis* species. The aim of this study was to evaluate the in vitro biofilm formation by blood isolates of these species. The total biomass in biofilm was evaluated by crystal violet staining and the cells metabolic activities was evaluated by XTT reduction colorimetric assay. *C. tropicalis* exhibited higher biofilm production of both total biomass and viable cells compared to *C. parapsilosis*. In this study the morphology of the biofilm cells was evaluated. Biofilm cells of *C. tropicalis* showed a greater amount of filamentous forms compared to biofilm cells of *C. parapsilosis*. The biofilm formation was also evaluated in the presence of different carbohydrates. There was no significant differences in biofilm formation among the tested carbohydrates, but the majority of them promoted cellular differentiation, especially in *C. tropicalis* isolates. A possible association between biofilm production and acid proteinase secretion and hemolysis was also evaluated. *C. parapsilosis* isolates that showed greater biofilm production also exhibited greater SAPs production compared to that observed for free cells. This association was not observed in *C. tropicalis*. The hemolytic factor was independent of the biofilm production in both species, besides that the cell culture medium enhanced significantly the hemolytic capacity. Biofilm production by blood isolates of *C. parapsilosis* stricto sensu in PTN like solutions was greater following growth in the presence of 25 and 30% of glucose. The lower amount of total biomass was observed in medium supplemented with 15% of glucose for the majority of the isolates. Concerning biofilm cells morphology, 67% had significant increase in filamentous forms in the presence of 30% glucose compared to that observed in medium without supplementation.

Keywords: *Candida parapsilosis* stricto sensu. *Candida tropicalis*. Biofilm. Total Biomass. Metabolic activity. Filamentous cells. Saps. Hemolytic factor.

LISTA DE TABELAS

PARTE 1

- Tabela 1.** Produção de biofilme por isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu medidos por redução de XTT e coloração por Cristal Violeta49
- Tabela 2.** Produção de biofilme por isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* medidos por redução de XTT e coloração por Cristal Violeta50
- Tabela 3.** Produção de biofilme por Biomassa total de isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu.....51
- Tabela 4.** Produção de biofilme por Células viáveis de isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu52
- Tabela 5.** Porcentagem de diferenciação de formas filamentosas em biofilmes de isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis*53
- Tabela 6.** Produção de protease ácida secretada por células livres e células de biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis*56

PARTE 2

- Tabela 1.** Formação de biofilme (biomassa total) por isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu após cultivo em meio Sabouraud suplementado com diferentes concentrações de glicose74

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

- Figura 1.** Porcentagem de formas filamentosas em biofilmes de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu (64.10 e 357.10) e de *Candida tropicalis* (65.10 e 268.10)54
- Figura 2.** Porcentagem de formas filamentosas em biofilmes de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis* sob diferentes condições de cultivo55
- Figura 3.** Produção de fator hemolítico por células livres e de biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu sob meios de cultivo distintos57
- Figura 4.** Produção de fator hemolítico por células livres e de biofilme de isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* sob meios de cultivo distintos58

PARTE 2

- Figura 1.** Produção de biofilme por isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu em presença de diferentes concentrações de glicose73
- Figura 2.** Porcentagem de formas filamentosas presentes em biofilmes de *Candida parapsilosis* stricto sensu em diferentes concentrações de glicose76

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	<i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> stricto sensu.....	18
3.2	Epidemiologia de <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> Associada à Candidemia.....	22
3.3	Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp	25
3.3.1	Biofilme de <i>Candida</i> spp em Dispositivos Médicos	27
	REFERÊNCIAS.....	31
	PARTE 1 – FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>in vitro</i> POR ISOLADOS SANGUÍNEOS DE <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> stricto sensu	40
	RESUMO.....	41
1.	INTRODUÇÃO.....	42
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1	Materiais Biológicos	43
2.2	Determinação de Biomassa Total.....	44
2.3	Determinação da Viabilidade Celular	44
2.4	Avaliação dos Tipos Celulares Presentes nos Biofilmes.....	45
2.5	Produção de Biofilme e Morfogênese em Presença de Diferentes Fontes de Carboidratos.....	46
2.6	Determinação da Atividade Proteolítica de Células Livres e de Biofilme.....	46
2.7	Determinação da Produção de Fator Hemolítico	45
2.8	Análises Estatísticas	48
3.	RESULTADOS	49

3.1	Avaliação da formação de biofilme: Biomassa Total e Células Viáveis	49
3.2	Avaliação dos tipos Celulares Presentes nos Biofilmes.....	52
3.3	Produção de Biofilme e Avaliação dos Tipos Celulares em Presença de Diferentes Carboidratos	54
3.4	Produção de Proteases Ácidas Secretadas (Saps) por Células Livres e por Células de Biofilme.....	55
3.5	Produção de Fator Hemolítico por Células Livres e por Células de Biofilme.....	56
4.	DISCUSSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	64

PARTE 2 – FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS SANGUÍNEOS DE <i>Candida parapsilosis</i> stricto sensu EM PRESENÇA DE SOLUÇÕES HIPERGLICÍDICAS EM CONCENTRAÇÕES EQUIVALENTES A DE NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL.....			68
	RESUMO.....		69
1.	INTRODUÇÃO.....		70
2.	MATERIAIS E MÉTODOS		71
2.1	Materiais Biológicos		71
2.2	Determinação da Biomassa Total.....		71
2.3	Avaliação dos Tipos Celulares Presentes nos Biofilmes.....		72
2.4	Análise Estatística		72
3.	RESULTADOS		72
4.	DISCUSSÃO.....		76
	REFERÊNCIAS.....		79
	CONCLUSÕES		83

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes fúngicos mais comumente associados a infecções invasivas, tornando-se um problema crescente de saúde pública em muitos países. Entre as infecções invasivas, salienta-se a relevância clínica dos casos de infecções de corrente sanguínea que são conhecidas como candidemia ou candidíase hematogênica (COLOMBO & GUIMARÃES 2003).

A ocorrência de casos de candidemia nas últimas décadas tem aumentado substancialmente, gerando um impacto considerável sobre as taxas gerais e específicas de causa de mortalidade em hospitais. *Candida albicans* tem sido a espécie de maior interesse clínico, entretanto, paralelamente a este aumento de casos de candidemias tem-se observado maiores taxas de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MARRA *et al.*, 2011; revisado por SILVA *et al.*, 2012; WISPLINGHOFF *et al.*, 2014).

Espécies patogênicas de *Candida* apresentam mecanismos que propiciam sucesso na colonização e infecção no hospedeiro. Dentre os fatores de virulência expressos por *Candida* spp, a formação de biofilme tem um grande significado no contexto clínico, pois está associada a maiores índices de infecção e de diminuição da suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Pelo menos 65% de todas as infecções microbianas estão relacionadas com o crescimento de biofilmes (POTERA, 1999).

Além da formação de biofilmes, há outros fatores de virulência que medeiam a patogenicidade de *Candida* spp, incluindo a evasão das defesas do hospedeiro, produção de enzimas hidrolíticas e outros fatores mais recentemente estudados como o fator hemolítico e o “switching” fenotípico.

Apesar da importância clínica de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, ainda são escassos os estudos relacionados aos seus fatores de virulência e patogenicidade, particularmente, os relacionados ao possível papel de biofilme na expressão destes fatores. Além disso, condições de cultivo que afetam a formação de biofilmes por espécies de *Candida*, particularmente *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são pouco relatados na literatura. Desta forma, o estudo de

variáveis que influenciam na produção e desenvolvimento de biofilme por espécies de *Candida* não-*albicans* apresenta grande relevância.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de biofilme *in vitro* por isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise comparativa entre isolados sanguíneos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu quanto a formação de biofilme (biomassa total e células viáveis) em superfície de poliestireno;
- Avaliar o potencial de morfogênese em células de biofilme de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu;
- Realizar análise comparativa entre isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu quanto a produção de biomassa total e morfogênese em presença de diferentes carboidratos;
- Avaliar a produção de proteases ácidas secretadas por células livres e células de biofilme de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu;
- Avaliar a produção de fator hemolítico por células livres e células de biofilme de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu;
- Avaliar a produção de biomassa total e potencial de diferenciação em pseudohifas por isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu em presença de soluções hiperglicídicas em concentrações equivalentes a de nutrição parenteral total.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu

Desde meados da década de 1980, os fungos têm se tornado um problema crescente devido aos elevados índices em infecções fúngicas nosocomiais, principalmente em pacientes imune-comprometidos (revisado por TROFA *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas em hospitais, ocasionando um impacto significativo na saúde pública (revisado por CALDERONE & FONZI 2001; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; revisado por YAPAR, 2014). Estas leveduras são encontradas de forma ubíqua e comensal na microbiota de indivíduos saudáveis; em adultos está presente no trato gastrointestinal em cerca de 20 a 80% da população sadia, e entre as mulheres de 20 a 30% apresentam colonização na vagina (COLOMBO & GUIMARAES, 2003; NAGLIK *et al.*, 2003).

A importância das leveduras do gênero *Candida* se deve a alta frequência com que colonizam, e podem desencadear infecção no hospedeiro humano. Estas leveduras podem tornar-se patogênicas caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa, ou qualquer interferência que possa romper as barreiras anatômicas da pele do hospedeiro, a exemplo de queimadura e uso de dispositivos médicos invasivos (KÓJIC & DAROUICHE, 2004; revisado por VAN ASBECK *et al.*, 2009; revisado por SILVA *et al.*, 2012).

As infecções por *Candida* spp abrangem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas. Dentre as infecções invasivas, destaca-se a candidemia que apresenta alta incidência em ambiente hospitalar. Infecções deste tipo estão relacionadas não somente aos fatores predisponentes que acometem cada paciente, mas também, aos procedimentos e materiais médicos utilizados na rotina hospitalar que podem ser responsáveis por aproximadamente metade dos casos nosocomiais de candidemia (ALMIRANTE *et al.*, 2005; BASSETTI *et al.*, 2006).

Espécies do gênero *Candida* apresentam grande capacidade de responder a mudanças no ambiente e hospedeiro. Assim, os processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos, podem facilitar a colonização e

posteriormente a infecção por estas leveduras (revisado por HAYNES, 2001). Em decorrência, *Candida* spp desenvolveram vários fatores de virulência que auxiliam na capacidade de colonizar tecidos, causar a doença e sobrepujar as defesas do hospedeiro.

Acerca de seu metabolismo, como todos os fungos, espécies de *Candida* adquirem energia via oxidação de compostos químicos. A glicose é a fonte principal de carbono, embora estas leveduras sejam capazes de metabolizar outros açúcares como a frutose, maltose, sacarose e a galactose (JORGE, 2012). O metabolismo destas leveduras ocorre principalmente em duas vias distintas, a respiração e a fermentação. Dentre essas vias, há a glicólise, que é uma via metabólica central para a assimilação de carbono, em que ocorre a conversão de glicose em piruvato. Sendo assim, na presença de oxigênio, o piruvato é convertido em ATP e CO₂, e na ausência de oxigênio, o piruvato é decomposto em etanol, CO₂ e oxaloacetato; conseqüentemente, espécies de *Candida* podem crescer em condições aeróbicas e adaptar-se em condições anaeróbicas.

Esta flexibilidade metabólica das leveduras torna-se importante na colonização de diversos nichos com diferentes carboidratos disponíveis e a assimilação de diferentes fontes de carbono disponíveis são alguns dos fatores que contribui para a ubiquidade da levedura (RODAKI *et al.*, 2009; ASKEW *et al.*, 2009).

Estudos conduzidos com *C. albicans* revelaram aumento na capacidade de adesão quando as leveduras foram cultivadas em suplementação de sacarose (MCCOURTIE & DOUGLAS, 1981; WILLIS *et al.*, 2000). Já, o glicídio galactose pode estar presente em forma livre em uma ampla gama de alimentos, sendo capaz de alterar os componentes da superfície da parede celular dos fungos e conseqüentemente mudar a sua adesão (MCCOURTIE & DOUGLAS, 1981). A glicose também foi relacionada a mudanças na capacidade adesão de *Candida* (HAWSER & DOUGLAS, 1995; NIKAWA *et al.*, 1997; JIN *et al.*, 2004).

No corpo humano, *Candida* spp ocupam diversos nichos dos quais muitos oferecem uma complexa mistura de nutrientes. Algumas partes do corpo oferecem baixas concentrações de glicose, enquanto outras fornecem

uma exposição transitória, como a cavidade oral e o trato gastrointestinal, ou até a falta de glicose como a pele e a unha (ENE *et al.*, 2012).

Das 200 espécies do gênero *Candida* conhecidas, somente 20 são reconhecidas como patógenos humanos. *C. albicans* destaca-se entre as espécies por ser mais frequentemente isolada. Contudo, nas últimas décadas, espécies de *Candida* não-*albicans* têm apresentado importância devido a sua alta prevalência e isolamento em hospitais (GIANINNI & MELHEM, 2000; PAPPAS *et al.*, 2003; revisado por SILVA *et al.*, 2012).

O aumento da incidência de infecções por *Candida* não-*albicans* pode estar relacionado às melhorias nos métodos de diagnósticos, bem como a introdução de técnicas de biologia molecular, uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres venosos e padrões de suscetibilidade antifúngica. (revisado por SILVA *et al.*, 2012).

Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, estão entre as principais espécies no contexto clínico atual. *C. parapsilosis* é considerada saprófita da pele e cavidade oral, entretanto, apresenta potencial patogênico podendo causar infecções em maior ocorrência em crianças, recém-nascidos prematuros e pacientes idosos (ALMIRANTE *et al.*, 2006; revisado por TROFA *et al.*, 2008). Esta espécie é reconhecida pela capacidade de formar biofilmes e aderir a superfícies plásticas, características que facilitam sua transmissão em ambientes hospitalares (CLARK *et al.*, 2004; SAN MIGUEL *et al.*, 2005). Casos de fungemia por *C. parapsilosis* são associados com nutrição parenteral total, uso de drenos e cateteres, antibióticos de largo espectro, terapias imunossupressoras e diabetes *mellitus* (WEEMS *et al.*, 1987).

C. parapsilosis foi originalmente descrita como *Monilia parapsilosis*, isolada de amostras de fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico e somente em 1932 esta espécie foi reclassificada como *C. parapsilosis*; era caracterizada como levedura não patogênica até o ano de 1940, em que foi o agente etiológico de um caso fatal de endocardite em um usuário de drogas (revisado por TROFA *et al.*, 2008; revisado por NOSEK *et al.*, 2009).

C. parapsilosis forma colônias brancas, cremosas, e com morfologia variável, apresentando desde brilhante, como lisa ou até rugosa. As células apresentam-se como ovais, redondas ou alongadas, medindo de 2,5 a

4µm, além disso, esta espécie não forma hifas verdadeiras, somente pseudohifas (revisado por TROFA *et al.*, 2008; revisado por NOSEK *et al.*, 2009; JORGE, 2012). *C. parapsilosis* é capaz de assimilar glicose, sacarose, galactose e maltose. Além disso, pode fermentar glicose e eventualmente galactose (JORGE, 2012; revisado por SILVA *et al.*, 2012.).

A existência de grupos apresentando diversidade genética entre os isolados de *C. parapsilosis*, foi proposta por Lehman e Lakser em 1992. Por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase e Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico, notou-se diferenças nas cepas de *C. parapsilosis* que eram fisiologicamente homogêneas, sendo classificadas em três grupos (I, II e III).

Após diversos estudos genéticos baseados na diferença existente entre os três grupos, Tavanti e colaboradores (2005) propuseram uma denominação taxonômica para estes grupos, *Candida parapsilosis* stricto sensu, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, pertencentes aos grupos I, II e III, respectivamente. Os testes fenotípicos não são capazes de diferenciar as espécies do complexo *C. parapsilosis*, somente pelo emprego de métodos moleculares é possível tal diferenciação (ABI-CHACRA *et al.*, 2013).

Outra espécie de *Candida não-albicans* de destaque no contexto clínico atual é *C. tropicalis*. Em países de clima tropical, esta espécie se destaca por ser relacionada a casos de candidemia, sendo em algumas localidades a espécie mais prevalente do gênero (COLOMBO *et al.*, 2006; revisado por CHAI *et al.*, 2010; FURLANETO *et al.*, 2011; NUCCI *et al.*, 2013).

C. tropicalis produz colônias esbranquiçadas, sem brilho e com morfologia variável. As células são esféricas, ovais ou alongadas, com medidas de 2,5µm de largura por 3 a 14µm de comprimento, além disso, é polimórfica, exibindo pseudohifas e hifas verdadeiras (revisado por SILVA *et al.*, 2012). Esta espécie assimila glicose, maltose, sacarose, galactose, além de fermentar glicose, maltose, sacarose e galactose (JORGE, 2012).

Comensal da microbiota do hospedeiro, a maioria das infecções causadas por *C. tropicalis* é originada endogenamente, tendo o seu potencial patogênico elevado em pacientes acometidos por câncer, doenças hematológicas como a neutropenia, transplantados e que receberam terapia imunossupressora (RICHARDSON & LASS-FLORL, 2008; NEGRI *et al.*, 2012). A colonização gastrointestinal por *C. tropicalis* é comum em indivíduos saudáveis

(até 30%), além de poder ser encontrada na pele, trato geniturinário e trato respiratório (revisado por CHAI *et al.*, 2010; revisado por NEGRI *et al.*, 2012).

Após a colonização, *C. tropicalis* tem capacidade de disseminar rapidamente em hospedeiros imunocomprometidos resultando em altas taxas de mortalidade, principalmente quando da ocorrência de candidemia. Além disso, os isolados *C. tropicalis* tem apresentado com frequência, menor suscetibilidade a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica (COLOMBO *et al.*, 2006; revisado por CHAI *et al.*, 2010 NEGRI *et al.*, 2012).

3.2 Epidemiologia de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* Associada à Candidemia

As infecções da corrente sanguínea têm chamado atenção por sua crescente incidência, gerando altos impactos nos sistemas de saúde em decorrência da dificuldade de tratamento, do alto custo, além de resultar em altas taxas de mortalidade, que são próximas a 50% em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (PAPPAS *et al.*, 2003; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; FÓRTUN *et al.*, 2012; NUCCI *et al.*, 2013).

A epidemiologia das infecções hematogênicas é geralmente influenciada por diversos fatores como as características geográficas e hospitalares, além da predisposição e condição do paciente (PFALLER *et al.*, 2011; GUINEA, 2014). Dados fornecidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e da Rede Nacional de Segurança dos EUA (Healthcare) apontam que espécies de *Candida* ocupam o quinto lugar entre os patógenos adquiridos no hospital e o quarto lugar entre os patógenos de infecções da corrente sanguínea (revisado por YAPAR, 2014).

A vigilância antifúngica global (ARTEMIS DISK) coletou isolados de 127 centros médicos de todo o mundo, totalizando 39 países. Os registros mostraram que apenas cinco espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) foram responsáveis por 92% dos casos de candidemia, e que *C. albicans* foi a espécie mais comum em todo o mundo, respondendo por 62% dos casos (revisado por GUINEA, 2014).

Na Itália, espécies de *Candida* não-*albicans* foram as mais frequentemente isoladas, sendo *C. parapsilosis* de maior ocorrência, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata* (CAGGIANO *et al.*, 2008; FÓRTUN *et al.*, 2012; TORTORANO *et al.*, 2012). Em análise realizada na Espanha, durante o período de 13 meses, 1.357 episódios de candidemia foram analisados. *C. albicans* apresentou-se como a espécie mais frequente, seguido por *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Um padrão diferenciado foi observado neste estudo em que espécies de *C. orthopsilosis* foi a quinta causa de fungemia (PEMÁN *et al.*, 2012).

Em um total de 1.143 casos de candidemia nos Estados Unidos, no período de 2 anos, *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, seguido de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HAJJJEH *et al.*, 2004). Em outro estudo mais recente, dados clínicos de 1.218 episódios de candidemia foram coletados em 52 pacientes nos EUA, entre 1998 e 2006. Houve um predomínio de *C. albicans*, seguido de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (WISPLINGHOFF *et al.*, 2014).

O maior estudo multicêntrico relacionado a episódios de candidemia realizado na América Latina revelou que dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram mais frequentes em hospitais terciários (NUCCI *et al.*, 2013).

No Brasil, um estudo realizado em centros médicos terciários de 9 cidades localizadas nas regiões sul, sudeste e central, foram detectados 712 casos de candidemia. *C. albicans* foi a espécie mais comum, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COLOMBO *et al.*, 2006).

Hinrichsen e colaboradores (2008) verificaram 21 episódios de candidemia na região nordeste do Brasil, onde espécies de *Candida* não-*albicans* representaram mais de 50% dos casos, com predomínio de *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%), ocorrendo alto índice de mortalidade (61%). Outro estudo realizado nesta mesma região, um total de 50 hemoculturas positivas para *Candida* spp foram analisadas, sendo que as espécies mais frequentes foram *C. parapsilosis*, seguido de *C. albicans* e *C. tropicalis* (MEDRANO *et al.*, 2006). Já, em outro estudo, *C. tropicalis* foi a espécie mais frequentemente isolada dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, seguido de

C. glabrata e *C. parapsilosis* na região nordeste brasileira (BARBERINO *et al.*, 2006).

Chang e colaboradores (2008), em análise realizada na região centro-oeste brasileira, verificou que dentre os casos de candidemia *C. albicans* foi mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Na região sul do Brasil, Aquino e colaboradores (2005) analisaram 131 episódios de candidemia, *C. albicans* foi prevalente, seguido de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. França e colaboradores (2008), também evidenciaram o predomínio de *C. albicans*, em 59 casos de candidemia analisados, seguido de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Em estudo mais recente, realizado por Costa e colaboradores (2014) no Hospital da Universidade Estadual de Londrina, foi observado a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* em casos de candidemia, sendo que *C. tropicalis* foi a espécie mais frequente, seguido por *C. albicans* e *C. parapsilosis* stricto sensu. Neste trabalho, dentre os isolados de *C. parapsilosis* analisados, 27% deles apresentaram resistência ao antifúngico fluconazol

As causas de diferenças no padrão de distribuição das espécies em casos de candidemia ainda não foram totalmente esclarecidas. Tem sido proposto que o uso profilático de determinados antifúngicos, o aumento do número de pacientes com doenças hematogênicas, além de outras doenças imunossupressoras podem contribuir para o aumento de infecções associadas a espécies de *Candida* não-*albicans*. Além disso, avanços nas técnicas de identificação podem auxiliar na evidenciação destas espécies não-*albicans* (DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER, 2012).

C. orthopsilosis e *C. metapsilosis* são espécies mais recentemente descritas, sendo anteriormente agrupadas no complexo *Candida parapsilosis*. Atualmente há poucos dados relativos a sua participação em casos de candidemia; os estudos já realizados revelam baixa frequência destas espécies comparativamente a *C. parapsilosis* stricto sensu. No Brasil, em um estudo multicêntrico foi demonstrado que do total de 141 isolados sanguíneos do complexo *C. parapsilosis* reidentificados, 88% compreendeu *C. parapsilosis* stricto sensu, 9% *C. orthopsilosis* e 3% *C. metapsilosis* (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Em outro estudo envolvendo 29 países representando os seis continentes, *C. parapsilosis* stricto sensu correspondeu a 91,3% dos isolados, seguido de *C. orthopsilosis* (1,8%), e *C. metapsilosis* (0,8%) (LOCKHART *et al.*, 2008).

3.3 Fatores de Virulência de *Candida* spp

Os micro-organismos patogênicos apresentam mecanismos que asseguram o êxito na colonização e infecção. Assim, as espécies de *Candida* expressam uma série de fatores de virulência que auxiliam na capacidade de colonizar tecidos, sobrepujar defesas e causar infecções no hospedeiro (HAYNES, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003).

A patogenicidade de espécies de *Candida* é mediada por vários fatores de virulência, incluindo a adesão e formação de biofilme, capacidade de evadir das defesas do hospedeiro e da produção de enzimas hidrolíticas, como as proteases e fosfolipases. Além disso, outros fatores recentemente estudados como o fator hemolítico, o qual possibilita a lise dos eritrócitos e acesso à hemoglobina podendo atuar como fonte de ferro para o micro-organismo; bem como o “switching” fenotípico, que consiste na capacidade da variação na morfologia celular obtendo maior afinidade pelos tecidos do hospedeiro (ZAUGG *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2009; NEGRI *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2011; NEGRI *et al.*, 2012; FAVERO *et al.*, 2014; MORALES *et al.*, 2014).

O primeiro estágio nas infecções por *Candida* é a sua aderência em superfícies, muitas vezes levando a formação de biofilmes. Assim, a aderência é um passo extremamente importante no processo de infecção, e o grau de adesão é dependente da espécie microbiana, do hospedeiro e das propriedades da superfície como a hidrofobicidade e a composição da parede celular. A capacidade dos micro-organismos aderirem às células, tecidos ou outros tipos de superfícies expostas à circulação de fluídos, é um pré-requisito para a colonização e subsequente infecção (CHANDRA *et al.*, 2001).

Além destes fatores, algumas espécies de *Candida* são polimórficas podendo apresentar morfologias celulares distintas, incluindo blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas. Esta transição de formas celulares é uma

das propriedades que pode contribuir na colonização de superfícies, disseminação pelos tecidos do hospedeiro e escape do sistema imune, além de proporcionar maior facilidade na captação de nutrientes, comparado com a forma em blastoconídeo (revisado por THOMPSON *et al.*, 2011; JORGE, 2012).

A maioria dos estudos relacionados a fatores de virulência em *Candida* spp é realizada com *C. albicans* como modelo. Contudo, existem diferenças significativas com relação à expressão de fatores de virulência entre as espécies. Apesar da importância clínica de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, ainda há a escassez de estudos relativos às propriedades de seus fatores de virulência.

A colonização de tecidos do hospedeiro por espécies de *Candida* também pode ser facilitada pela liberação de enzimas hidrolíticas como proteinases aspartil secretadas (SAPs), fosfolipases e lipases (revisado por SILVA *et al.*, 2012). Fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídeos e ácidos graxos, contribuindo para a adesão da levedura (GHANNOUM, 2000).

A secreção da enzima fosfolipase por *C. parapsilosis* é uma questão controversa; alguns estudos demonstram a sua produção e outros relatam que esta espécie não produz esse fator de virulência (revisado por TROFA *et al.*, 2008; revisado por SILVA *et al.*, 2012). Já as enzimas lipases estão envolvidas na hidrólise de triglicerídeos e suas possíveis funções incluem a digestão de lipídeos para a aquisição de nutrientes, adesão às células hospedeiras e interações com outras enzimas (revisado por TROFA *et al.*, 2008).

As principais, e mais estudadas, enzimas são as proteases aspárticas (Saps) que facilitam a invasão e colonização pois possuem a capacidade de hidrolisar as proteínas do hospedeiro envolvidas no mecanismo de defesa, além do colágeno, queratina, albumina, e mucina, permitindo assim a penetração da levedura no tecido (revisado por NAGLIK *et al.*, 2003; SPECIAN *et al.*, 2013).

A produção de Saps por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem sido descrita (DE BERNARDIS *et al.*, 1999; D'ÉÇA JUNIOR *et al.*, 2011), sendo a produção influenciada pelo sítio anatômico de isolamento. Segundo França e colaboradores (2010), isolados de *C. parapsilosis* de secreção traqueal foram mais produtoras de proteases do que isolados de *C. tropicalis* obtidos do mesmo sítio. Segundo estes autores, *C. parapsilosis* isolada de infecções superficiais

foram mais produtoras de proteases comparativamente aos isolados de secreção traqueal.

Outro fator de virulência que tem sido reconhecido atualmente como atributo de virulência em espécies de *Candida* é o fator hemolítico. Este fator promove a lise dos eritrócitos facilitando o acesso da levedura à hemoglobina, neste acesso o micro-organismo pode adquirir ferro elementar o qual é fundamental para a sobrevivência e estabelecimento da infecção (HOWARD, 1999; SUTAK *et al.*, 2008).

Na literatura, há dados controversos acerca da produção de fator hemolítico por *C. parapsilosis*. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo têm revelado que tanto *C. tropicalis* quanto *C. parapsilosis* apresentam potencial hemolítico (FRANÇA *et al.*, 2010; FAVERO *et al.*, 2014).

Dentre os fatores de virulência associados a patogenicidade de *Candida* spp a formação do biofilme assume grande relevância principalmente os biofilmes formados em superfícies de dispositivos médicos.

3.3.1 Biofilme de *Candida* spp em Dispositivos Médicos

Muitos micro-organismos em seus habitats naturais são encontrados em forma de biofilme, aderidos a uma superfície ou como organismos livres. Biofilmes são definidos como uma comunidade microbiana estruturada que estão ligados a uma superfície, envoltos por uma matriz exopolimérica e exibindo propriedades fenotípicas distintas (DONLAN, 2001).

Os biofilmes são considerados as formas mais prevalentes de crescimento dos micro-organismos e resultam de uma tendência natural de fixação em superfícies bióticas ou abióticas, variando desde superfícies minerais, tecidos de mamíferos, polímeros sintéticos e dispositivos médicos (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006; SILVA *et al.*, 2011; revisado por TOURNU *et al.*, 2011).

A produção de biofilme por espécies do gênero *Candida* é preocupante principalmente quando se estabelece em materiais sintéticos implantados, particularmente em cateteres intravasculares, de diálise peritoneal, derivações peritoneais ventriculares e outros dispositivos implantados,

necessários para a sobrevivência e para a melhoria da qualidade de vida do paciente (revisado por SARDI *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2013).

C. tropicalis e *C. parapsilosis* são capazes de formar biofilmes, os quais têm sido associados com maiores taxas de mortalidade em comparação com os isolados que não possuem esta capacidade (KUNAMOTO 2002). Infecções relacionadas a cateteres são a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes hospitalizados, e os biofilmes microbianos formados em cateteres estão associados com 90% destas infecções (DIDONE *et al.*, 2011).

O aumento da resistência antifúngica de espécies de *Candida* em decorrência da formação de biofilme foi demonstrado pela primeira vez por Hawser e Douglas (1995). Biofilme de *Candida* pode ser até 2000 vezes mais resistente do que as células planctônicas a vários antifúngicos, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol (HAWSER & DOUGLAS, 1995, CHANDRA *et al.*, 2001, JAIN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de biofilme por espécies de *Candida* consiste em diversas fases onde o passo inicial compreende a adesão das células fúngicas ao substrato, seguido de uma fase de filamentação e proliferação das células que resultam em múltiplas camadas e em diferentes tamanhos. O próximo passo da maturação resulta em uma rede complexa de células incorporadas ao material polimérico extracelular constituído de hidratos de carbono, proteínas, hexosaminas, fósforo e ácido urônico. Por último, há a dispersão das células (BAILLIE & DOUGLAS, 2000; BLANKENSHIP & MITCHELL, 2006; SENEVIRATNE & JIN, 2008; revisado por TOURNU *et al.*, 2011).

Na adesão, há a formação de um complexo espacial de divisões sequenciadas levando a um agregado de células em uma arquitetura organizada. Os biofilmes “maduros” exibem uma estrutura complexa e extensa, contribuindo no arranjo espacial para facilitar o influxo de nutrientes e eliminação de resíduos. A movimentação de fluídos e choques mecânicos contribuem para a liberação de fragmentos de biofilme, veiculando a levedura para outros locais proporcionando com isso, a ocorrência de infecções sistêmicas (BAILLIE & DOUGLAS, 2000; CHANDRA *et al.*, 2001; DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2005). Além disso, a adesão das células é mediada por interações não

específicas como a hidrofobicidade e forças eletrostáticas entre as células; e também por interações específicas, no qual as moléculas são expressas, como as adesinas, para propiciar uma adesão mais forte (RAMAGE *et al.*, 2005; SENEVIRATNE & JIN 2008). A filamentação contribui para uma produção abundante de biofilme por espécies de *Candida*, além de ser correlacionada com uma melhor adesão e desenvolvimento dos biofilmes (LADERO *et al.*, 2013).

A matriz extracelular de biofilme representa uma característica única ao passo que sua quantidade e composição podem variar de uma espécie para outra e em diferentes locais de infecção, dependendo dos estímulos ambientais como a disponibilidade de nutrientes e estímulos mecânicos (D'ENFERT, 2006).

Condições ambientais como a composição do meio, o pH e oxigênio, bem como o isolado e a espécie, afetam o desenvolvimento da matriz do biofilme. A matriz é aniônica, atraindo cátions e nutrientes, aumentando com isso a disponibilidade destes para os membros do biofilme, além disso, esta matriz é muito hidratada protegendo as células da desidratação. Todos esses fatores são vantajosos para as células presentes no biofilme, as quais são chamadas sésseis, enquanto que as de forma livre são ditas planctônicas (revisado por RAMAGE *et al.*, 2009).

Biofilme de *C. parapsilosis* tende a ser delgado e pouco estruturado, sendo constituído quase que exclusivamente por blastoconídeos agregados (KUHN *et al.*, 2002). *C. parapsilosis* apresenta prevalência de formação de biofilmes em dispositivos médicos e cateteres intravenosos (TROFA *et al.*, 2008). A matriz exopolimérica de biofilme de *C. parapsilosis* é composta de grandes quantidades de carboidratos e o teor de proteínas é baixo em comparação aos biofilmes de *C. tropicalis* (SILVA *et al.*, 2009).

A administração de nutrição parenteral facilita a colonização por *C. parapsilosis*. Isso é devido ao fato da levedura possuir vantagem seletiva de crescimento em presença de altas concentrações de glicose. Estudos relatam que a nutrição parenteral total aumenta o peso seco em até 40% de biofilme de *C. parapsilosis* (KUHN *et al.*, 2004).

Já, isolados de *C. tropicalis* foram classificados como sendo altamente formadores de biofilmes que consiste de uma rede densa de células leveduriformes e evidente morfologia filamentosa (SILVA *et al.*, 2009). A matriz

de biofilmes desta espécie consiste de carboidratos, proteínas, hexosaminas, fósforo e ácido urônico, sendo a quantidade de carboidratos e proteínas em menor quantidade e hexosamina em maior quantidade (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006; SILVA *et al.*, 2009). O crescimento de formas filamentosas em biofilme, embora não seja estritamente essencial para a sua formação, reforça a totalidade da estrutura do biofilme e fornece sítios de proteção e adesão para a levedura (RAMAGE *et al.*, 2002).

REFERÊNCIAS

- ABI-CHACRA, E. A.; SOUZA, L. O. P.; CRUZ, L. P.; BRAGA-SILVA, L.; GONÇALVES, D. S.; SODRÉ, C. L.; RIBEIRO, M. D.; SEABRA, S. H.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BARBEDO, L.S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; ZICCARDI, M.; SANTOS, A. L.S. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p.831-848, 2013.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 999-1008, 2006.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S. K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.; WARNOCK, D.W.; PAHISS, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 43, p. 1829-1835, 2005.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATA, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; PAHISSA, A. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1681-1685, 2006.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.411-418, 2005.
- ASKEW, C.; SELLAM, A.; EPP, E.; HOGUES, H.; MULLICK, A.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. **Plos Pathogens**, v. 5, p. 2-20, 2009.
- BAILLIE, S. G.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 397-403, 2000.
- BARBERINO, M. G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A.; NETTO, E. M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of Blood Stream Infections by *Candida* in Three Tertiary Hospitals in Salvador, Brasil: A Case-Control Study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 36-40, 2006.
- BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p.1-6, 2006.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 588–594, 2006.

CAGGIANO, G.; IATTA, R.; LANEVE, A.; MANCA, F.; MONTAGNA, M. T. Observational study on candidaemia at a university hospital in Southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v.51, p. 123-128, 2008.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence Factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-335, 2001.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W. WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p.282-292, 2010.

CHANDRA, J., KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L.L.; MCCORNICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 5385-5394, 2001.

CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C. N.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M.; PONTES, E. R. J. C.; MACHADO, V. E. *Candida* Bloodstream Infection: Data from a Teaching Hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 265-268, 2008.

CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGE, B. A.; BRANDT, M.; WEBB, R. M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRIDKIN, S. K.; HAJJEH, R. Epidemiologic and Molecular Characterization of na Outbreak of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4468-4472, 2004.

COLOMBO, A.; L., GUIMARÃES, T. Epidemiologia das Infecções Hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGE, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: a 4- Year Survey. **Mycopathologia**, v.178, p. 243-250, 2014.

D' EFERT, C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 465-470, 2006.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F., SAN MILLAN, R.; PONTON, J.; CASSONE, A. Biotyping and Virulence Properties of Skin Isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3481-3486, 1999.

D'ÊÇA JUNIOR, A. D.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 334-338, 2011.

DIDONE, L.; OGA, D.; KRYSAN, D. J. A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. **Yeast**, v. 28, p. 561-568, 2011.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 45-48, 2012.

DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Health Care Epidemiology**, v. 33, p. 1387-1392, 2001.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 20-26, 2003.

ENE, J. V.; ADYA, A.K.; WEHMEIER, S.; BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Host Carbon Sources Modulate Cell Wall Architecture, Drug Resistance and Virulence in a Fungal Pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 1319-1335, 2012.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Haemolytic factor production by clinical Isolates of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 68, p. 161-166, 2014.

FRANÇA, E. J. G.; FAVERO, D; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 318-321, 2010.

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, v. 54, p. e44 – e51, 2011.

FRANÇA, J.C., RIBEIRO, C.E., QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 23-28, 2008.

FORTÚN, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; GÓMEZ-GARCÍA DE LA PEDROSA, E.; PINTADO, V.; COBO, J.; FRESCO, G; MEIJE, Y.; ROS, L.; LUENGO, J.; AGUNDEZ, M.; BELSO, A.; SANCHEZ-SOUZA, A.; LOZA, E.; MORENO, S. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. **Journal of Infection**, v. 65, p. 64-70, 2012.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 595-599, 2011.

GIANNINI, M. J. S. M.; MELHEM, M. S. C. Infecções Fúngicas. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. (Ed.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap.33, p.334-403.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122-143, 2000.

GONÇALVES, S.S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C.; BRIONES, M. R.; MELO, A. S.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a Nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 885-887, 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5-10, 2014.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L.H.; LYON, M.; SKAGGS, B. A. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; YANG, W. L.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M.; WARNOCK, D. W. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519-1527, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, v.9, p.591-595, 2001.

HAWSER, S. P; DOUGLAS, L.J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in-vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.2128-2131, 1995.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A.S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

HOWARD, D.H. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 394-404, 1999.

JAIN, N., KOHLI, R., COOK, E., GIALANELLA, P., CHANG, T., FRIES, B.C. Biofilm formation by and Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates from Urine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1697–1703, 2007.

JIN, Y.; LAKSHMAN, P.; SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE, Y.; YIP, H. K. Biofilm Formation of *Candida albicans* is Variably affected by Salvia and Dietary Sugars. *Archives of Oral Biology*, v. 49, p. 489-498, 2004.

JORGE, A., O., C. **Microbiologia e Imunologia Oral**. Edição: 1°. São Paulo: Elsevier, 2012, 384.

KOJIC, E., M.; DAROUICHE, R., O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUN, M.A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 878-888, 2002.

KUHN, D. M; MUKHERJEE, P.K; CLARK, T. A; PUJOL, C. CHANDRA, J. HAJJEH, R. A; WARNOCK, D. W; SOIL, D. R; GHANNOUM, M.A. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1074–81, 2004.

KUNAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p.608–611, 2002.

LADERO, M.A.; BLANCO, M. T.B.; HURTADO, C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, M. T.; GÓMEZ-GARCIA, A. C. Determination of Biofilm Production by *Candida tropicalis* Isolated from Hospitalized Patients and its Relation to Cellular Surface Hydrophobicity, Plastic Adherence and Filamentation Ability. **Yeast**, v.30, p. 331-339, 2013.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 3249-3254, 1992.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2659-2664, 2008.

MARRA, A. R.; CAMARGO, L.F.A.; PIGNATARI, A. C. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.P.; MEDEIROS, E. A. S.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A. P.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; SOUZA, M.A.S.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M.B. Nosocomial

Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866-1871, 2011.

MCCOURTIE, J.; DOUGLAS, J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. **Infection and Immunity**, v. 32, p. 1234-1241, 1981.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. D. A.; ROCHA, M. F. G., RABENHORST, S.H.B., SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p.17–20, 2006.

MITCHELL, K. F., TAFF, H. T.; CUEVAS, M.A.; REINICKE, E.L.; SANCHEZ, H.; ANDES, D. R. Role of Matrix β -1,3 Glucan in Antifungal Resistance of Non-*albicans Candida* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1918-1920, 2013.

MORALEZ, A. T.; FRANÇA, E. J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v.52, p. 106-114, 2014.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v.169, p.175–182, 2010.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

NIKAWA, H.; NISHIMURA, H., HAMADA, T.; KUMAGAI, H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effects of Dietary Sugars and, Saliva and Serum on *Candida* Biofilm Formation on acrylic surfaces. **Mycopathologia**, v. 139, p. 87-91, 1997.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z.; KOSA, P.; GACSER, A.; TOMASKA, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 55, p. 497-509, 2009.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PlosOne**, v.8, p. e59373, 2013.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; HAMIL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSTOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 634-643, 2003.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GUINEA, J.; MERINO, P.; PIPAON, M. T. R. P.; MOLINO, L. P.; SICILIA, M. J. L.; MARCO, F.; GARCIA, J.; ROSELLÓ, E. M.; PEDROSA, E. G.; BORRELL, N.; PORRAS, A.; YAGUE, G. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicenter prospective survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 1181-1187, 2012.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Candida Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community- Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 561-566, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3-S13, 2012.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 19, p. 1837-1838, 1999.

RAMAGE, G; BACHMANN, S; PATTERSON, T. F; WICKES, B. L; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.973-980, 2002.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* Biofilms: an Update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p.633-638, 2005.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 340-355, 2009.

RODAKI, A.; BOHOVYCH, I.M.; ENJABERT, B.; YOUNG, T.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J.P. Glucose Promotes Stress Resistance in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p.4845-4855, 2009.

RICHARDSON, M.; LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p. 5–24, 2008.

SAN MIGUEL, L. G.; COBO, J.; OTHEO, E.; SANCHEZ-SOUSA, A.; ABRAIRA, V.; MORENO, S. Secular Trends of Candidemia in a Large Tertiary-Care Hospital from 1988 to 2000: Emergence of *Candida parapsilosis*. **Infection Control and**

Hospital Epidemiology, v. 6, p. 548-552, 2005.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, p. 582-590, 2008.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681-689, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19(5), p. 241–247, 2011.

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

SPECIAN, A. F. L.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural analysis of in vitro adherence and production of acid proteases by clinical isolates of *Candida parapsilosis* sensu stricto following growth in the presence of keratinous substrates from human source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 1-6, 2013.

SUTAK, R.; LESUISSE, E.; TACHEZY, J.; RICHARDSON, D. R. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 261-268, 2008.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MALDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.

THOMPSON, D. L.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v.10, p.1173 – 1182, 2011.

TORTORANO, A.M.; DHO, G.; PRIGITANO, A.; BREDA, G.; GRANCINI, A.; EMMI, V.; CAVANNA, C.; MARINO, G.; MORERO, S.; OSSI, C.; DELVECCHIO, G.; PASSERA, M.; CUSUMANO, V.; DAVID, A.; BONACCORSO, G.; CORONA, A.; FAVARO, M.; VISMARIA, C.; GARAU, M.G.; FALCHI, S.; TEJADA, M. R. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicenter prospective, observational study in Italy (2006-2008). **Mycoses**, v. 55, p. 73-79, 2012.

TOURNU, H.; VAN DIJCK P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **International Journal of Microbiology**, v.2012, 2011.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

VAN ASBECK, E., C.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 283-309, 2009.

YAPAR, N. Epidemiology and Risk Factors for Invasive Candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

WEEMS, J. J.; CHAMBERLAND, M. E.; WARD, J.; WILLY, M.; PADHYE, A. A.; SOLOMON L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1029-1032, 1987.

WILLIS, A. M.; COULTER, W. A.; HAYES, J. R.; BELL, P.; LAMEY, J. Factors Affecting the Adhesion of *Candida albicans* to Epithelial Cells of Insulin-Using Diabetes Mellitus Patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 291-293, 2000.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309–17, 2004.

WISPLINGHOFF, H.; EBBERS, J.; GEURTZ, L.; STEFANIK, D.; MAJOR, Y.; EDMOND, M.; WENZEL, R. P.; SEIFERT, H. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 78-81, 2014.

ZAUGG, C.; ZEPÉLIN, M.B.V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v.69, p. 405–412, 2001.

PARTE 1

FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro* POR ISOLADOS SANGUÍNEOS DE *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções humanas. Estudos epidemiológicos apontam o aumento de espécies de *Candida* não-*albicans*, destacando-se *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis*. Um importante fator de virulência destas espécies é a produção de biofilmes resultando em reservatório de importantes infecções. O objetivo do presente estudo foi avaliar a formação de biofilme *in vitro* por isolados sanguíneos dessas espécies. A análise de biomassa total do biofilme foi realizada pela coloração por cristal violeta e a atividade metabólica foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico resultante da redução do XTT. *C. tropicalis* foi maior produtor de biofilme, tanto de biomassa total quanto células viáveis, comparativamente a *C. parapsilosis*. Neste estudo foi também avaliada a morfologia das células constituintes do biofilme. Biofilmes de *C. tropicalis* apresentaram maior quantidade de formas filamentosas comparativamente aos biofilmes de *C. parapsilosis*. A formação de biofilmes foi avaliada em presença de diferentes carboidratos. Não foram observadas diferenças significativas na produção de biofilme em função dos carboidratos testados; no entanto, a maioria dos carboidratos testados promoveu diferenciação celular (filamentação), particularmente em isolados de *C. tropicalis*. Por fim, foi avaliada a possível associação de biofilme com produção de proteases ácidas secretadas e de fator hemolítico. Para os isolados de *C. parapsilosis* ranqueados como fortemente produtores de biofilme, a produção de Saps foi significativamente superior a partir de células de biofilme comparativamente a de células livres, sugerindo a ocorrência de associação entre esses fatores de virulência. Já quanto aos isolados de *C. tropicalis* esta associação não foi observada. A produção de fator hemolítico foi independente da capacidade de formação de biofilme para isolados de ambas espécies.

Palavras-chaves: *Candida parapsilosis* stricto sensu, *Candida tropicalis*, Biofilme, Biomassa Total, atividade metabólica, formas filamentosas, Saps, Fator Hemolítico.

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções humanas (MARRA *et al.*, 2011). Estas infecções abrangem um espectro amplo de doenças superficiais à invasivas, destacando-se os casos de candidemia. As infecções da corrente sanguínea têm chamado a atenção em vários campos da medicina por sua crescente incidência, gerando altos impactos em decorrência da dificuldade de tratamento, do alto custo para os sistemas de saúde, além de resultar em altas taxas de mortalidade que são próximas a 50% em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (NUCCI *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos recentes têm revelado que *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são as espécies de *Candida* não-*albicans* mais frequentemente encontradas em amostras sanguíneas em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (CÓRDOBA *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011; TORTORANO *et al.*, 2012; BONFIETTI *et al.*, 2012; BUSTAMANTE *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014).

A complexidade das interações entre *Candida* e o hospedeiro sugere que *Candida* spp possuam ampla versatilidade genética e flexibilidade metabólica, podendo crescer em condições aeróbicas e adaptar-se em condições anaeróbicas, facilitando com isso a colonização de diversos nichos no hospedeiro e em presença de carboidratos distintos (ASKEW *et al.*, 2009).

Espécies patogênicas de *Candida* tornam-se agentes infecciosos devido a expressão de fatores de virulência e alterações na imunidade, ou quebra das barreiras anatômicas, do hospedeiro (DIGNANI *et al.*, 2003). Dentre os fatores de virulência tem-se a capacidade de transição blastoconídeo/formas filamentosas, invasão de tecidos, produção de enzimas hidrolíticas, como as proteases e fosfolipases, produção de fator hemolítico, capacidade de gerar variantes fenotípicas (*switching* fenotípico) e formação de biofilme (SOLL *et al.*, 1992; MANNS *et al.*, 1994; NAGLIK *et al.*, 2003; AL-FATTANI *et al.*, 2006; NOBILE *et al.*, 2008; TROFA *et al.*, 2008).

Pelo menos 65% de todas as infecções microbianas estão relacionadas com o crescimento de biofilmes (POTERA, 1999). O crescimento de micro-organismos na forma de biofilme é uma maneira de proteção para o

desenvolvimento dos mesmos, promovendo simbiose e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (revisado por SARDI *et al.*, 2013).

Espécies de *Candida* que apresentam capacidade de formar biofilmes são potenciais causas de infecções sistêmicas devido a suscetibilidade reduzida a antifúngicos (CHANDRA 2001; SHIN *et al.*, 2002; SARDI *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2013). Além disso, a capacidade de crescimento na forma de biofilme possui importância clínica significativa, uma vez que esta pode estar associada à expressão aumentada de possíveis fatores de virulência (SILVA *et al.*, 2010).

Segundo a literatura, a habilidade de formar biofilme é um elemento chave na patogenicidade de *C. tropicalis* (CHAI *et al.*, 2010), sendo que resistência antifúngica conferida por biofilme já foi demonstrada (AL-FATTANI *et al.*, 2006). Já, *C. parapsilosis* apresenta reconhecida capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos e cateteres intravenosos (TROFA *et al.*, 2008).

Desta forma, a avaliação de formação de biofilme por isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* torna-se relevante, podendo auxiliar no maior entendimento deste importante fator de virulência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais Biológicos

Neste estudo foram avaliados isolados obtidos de episódios de candidemia, sendo 13 isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu e 13 isolados de *C. tropicalis* provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina-PR, no período de 2010 e 2011 (COSTA *et al.*, 2014). Estes isolados foram armazenados em meio Sabouraud com glicerol 20% a -20°C.

2.2 Determinação de Biomassa Total

A obtenção de biofilme de *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis* foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2009) e Pierce *et al.* (2008), com modificações.

Para o preparo dos inóculos, os isolados foram previamente cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 48h a 37°C. Em seguida, uma alíquota de células foram subcultivadas em meio RPMI (Sigma®) suplementado com 2% de glicose, por 18h a 37°C em agitação a 120rpm. Foi ajustada a concentração celular em 1×10^8 céls/mL, 200µL dessa solução foi adicionado em cada poço de uma microplaca de poliestireno de fundo reto, incubada por 24h a 37°C, em condição estática. Em seguida, 100µL do meio RPMI foi removido e a mesma quantidade de meio fresco foi adicionado aos poços, incubando a placa por mais 48h nas mesmas condições.

As células aderidas aos poços foram lavadas duas vezes com solução de PBS, fixadas com 200µL de metanol por 15 minutos e coradas com 200µL de solução de cristal violeta a 1% por 5 minutos. Para a liberação do corante e posterior leitura, foram adicionados 200 µL de ácido acético (33%) e a absorvância da solução lida em leitor de Elisa (Bio-Tek L 808) em 600nm.

O ranqueamento da produção de biofilme por biomassa total foi determinado de acordo com os dados obtidos nas triplicatas, de conjuntos independentes do experimento. A produção de biofilme de cada isolado foi classificada como: Baixa produção ($DO_{600} < 1.0$), média produção ($DO_{600} 1.0 - 2.0$) e alta produção ($DO_{600} > 2.0$).

2.3 Determinação da Viabilidade Celular

A atividade metabólica das células do biofilme foi avaliada de acordo com Pierce (2008), utilizando o ensaio colorimétrico resultante da redução de XTT. Esta medição será baseada na redução do composto 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil] -2H- hidróxido de tetrazólio (XTT) (Sigma) pela desidrogenase mitocondrial em composto formazan laranja, solúvel em água, cuja intensidade é quantificada por

absorbância. A coloração obtida foi diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular, cuja intensidade é quantificada por absorbância.

Um volume de 100µL contendo 0,5mg/mL de XTT com 10mM de menadiona foi adicionado aos poços do biofilme e aos poços controle (sem biofilme) que foram previamente lavados. As placas foram incubadas no escuro por 3 horas a 37°C. Uma alíquota de 80µL do sobrenadante com resultante foi retirada dos poços e transferida a outra placa de microtitulação para a realização da leitura no leitor ELISA (Bio-Tek L 808) a 490nm. Poços contendo somente o XTT foram considerados como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicatas em conjuntos independentes.

O ranqueamento da produção de biofilme pela quantificação de células viáveis foi determinado de acordo com os dados obtidos nas triplicatas, de conjuntos independentes do experimento. A produção de biofilme de cada isolado foi classificada como: Baixa produção ($DO_{490} < 0.3$), média produção ($DO_{490} 0.3 - 0.5$) e alta produção ($DO_{490} > 0.5$).

2.4 Avaliação dos Tipos Celulares Presentes nos Biofilmes

Para a análise dos tipos celulares constituintes dos biofilmes foram utilizados os isolados 44.10/ 357.10 de *C. parapsilosis* e 63.10/ 268.10 de *C. tropicalis*. As condições de cultivos foram as mesmas empregadas na avaliação da biomassa total.

Após a formação do biofilme, os poços da microplaca foram lavados duas vezes com tampão PBS para a remoção das células não aderentes. Em seguida, foram adicionados aos poços 200µL do mesmo tampão e realizado a remoção do biofilme aderido com auxílio de ponteira de micropipeta estéril. Uma alíquota de 10µL de cada solução de PBS com as células do biofilme foi utilizada para determinação da capacidade de diferenciação celular em formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas). Essa avaliação foi realizada em triplicata, por microscopia de luz com auxílio da Câmara de Neubauer, avaliando a morfologia celular de 1.000 células por amostra. Os dados foram expressos em porcentagem das formas filamentosas. Para a documentação da morfologia celular uma alíquota de 10µL foi transferida para uma lâmina de vidro e

observado por microscopia de luz, e as imagens documentadas em ampliação de 20x.

2.5 Produção de Biofilme e Morfogênese em Presença de Diferentes Fontes de Carboidratos

Para a formação dos biofilmes em diferentes fontes de carboidratos foram utilizados isolados com alta produção de biomassa total (357.10 *C. parapsilosis* e 291.11/ 268.10 de *C. tropicalis*), média (65.10 *C. parapsilosis* e 239.10 *C. tropicalis*) e baixa produção (122.11/ 117.11 *C. parapsilosis* e 394.11 *C. tropicalis*), conforme o ranqueamento estabelecido no item 2.2. A obtenção dos biofilmes foi realizada como descrito no item 2.2 com algumas modificações.

As células foram subcultivadas em caldo RPMI e RPMI suplementado com diferentes concentrações de glicose (2 e 4%), galactose (2 e 4%), maltose (1 e 2%) e sacarose (1 e 2%) e o desenvolvimento do biofilme foi realizado com os mesmos meios de cultivo. Na avaliação da diferenciação celular em formas filamentosas, a metodologia foi realizada como já descrita no item 2.4.

2.6 Determinação da Atividade Proteolítica de Células Livres e de Biofilme

Para a determinação da atividade proteolítica foram utilizados os mesmos isolados descritos no item 2.5.

A atividade proteolítica foi avaliada a partir de células cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de glicose, por 18h a 37°C em agitação a 120rpm (células livres) e células constituintes do biofilme, obtidas conforme descrito no item 2.4.

Para a determinação da produção de proteases ácidas secretadas, 125µL dos inóculos padronizados (1×10^6 células/mL) foram adicionados a 5mL de meio YCB (Yeast Carbon Base) suplementado com BSA

(albumina de soro bovino), na concentração final de 0,05%, seguido de incubação a 37°C/48h sob rotação (180rpm).

Após o cultivo realizou-se a contagem celular, seguido de centrifugação para obtenção do sobrenadante de cultivo. Para cada ensaio proteolítico foi utilizado 50µL do sobrenadante e 200µL de tampão citrato em pH 3,5. Após a incubação a 37°C/2h foram adicionados 250µL de ácido tricloroacético (TCA) em banho invertido, seguido de incubação a 4°C durante 1h. Após centrifugação, 150µL do sobrenadante da reação foram adicionados aos poços da placa de poliestireno de fundo reto e adicionados 100µL de solução de comassie blue. Após 10 minutos, a placa foi lida em leitor Elisa a 600nm. A atividade proteolítica foi calculada com base na diferença da absorbância entre as amostras e os controles. Nos controles, os sobrenadantes foram tratados com ácido tricloroacético previamente ao ensaio enzimático (SPECIAN *et al.*, 2013). Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que promoveu um aumento de 0.1 na absorbância, sendo a produção de proteases expressa em U/mL. Os experimentos foram realizados em triplicatas e em conjuntos independentes.

2.7 Determinação da Produção de Fator Hemolítico

Para a determinação da produção de fator hemolítico foram utilizados os mesmos isolados citados nos itens anteriores (2.5 e 2.6).

A análise da produção de fator hemolítico foi realizada a partir das células livres e de células do biofilme. Para isto, 20µL de uma suspensão celular (1×10^7 células/mL) dos isolados foram inoculados em 3mL de meio de cultivo Sabouraud e RPMI (adicionado 4% de glicose), suplementados com 7% de sangue humano, seguido de incubação a 37°C sob rotação de 90rpm por 48 horas. Após este período, os cultivos foram centrifugados (1080 rpm por 5 minutos). A fim de se mensurar a produção de fator hemolítico, alíquotas de 100µL do sobrenadante obtido foram transferidas para uma microplaca de poliestireno e submetidas à leitura espectrofotométrica a 540nm. A hemólise foi expressa em porcentagem, sendo calculada de acordo com a equação (FAVERO *et al.*, 2011)

$$\text{Hemólise (\%)} = 100 - \left[\frac{A_p - A_s}{A_p - A_n} \times 100 \right]$$

Onde:

A_p : Absorbância do controle positivo;

A_n : Absorbância do controle negativo;

A_s : Absorbância da amostra teste.

O controle positivo se baseou em meio de cultivo suplementado com sangue acrescido de 100 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS). O controle negativo em meio de cultivo suplementado com sangue. Os controles foram submetidos as mesmas condições que a dos cultivos.

2.8 Análises Estatísticas

Para a análise da formação de biofilme (células viáveis) pelos isolados foi empregado o teste-t de Tukey. Análise comparativa da produção de biofilme entre as duas espécies e na produção de biofilme em diferentes carboidratos foi utilizado o teste-t de Student, considerando $p < 0,05$, com o auxílio do programa BioStat 5.0 nos dois testes.

Na análise comparativa de atividade proteolítica e hemolítica entre células livres e células presentes no biofilme foi empregado o teste- t de Student, considerando $p < 0,05$, com o auxílio do programa BioStat 5.0.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da formação de biofilme: Biomassa Total e Células Viáveis

Os dados de formação de biofilme em termos de biomassa total e de células viáveis por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os valores de D.O de biomassa total obtidos para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram variados, sendo que todos os isolados sanguíneos das duas espécies testadas foram capazes de produzir biofilme em superfície de poliestireno.

Tabela 1. Produção de Biofilme por isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu medidos por redução de XTT e coloração por Cristal Violeta.

Isolados <i>C. parapsilosis</i>	CV (M.G ±D.P) / variância	XTT (M.G ±D.P) / variância
44.10	1.183 ± 0.366/ 0.823 – 1.713	0.54 ± 0.06/ 0.452 – 0.599
65.10	1.421 ± 0.968/ 0.483 – 2.785	0.27 ± 0.03/ 0.233 – 0.324
471.10	1.225 ± 0.959/ 0.611 – 2.835	0.508 ± 0.04/ 0.446 -0.534
551.10	0.921 ± 0.211/ 0.666 – 1.179	0.650 ± 0.06/ 0.59 – 0.74
122.11	0.766 ± 0.428/ 0.393 – 1.435	0.192 ±0.09/ 0.129-0.35
230.11	0.948 ± 0.161/ 0.764 – 1.159	0.127 ± 0.006/ 0.118 – 0.132
450.11	0.821 ±0.239/ 0.522 – 1.045	0.352 ± 0.09/ 0.242 – 0.475
262.10	0.953 ± 0.333/ 0.640 – 1.447	0.543 ±0.08/ 0.471 – 0.663
275.10	0.856 ± 0.082/ 0.743 – 0.924	0.137 ± 0.007/ 0.127 – 0.145
357.10	2.068 ± 0.434/ 1.736 – 2.719	0.351 ± 0.149/ 0.179 – 0.521
390.10	0.739 ± 0.316/ 0.396 – 1.163	0.11 ± 0.003/ 0.108 – 0.116
117.11	0.645 ± 0.125/ 0.482 – 0.729	0.139 ± 0.014/ 0.128 – 0.161
185.11	0.886 ±0.604/ 0.437 – 1.876	0.187 ± 0.04/ 0.150 – 0.251

CV=Cristal Violeta, XTT= Sal de Tetrazólio reduzido em corante formazan, M.G= Média Geométrica, D.P= Desvio Padrão.

Tabela 2. Produção de Biofilme por isolados de *C. tropicalis* medidos por redução de XTT e coloração por Cristal Violeta.

Isolados <i>C. tropicalis</i>	CV (M.G \pm D.P) / variância	XTT (M.G \pm D.P) / variância
46.10	1.834 \pm 0.06/ 1.755 – 1.917	0.728 \pm 0.005/ 0.721- 0.736
63.10	2.328 \pm 0.09/ 2.321 – 2.342	0.177 \pm 0.01/ 0.154 – 0.194
207.10	2.412 \pm 0.02/ 2.375 - 2.438	0.453 \pm 0.183/ 0.340 – 0.742
239.10	1.741 \pm 0.06/ 1.666 – 1.833	0.239 \pm 0.023/ 0.209 – 0.265
268.10	2.545 \pm 0.176/ 2.425 – 2.801	0.477 \pm 0.186/ 0.258 – 0.686
455.10	2.80 \pm 0.102/ 2.67 – 2.93	0.336 \pm 0.07/ 0.274 – 0.452
474.10	2.367 \pm 0.02/ 2.349 – 2.40	0.467 \pm 0.071/ 0.376 – 0.545
509.10	2.738 \pm 0.312/ 1.515 – 2.18	0.402 \pm 0.08/ 0.292 – 0.489
67.11	1.930 \pm 0.312/ 2.515- 2.187	0.389 \pm 0.051/ 0.349 – 0.465
132.11	1.994 \pm 0.179/ 1.75 – 2.148	0.308 \pm 0.065/ 0.257 – 0.406
193.11	2.30 \pm 0.226/ 2.005 – 2.53	0.564 \pm 0.07/ 0.462 – 0.642
291.11	2.420 \pm 0.291/ 2.159 – 2.84	0.234 \pm 0.03/ 0.209 – 0.283
394.11	0.907 \pm 0.175/ 0.736 – 1.158	0.315 \pm 0.106/ 0.237 – 0.48

CV=Cristal Violeta, XTT= Sal de Tetrazólio reduzido em corante formazan, M.G= Média Geométrica, D.P= Desvio Padrão.

Na análise dos dados relativos a biomassa total, os isolados foram categorizados de acordo com a capacidade da produção de biofilme, sendo considerada produção baixa ($DO_{600} < 1.0$), média ($DO_{600} 1.0 - 2.0$) e alta ($DO_{600} > 2.0$). Quanto aos isolados de *C. parapsilosis* observou-se que grande parte (69,23%) apresentaram produção baixa de biofilme e somente 7,69% foi altamente produtor e 23,07% foi medianamente produtor (Tabela 3).

Em relação a *C. tropicalis*, 30,76% dos isolados apresentaram formação mediana de biofilme e 61,53% foram altamente produtores e apenas 7,69 apresentou baixa produção. Dessa forma, isolados sanguíneos de *C.*

tropicalis foram mais produtores de biomassa total em superfície de poliestireno comparativamente aos isolados sanguíneos de *C. Parapsilosis* (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de Biofilme por Biomassa total de isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu.

Espécies de <i>Candida</i>	Produção de Biofilme		
	Alta	Média	Baixa
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (7,69%)	3 (23,07%)	9 (69,23%)
<i>Candida tropicalis</i>	8 (61,53%)	4 (30,76%)	1(7,69%)

Com o objetivo de avaliar a atividade metabólica dos biofilmes (células viáveis) foi utilizado o ensaio de redução do substrato XTT. As tabelas 1 e 2 mostram a atividade metabólica de biofilmes maduros (72 horas) de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente.

A quantidade de células sésseis viáveis foi variável para ambas espécies testadas. Quanto a *C. parapsilosis* os valores de atividade metabólica variaram de $0,65 \pm 0,06$ a $0,11 \pm 0,03$ (Tabela 1). Já para isolados de *C. tropicalis* estes valores variaram de $0,72 \pm 0,19$ a $0,17 \pm 0,01$ (Tabela 2). A análise comparativa entre as duas espécies revelou que biofilme de *C. tropicalis* apresentou maior atividade metabólica em biofilme (células viáveis), com valor médio de D.O_{490nm} de 0,405, comparativamente à *C. parapsilosis* com valor médio de D.O_{490nm} de 0,295 (teste- t, $p < 0,05$).

A atividade metabólica dos biofilmes foi também ranqueadas com base nos valores de D.O_{490nm}. Nesta análise, *C. parapsilosis* apresentou maior número de isolados fortemente produtores comparativamente a *C. tropicalis*, que apresentou maior número de isolados com atividade metabólica mediana (Tabela 4). O maior número de isolados com atividade metabólica baixa foi de *C. parapsilosis*.

Tabela 4. Produção de Biofilme por Células viáveis de isolados sanguíneos de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* stricto sensu.

Espécies de <i>Candida</i>	Produção de Biofilme		
	Alta	Média	Baixa
<i>Candida parapsilosis</i>	4 (30,76%)	2 (15,38%)	7 (53,8%)
<i>Candida tropicalis</i>	2 (15,38%)	8 (61,53%)	3 (23,07%)

3.2 Avaliação dos tipos Celulares Presentes nos Biofilmes

A avaliação dos tipos celulares nos biofilmes foi realizada por microscopia de luz e apresentada em porcentagem de formas filamentosas em relação ao número total de células. Como mostrado na Tabela 5, *C. parapsilosis* apresentou menor porcentagem de diferenciação em pseudo-hifas comparativamente as porcentagens de formas filamentosas observadas para os isolados de *C. tropicalis*.

Quanto a *C. parapsilosis*, 62% dos isolados testados apresentaram dimorfismo, sendo que 24% destes apresentaram no máximo 1% de pseudo-hifas no biofilme e 38% apresentaram porcentagens de 1,1 a 3% de pseudo-hifas no biofilme. Já na análise dos isolados de *C. tropicalis* a maioria (92%) apresentou dimorfismo no biofilme. Destes, 31% apresentaram no máximo 1% de formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) no biofilme, 38% apresentaram porcentagens de 1,1 a 3% de formas filamentosas e 23% apresentaram porcentagens de 3,1 a 5% de formas filamentosas (Tabela 5).

Os dados demonstram que isolados sanguíneos de *C. tropicalis* apresentaram capacidade de dimorfismo em biofilme sobre superfície de poliestireno significativamente superior (teste t $p < 0,05$) aos de *C. parapsilosis*.

Tabela 5. Porcentagem de diferenciação de formas filamentosas em biofilmes de isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis*.

Espécie	% de Formas Filamentosas			
	Ausência	0 a 1,0	1,1 a 3,0	3,1 a 5,0
<i>C. parapsilosis</i> stricto sensu (n=13)	38,4%(n=5)	46,1%(n=6)	15,3%(n=2)	0
<i>C. tropicalis</i> (n=13)	7,7%(n=1)	30,7%(n=4)	38%(n=5)	23%(n=3)

Além da avaliação da capacidade de morfogênese, foi avaliada a morfologia e arranjo das células sésseis na superfície de poliestireno de isolados ranqueados como fortemente e como medianamente produtores de biomassa total. O isolado 357.10 de *C. parapsilosis* caracterizado como fortemente produtor de biofilme apresentou biofilme com células de diferentes morfologias: ovais, alongadas e em tamanhos diferenciados, além da presença de pseudohifas. Já quanto ao isolado 44.10 caracterizado como menor produtor de biomassa total, o biofilme apresentou células exclusivamente blastoconidiais de tamanhos diversos (Figura 1).

Quanto aos isolados de *C. tropicalis*, o isolado 268.10 caracterizado como fortemente produtor de biomassa total apresentou grande densidade celular constituída por blastoconídeos de diferentes tamanhos e formas, além da presença abundante de pseudohifas e hifas. Já o isolado 63.10 caracterizado como menor produtor de biomassa total, o biofilme foi constituído por células arredondadas e alongadas, e pouca quantidade de formas filamentosas (Figura 1).

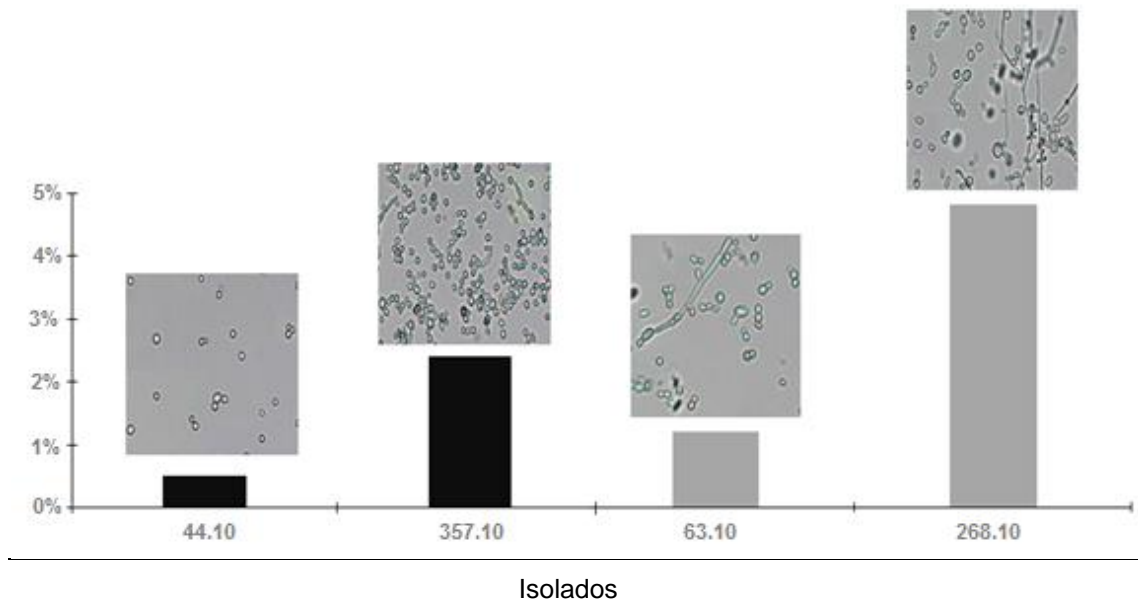


Figura 1. Porcentagem de Formas Filamentosas em biofilmes de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu (44.10 e 357.10) e de *Candida tropicalis* (63.10 e 268.10).

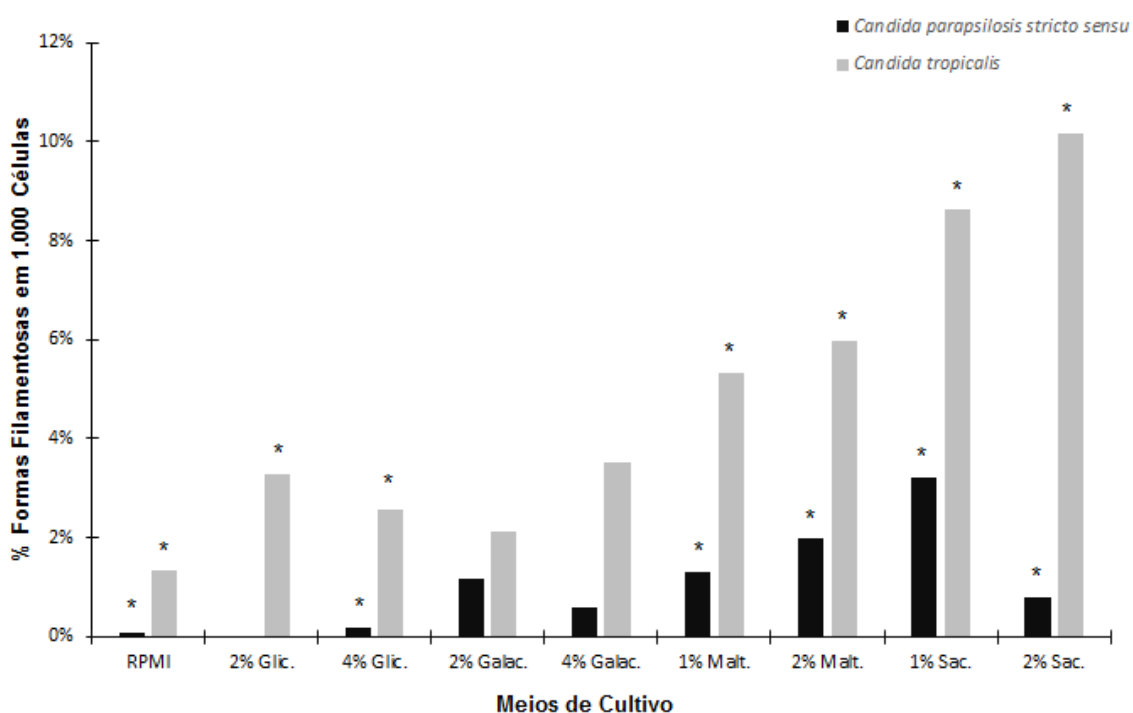
3.3 Produção de Biofilme e Avaliação dos Tipos Celulares em Presença de Diferentes Carboidratos

A produção de biomassa total pelos isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em meio RPMI suplementado com diferentes carboidratos não foi significativamente diferente ($p > 0,05$).

Em meio RPMI sem suplementação, a análise comparativa da formação de biofilme pelas duas espécies analisadas revelou diferença significativa na formação de biofilme onde *C. tropicalis* apresentou maior biomassa comparativamente a *C. parapsilosis* (teste-t $p < 0,05$).

A diferenciação em formas filamentosas entre células sésseis do biofilme após cultivo em diferentes carboidratos também foi analisada. A maior diferenciação em pseudohifas pelos isolados de *C. parapsilosis* foi observada em suplementação com maltose (1 e 2%), e sacarose (1%). Dados semelhantes foram obtidos para *C. tropicalis* onde as maiores porcentagens de células filamentosas foram observadas em presença de maltose (1 e 2%) e sacarose (1 e 2%) (Figura 2).

A análise comparativa da diferenciação em formas filamentosas presentes nos biofilmes entre as duas espécies revelou que os isolados de *C. tropicalis* apresentaram maior diferenciação comparativamente aos isolados de *C. parapsilosis*, em 77% dos meios de cultivo testados, não diferenciando estatisticamente somente no meio de cultivo com suplementação com galactose (teste-t $p < 0.05$) (Tabela 2).



* Diferenças significativas na quantidade de formas filamentosas entre as espécies (Teste-t $p < 0,05$).

Figura 2. Porcentagem de formas filamentosas em biofilmes de *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis* sob diferentes condições de cultivo.

3.4 Produção de Proteases Ácidas Secretadas (Saps) por Células Livres e por Células de Biofilme

Todos os isolados sanguíneos analisados produziram Saps nas condições testadas. Destes, 4 isolados (65.10 e 357.10 de *C. parapsilosis*; 291.11 e 394.11 de *C. tropicalis*) apresentaram diferença significativa quanto a produção de protease por células livres e células de biofilme (teste- t $p < 0.05$).

Destes, para 3 isolados (65.10, 357.10 e 394.11) a produção de Saps foi significativamente superior a partir de células de biofilme comparativamente a de células livres. Já, para o isolado 291.11 de *C. tropicalis* a maior produção de Saps ocorreu a partir de células livre comparativamente a de células de biofilme (Tabela 6).

Análise comparativa entre as duas espécies quanto a produção de Saps revelou ausencia de diferenças significativas, tanto a partir de células livres quanto de células de biofilme.

Tabela 6. Produção de protease ácida secretada por células livres e células de biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida tropicalis*.

Isolado	Atividade Proteolítica (U/ml)	
	Células Livres	Células Biofilme
<i>C. parapsilosis</i> stricto sensu		
65.10	0.16±0.169*	1.0±0.12*
357.10	0.13±0.12*	0.43±0.16*
122.11	0.21±0.18	0.1±0.14
117.11	0.33±0.26	0.4±0.21
<i>C. tropicalis</i>		
268.10	0.1±0.08	0.4±0.29
291.11	0.76±0.124*	0.16±0.09*
239.10	0.63±0.04	0.6±0.21
394.11	0.16±0.169*	0.56±0.09*

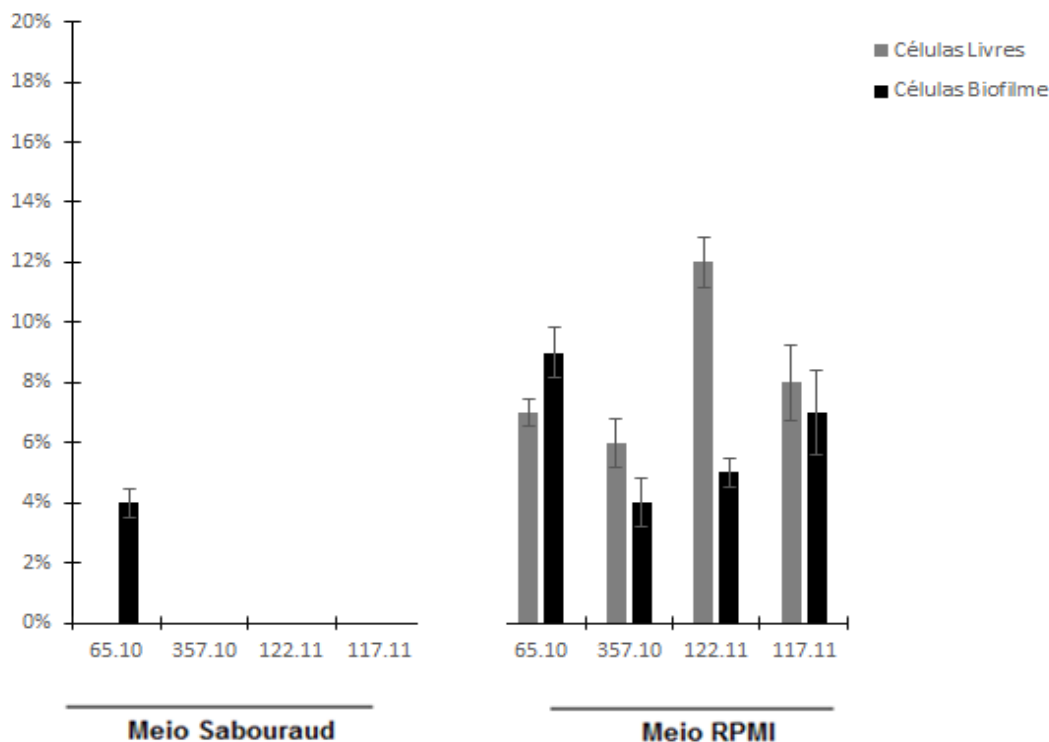
* Isolados com diferença estatisticamente significativas (Teste-t p<0,05).

3.5 Produção de Fator Hemolítico por Células Livres e por Células de Biofilme

A produção de fator hemolítico por células livres e por células de biofilme de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis* estão apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Quanto a *C. parapsilosis*, nenhum isolado apresentou atividade hemolítica a partir de células livres, após cultivo em meio Sabouraud. Já, para células obtidas de biofilme, a atividade hemolítica foi observada no cultivo do

isolado 65.10. Diferentemente, os cultivos em meio RPMI resultou em atividade hemolítica para todos os isolados, tanto a partir de células livres como de células de biofilme. Dos isolados analisados, apenas o isolado 122.11 apresentou diferença significativa (teste-t $p < 0.05$) entre células livres e de biofilme na promoção de hemólise, sendo a maior hemólise observada a partir de células livres (Figura 3).



* Isolados estatisticamente diferentes em relação a produção de biofilme (Teste-t $p < 0.05$).

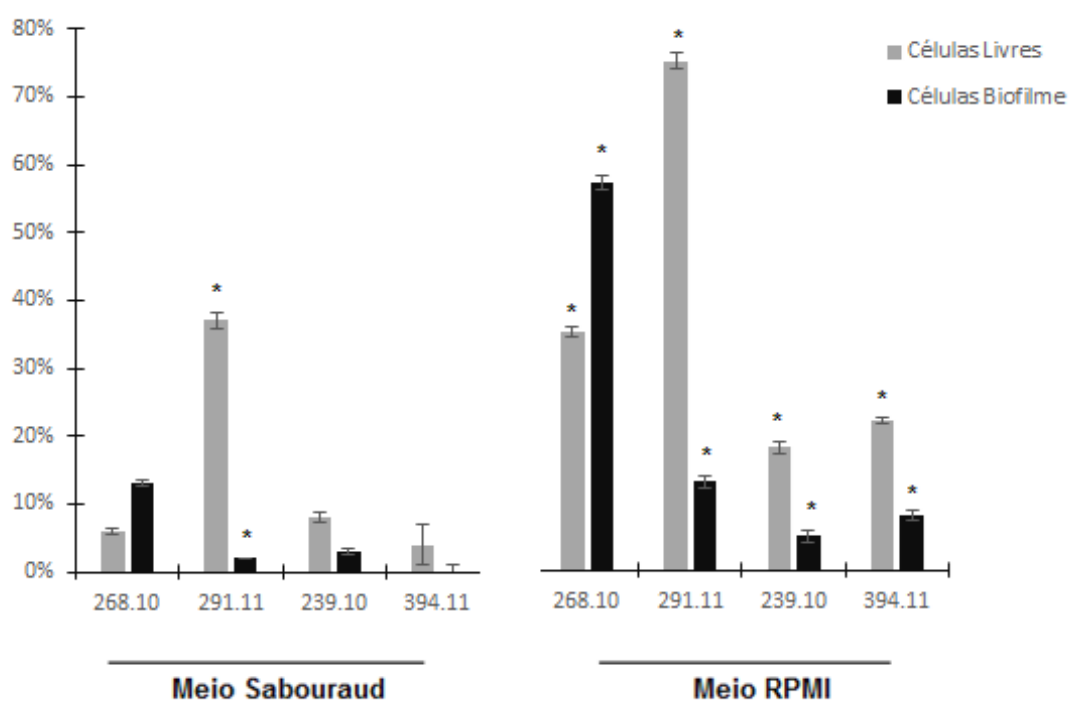
Figura 3. Produção de fator hemolítico por células livres e de biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu sob meios de cultivo distintos.

Já para *C. tropicalis* foi observada a produção de fator hemolítico por todos os isolados nos dois meios de cultivo testados, com exceção de células de biofilme do isolado 394.11 em meio Sabouraud (Figura 4). Em meio Sabouraud, diferença significativa na hemólise entre células livres e de biofilme foi observada somente para o isolado 291.11, sendo a maior hemólise promovida por células livres (teste-t $p < 0.05$).

Já, no meio RPMI, todos os isolados produziram fator hemolítico a partir de células livres e de biofilme. Do total de isolados, 3 apresentaram

atividade hemolítica significativamente superior (teste-t $p < 0.05$) a partir de células livres comparativamente a de células de biofilme. Somente o isolado 268.10 apresentou maior produção de fator hemolítico a partir de células de biofilme comparativamente a de células livres (Figura 4).

Há de se destacar a influência do meio de cultivo na produção do fator hemolítico, sendo que cultivo em meio RPMI resultou em atividade hemolítica significativamente superior a observada no meio Sabouraud (teste-t $p < 0.05$).



* Isolados estatisticamente diferentes em relação a produção de biofilme (Teste-t $p < 0.05$).

Figura 4. Produção de fator hemolítico por células livres e de biofilme de isolados sanguíneos de *C.andida tropicalis* sob meios de cultivo distintos.

4. DISCUSSÃO

Vários delineamentos experimentais têm sido utilizados para caracterizar as propriedades de biofilmes de *Candida* formados *in vitro*. Quanto a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, ainda são escassos os estudos acerca de protocolos padronizados para uma melhor avaliação de formação de biofilme.

Com objetivo de uma melhor reprodução de análise de formação de biofilme por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram realizadas modificações na tentativa de definir um melhor protocolo. A mensuração da biomassa total pelo emprego de cristal violeta foi realizada de acordo com Silva e colaboradores (2009) com algumas modificações, incluindo mudança do meio empregado no subcultivo sendo o meio Sabouraud substituído pelo meio RPMI suplementado com 2% de glicose; e o estabelecimento de pH 7,0 para o cultivo. Observou-se que o subcultivo em RPMI resultou em maior eficiência na aderência celular e produção mais abundante de biofilme (dados não mostrados). Dado semelhante foi descrito por Estivill e colaboradores (2011) em que foi observado um maior produção de biofilme por isolados de *C. parapsilosis* em diferentes materiais, devido a suplementação de glicose no meio de cultivo.

No presente estudo, além de alterações no meio de cultura, o cultivo de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu foi realizado a 37°C e em condição estática. Com isso, foi possível proporcionar uma melhor aderência da levedura a superfície de poliestireno (dados não mostrados). Thein *et al.* (2007) descreveram que a formação de biofilme por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, em condições estáticas foi significativamente superior comparativamente a cultivo sob agitação. Além disso, o desenvolvimento de biofilme em temperatura próxima a corporal contribui para análises referentes ao potencial patogênico em humanos, proporcionando aos isolados um aumento na filamentação, obtendo com isso, maior capacidade de aderência e formação do biofilme (LADERO *et al.*, 2013).

A análise comparativa da formação de biofilme por biomassa total de isolados hematogênicos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu realizada neste estudo revelou que os isolados de *C. tropicalis* são mais produtores de biofilme em comparação aos isolados de *C. parapsilosis*. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Shin e colaboradores (2002) embora

tenham empregado metodologia distinta da utilizada em nosso estudo. Estes autores avaliaram a produção de biofilme por espécies de *Candida não-albicans*, sendo que os isolados de *C. tropicalis* foram os maiores produtores, seguido de isolados de *C. parapsilosis*.

Já, no ranqueamento realizado para a análise da formação de biofilme pela mensuração de células viáveis, *C. parapsilosis* apresentou mais isolados altamente produtores de biofilme comparativamente a *C. tropicalis* (4 versus 2). No entanto, a maioria dos isolados de *C. parapsilosis* foi caracterizada como pouco produtores de biofilme. Em estudo realizado por Pannanusorn e colaboradores (2013) biofilmes de *C. tropicalis* também apresentaram maior atividade metabólica comparativamente aos de *C. parapsilosis*.

Sendo assim, neste estudo, a atividade metabólica (células viáveis) de biofilmes de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi variável, sugerindo que a produção de biofilme sobre poliestireno parece ser uma característica dependente do isolado, como sugerido por outros autores (KUHN *et al.*, 2002; LATIFF *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; PANNANUSORN *et al.*, 2013).

Esta diferença nas análises realizadas da produção de biofilme, das duas espécies pode sugerir a importância em realizar metodologias distintas a fim de mensurar a produção de biofilme por espécies de *Candida*. Segundo a literatura, a coloração por cristal violeta pode influenciar a quantificação de biomassa total, devido ao fato de que o corante pode corar toda a estrutura do biofilme, incluindo além de células sésses, a matriz exopolimérica, que também retém o corante. Outro fator que pode estar associado a determinação de biomassa total é o tamanho das células do biofilme e a quantidade de formas filamentosas (SILVA *et al.*, 2010). Assim, métodos alternativos, em adição ao de determinação da atividade metabólica, realizada por XTT, são propostos para fins de comparação de produção de biofilme por diferentes espécies de *Candida* (HENRIQUES *et al.*, 2005).

Em relação a morfologia das células constituintes dos biofilmes, as análises realizadas indicaram diferenças entre as duas espécies. O isolado de *C. tropicalis* caracterizado como fortemente produtor de biofilme apresentou células de tamanhos variados e maior diferenciação em formas filamentosas comparativamente ao observado para *C. parapsilosis*. Quanto a *C. parapsilosis*,

o isolado que apresentou maior biomassa total exibiu biofilme constituído principalmente por aglomerados de blastoconídeos de tamanhos variados, principalmente alongadas e com a presença de pseudohifas. Por outro lado, o isolado fracamente produtor de biofilme apresentou reduzida quantidade de blastoconídeos e ausência de filamentação. Corroborando com dados deste estudo, Silva e colaboradores (2009) demonstram por microscopia de varredura uma grande quantidade de hifas em biofilmes de *C. tropicalis*. Já os biofilmes de *C. parapsilosis* foram classificados como uma “rede densa” de células de morfologias variadas, e alguns isolados com presença de pseudohifas.

No nosso estudo, os isolados de *C. parapsilosis* apresentaram menor diferenciação em formas filamentosas em comparação com os isolados de *C. tropicalis*. Ladero e colaboradores (2013) correlacionaram a produção abundante de biofilme por *C. tropicalis* devido à alta filamentação, evidenciando com isso, a importância da capacidade de dimorfismo na aderência das células e formação do biofilme. A presença de formas filamentosas, mais particularmente de hifas, tem importância na integridade estrutural dos biofilmes, sendo que a morfogênese ocorre em resposta a estímulos ambientais distintos.

Outra análise realizada em nosso estudo compreendeu a avaliação do possível efeito de diferentes carboidratos na produção de biofilme por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* devido ao fato de que patógenos clinicamente importantes podem se estabelecer em ambientes que estão em constante mudança de fluídos. Os dados revelaram que os carboidratos testados (glicose, galactose, maltose e sacarose) não afetaram o desenvolvimento de biofilmes para nenhuma das espécies testadas.

No entanto, a resposta de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* à presença de diferentes carboidratos como fonte de carbono na formação de biofilme é relevante para a compreensão do potencial de virulência destas leveduras. Ene e cols (2012) analisaram os efeitos de diferentes fontes de carbono na estrutura celular de *C. albicans*. A arquitetura, bioquímica e propriedades biofísicas da parede celular destas leveduras foram fortemente influenciadas, resultando em diferenças na adesão, adaptação ao estresse e resistência a antimicrobianos.

No presente estudo, a avaliação da capacidade de dimorfismo em células constituintes dos biofilmes em presença dos diferentes carboidratos

revelou que a maioria dos carboidratos testados promoveu a diferenciação em formas filamentosas comparativamente ao obtido no meio RPMI sem suplementação, principalmente em *C. tropicalis*.

Além da produção de biofilme, outros fatores de virulência são essenciais para o desencadeamento de infecções por espécies de *Candida*. A secreção de proteases ácidas (Saps) têm sido associada com a virulência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* por contribuir com a aderência das células a diferentes substratos (ZAUGG *et al.*, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003; D'ÉÇA JUNIOR *et al.*, 2011).

A análise da secreção de enzimas hidrolíticas, em particular proteases, por células de biofilme de isolados hematogênicos de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ainda não foi relatada na literatura.

Quanto a *C. parapsilosis*, observou-se que para os isolados ranqueados como altamente e medianamente produtores de biofilme, a produção de Saps por células de biofilme foi significativamente superior a de células livres, sugerindo a ocorrência de associação entre esses fatores de virulência. Este fato pode ser devido ao papel das proteases na aderência de células de *C. parapsilosis*, sendo esta a primeira etapa no desenvolvimento de biofilme. Para *C. albicans* as proteases apresentam papel fundamental na aderência e invasão de tecido epitelial (MONOD & BORG-VON, 2002). Silva *et al.* (2009) descreveram que a expressão de genes codificadores de Saps foi variável entre isolados clínicos de *C. parapsilosis* quando em contato com tecido humano oral reconstituído (RHOE).

Nos dados obtidos em nosso estudo quanto aos isolados de *C. tropicalis*, esta associação foi observada somente um isolado. A produção de protease foi variada, onde um isolado altamente produtor e outro isolado de baixa produção de biomassa total apresentaram valores superiores a de células de biofilme comparativamente a células livres. E os outros dois isolados analisados demonstraram maior produção de protease em células livres em comparação com as de biofilme.

Neste estudo, não foi observada diferença significativa entre *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* quanto a produção de Saps. Diferentemente, D'Éça *et al.* (2011) descreveram que os isolados de *C. parapsilosis* foram mais

produtores de Saps comparativamente a outras espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Outra possível característica associada a virulência de *Candida* spp compreende a produção de fator hemolítico. Foi possível verificar que a atividade hemolítica não foi dependente da capacidade de formação de biofilme, além do fato de que o meio de cultivo influenciou significativamente a capacidade hemolítica. Neste estudo, isolados sanguíneos de *C. tropicalis* apresentaram maior atividade hemolítica comparativamente aos isolados de *C. parapsilosis*, corroborando com dados da literatura (FRANÇA *et al.*, 2010; FAVERO *et al.*, 2014).

REFERÊNCIAS

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 999-1008, 2006.

ASKEW, C.; SELLAM, A.; EPP, E.; HOGUES, H.; MULLICK, A.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. **Plos Pathogens**, v. 5, p. 2-20, 2009.

BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M.A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. C. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian Tertiary Hospital, **Mycopathologia**, v. 174, p. 389-396, 2012.

BUSTAMANTE, B.; MARTINS, M.A.; BONFIETTI, L.X.; SZESZS, M.V.V.; JACOBS, J.; GARCIA, C.; MELHEM, M.S.C. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 855-860, 2014.

CHAI, L.Y.A.; DENNING, D.W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Review in Microbiology**, v. 36, p. 282-298, 2010.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRA, J.; PATEL, J.D.; LI, J.; ZHOU, G.; ANDERSON, J.M.; GHANNOUM, M. A. Modifications of Surface Properties of Biomaterials Influences the Ability of *Candida albicans* to Form Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8795-8801, 2005.

CHEN, P. L.; LO, H.J.; WU, C.J.; LEE, H.C.; CHANG, C.M.; LEE, N.Y.; WANG, A.H.; LIN, W.L.; KO, N.Y.; LEE, C.C.; KO, W.C. Species distribution and antifungal susceptibility of blood *Candida* isolates at a tertiary hospital in southern Taiwan, 1999–2006. **Mycoses**, v. 54, p. e17- e23, 2011.

CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M.E.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, p.176-185, 2011.

COSTA, V.G.; QUESADA, R.M.B.; STIPP-ABE, A.T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243-250, 2014.

DIGNANI, M.C; SOLOMKIN, J.S; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E; MCGINNIS, M. R; PFALLER, M.A. **Medical Mycology**. 1° Ed. Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

ENE, J. V.; ADYA, A.K.; WEHMEIER, S.; BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. Host Carbon Sources Modulate Cell Wall Architecture, Drug Resistance and Virulence in a Fungal Pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 1319-1335, 2012.

ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; TORRES-LANA, A.; CARRILLO-MUNÓZ, A.J.; ARÉVALO, M.P. Biofilm formation by Five species of *Candida* on Three Clinical Materials. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 238-242, 2011.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Haemolytic factor production by clinical Isolates of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 68, p. 161-166, 2014.

FRANÇA, E. J. G.; FAVERO, D; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 318-321, 2010.

FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R.M.B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Haemolytic and Proteinase Activities in Clinical Isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with Reference to the Isolation Anatomic Site. **Mycoses**, v. 54, p. 44-51, 2009.

D'ÉÇA JUNIOR, A. D.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S.G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. In vitro Differential Activity of Phospholipases and Acid Proteinases of Clinical Isolates of *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 334-338, 2011.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUN, M.A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 878-888, 2002.

LADERO, M.A.; BLANCO, M. T.B.; HURTADO, C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, M. T.; GÓMEZ-GARCIA, A. C. Determination of Biofilm Production by *Candida tropicalis* Isolated from Hospitalized Patients and its Relation to Cellular Surface Hydrophobicity, Plastic Adherence and Filamentation Ability. **Yeast**, v.30, p. 331-339, 2013.

LATIFF, A. A.; MUKHERJEE, P.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; GHANNOUM, M. Characterization of Biofilms Formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 265-270, 2010.

MANNS, J. A.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A.; PIGNATARI, A.C.C. *et al.* and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866–1871, 2011.

MITCHELL, K. F., TAFF, H. T.; CUEVAS, M.A.; REINICKE, E.L.; SANCHEZ, H.; ANDES, D. R. Role of Matrix β -1,3 Glucan in Antifungal Resistance of Non-*albicans Candida* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1918-1920, 2013.

MONOD, M.; BORG-VON, Z.M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 1087-1093, 2002.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v. 18. p. 1017-1024, 2008.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PlosOne**, v.8, p. e59373, 2013.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; ROMLING, U. Prevalence of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Candida* species Causing Bloodstream Infection. **Mycoses**, v. 56, p. 264-272, 2013.

PIERCE, C. G., UPPULURI, P., TRISTAN, A. R., JR, F. L. W., RAMAGE, G., LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, **Nature Protocols**, v.3(9), p.1494–1500, 2008.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 19, p. 1837-1838, 1999.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SHIN, J. H.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S.K.; SUH, S. P.;RYANG, D. W. Biofilm Production by Isolates of *Candida* species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244-1248, 2002.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. In vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 61, p. 534-540, 2010.

SILVA, S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p. 681–689, 2009.

SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 183-203, 1992.

SPECIAN, A.F.L.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural Analysis of in Vitro Adherence and Production of Acid Proteases by Clinical Isolates of *Candida parapsilosis* Sensu Stricto Following Growth in the Presence of Keratinous Substrates from Human Source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 1-6. 2013.

THEIN, Z. W.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. In Vitro Biofilm Formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under Dynamic and Anaerobic Conditions. **Archives of Oral Biology**, v. 52, p. 761-767, 2007.

TORTORANO, A.M.; DHO, G.; PRIGITANO, A.; BREDA, G.; GRANCINI, A.; EMMI, V.; CAVANNA, C.; MARINO, G.; MORERO, S.; OSSI, C.; DELVECCHIO, G.; PASSERA, M.; CUSUMANO, V.; DAVID, A.; BONACCORSO, G.; CORONA, A.; FAVARO, M.; VISMARIA, C.; GARAU, M.G.; FALCHI, S.; TEJADA, M. R. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicenter prospective, observational study in Italy (2006-2008). **Mycoses**, v. 55, p. 73-79, 2012.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, E. M.; TRECARIKI, B. F.; ROSSI, M.; DONATI, K. G.; SORDA, M.; SPANU, G.F.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1843-1850, 2007.

ZAUGG, C.; ZEPERLIN, M. B.; REICHARD, D. S.; MONOD, M. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v.69, p. 405-412, 2001.

PARTE 2

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS SANGUÍNEOS DE
Candida parapsilosis stricto sensu EM PRESENÇA DE SOLUÇÕES
HIPERGLICÍDICAS EM CONCENTRAÇÕES EQUIVALENTES A DE
NUTRIÇÃO PARENTERAL TOTAL**

RESUMO

A utilização de dispositivos médicos e a administração de nutrição parenteral total (NPT) por meio de cateteres aumentam os riscos de infecções nosocomiais da corrente sanguínea. *C. parapsilosis* tem sido frequente em candidíases e a produção de biofilme é apontada como um fator de virulência potencial desta espécie, sendo responsável por fungemias relacionadas a cateter em pacientes submetidos a NPT. *C. parapsilosis* se multiplica em concentrações elevadas de glicose e formam biofilme em materiais protéticos podendo ter acesso a corrente sanguínea e estabelecer infecção. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a formação de biofilme e diferenciação em formas filamentosas por isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu em meio Sabouraud suplementado com glicose em proporção equivalente a apresentada nas soluções de nutrição parenteral (5, 15, 25 e 30%). A formação de biofilme, baseada em biomassa total, foi verificada por espectrofotometria da densidade óptica após coloração com cristal violeta a 1%. A avaliação dos tipos celulares presentes nos biofilmes foi realizada por microscopia de luz. A produção de biofilme pelos isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu foi superior em presença de 30 e 25% de glicose comparativamente as demais concentrações testadas; sendo que os menores valores de biomassa total foram observados em presença de 15% de glicose para a maioria dos isolados. Quanto a morfologia de células do biofilme, dos seis isolados analisados, 67% apresentou aumento significativo de formas filamentosas em presença de 30% de glicose comparativamente ao observado no cultivo sem suplementação. Estes dados sugerem que a capacidade de isolados de *Candida parapsilosis* em produzir biofilmes em meio Sabouraud contendo glicose pode refletir seu potencial patogênico em causar fungemia relacionada a cateteres venosos centrais em pacientes submetidos a nutrição parenteral total.

Palavras-chaves: *Candida parapsilosis* stricto sensu, filamentação, Biofilme, glicose.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de cateteres para acesso vascular tornou-se de uso frequente na medicina moderna. Estes dispositivos estão associados a um grande número de complicações, dentre as quais as infecções tem sido predominantes (revisado por CRUMP & COLLIGNON, 2000).

Infecções fúngicas nosocomiais têm aumentado em incidência nas últimas décadas ocasionando altos índices de mortalidade. Espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes fúngicos mais comumente isolados, tornando um problema crescente de saúde pública em muitos países (GUDLAUGSON *et al.*, 2003).

No Brasil, *Candida parapsilosis* é responsável por 20-30% dos episódios de candidemia, com prevalência similar entre populações adulta e pediátrica (BRITO *et al.*, 2006). Recentemente, em estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina foi observado que *C. parapsilosis* foi a terceira espécie mais isolada de infecções hematogênicas, correspondendo a 22% dos isolados obtidos (COSTA *et al.*, 2014).

C. parapsilosis é comensal da microbiota dos seres humanos e a sua capacidade de formar biofilmes em soluções com altas concentrações de glicose e adesão a materiais protéticos, como cateteres, faz com que esta levedura seja de grande importância em casos de candidemia associada a hiperalimentação parenteral e dispositivos intravasculares (SHIN *et al.*, 2002; CLARK *et al.*, 2004). As soluções de nutrição parenteral total são consideradas um rico e seletivo meio de crescimento para espécies de *Candida* (PFALLER *et al.*, 2001; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; BANTON, 2006)

A nutrição parenteral total (NPT) é uma terapia nutricional, bem estabelecida, que permite a alimentação intravenosa de pacientes críticos quando a via enteral não é possível (GOLDMANN & PIER, 1993). É bastante utilizada nos ambientes hospitalares, sendo infundida através de um cateter venoso central e normalmente consiste de uma solução de aminoácidos, glicose, lipídeos, vitaminas e minerais (WILMER & VAN DEN BERGHE, 2008).

Almirante e cols (2006) relataram a forte influência da administração de nutrição parenteral sobre o crescimento de *C. parapsilosis* e posteriormente o estabelecimento de infecção sanguínea.

A formação de biofilme é um importante fator de virulência aumentando do potencial patogênico da levedura. Após a colonização, os microorganismos podem se disseminar do biofilme e iniciar uma infecção aguda e disseminada.

Desta forma, a avaliação do papel de soluções hiperglicídicas na formação de biofilme por *C. parapsilosis* torna-se relevante, permitindo acrescentar informações acerca da sua patogenicidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais Biológicos

Foram avaliados 13 isolados de amostras sanguíneas de *C. parapsilosis* stricto sensu provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina-PR, no período de 2010 e 2011 (COSTA *et al.*, 2014). Estes isolados foram armazenados em meio Sabouraud com glicerol 20% a -20°C.

2.2 Determinação da Biomassa Total

A obtenção dos biofilmes foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2009) e Pierce *et al.* (2008), com modificações.

Para o preparo dos inóculos, os isolados foram previamente cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 48h a 37°C. Em seguida, uma fração de células foi subcultivada em caldo Sabouraud (4% glicose, 1% peptona, 0,25% extrato de levedura), suplementado com glicose (5, 15, 25 ou 30%), por 18h a 37°C sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, foi realizado o ajuste de concentração celular para 1×10^8 céls/mL de caldo Sabouraud nas diferentes concentrações de glicose. Volumes de 200µL desta suspensão foram transferidos para poços de fundo reto da microplaca de poliestireno, seguido de incubação por 24h a 37°C, em condição estática. Em seguida, 100µL do meio de cultivo foi removido e a mesma quantidade do mesmo meio fresco foi adicionada aos poços, seguido de incubação por mais 48h nas mesmas condições.

Após este período, os poços da microplaca foram lavados duas vezes com tampão PBS para a remoção das células não aderentes. Para a mensuração da biomassa total, foi realizada coloração com cristal violeta como descrito por Silva *et al.* (2009). As células aderidas após a lavagem com PBS foram fixadas com 200µL de metanol por 15 minutos e coradas com 200µL de solução de cristal violeta a 1% por 5 minutos, e os poços lavados com tampão PBS. Para a liberação do corante e posterior leitura, foram adicionados 200 µL de ácido acético (33%) e a absorbância da solução lida em leitor de Elisa (Bio-Tek L 808) em 600nm.

Na análise da produção de biofilme por cada isolado foi realizado um ranqueamento determinado de acordo com os dados obtidos nas triplicatas, de conjuntos independentes do experimento. A produção de biofilme de cada isolado foi classificada como: Baixa produção ($DO_{600} \leq 2.0$), média produção ($DO_{600} 2.1 - 3.0$) e alta produção ($DO_{600} > 2.0$).

2.3 Avaliação dos Tipos Celulares Presentes nos Biofilmes

Foram utilizados seis isolados sanguíneos de *C. parapsilosis*, escolhidos aleatoriamente. Após a formação do biofilme conforme descrito no item 2.2, os poços da microplaca foram lavados com tampão PBS para a remoção das células não aderentes. Em seguida, foram adicionados 200µL do mesmo tampão e realizada a remoção de células do biofilme com auxílio de ponteira de micropipeta estéril. Uma alíquota de 10µL de cada solução de PBS com as células do biofilme foi utilizada para determinação da capacidade de diferenciação celular em pseudohifas. Essa avaliação foi realizada em triplicata, por microscopia de luz com auxílio da Câmara de Neubauer, avaliando a morfologia celular de 1.000 células por isolado. Os dados foram expressos em termos de porcentagem de formas filamentosas em relação às leveduras totais.

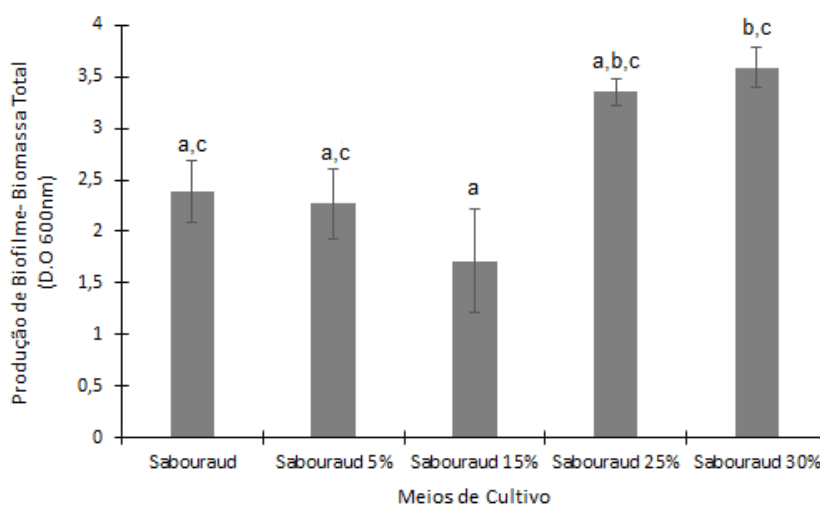
2.4 Análise Estatística

Para a análise da formação de biofilme e morfogênese nos diferentes meios de cultivo foi empregado os testes, teste- t de Tukey.

3. RESULTADOS

Neste estudo foi avaliada a biomassa total de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu após cultivo em presença de concentrações de glicose equivalentes às de soluções de nutrição parenteral total.

Todos os isolados formaram biofilme em todos os meios de cultivo testados, no entanto, em cultivos suplementados com 25 e 30% de glicose ocorreram os maiores valores de biomassa total comparativamente aos dos demais meios testados. Como observado na Figura 1, a produção de biofilme foi significativamente superior em presença de 30% de glicose comparativamente ao biofilme produzido em presença de 5 e 15% e em Sabouraud sem suplementação. A biomassa total produzida em presença de 25% de glicose diferiu somente da biomassa produzida em 15% (Teste-t Tukey).



*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa em relação ao crescimento de biofilme nas diferentes suplementações ($p < 0,05$, Teste-t Tukey).

Figura 1. Produção de biofilme por isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu em presença de diferentes concentrações de glicose.


Quando os isolados foram avaliados individualmente, observou-se que a maioria (69%; $n=9$) apresentou maior valor de biomassa total em suplementação com glicose a 30% comparativamente ao observado em Sabouraud sem suplementação. No entanto, apenas 1 isolado (185.11)

apresentou biomassa total significativamente inferior no meio sem suplementação (Friedman $p < 0.05$). Em meios suplementados com 15% de glicose foram observados os menores valores de biomassa total para a maioria dos isolados (77%) e somente 2 isolados apresentaram menor produção de biofilme em 5% de glicose.

Dos 13 isolados analisados, apenas 2 (471.10 e 390.10) não apresentaram diferenças significativas na formação de biofilme após cultivo nas diferentes concentrações de glicose (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de biofilme (biomassa total) por isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu após cultivo em meio Sabouraud e Sabouraud suplementado com diferentes concentrações de glicose.

Isolados	Meio de Cultivo				
	Sabouraud	Sabouraud + 5% Glicose	Sabouraud + 15% Glicose	Sabouraud + 25% Glicose	Sabouraud + 30% Glicose
44.10					
65.10					
471.10					
551.10					
122.11					
230.11					
450.11					
262.10					
275.10					
357.10					
390.10					
117.11					
185.11					

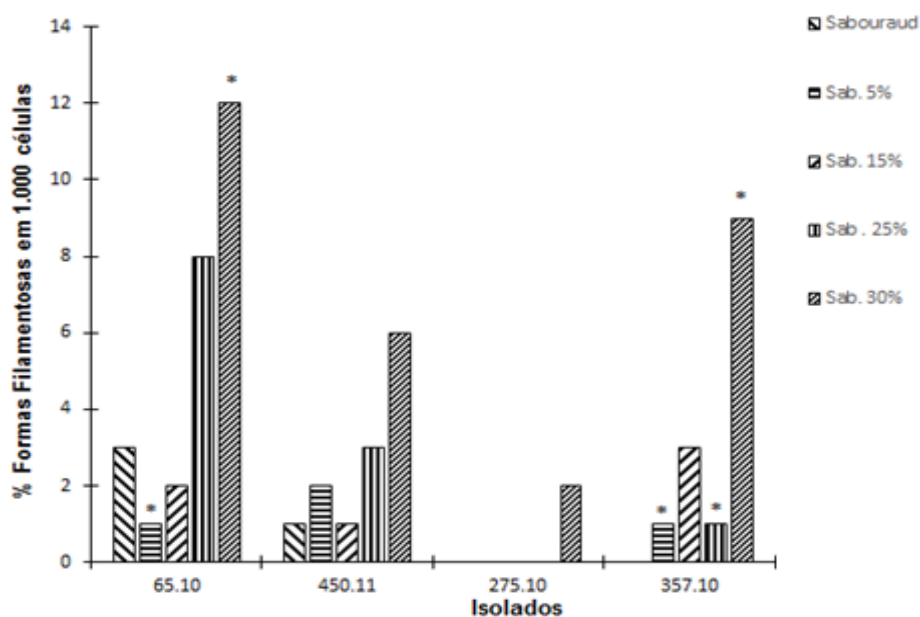
: Produção de Biofilme significativamente inferior pelo respectivo isolado

: Produção de Biofilme significativamente superior pelo respectivo isolado

Quanto ao potencial de diferenciação em pseudohifas nos diferentes meios testados, nossos dados revelaram que a diferenciação foi dependente da concentração de glicose presente no meio de cultivo (Figura 2). Dos isolados analisados, apenas dois (471.10 e 262.10) não apresentaram pseudohifas em seus biofilmes. Os demais isolados apresentaram pseudohifas, sendo a concentração em 30% de glicose a que mais promoveu o dimorfismo celular (Figura 2). O isolado 275.10 apresentou diferenciação em pseudo-hifas somente em meio de cultivo suplementado com 30% de glicose.

A diferenciação em pseudo-hifas foi significativamente superior após cultivo em presença de 30% de glicose comparativamente a diferenciação obtida em 5% de suplementação para o isolado 65.10. Já quanto ao isolado 357.10, a diferenciação em pseudo-hifas foi significativamente superior em presença de 30% de glicose comparativamente a diferenciação observada em meio Sabouraud e em presença de 25% de glicose. Os isolados 450.11 e 275.10 não apresentaram diferenças nas porcentagens de filamentação em função das suplementações com diferentes concentrações de glicose (Figura 2).

A partir de células presentes no biofilme em superfície de poliestireno foi possível observar células pequenas e arredondadas (dados não mostrados) em meio de cultivo sem suplementação com glicose. Já em suplementação com 30% de glicose foram observadas células maiores e em maior quantidade, além disso, apresentaram formatos diferenciados: ovais, arredondadas e alongadas, além da presença abundante de pseudohifas.



*Produção de Pseudohifa estatisticamente diferentes em relação aos meios de cultivo distintos (Teste-t de Tukey $p < 0,05$).

Figura 2. Porcentagem de formas filamentosas presentes em biofilmes de *C. parapsilosis* stricto sensu em diferentes concentrações de glicose.

4. DISCUSSÃO

As espécies de *Candida* são a segunda causa mais comum de infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, sendo estas consideradas de alta mortalidade, alcançando o patamar de 50% em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (EDMOND *et al.*, 1999; KOJIC & DAROUICHE, 2004; MORGAN *et al.*, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007; BASSETTI *et al.*, 2007). Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* é amplamente reconhecida como principal responsável por casos de fungemia em pacientes hospitalizados. Isso se deve, em parte, pela capacidade de *C. parapsilosis* formar biofilme em soluções com altas concentrações de glicose.

No nosso estudo, pioneiro na demonstração de desenvolvimento de biofilme por isolados hematogênicos de *C. parapsilosis* em diferentes concentrações de glicose, foi possível verificar um melhor desenvolvimento de

biofilme em meios de cultivo suplementados com glicose, principalmente em altas concentrações (25 e 30%).

A suplementação dos meios de cultivo utilizados neste estudo foram realizados com propósito de se tornarem equivalentes ao encontrado em cateteres na administração de NPT. Além disso, o meio de cultura Sabouraud foi escolhido a fim de contribuir para esta equivalência, por ser um meio rico em proteínas e minerais. A NPT é rica em aminoácidos, vitaminas, minerais, lipídeos, oligoelementos e principalmente glicose, com finalidade de atender às necessidades energéticas e protéicas de pacientes.

Nas soluções de NPT, os glicídios administrados podem ser soluções de glicose, frutose e xilitol, mas em geral é utilizado apenas glicose, a qual é aplicada como fonte calórica exclusiva sendo útil no suprimento da necessidade calórica diária pelo paciente. Este carboidrato é aplicado nas formas de dextrose a 25, 50 ou 70%, e a concentração máxima final que pode ser administrada por via central é de 35% (KNOBEL, 2006; METHENY, 1996).

Em um estudo de coorte, Blumberg e cols (2001) analisaram o papel da nutrição parenteral em casos de candidemia. Segundo estes autores o risco atribuível foi 3,6 maior para os pacientes submetidos a NPT do que os não submetidos a este tratamento. Em outro estudo, Clark e colaboradores (2004) identificaram 22 casos de infecção da corrente sanguínea por *C. parapsilosis*, sendo que dentre os fatores de risco associados destacam-se a internação em unidade de terapia intensiva e recebimento de NPT.

Além da importância do papel da glicose no crescimento do biofilme, também podemos observar em nosso estudo a influência da glicose na diferenciação celular em pseudohifas.

A capacidade de dimorfismo apresentado por espécies de *Candida* tem um papel fundamental para um bom desenvolvimento de biofilme, além disso, as estruturas de pseudohifas ou hifas verdadeiras contribuem para a virulência da levedura, facilitando a adesão e invasão dos tecidos (HAWSER & DOUGLAS, 1994; KOJIC & DAROUICHE, 2004).

Corroborando com nosso estudo, acerca do aumento da produção de formas filamentosas em altas concentrações de glicose, Swindell e cols (2009) demonstraram a influencia de soluções hiperlipídicas e hiperglicídicas no desenvolvimento de biofilmes por *C. albicans*. O efeito desta

suplementação afetou desde o crescimento, até a arquitetura e morfologia das células presentes no biofilme, resultando em aumento no número de hifas em comparação com o biofilme formado em meio de cultivo sem suplementação.

Segundo a literatura, biofilme de *C. parapsilosis* tem arquitetura pouco estruturada e é constituído quase que exclusivamente por blastoconídeos agregados; além de ser altamente isolado- dependente (KUHN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009). Em nosso estudo, o papel de diferentes concentrações no desenvolvimento de biofilme e promoção de diferenciação também foi isolado dependente, embora em presença de altas concentrações de glicose estas características foram mais pronunciadas.

REFERÊNCIAS

- ALLWOOD, M.C. Microbiological Risks in Parenteral Nutrition Compounding. **Nutrition**, v. 13, p. 60-61, 1997.
- ALMIRANTE, B. D; RODRIGUEZ, M. CUENCA-ESTRELLA, M; ALMELA, F; SANCHEZ, J, AYATS, C; ALONSO-TARRES, J. L; RODRIGUEZ, T; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1681-1685, 2006.
- BANTON, J. Techniques to Prevent Central Venous Catheter Infection: Products, Research, and Recommendations. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 21, p. 56-61, 2006.
- BASSETTI, M.; TRECARICHI, E.M.; RIGH E.; SANGUINETTI, M.; BISIO, F.; POSTERARO, B.; SORO, O.; CAUDA, R.; VISCOLI, C.; TUMBARELLO, M. Incidence, Risk Factors, and Predictors of Outcome of Candidemia. Survey in 2 Italian University Hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p. 325-331, 2007.
- BLUMBERG, H. M.; JARVIS, W. R., SOUCIE, M.; EDWARDS, J. E.; PATTERSON, J. E.; PFALLER, M. A.; RANGEL-FRAUSTO, S.; RINALDI, M. G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R. T.; WENZEL, R. P. Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients: The NEMIS Prospective Multicenter Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 177-186, 2001.
- BONASSOLI, L. A; BERTOLI, M; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v.59, p. 159-162, 2005.
- BRITO, L.R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R.C.; ALMEIDA, L.P.; da MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.
- CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R.H.; SCOTT, F.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4468–4472, 2004.
- COSTA, V.G.; QUESADA, R.M.B.; STIPP-ABE, A.T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243-250, 2014.
- CRUMP, J.A., COLLIGNON, P.J. Intravascular Catheter-Associated Infections. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p. 1-8, 2000.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S. E.; McCLISH, D. K.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N., WENZEL, R. P. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 239-244, 1999.

FRIDKIN, S.K.; JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.

GOLDMANN, D.A., PIER, G.B. Pathogenesis of Infections Related to Intravascular Catheterization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 176-192, 1993.

GUDLAUGSON, O; GILLESPIE, S. H; LEE, K; VANDE BERG, J. HU, J; MESSER, S; HERWALDT, L; PFALLER, M; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia. **Clin Infect Dis** 37:1172-7, 2003.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, J. L. Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials in Vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 915-921, 1994.

JIN, Y.; LAKSHMAN, P.; SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE, Y.; YIP, H. K. Biofilm Formation of *Candida albicans* is Variably affected by Saliva and Dietary Sugars. *Archives of Oral Biology*, v. 49, p. 489-498, 2004.

KNOBEL, E. **Conduitas no Paciente Grave**. 3º edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 878-888, 2002.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.W.; SOLL, D. R.; GHANNOUM, M. A. *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1074-1081, 2004.

KUWAHARA, T; SHIMONO, K; KANEDA, S.; TAMURA, T.; ICHIHARA, M.; NAKASHIMA, Y. Growth of Microorganisms in Total Parenteral Nutrition Solutions Containing Lipid. **International Journal of Medical Sciences**, v.3, p. 101-109, 2010.

KUWAHARA, T; KANEDA, S.; SHIMONO, K.; INOUE, Y. Growth of Microorganisms in Total Parenteral Nutrition Solutions Without Lipid. **International Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 43-47, 2010.

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A.; PIGNATARI, A.C.C.; Brazilian SCOPE Study Group: Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of

2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866-1871, 2011.

MCCOURTIE, J; DOUGLAS, J. Relationship Between Cell Surface Composition of *Candida albicans* and Adherence to Acrylic After Growth on Different Carbon Sources. **Infection and Immunity**, v.32, p. 1234-1241, 1981.

METHENY, N, M. **Fluid and electrolyte balance: Nursing Considerations**. 3^o Edição. Editora Philadelphia, 1996.

MORGAN, J.; MELTZER, M.I.; PLIKAYTIS, B.D.; SOFAIR, A. N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L.H.; SEABERG, E. C.; HAJJEH, R. A.; TEUTSCH, S. M. Excess Mortality, Hospital Stay, and Cost Due to Candidemia: A Case-Control Study Using Data From Population-Based Candidemia Surveillance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, p. 540-547, 2005.

MUKHERJEE, P, K.; CHANDRA, J. *Candida* Biofilm Resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 301-309, 2004.

NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; GHOUL, S.; ROUABHIA, M.; BAKHROUF, A. Effect of Glucose Supplementation on *Candida albicans* Virulence in Immunosuppressed Swiss Albino Mice (*Mus musculus*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 2479-2487, 2011.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J; Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3254-3259, 2001.

PIERCE, C. G., UPPULURI, P., TRISTAN, A. R., JR, F. L. W., RAMAGE, G., LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, **Nature Protocols**, v.3(9), p.1494–1500, 2008.

SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S. K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Biofilm Production by Isolates of *Candida* species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates From Other Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244-1248, 2002.

SILVA, S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p. 681–689, 2009.

ST-GERMAIN, G. LAVERDIERE, M. PELLETIER, R. BOURGAULT, A.; M. LIBMAN, M. LEMIEUX, C. NOEL, G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.949-953, 2000.

SWINDELL, K., LATIFF, A. A., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Parenteral Lipid Emulsion Induces Germination of *Candida albicans* and Increases Biofilm Formation on Medical Catheter Surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**. v.200, p.473-480, 2009.

THOMPSON, D.S.; CARLISLE, P.L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1173-1182, 2011.

TOSUN, I.; AKYUZ, Z.; GULER, N.C.; GULMEZ, D.; BAURAMOGLU, G.; KAKLIKKAYA, N.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; AYDIN, F. Distribution, Virulence Attributes and Antifungal Susceptibility Patterns of *Candida parapsilosis* Complex Strains Isolated from Clinical Samples. **Medical Mycology**, v. 51, p. 483-492, 2013.

WILMER, A., VAN DEN BERGHE, G. Parenteral Nutrition. In: GOLDMAN, L. D. **Cecil Medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier,p.1621-1623, 2008.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, K.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M.B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases From a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

CONCLUSÕES

- Isolados sanguíneos de *C. tropicalis* possuem maior capacidade de produção de biofilme (biomassa total e células viáveis) e dimorfismo comparativamente a isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu;
- A produção de biofilme por isolados sanguíneos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu parece ser isolado dependente;
- A suplementação de carboidratos, em particular dissacarídeos, influenciam o desenvolvimento de biofilmes de *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis* favorecendo a diferenciação em formas filamentosas;
- A suplementação de carboidratos promoveu dimorfismo em formas filamentosas em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu;
- A formação de biofilme parece estar associada a produção de proteases ácidas secretadas em *C. parapsilosis* stricto sensu, mas não em *C. tropicalis*;
- O meio de cultivo influencia a produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* stricto sensu;
- A presença de glicose em concentrações equivalentes as administradas em nutrição parenteral total promove aumento de biomassa total e diferenciação em formas filamentosas por *C. parapsilosis* stricto sensu.