



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA TROPICALIS*:**  
CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE COLÔNIAS E  
ASSOCIAÇÃO COM VIRULÊNCIA

---

Londrina  
2015

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA TROPICALIS*:**  
CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE COLÔNIAS E  
ASSOCIAÇÃO COM VIRULÊNCIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina  
2015

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

Moralez, Alane Tatiana Pereira .

Switching fenotípico em *Candida tropicalis*: caracterização ultraestrutural de colônias e associação com virulência / Alane Tatiana Pereira Moralez. - Londrina, 2015.  
108 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Coorientador: Luciana Furlaneto-Maia.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Candida - Teses. 2. Fatores de virulência - Teses. 3. Switching fenotípico - Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina . II. Furlaneto-Maia, Luciana . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA TROPICALIS*:**  
**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE COLÔNIAS E**  
**ASSOCIAÇÃO COM VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina  
Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Profa. Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

---

Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de dezembro de 2015.

## **DEDICO**

A Deus, minha fonte de fé e perseverança durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Pela oportunidade, saúde e proteção.

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida, pelo amor e apoio incondicional que tanto me inspiraram e me encorajaram a ser forte mesmo nos dias mais difíceis. Pelas orações e toda motivação que me dedicaram. É com imenso orgulho que dedico a vocês esta conquista.

Ao Admilton Júnior, meu amor, companheiro em todos os momentos. Por me ouvir, aconselhar e colaborar durante os delineamentos de muitos dos experimentos desenvolvidos neste trabalho. Sobretudo pelo amor e apoio emocional a mim dedicados. Por toda paciência nos momentos difíceis.

À querida amiga Kátia Rocha com quem iniciei a caminhada na Pós-graduação. Sua amizade e companhia tornaram meus dias mais leves e me deram forças nos momentos de preocupação ou desânimo.

À querida amiga Lilian Hattori que mesmo distante me dá forças e me encoraja com sua positividade e amizade verdadeira.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela constante orientação desde o mestrado. Agradeço por ter acreditado em meu potencial e confiado no meu trabalho, isso foi fundamental para minha caminhada na Pós-Graduação. Agradeço por todos os seus ensinamentos e pelo seu exemplo de comprometimento com a ciência, os quais me proporcionaram uma formação sólida. Minha eterna gratidão pela oportunidade diária de aprendizado em seu laboratório.

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia pela colaboração na realização deste trabalho. Obrigada por todas suas correções, sugestões e aconselhamentos profissionais que me incentivaram a buscar fazer sempre o meu melhor.

À professora Dra. Célia Tardeli de Jesus Andrade por transmitir seus conhecimentos com tanta generosidade e paciência e por disponibilizar recursos e equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por partilhar seus conhecimentos e por toda disponibilidade de recursos para realização deste trabalho.

Aos professores Dr Admilton Gonçalves de Oliveira Junior e Dr. Galdino Andrade Filho pela disponibilização de recursos e equipamentos do Laboratório de Ecologia Microbiana.

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, por compartilharem seus conhecimentos, especialmente a Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi pela primeira oportunidade de estágio na UEL e por toda ajuda até aqui, minha eterna gratidão.

À Universidade Estadual de Londrina.

A todos os colegas de laboratório com quem convivi durante estes anos, agradeço pelo bom convívio e pela grande oportunidade de aprendizado que tive com cada um. Em especial agradeço à Emanuele França e ao Hugo Perini pela amizade e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico Osvaldo Lopes, por proporcionar boas condições de trabalho e pelo bom convívio no laboratório.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigada a todos!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

MORALEZ, Alane Tatiana Pereira. **Switching** fenotípico em *C. tropicalis*: caracterização ultraestrutural de colônias e associação com virulência. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

*Candida tropicalis* é um patógeno humano associado a altas taxas de mortalidade. O *switching* fenotípico é um importante fator de virulência desta espécie. Este estudo foi realizado para avaliar, primeiramente, o efeito do *switching* fenotípico em *C. tropicalis* quanto a dano celular em células FaDu e virulência em *Galleria mellonella*. Para isso foram utilizados o isolado 49.07 e seus variantes e revertentes derivados de *switching*. O variante crepe e seu revertente promoveram maior dano celular em células FaDu comparativamente ao do isolado parental. Variantes de *switching* apresentaram virulência distinta em *G. mellonella*. Larvas infectadas com o variante crepe tiveram morte mais rápida comparada às larvas infectadas com o isolado parental. Além disso, a carga fúngica foi 6,1 superior em larvas infectadas com o variante crepe comparada a de larvas infectadas com o parental. O variante rugoso foi o menos virulento comparado ao parental. Além disso, foi avaliado o efeito do *switching* na formação de biofilme, e verificadas a filamentação e a virulência em larvas de *G. mellonella* por células planctônicas e sésseis recuperadas de biofilmes formados por morfotipos distintos. O efeito do *switching* na formação de biofilme foi variável entre os sistemas de *switching* testados. Células sésseis foram mais filamentosas do que células planctônicas para o revertente de crepe (49.07). Filamentação entre células sésseis do variante rugoso (49.07) foi maior comparativamente a do seu respectivo parental. Virulência foi superior para larvas infectadas com células sésseis comparativamente à células planctônicas obtidas do revertente de crepe (isolado 49.07) e do isolado parental (isolado 700.11). Diferentemente, células planctônicas do variante enrugado (700.11) foram mais virulentas que células sésseis. Células sésseis do variante crepe, e revertentes de crepe e enrugado apresentaram virulência superior à do seu respectivo isolado parental. Por fim, colônias de padrões morfológicos liso e estruturado foram caracterizadas quanto a ultraestrutura e composição de matriz extracelular (carboidratos e proteínas). O variante rugoso (isolado 49.07) exibiu níveis superiores de ambos componentes do que seu respectivo parental. Colônias de padrão estrutural liso do isolado 100.10 apresentaram quantidades superiores de carboidratos e proteínas, comparadas a colônias de mesmo fenótipo do isolado 49.07. Diferenças significativas foram observadas entre os níveis de carboidratos comparando os variantes crepes de ambos isolados. Concluindo, foi demonstrado que o *switching* fenotípico tem efeito na virulência e em fatores de virulência de *C. tropicalis*. Este estudo relatou pela primeira vez a ocorrência de *switching* durante a infecção em *G. mellonella*. Pela primeira vez foi comparada a virulência de células sésseis e planctônicas a partir de biofilmes formados por isolados de *switching* fenotípico e avaliada a composição de matriz extracelular de colônias *switching*.

**Palavras-chave:** *Candida tropicalis*. Phenotypic Switching. Virulência. Biofilme. *G. mellonella*

MORALEZ, Alane Tatiana Pereira. **Phenotypic Switching in *C. tropicalis*: ultrastructural characterization of colonies and association with virulence.** 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

*Candida tropicalis* is a human pathogen associated with high mortality rates. The phenotypic switching is important virulence factor of this species. This study was firstly carried out to evaluate the effect of phenotypic switching in *C. tropicalis* regarding cell-damage in FaDu cells and virulence in *Galleria mellonella*. To this, we employed *C. tropicalis* isolate 49.07 and strains that arose by phenotypic switching denoted variants and revertants. The crepe variant and its revertant caused increased FaDu cells damage compared to unswitched strain. Switched variants exhibited distinct virulence in *G. mellonella*. Infected larvae with crepe variant had faster death compared to parental-strain infected larvae; besides, fungal burden was about 6.1-fold higher in infected larvae with crepe variant compared to parental strain. The rough variant was less virulent compared to the parental strain. Further, it was evaluated the effect of switching on biofilm formation, and assessed filamentous growth and virulence in *G. mellonella* larvae of planktonic and sessile cells recovered from biofilms formed by distinct morphotypes. The effect of phenotypic switching in biofilm formation was variable among switching system tested. Sessile cells were more filamentous than planktonic cells for the revertant of crepe (49.07). Filamentation among sessile cells of the switch variant rough (49.07) was higher than that observed for its parental counterpart strain. Virulence was higher for infected-*G. mellonella* larvae with sessile cells than that observed for larvae infected with planktonic from revertant of crepe (isolate 49.07) and the parental strain (isolate 700.11). Differently, planktonic cells from wrinkle variant (700.11) were more virulent than sessile cells. Sessile cells of the crepe variant, the revertant of crepe and the revertant of wrinkle showed higher virulence than their respective parental strains. Finally, colonies of morphological patterns smooth and structured were characterized regarding ultrastructure and extracellular matrix composition (carbohydrates and protein). The rough variant (isolate 49.07) exhibited higher levels of both components than that observed for its parental counterpart. Colonies exhibiting smooth structural pattern of isolate 100.10 showed higher amounts of carbohydrates and proteins, compared to colonies of the same phenotype of the isolate 49.07. Significant differences were observed between levels of carbohydrates from colonies of crepe variants from both isolates. In conclusion, it was demonstrated that phenotypic switching affects virulence and virulence factors in *C. tropicalis*. This study reported for the first time the occurrence of switching during infection in *G. mellonella*. For the first time was compared virulence of sessile and planktonic cells from biofilms formed by switching phenotypic strains and assessed the composition of extracellular matrix from switching colonies.

**Key words:** *C. tropicalis*. Phenotypic Switching. Virulence. Biofilm. *G. mellonella*.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1

- Figura 1** – Representative colonies of five phenotypes from isolate 49.07 of *C. tropicalis* .....58
- Figura 2** – Lactato dehydrogenase (LDH) measured in the epithelial cell (FaDu) culture supernatant after 24 h incubation with *C. tropicalis* strains. ....60
- Figura 3** – Kaplan-Meier survival curves for *G. mellonella* larvae infected with different concentrations of *C. tropicalis* isolate 49.07 (parental strain) yeast cells. ....61
- Figura 4** – Kaplan-Meier survival curves for *G. mellonella* larvae infected with with *C. tropicalis* parental strain (smooth), switched variants (crepe and rough) and revertants (R crepe and R rough).....62
- Figura 5** – Fungal burden in *G. mellonella* infected with *C. tropicalis* strains.....63
- Figura 6** – Colonies types recovered from infected *G. mellonella* larvae with parental strain (A), crepe variant (B) and rough variant (C). .....64
- ### Artigo 2
- Figura 1** – Phenotypic switching in *Candida tropicalis*.....79
- Figura 2** – *In vitro* biofilm formation by *C. tropicalis* morphotypes derived from phenotypic switching. ....80
- Figura 3** – Filamentous growth among sessile cells (S) and planktonic cells (P) recovered from biofilms formed by *C. tropicalis* morphotypes of two switching systems (isolate 49.07 and 700.11). ....81
- Figura 4** – Calcofluor white staining of sessile and planktonic cells recovered from biofilms formed by morphotypes related to isolates 49.07 and 700.11. ....82
- Figura 5** – Kaplan-Meier survival curves of *G. mellonella* larvae infected with sessile (S) and planktonic (P) cells of *C. tropicalis*. Morphotypes of the isolates 49.07 or 700.11 of *C. tropicalis* at  $2 \times 10^6$  CFU/larva and monitored over a period of 10 days.....83

<b>Figura 6</b> – <i>Galleria mellonella</i> killing by different cellular types (sessile or planktonic) recovered from biofilms formed by morphotypes of clinical isolates of <i>C. tropicalis</i> .....	84
---	----

### **Artigo 3**

<b>Figura 1</b> – Padrões morfológicos de colônias de <i>C. tropicalis</i> .....	98
--	----

<b>Figura 2</b> – Padrão ultraestrutural de colônias de padrão liso após cultivo de 96 h a 28 °C de em YPD solidificado .....	99
---	----

<b>Figura 3</b> – Padrão ultraestrutural de colônias de padrão estruturado após cultivo de 96 h a 28 °C em YPD solidificado .....	100
---	-----

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

**Tabela 1** – Composição de matriz de colônias de *Candida tropicalis* em termos de quantidades de carboidratos e proteínas totais.....101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHX	Chlorhexidine digluconate
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CV	Crystal Violet
GTA	Glutaraldehyde
HMBF	Homogeneity for Biofilm Formation
HTBF	Heterogeneity for Biofilm Formation
LDH	Lactate Dehydrogenase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS	Phosphate Buffer Saline
RC	Reverting Crepe
RIE	Reverting Irregular Edge
RM	Reverting Micelial
RR	Reverting Rough
RW	Reverting Wrinkle
SEM	Scanning Electron Microscopy
<i>Wor1</i>	<i>White-Opaque</i> Regulator
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1. EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> – EMERGÊNCIA DE ESPÉCIES NÃO- <i>ALBICANS</i> EM CASOS DE CANDIDEMIA .....	16
3.1.1. Candidemia Devido a <i>Candida tropicalis</i> .....	18
3.2. FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	19
3.2.1. Formação de Biofilme e Diferenciação Celular em <i>Candida tropicalis</i> .....	20
3.3. <i>SWITCHING</i> FENOTÍPICO EM <i>CANDIDA</i> SPP. ....	22
3.3.1. Switching Fenotípico Em <i>Candida albicans</i> .....	23
3.3.2. Switching Fenotípico Em <i>Candida não-albicans</i> .....	26
3.3.3. Switching Fenotípico Em <i>Candida tropicalis</i> .....	28
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>ARTIGO 1</b> .....	43
Phenotypic switching in <i>Candida tropicalis</i> is associated with changes in cell- damaging potential in oral epithelial cells and virulence in <i>Galleria mellonella</i>	
<b>ARTIGO 2</b> .....	65
Switched strains of <i>Candida tropicalis</i> produce planktonic and biofilm cells with varied filamentation potential and virulence in <i>Galleria mellonella</i>	
<b>ARTIGO 3</b> .....	85
Avaliação de colônias de morfotipos de <i>Candida tropicalis</i> derivados de <i>switching</i> fenotípico: organização ultraestrutural e composição de matriz extracelular	

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por espécies do gênero *Candida* têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Estudos epidemiológicos apontam uma evolução rápida e significativa na incidência de espécies não *Candida albicans*, sendo *Candida tropicalis* a segunda espécie mais comumente isolada e frequentemente associada a infecções nosocomiais invasivas particularmente em países de regiões tropicais.

Vários fatores de virulência parecem estar associados a infecções causadas por *C. tropicalis*. Dentre as principais características associadas ao seu potencial patogênico tem-se a versatilidade em adaptar-se a diferentes nichos. Tal versatilidade pode ser facilitada por atributos como a capacidade de diferenciação celular (formação de hifas e pseudo-hifas), aderência, formação de biofilme, e invasão de tecidos. Mais recentemente, a plasticidade de *C. tropicalis*, tem sido atribuída a sua capacidade de desenvolver *switching* fenotípico.

O evento de *switching* fenotípico em leveduras é caracterizado como um mecanismo epigenético, que as possibilita serem resilientes a pressões seletivas do ambiente. Em leveduras do gênero *Candida*, *switching* fenotípico tem sido correlacionado com variações na expressão de fatores de virulência, bem como com alterações no padrão de sensibilidade a determinados antifúngicos comumente utilizados na prática clínica.

Em *C. tropicalis*, sistemas de *switching* distintos têm sido descritos, incluindo os relatados pelo nosso grupo. Nestes estudos, a organização ultraestrutural de colônias derivadas de *switching* (variantes de *switching*), bem como a associação de variantes com expressão diferenciada de determinantes de virulência foram alvos de avaliação. No entanto, pouco ainda se conhece dos mecanismos relacionados ao *switching* fenotípico nesta espécie e seu papel na virulência.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de *switching* fenotípico na virulência de *C. tropicalis*, e caracterizar a ultraestrutura de colônias de morfotipos distintos, derivadas de *switching* fenotípico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do *switching* fenotípico na virulência de *C. tropicalis*, empregando ensaio de citotoxicidade celular e virulência em modelo invertebrado (*Galleria mellonella*);
- Avaliar o efeito do *switching* fenotípico na formação de biofilme *in vitro*, e na filamentação e virulência em *G. mellonella* por células planctônicas e sésseis;
- Caracterizar ultraestruturalmente variantes fenotípicas de *C. tropicalis* derivados de *switching* com diferentes padrões morfológicos de colônias quanto a presença e distribuição de matriz extracelular e avaliar a composição desta matriz quanto aos conteúdos de carboidratos e proteínas totais.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA* – EMERGÊNCIA DE ESPÉCIES NÃO-*ALBICANS* EM CASOS DE CANDIDEMIA

A incidência de infecções oportunistas tem aumentado significativamente nos últimos anos. A maioria dos casos de infecções oportunistas é resultante do aumento da expectativa de vida propiciado pelos avanços tecnológicos em termos de diagnóstico e tratamentos terapêuticos. Entre estas, as infecções fúngicas tem ocorrido com maior frequência (NUCCI et al., 2010, YAPAR, 2014).

No âmbito das infecções fúngicas mais prevalentes, as espécies do gênero *Candida* são apontadas como os principais agentes patogênicos. O gênero *Candida* é composto por membros do reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Sacaromycetales* e família *Candidaceae* (CHAI et al., 2010; STEFFAN et al., 1997). Existem mais de 200 espécies de *Candida* descritas, mas somente um pequeno número é reconhecido como patógenos humanos. Destas, quatro espécies são responsáveis por cerca de 95% das infecções causadas por *Candida* spp. (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*) (BUTLER et al., 2009; DIEKEMA et al., 2012; DIMOPOULOS et al., 2008; LEWIS, 2009; LIM et al., 2012; NUCCI 2010; PFALLER et al., 2007; POLVI et al., 2015).

Embora *C. albicans* seja o agente causal mais comumente isolado em casos de infecções por *Candida* spp., nas últimas décadas sua prevalência tem sofrido um declínio, acompanhado da emergência de novas espécies. Esta inversão epidemiológica das candidíases tem surgido como resultado do desenvolvimento de novas metodologias de identificação, possibilitando melhor acurácia na identificação de espécies de *Candida* não-*albicans* (BUTLER et al., 2009; DIMOPOULOS et al., 2008; FALAGAS et al., 2010; YAPAR 2014).

A epidemiologia das espécies do gênero *Candida* compreende vários aspectos como região demográfica, grupo de indivíduos estudado, bem como características específicas de determinadas espécies. As taxas de isolamento das espécies de *Candida* mais prevalentes ainda podem variar de acordo com como sítio de colonização ou infecção, idade, doenças de base, ala de internação entre outros aspectos (PFALLER et al., 2007; YAPAR 2014).

Embora possam viver como comensais da microbiota humana, estas leveduras são responsáveis por um amplo repertório de infecções que variam entre infecções superficiais, de mucosas ou sistêmicas (PFALLER et al., 2007; SARDI et al., 2013).

A incidência de candidíases invasivas tem aumentado progressivamente nas últimas duas décadas. Dentre as candidíases invasivas, a candidemia tem sido reconhecida como a principal causa de morbidade e mortalidade em hospitais terciários do mundo todo (ALMIRANTE et al., 2006; NISHIKAKU et al., 2010; MERSEGUEL et al., 2015).

Os principais fatores de risco para candidemias incluem malignidade; longos períodos de internação; neutropenia; recepção de órgãos sólidos transplantados; entre outros fatores que levam um indivíduo à imunossupressão. Dessa forma, a ocorrência de candidemias é possivelmente observada em pacientes submetidos a antibioticoterapia; quimioterapia; longos períodos de internação; nutrição parenteral; procedimentos médicos invasivos, assim como em indivíduos admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) (HINRICHSEN et al., 2008; PFALLER et al., 2007; WARNOCK, 2007; YAPAR, 2014).

Embora grande parte dos casos de candidemia seja atribuída a *C. albicans*, os casos de candidemia por *Candida* não-*albicans* tem aumentado progressivamente em várias partes do mundo, especialmente nos Estados Unidos, Ásia, e América Latina (MERSEGUEL et al., 2015; NISHIKAKU et al., 2010; PFALLER et al., 2007). A proporção de candidemias devido a *C. albicans* e espécies não-*albicans* pode variar com a distribuição geográfica destas espécies, bem como em relação a hospitais individualmente (COLOMBO et al, 2015; PFALLER et al., 2012, 2014).

Nucci e colaboradores (2013) em estudo recente acerca da epidemiologia de candidemias na América Latina relataram a alta incidência destas infecções, especialmente em crianças, com prevalência das espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* dependendo da região geográfica.

### 3.1.1. Candidemia Devido a *Candida Tropicalis*

*C. tropicalis* é um fungo diplóide, polimórfico, que apresenta diferenciação celular em resposta a mudanças ambientais. Macroscopicamente, colônias de *C. tropicalis* possuem morfologia de padrão “liso”, com aspecto cremoso, superfície brilhante e bordas regulares (CHAI et al., 2010; LACAZ, et al., 2002).

Do ponto de vista filogenético, *C. tropicalis* é a segunda espécie do gênero mais próxima de *C. albicans*, sendo antecedida apenas por *Candida dubliniensis*, e compartilha muitos determinantes de virulência com essas espécies. No entanto, estas espécies ainda apresentam grandes diferenças quanto a características fenotípicas e quanto ao grau de patogenicidade, permitindo que estas sejam estudadas com base em seus genomas (CHAI et al., 2010).

Dados epidemiológicos mundiais apontam que *C. tropicalis* representa de 3-66% dos casos de candidemia no mundo todo, sendo mais comumente isolada em países tropicais (PFALLER et al. 2000; TAN et al. 2015; VISCOLI et al. 1999; YAP et al. 2009).

Um estudo prospectivo multicêntrico realizado no Brasil revelou altos índices de candidemia com 2.49 casos por 1000 admissões. Estes índices são cerca de 3 a 10 vezes superiores aos relatados para o Hemisfério Norte com aproximadamente 50% de taxa de mortalidade. Além disso, a mortalidade bruta em 30 dias por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* juntas foi superior (41,4%) a taxa de mortalidade observada por *C. albicans* (40,9%) (COLOMBO et al., 2006; NUCCI et al., 2010, 2013).

No Brasil, *C. tropicalis* é o 2º agente mais frequente em casos de candidemia, responsável por cerca de 20-24% destas infecções. Além de sua importância epidemiológica mundial e clínica, em países de clima tropical, uma recente revisão de estudos epidemiológicos evidenciou que a incidência de infecções por *C. tropicalis* vem aumentando mundialmente (BERGAMASCO et al., 2013; CHAI et al., 2010; COLOMBO et al., 2006; FURLANETO et al., 2011; GUINEA et al., 2014; NUCCI et al., 2013; QUINDÓS et al., 2014).

Em âmbito regional, em estudo epidemiológico conduzido no Hospital Universitário de Londrina/PR foi observado que 30,5% dos casos de candidemia foram atribuídos a *C. tropicalis*, enquanto 24,1% foram associados a *C. albicans* (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2014).

A maioria das infecções causadas por *C. tropicalis* parece ter origem predominantemente endógena, a partir da microbiota do hospedeiro. Essa espécie frequentemente acomete pacientes portadores de doenças hematológicas, neutropênicos, transplantados, portadores de câncer, além de pacientes imunossuprimidos devido ao uso de antimicrobianos ou que sofreram algum trauma causando danos à mucosas. O desequilíbrio imunológico provocado por tais fatores facilita a translocação desses micro-organismos da microbiota gastrointestinal para outros sítios anatômicos, causando infecção (DIMOPOULOS et al., 2008; KONTOYIANNIS et al., 2001; LASS-FLORL & RICHARDSON; 2008; NEGRI et al., 2011, 2012).

Os altos índices de candidemia causados por *C. tropicalis* são preocupantes devido a ampla distribuição desta espécie em diferentes cenários clínicos e em todas as faixas etárias. Estudos apontam que os altos índices de mortalidade associados à candidemia causada por *C. tropicalis* superam os relatados para outras espécies do gênero, incluindo *C. albicans*. Além disso, isolados clínicos de *C. tropicalis* podem apresentar menor suscetibilidade a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica comparativamente à *C. albicans* (ALP et al., 2015; COLOMBO et al., 2007; EGGIMANN et al., 2003; KONTOYIANNIS et al., 2001; MA et al., 2013; NEGRI et al., 2012).

Múltiplos fatores têm sido relacionados a patogênese de *C. tropicalis*. Acredita-se que um dos fatores que influenciam sua virulência esteja relacionado a plasticidade fenotípica a qual permite adaptação a diversas alterações ambientais bem como confere propriedades particulares nos processos de colonização e infecção (FRANÇA et al., 2011b, MORALES et al., 2014, PORMAN et al., 2011, 2013, SOLL, 1988).

### 3.2. FATORES DE VIRULÊNCIA EM *CANDIDA TROPICALIS*

O sucesso de micro-organismos como agentes patogênicos é comumente resultante da expressão de seus potenciais fatores de virulência. Tais atributos são determinados geneticamente, porém são expressos sob determinadas condições e os permitem sobrepujar o sistema imune facilitando a colonização e o processo de infecção no hospedeiro (HAYNES, 2001; NAGLIK et al., 2003).

Espécies do gênero *Candida* são consideradas patógenos oportunistas uma vez que, podem modular a expressão de determinados fatores de virulência em resposta a alterações associadas a imunossupressão do hospedeiro (HAYNES, 2001; NAGLIK et al., 2003; SOLL, 2002). Para *Candida* spp., a presença de genes que codificam para determinantes de virulência bem como a expressão destes fatores são variáveis (DEORUKHKAR et al., 2015; SARIGUZEL et al., 2015).

Embora a maioria dos estudos relativos ao papel dos fatores de virulência na patogênese de *Candida* spp. utiliza *C. albicans* como modelo de estudo, *C. tropicalis* também tem sido alvo destes estudos, uma vez que tem emergido entre as principais espécies clinicamente relevantes. No entanto, a expressão fenotípica e genotípica de determinantes de virulência por esta espécie ainda são pouco elucidadas (CHAI et al., 2010; O'DONNELL et al., 2015).

Entre os fatores de virulência já descritos como associados a capacidade patogênica de *C. tropicalis* tem-se a capacidade de adesão a diferentes superfícies, a produção de enzimas extracelulares, a produção de fator hemolítico, a invasão de tecidos do hospedeiro, a diferenciação celular, a capacidade em formar biofilme e o *switching* fenotípico (CHAI et al., 2010; FRANÇA et al., 2011a, 2011b; GALÁN-LADERO et al., 2013; MORALEZ et al., 2014; NEGRI et al., 2010, 2011; OKAWA et al., 2008; PORMAN et al., 2011, 2013; SILVA et al., 2009; ZAUGG et al., 2001).

### 3.2.1. Formação de Biofilme e Diferenciação Celular em *Candida tropicalis*

Uma considerável proporção de infecções causadas por *C. tropicalis* está associada à sua habilidade em formar biofilmes em diferentes superfícies incluindo dispositivos médicos, principalmente em casos de infecções nosocomiais (DOUGLAS, 2003; NEGRI et al., 2011; RAMAGE et al., 2006).

Biofilmes formados por leveduras são compostos por células sésseis de dois tipos celulares: células leveduriformes (blastoconidiais) e células filamentosas (hifais) fortemente aderidas a um substrato ou umas às outras, embebidas por uma matriz extracelular polimérica. Estas células são fenotipicamente distintas de células planctônicas ou células suspensas, particularmente, são menos suscetíveis a agentes antimicrobianos, possivelmente devido à presença de matriz

extracelular polimérica (Revisado por DOLAN e COSTERTON, 2002; AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006; TROFA et al., 2008).

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 bem como propiciar tolerância a antibioticoterapia convencional (SILVA et al., 2011a, 2012). Dessa forma, infecções associadas a formação de biofilme em dispositivos médicos podem ser de difícil tratamento, acarretando em uma fonte constante de infecção e gerando grandes impactos econômicos nos serviços de saúde pública (DOUGLAS, 2003; RAMAGE et al., 2005, 2006).

Biofilmes formados por isolados clínicos de *C. tropicalis* podem ser compostos majoritariamente de células blastoconidiais com a presença de poucas hifas ou ainda podem ser compostos majoritariamente de células filamentosas. A estrutura de biofilmes formados por *C. tropicalis* é uma característica isolado-dependente, e apresenta diferentes arranjos: ora apresentam-se como um filme homogêneo de células, ora como agregados de células descontínuas fortemente ancoradas a superfície (BIZERRA et al, 2008; SILVA et al., 2009). Além disso, biofilmes de *C. tropicalis* apresentam baixos níveis de carboidratos e proteínas comparativamente a de outras espécies do gênero (AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006; SILVA et al., 2009).

*C. tropicalis* é reconhecida por seu alto potencial em formar biofilmes tanto em biomateriais implantados em humanos como *in vitro* sobre diferentes superfícies como cateter - polivinil cloreto (PVC) (HAWSER & DOUGLAS, 1994), poliestireno (SHIN et al., 2002; PARAHITIYAWA et al., 2006), silicone e látex (CUELLAR-CRUZ et al., 2012; NEGRI et al., 2010; SILVA et al., 2009; SILVA et al, 2010).

Estudos conduzidos por Shin et al. (2002) avaliaram a formação de biofilmes por diferentes espécies de *Candida*, revelando que a porcentagem de isolados de *C. albicans* produtores de biofilme foi significativamente inferior à de isolados de espécies não-*albicans*. Outros estudos comparativos entre *C. albicans* e *C. tropicalis* quanto à formação de biofilme, em condição estática, revelaram que *C. tropicalis* apresenta maior capacidade produtora. No entanto, a produção de biofilme por *C. tropicalis*, é isolado-dependente, característica não observada em outras

espécies de *Candida não-albicans* (AL-FATTANI E DOUGLAS, 2006; SILVA et al., 2009).

Isolados clínicos de *C. tropicalis* formadores de biofilme são responsáveis por até 50% de mortalidade hospitalar em comparação com espécies não formadoras de biofilme (KUMAMOTO et al., 2002; SILVA et al., 2011a). Estes isolados podem ser recuperados com frequência a partir de dispositivos cardíacos, a exemplos de cateteres vasculares, próteses auriculares, urinárias e nutrição parenteral (KOJIC & DAROUICHE, 2004; SHIN et al., 2002).

Devido ao seu caráter polimórfico, *C. tropicalis* pode ser encontrada em múltiplas formas morfogênicas, incluindo fases blastoconidiais, hifais e pseudohifais (SILVA et al., 2011b). Para patógenos fúngicos, incluindo espécies patogênicas do gênero *Candida* é amplamente aceito que a morfologia celular blastoconidial é essencial para uma disseminação no hospedeiro, enquanto formas filamentosas são necessárias para a invasão de tecidos (JACOBSEN et al., 2012; THOMPSON et al., 2012).

Recentemente, Silva et al. (2011b) demonstraram que apenas formas filamentosas de *C. tropicalis* foram capazes de invadir o epitélio oral, sugerindo que a filamentação pode facilitar a invasão do tecido por esta espécie.

Embora as formas celulares exibidas por *C. tropicalis* sejam semelhantes às apresentadas por *C. albicans*, há poucas evidências sobre a importância da morfologia celular para a virulência *C. tropicalis*.

### 3.3 SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA* SPP.

O *switching* fenotípico é um evento biológico que ocorre em populações de micro-organismos procariotos e eucariotos, incluindo fungos patogênicos. Em fungos este evento é responsável por gerar diversas mudanças, resultando no surgimento de colônias com morfologia alterada, a qual ocorre em apenas uma parcela da população com taxas superiores às de mutação somática (SOLL, 1992). O *Switching* fenotípico ocorre de forma randômica e reversível e representa um estado epigenético passível de taxas significativas de interconvertibilidade (CASADESÚS & LOW, 2013; JAIN et al., 2008; SOLL, 1992). Mecanismos epigenéticos induzem a ocorrência de mudanças estáveis na

expressão gênica durante o processo proliferação celular, sem, contudo, alterar a sequência do DNA (CASADESÚS & LOW, 2013; MULLER & PRADO, 2008)

Fenótipos provenientes de *switching* são estáveis por algumas gerações. Dessa forma, micro-organismos hábeis a alterações fenotípicas promovidas por *switching* são mais facilmente adaptados a mudanças ambientais o que os propiciam vantagens seletivas, inclusive durante a invasão ao organismo hospedeiro (JAIN et al., 2008; SOLL, 2009; STRAUB et al., 2001; ŠŤOVÍČEK et al., 2014; XIE et al., 2013).

A ocorrência de *switching* tem sido demonstrada em diversas espécies fúngicas, incluindo membros do clado CTG como *C. albicans* e *C. tropicalis*, bem como, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti* e *Histoplasma capsulatum* (JAIN et al., 2006; JAIN et al., 2008; KÜGLER et al., 2000; MANCERA et al., 2015). O mais bem estudado sistema de *switching* fenotípico foi primeiramente descrito para *C. albicans*, denominado “*White-opaque*”, cuja variação morfológica implica na transição entre colônias de fenótipo “white” (brancas) e colônias de fenótipo “opaque” (opacas), sendo o principal modelo para estudos de *switching* em fungos (SOLL, 1992).

### 3.3.1. *Switching* Fenotípico Em *Candida albicans*

*C. albicans* é o principal patógeno fúngico do gênero relacionado a infecções em humanos no mundo todo, sendo responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade (FLEVARI et al., 20013 NUCCI et al., 20013). Sua principal característica é a plasticidade fenotípica, que lhe permite variações morfológicas em colônias e células (SI, et al., 2013; SOLL, 1992, 2009, 2014).

O *switching* fenotípico em *C. albicans* foi primeiramente descrito em 1985. No entanto, a descoberta do sistema de *switching* “*white-opaque*” nesta espécie ocorreu em 1987 e a partir de então, passou a ser extensivamente estudado.

Pomes et al. (1985) demonstraram que variação morfológica em colônias de *C. albicans* entre fenótipos liso e rugoso era reversível quando submetidas a baixas doses de radiação UV. Estudos concomitantes resultaram em novas observações acerca de variações fenotípicas em colônias de outra cepa de *C. albicans* (SLUTSKY et al., 1985). Neste estudo, foi observada alta frequência de

variação fenotípica da cepa 3153A, resultando em pelo menos sete morfologias distintas de colônia. A partir de então, a ocorrência de *switching* fenotípico foi relatado em diversas outras cepas de *C. albicans* e foram constatados diferentes sistemas de *switching*, que diferiam entre si quanto ao repertório de variantes fenotípicas observados (SOLL et al., 1987, 1988).

Desde sua descoberta em 1987 até o ano de 2002, os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação do sistema de *switching* “white-opaque” em *C. albicans* permaneceram desconhecidos. A partir de 2002, estudos conduzidos por Miller e Johnson acerca do papel do *switching* “white-opaque” no processo de *mating* em *C. albicans* impulsionaram novas descobertas, que continuam a surgir utilizando este modelo de estudo (ANDERSON & SOLL, 1987; SLUTSKY et al., 1987).

Além das mudanças reversíveis na morfologia de colônia, as variações fenotípicas promovidas pelo sistema *white-opaque* possuem impacto em nível celular. Células de fenótipo *white* possuem formato arredondado característico da maioria dos isolados de *C. albicans*, enquanto células de fenótipo *opaque* são duas vezes mais largas e alongadas, apresentando pequenas pontuações na parede celular e exibem padrões de brotamento particulares (LOHSE & JOHNSON, 2009; SLUTSKY et al., 1987).

O sistema de *switching white-opaque* também está associado a alterações em fatores de virulência (SOLL, 1992). Com relação ao potencial de filamentação, células *white* se diferenciam em formas filamentosas em resposta a uma variedade de condições ambientais, tais como presença de soro, temperaturas elevadas (próximas a 37 °C), pH próximo a neutralidade e limitação nutricional. Diferentemente, células *opaque* não filamentam em nenhuma dessas condições (SI, et al., 2013; SLUTSKY et al., 1987). No entanto a diferenciação em hifas e pseudo-hifas a partir de células *opaque* pode ser induzida por condições distintas, como limitação de fosfato, meio sorbitol e temperaturas não superiores a 25 °C (SI et al., 2013).

Posteriormente ao conhecimento das diferenças marcantes entre células ou colônias do sistema *white* e *opaque*, surgiram suspeitas de que tais variações fenotípicas fossem decorrentes da expressão gênica diferencial entre estas fases (LAN et al., 2002). No início da década de 90 foi identificado o primeiro gene *opaque* específico – o gene *SAP1* (*Secreted Aspartic Proteases 1*). Em

seguida, outros estudos identificaram diversos genes fase-específicos, bem como o efeito da transição *white-opaque* na expressão de um amplo número de genes. Atualmente é reconhecido que o gene *WOR-1* (*white-opaque Regulator 1*) tem um papel fundamental na transição *white-opaque*, sendo que sua deleção suprime o evento de *switching* e sua superexpressão em células da fase *white* leva a uma conversão em massa para a fase *opaque* (SOLL, 2009).

Estudos relativos ao perfil de expressão gênica durante a filamentação em células *white* e *opaque* demonstram, que além dos estímulos físico-químicos, a filamentação nestes tipos celulares também pode ser afetada pela expressão diferencial de genes fase-específica. Segundo a literatura, apenas 11 genes são concomitantemente expressos pelos dois tipos celulares durante a filamentação, enquanto 44 genes são induzidos especificamente nas células hifais do tipo *white* e 37 genes são induzidos especificamente nas células filamentosas de *opaque*. No entanto, muitas das vias regulatórias que controlam a filamentação nesses dois tipos celulares são compartilhadas (SI et al., 2013).

Estudos posteriores demonstraram que o *switching white-opaque* é fundamental ao processo de *mating* sexual em *C. albicans*, sendo que apenas células de fenótipo *opaque* são *mating*-competentes. Sahni et al. (2009) demonstraram que células *opaque mating*-competentes liberam feromônios capazes de sinalizar e estimular células *white mating*-incompetentes que por sua vez são induzidas à formação de biofilme, o que facilitaria o *mating*, uma vez que proporcionaria proteção do frágil gradiente de feromônios que direcionam o quimiotropismo, necessário para a ocorrência de *mating*.

Além de regular o *mating*, outros vários aspectos biológicos são regulados pelo *switching white-opaque* em *C. albicans*. Estudos revelaram que células *white* são mais virulentas em modelo animal de infecções sistêmicas comparativamente às células *opaque* e o inverso é verdadeiro em um modelo animal de infecção cutânea (KAVAAL et al., 1999, LOCKHART et al., 2003), uma vez que células *opaque* apresentam-se mais virulentas em relação às células *white* (KVAAL et al., 1999).

Outro importante fator que distingue células *white-opaque* é que células *opaque* apresentam menor suscetibilidade à fagocitose por células do sistema imune inato comparativamente às células *white*, o que sugere um papel do sistema *White-opaque* no processo de evasão à fagocitose (LOHSE et al., 2008).

### 3.3.2 *Switching* Fenotípico Em *Candida* não-*albicans*

Assim como *C. albicans*, espécies de *Candida* não-*albicans* como *Candida lusitanae*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *Candida krusei* se destacam pela alta frequência como agentes patogênicos em casos infecções humanas em diferentes partes do mundo. (NUCCI et al., 2013; PAPON et al., 2013; SARDI et al, 2013; SILVA et al., 2012).

Embora o sistema *white-opaque* de *C. albicans* seja extensivamente estudado tanto em nível celular quanto molecular, a maioria dos sistemas de *switching* em espécies não-*albicans* ainda são pouco caracterizados. No entanto, muitos estudos têm demonstrado a influência do *switching* fenotípico com alterações fisiológicas e estruturais em *Candida* não-*albicans*.

O primeiro sistema de *switching* fenotípico descrito para *C. glabrata*, foi caracterizado pela emergência espontânea de colônias de coloração variável entre branco e marrom escuro na presença de íons cobre (CuSO<sub>4</sub>) adicionados em meio de cultivo. O repertório de *switching* exibido nesse sistema compreende os fenótipos *White* (Wh), *Light brown* (LB), *Dark Brown* (DB), *Very dark brown* (vDB). Além do gradiente de coloração evidenciado em presença de CuSO<sub>4</sub>, os fenótipos do sistema central de *switching* também podem ser distinguidos em presença do corante floxina B, sendo nesse caso formadas colônias com coloração variável entre rosa escuro e branco. Os diferentes fenótipos desse sistema de *switching* não diferem quanto à morfologia celular e proporção de pseudo-hifas e tubos germinativos que constituem as colônias variantes (LACHKE et al., 2000, 2002).

O sistema central de *switching* de *C. glabrata* está associado a regulação do gene *MT-II*, que codifica uma proteína metalotioneína – responsável pela regulação da concentração celular de elementos traço bem como do gene *HLP*, que codifica uma hemolisina (LACHKE et al., 2000, 2002).

Posteriormente, um segundo sistema de *switching* foi identificado em *C. glabrata*, denominado *irregular wrinkle*. Esse sistema é caracterizado pela emergência espontânea de colônias de fenótipo altamente enrugada, IWr, que surgiram a partir de colônias DB ou LB. Neste sistema, IWr difere de seus parentais com relação a proporção de formas filamentosas componentes da colônia. Colônias IWr são formadas predominantemente por pseudo-hifas até seis dias de desenvolvimento e após esse período inicia-se um acúmulo de células

blastoconidiais e tubos germinativos. Diferentemente, colônias parentais, são majoritariamente formadas por células blastoconidiais no início de seu desenvolvimento, ocorrendo acúmulo de pseudo-hifas e tubos germinativos após três dias de desenvolvimento (LACHKE et al., 2002).

Ainda em relação a *C. glabrata* foi relatada a ocorrência *switching* fenotípico *in vivo*, em sítios de infecção, cujo fenótipo dominante foi o *Dark Brown* (DB). Este fenótipo também foi descrito como o mais virulento dentre os variantes fenotípicos dos sistemas de *switching* central e *irregular wrinkle* (BROCKERT et al., 2003).

A primeira descrição de variações fenotípicas associados ao evento de *switching* fenotípico em *C. parapsilosis* ocorreu em 2005, quando Laffey e Butler (2005) observaram o fenômeno de *switching* fenotípico em 20 isolados da espécie e identificaram quatro fenótipos estáveis, denominados *crepe*, *concentric*, *crater* e *smooth*. Estes pesquisadores identificaram que os variantes fenotípicos apresentavam diferenças na morfologia da colônia, como por exemplo quanto aos tipos celulares que compõem as colônias, sendo as colônias *crepe* e *concentric* compostas quase exclusivamente por pseudo-hifas, enquanto colônias *smooth* e *crater* predominantes compostas por blastoconídios. Ainda, colônias *smooth* são compostas por células de tamanho inferior aos outros fenótipos variantes e seu desenvolvimento é significativamente mais rápido que dos demais. Segundo estes autores, *switching* fenotípico teve efeito na formação de biofilme e a capacidade de invasão em ágar em *C. parapsilosis*.

O *switching* fenotípico também está associado a alterações em propriedades biológicas de *C. lusitaniae* e *C. krusei*. Em *C. lusitaniae*, o *switching* fenotípico cujos variantes resultam em três fenótipos: *light brown*, *brown* e *dark brown*, está associado a resistência a anfotericina B e ao potencial de filamentação (LASTAUSKIENĖ et al., 2015; MILLER et al., 2006; YOON et al., 1999). Em *C. krusei* além conferir diferenças na morfologia celular em relação a seus parentais (cepas originais), o *switching* possui efeito no aumento do potencial de adesão a superfícies abióticas e diminuição da suscetibilidade a clorexidina diglucanato (CHX) (ARZMI et al., 2012).

### 3.3.3 *Switching* Fenotípico Em *Candida tropicalis*

O primeiro relato da ocorrência de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* foi em 1988, quando a alteração na morfologia de colônias foi verificada em isolados recuperados de um paciente durante o curso de uma infecção sistêmica (SOLL et al., 1988). No entanto, novos estudos abordando a ocorrência desse fenômeno em *C. tropicalis* só foram realizados mais de duas décadas depois.

Estudos conduzidos por França et al. (2011b) em nosso grupo relatou pela primeira vez o efeito do *switching* fenotípico em características fisiológicas e ultraestruturais de variantes fenotípicas de *C. tropicalis*. Analisando um único isolado clínico (49/07) que apresentou um repertório de *switching* composto por quatro morfotipos – um parental *smooth* e variantes originados a partir do parental, *semi-smooth*, *ring* e *rough*. Além das diferenças acentuadas com relação à morfologia das colônias, os variantes fenotípicos também apresentaram diferenças quanto à composição dos tipos celulares, sendo a quantidade de formas filamentosas presentes em colônias *ring* e *rough* significativamente superior às presentes em *smooth* e *semi-smooth* (FRANÇA et al., 2011b; MORALES et al., 2014). Ultra estruturalmente apenas colônias de fenótipos *ring* e *rough* apresentaram material extracelular em seus interiores conectando células próximas ou distantes, sugerindo a participação deste material extracelular na formação e manutenção da estrutura das colônias mais complexas.

No mesmo ano, Porman et al. (2011) descreveram pela primeira vez a ocorrência de um sistema de *switching white-opaque* em *C. tropicalis*. Semelhante ao que ocorre em *C. albicans*, além da alteração nas características morfológicas das colônias, este sistema também envolve modificações em nível celular. Em *C. tropicalis*, o sistema *white-opaque* apresenta células *opaque* maiores e mais alongadas que as células *white*. Outra característica marcante compartilhada entre os sistemas de *switching white-opaque* de *C. albicans* e *C. tropicalis* é sua regulação por um fator de transcrição denominado *Wor1*. (JONES et al., 2014; PORMAN et al., 2011, 2013; XIE et al., 2012).

Análises do perfil transcricional de células do sistema *white-opaque* demonstraram a expressão diferencial de genes fase específica tanto em *C. albicans* como em *C. tropicalis*. Em relação aos genes de fase *white*, apenas 62 genes relacionados à transição de células *white* são observados em ambas espécies. Com

relação as células *opaque* apenas 25 genes são compartilhados entre essas duas espécies (PORMAN et al., 2011, 2013).

Em *C. albicans* a conversão *white-opaque* tem papel central na regulação do *mating* sexual e apenas células *opaque* são *mating* competentes. Além disso, nessa espécie o *switching white-opaque* é controlado pelo *locus MTL* (*mating-type-like*) e apenas células homocigotas para este loco são capazes de realizar a conversão do estado *white* para *opaque*. Diferentemente, a conversão *white-opaque* em *C. tropicalis* independe do controle do *locus MTL* e células *white* homocigotas ( $a/a$ ;  $\alpha/\alpha$ ) ou heterocigotas ( $a/\alpha$ ) são capazes de realizar a conversão para o estado *opaque*. Além disso, em *C. tropicalis* ambos tipos celulares *white* e *opaque* são *mating*-competentes. Entretanto, células *white* apresentam menor eficiência em se tornarem *mating*-competentes em relação as células *opaque* (PORMAN et al., 2013).

Para *C. albicans* é reconhecido que uma série de variações ambientais influenciam na conversão *white-opaque*, incluindo o aminoaçúcar N-acetilglicosamina. Em *C. tropicalis* a presença desse açúcar possui impacto no *switching white-opaque* induzindo a formação de células *opaque*, facilitando o *mating* e inibindo a filamentação nessas células. Assim, até o momento tem sido demonstrado que apesar das características compartilhadas entre os sistemas *white-opaque* de *C. albicans* e *C. tropicalis*, diversas características desses sistemas de *switching* diferem substancialmente entre essas duas espécies (XIE et al., 2012).

Recentemente, foi demonstrado a ocorrência de formação de biofilme sexual em *C. tropicalis* mediada por *mating*. Neste estudo foi demonstrado que somente células de fenótipo *opaque* são hábeis a formação de biofilme. Ainda, o biofilme sexual formado por células *opaque* de *C. tropicalis* apresenta arquitetura complexa, composta por diferentes camadas formadas por células de diferentes morfologias com presença de matriz extracelular (JONES et al., 2014).

A observação de sistemas de *switching* em *C. tropicalis* que diferem do sistema *white-opaque* começou com os estudos pioneiros de Soll et al. (1988) e posteriormente de França e colaboradores em 2011.

Mais recentemente, Moralez et al. (2014) em nosso grupo buscou expandir o conhecimento acerca da ocorrência de sistemas de *switching* em *C. tropicalis* que diferem do sistema *white-opaque* já descrito para esta espécie. Inicialmente estes autores observaram a ocorrência de sistemas marcados pela emergência espontânea de colônias a partir de isolados clínicos de *C. tropicalis*.

Estes autores investigaram a possível associação entre variantes morfológicas promovidos por *switching* fenotípico e modificações na expressão fenotípica de características relacionadas a fatores de virulência em *C. tropicalis*. Para isso foram utilizados cinco isolados clínicos com um repertório de *switching* variado para cada isolado, sendo os fenótipos obtidos denominados parental: *smooth*; variantes: *crepe* e *rough* e (isolados 49/07 e 100/10) parental: *smooth*; variantes: *crater* e *irregular center* (isolado 335/07); parental: *fuzzy*, variante: *mycelial* (isolado 46/10), e parental: *smooth*; variante: *diffuse* (isolado 335/07) (MORALEZ et al., 2014).

Ao avaliar o potencial hemolítico dos variantes epigenéticos, todos apresentaram atividade hemolítica e para a maioria dos variantes fenotípicos foram verificadas diferenças quanto ao potencial hemolítico comparativamente aos seus parentais.

Tendo em vista que a capacidade de formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência de *C. tropicalis* (CLARKSON et al., 2010; SILVA et al., 2009) também foi avaliado o potencial de formação de biofilme *in vitro* dos diferentes fenótipos exibidos pelos isolados clínicos *C. tropicalis*. Todos os fenótipos apresentaram potencial em formar biofilme dos quais três variantes produziram biofilme em quantidades significativamente superiores à de seus respectivos parentais, sugerindo a influência das mudanças fenotípicas promovidas pelo *switching* na formação de biofilme nesta espécie.

Em algumas espécies do gênero *Candida*, o *switching* está associado a diminuição da suscetibilidade a determinados antifúngicos (ARZMI et al., 2012, LASTAUSKIENĖ et al., 2015, MILLER et al., 2006, YOON, et al., 1999). Nesse sentido, além de características relacionadas a virulência, Moralez et al. (2014) também avaliaram a suscetibilidade dos variantes epigenéticos de isolados clínicos de *C. tropicalis* a antifúngicos comumente administrados na prática clínica. As avaliações demonstraram uma suscetibilidade diferenciada entre os fenótipos de *C. tropicalis* ao antifúngico itraconazol. Estes dados sugerem que o evento de *switching* afeta a suscetibilidade de variantes fenotípicos de *C. tropicalis* e pode representar uma vantagem adaptativa a esta espécie em casos de infecção.

## CONCLUSÃO

Até o presente momento estudos referentes a ocorrência de *switching* fenotípico em *Candida* spp. demonstram que este evento pode influenciar de forma variável características morfológicas e fisiológicas de importantes espécies patogênicas do gênero. Apesar dos poucos estudos que exploram novos sistemas de *switching* em *C. tropicalis*, nos últimos anos este assunto tem ampliado o interesse de cientistas. É evidente que futuros estudos são desejáveis para trazer novas descobertas sobre o evento de *switching* nesta espécie de tamanha relevância epidemiológica.

## REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI M. A; DOUGLAS, L. J. Biofilm matriz 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.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS. J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; BARCELONA CANDIDEMIA PROJETO STUDY GROUP. 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.
- ALP, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; GULMEZ, D.; ASCIOGLU, S.; UZUN, O.; AKOVA, M. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 498-505, 2015.
- ANDERSON, J. M.;SOLL, D. R. Unique Phenotype of Opaque Cells in the White Opaque Transition of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.5579-5588, 1987.
- ARZMI, M. H.; RAZAK, F. A.; MUSA, M. Y.; HARUN, W. H. A. W. Effect of phenotypic switching on biological properties and susceptibility to chlorhexidine in *Candida krusei* ATCC 14243. **Federation of European Microbiological Societies**, v.12, p.351-358, 2012.
- BERGAMASCO, M. D.; GARNICA, M.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v. 56, p. 256-263, 2013.
- BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; QUESADA, R. M. B.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 442-450, 2008.
- BROCKERT, P. J.; LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; PUJOL, C.; GALASK, R.; SOLL, D. R. Phenotypic Switching and Mating Type Switching of *Candida glabrata* at Sites of Colonization. **Infection and Immunity**, v.71, p.7109-7118, 2003.
- BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. S. S.; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C. A.; RHEINBAY, E.; GRABHERR, M.; FORCHE, A.; REEDY, J. L.; AGRAFIOTI, I.; ARNAUD, M. B.; BATES, S.; BROW, A. J. P.; BRUNKE, S.; CONSTANZO, M. C.; FITZPATRICK, D. A.; de GROOT, P. W. J.; HARRIS, D.; HOYER, L. L.; HUBE, B.; KLIS, F. M.; KODIRA, C.; LENNARD, N.; LOGUE, M. E.; MARTIN, R.; NEIMAN, A. M.; NIKOLAOU, E.; QUAIL, M. A.; QUINN, J., SANTOS, M. C.;SCHMITZBERGER,, F. F.; SHERLOCK, G.; SHAH, P.; SILVERSTEIN, K. A. T.; SKRZYPEK, M.; SOLL, D.; STAGGS, R.; STANSFIEL, I.;STUMPF, M. H.; SUDBERY, P. E.; SRIKANTHA, T.; ZENG, Q.; BERMAN, J.; BERRIMAN, M.;

HEITMAN, J.; GOW, N. A. R.; LORENZ, M. C.; BIRREN, B. W.; KELLIS, M.; CUOMO, C. A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p. 657-662, 2009.

CASADESÚS, J.; LOW, D. A. Programmed Heterogeneity: Epigenetic Mechanisms In Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.13929-13935, 2013.

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

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v. 4, p.197–203, 1996.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA 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.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A, C.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570–576, 2007.

COLOMBO, R. E.; VAZQUEZ, J. Echinocandins for Primary Therapy of Candidemia: Time for a Paradigm Shift?.**Current Fungal Infection Reports**, v. 9, p. 15-22, 2015.

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.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; GONZÁLES-VEGA, A.; NOVEL-MENDONZA, B.; ROMERO-LÓPEZ, E.; BACA-RUIZ, E.; ESCORZA-QUINTANAR, M. A.; CASTRO-VILLAGÓMEZ, J. C. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 2513-2527, 2012.

DEORUKHKAR, S.C.; SAINI, S. Virulence factors attributed to pathogenicity of non *albicans* *Candida* species isolated from Human Immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Annals of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 2, p. A62-66, 2015.

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.

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIOTIS, G. ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Critical Care and Trauma**, v. 106, p. 523-529, 2008.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in microbiology**, v. 11, p. 30-36, 2003.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p.685–702, 2003.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various *non-albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e954-e966, 2010.

FLEVARI, A.; THEODORAKOPOULOU, M.; VELEGRAKI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1199, 2013.

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, 2011a.

FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypes switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011b.

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.

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

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity*, v. 62, p.915–921, 1994.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÉGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

JACOBSEN, I. D.; WILSON, D.; WACHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, v. 10, p. 85-63, 2012.

JAIN, N.; LI, L.; MAFADDEN, D. C.; BANARJEE, U.; WANG, X.; COOK, E.; FRIES, B. C. Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is

associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system. **Infection and Immunity**, v.74, p.896-903, 2006.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B.C. Phenotypic switching in fungi, **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.

JONES, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. **Molecular Microbiology**, v.92, p.383-398, 2014.

KVAAL, C.; LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; DANIELS, K.; MCCOY, J.; SOLL, D. R. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. **Infection and immunity**, v. 67, p. 6652-6662, 1999.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 255–267, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical infectious diseases**, v. 33, p. 1676-1681, 2001.

KÜGLER, S.; SEBGHATI, T.S.; EISSENBERG; L.G.; GOLDMAN, W. E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v.97, p.8794-8798, 2000.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* Biofilms. **Current Opinion. Microbiology**, v. 5, p. 608–611, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, C. E.; HEINZ-VACARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica de Lacaz**. 9ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; TSAI, L. K.; DANIELS, K.; SOLL, D. R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and newly discovery hemolysin gene HLP. **Infection and Immunity**, v.68, p.884-895, 2000.

LACHKE, S. A.; JOLY, S.; DANIELS, K.; SOLL, D. R.; Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v.148, p. 2661-2674, 2002.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v.151, p.1073-1081, 2005.

LAN, C. Y.; NEWPORT, G.; MURILLO, L.A.; JONES, T.J.; SCHERER, S.; DAVIS, R. W.; AGABIAN, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 14907– 14912, 2002.

LASTAUSKIENĖ, E.; ČEPUTYTĖ, J.; GIRKONTAITĖ, I.; ZINKEVIČIENĖ, A. Phenotypic Switching of *Candida guilliermondii* is Associated with Pseudohyphae Formation and Antifungal Resistance. **Mycopathologia**, v. 179, p. 205-211, 2015.

LEWIS, R. E. Trends in invasive *Candida* infections and their treatment: focus on echinocandins. **Current Medical Research and Opinion**, v. 25, p. 1729-62, 2009.

LOCKHART, S. R.; ZHAO, R.; DANIELS, K. J.; SOLL, D. R. Alpha-pheromone induced “shmooing” and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. **Eukaryot Cell**; v. 2: p. 847\_55, 2003.

LOHSE, M. B.; JOHNSON, A. D. Differential Phagocytosis of White versus Opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and Mouse Phagocytes. **PLoS One**, v.3, p.e1473, 2008.

MA, C. F.; LI, F. Q.; SHI, L. N.; HU, Y. A.; WANG, Y.; HUANG, M.; KONG, Q. Q. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 337-346, 2013.

MANCERA, E.; PORMAN, A. M.; CUOMO, C. A.; BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Finding a Missing Gene: EFG1 Regulates Morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, p. 849-856, 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍ NEZ, L.; CUENCA ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, v.51, p.461-472, 2013.

MERSEGUEL, K. B.; NISHIKAKU, A. S.; RODRIGUES, A. M.; PADOVAN, A. C.; CARMONA E FERREIRA, R.; MELO, A. S. A.; BRIONES, M. R. S.; COLOMBO, A. L. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 15-57, 2015.

MILLER, M. G., JOHNSON, A. D. White-opaque *switching* in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, v. 110, p. 293–302, 2002.

MILLER, N. S.; DICK, J. D.; MERZ, W. G. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, p. 1536-1539, 2006.

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 1-9, 2014.

MULLER, H. R., PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo da Genética. **Rubs**, v.1, p.61-69, 2008.

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.; 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.; BOTELHO, N.; SILVA, S.; LOPES, L. M. R. H.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology**. v, 60, p. 12 70-1275, 2011.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; BREDÁ, D.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida tropicalis* biofilms: Effect on urinary epithelial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 53, p. 95-99, 2012.
- NISHIKAKU, A. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Geographic trends in invasive candidiasis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, p. 210-218, 2010.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. 561-570, 2010.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. L.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, p.e59373, 2013.
- O'DONNELL, L. E.; ROBERTSON, DOUGLAS, R.; RAMAGE, G. *Candida* Virulence Factors. In: **Oral Candidosis**. Springer Berlin Heidelberg, p. 7-19, 2015.
- OKAWA, Y.; MIYAUCHI, M.; KOBAYASHI, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1507-1510, 2008.
- PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLoS Pathogens**, v.9, p.e1003550, 2013.
- PARAHITIYAWA, N. B.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P.; YE, J.; TSANG, P. W. K.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, S. K. W. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **APMIS**, v. 114, p. 298–306, 2006.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R. J. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 747-751, 2000.
- 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. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, p. S3-S13, 2012.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. 2014. **PLoS One**, v. 9, p. e10510, 2014.

POLVI, E. J.; LI, X.; O'MEARA, T. R.; LEACH, M. D.; COWEN, L. E. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 2261-2287, 2015.

POMES, R.; GIL, C.; NOMBELA, C. Genetic Analysis of *Candida albicans* Morphological Mutants. **Journal of General Microbiology**, v.131, p.2107-2113, 1985.

PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.21158-21163, 2011.

PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M. P.; JONES, S. K.; WANGN, N.; BENNETT RJ. MTL-Independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **PLoS Genetics**, v.9, p. e1003369, 2013.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 42-48, 2014.

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.; MARTINEZ, J. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p.979–986, 2006.

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

SAHNI, N.; YI, S.; DANIELS, K. J.; SRIKANTHA, T.; PUJOL, C.; SOLL, D. R. Genes selectively up-regulated by pheromone in white cells are involved in biofilm formation in *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000601, 2009.

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.

- SARIGUZEL, F. M.; BERK, E.; KOC, A. N.; SAV, H.; DEMIR, G. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, p. 857-864, 2015.
- SCORZONI, L.; de LUCAS, M. P.; MESA-ARANGO, A. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; LOZANO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; ZARAGOZA, O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS one**, v. 8, 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.
- SI, H.; HERNDAY, A. D.; HIRAKAWA, M. P.; JOHNSON, A. D.; BENNETT, R. J. *Candida albicans* White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth. **PLoS Pathogens**, v.9, p.e1003210, 2013.
- SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p.681–689, 2009.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 747-754, 2010.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 241-247, 2011a.
- SILVA, S.; HOOPER, S. J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. M. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 264-272, 2011b.
- 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.
- SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D. R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, v. 230, p.666-669, 1985.
- SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D. R. White-Opaque Transition: a Second High-Frequency Switching System in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.189-197, 1987.

SOLL, D. R.; LANGTIMM, C. J.; McDOWELL, J.; HICKS, J.; GALASK, R. High-Frequency Switching in *Candida* Strains Isolated from Vaginitis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1611-1622, 1987.

SOLL, D. R.; STAEBELL, M.; LANGTIMM, C.; PFALLER, M.; HICKS, J.; RAO, T. V. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic. **Journal of clinical Microbiology**, v. 26, p. 1448-1459, 1988.

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

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, p. 101-110, 2002.

SOLL.D.R. Why does *Candida albicans* Switch? **FEMS Yeast Research**, v.9, p.973-989, 2009.

SOLL, D. R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. **Journal of oral microbiology**, v. 6, p. 22993, 2014.

STEFFAN, P.; VAZQUEZ, J. A.;BOIKOV, D.; XU, C.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2031–2039, 1997.

ŠT'OVÍČEK, V.; VÁCHOVÁ, L.; KUTHAN, M.; PALKOVÁ, Z. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeasts colonies. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 1012-122, 2010.

STRAUB, A.; MICHEL, S.; MORSCHHÄUSER, J. Analysis of Phase-Specific Gene Expression at the Single-Cell Level in the White-Opaque Switching System Of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.3761-3769, 2001.

TAN, J.; ZHANG, J.; CHEN, W.; SUN, Y.; WAN, Z.; LI, R.; LIU, W. The A395T Mutation in ERG11 Gene Confers Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* Causing Candidemia. **Mycopathologia**, v. 179, p. 213-218, 2015.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 9, p. 1173-1182, 2011.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A.; COLLETTE, L.; MARTINO, P.; VANDERCAM, B.; DOYEN, C.; LEBEAU, B.; SPENCE, D.; KRCMERY, V. DE PAUW, B.; MEUNIER, F. Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**, v.28, p.1071-1079, 1999.

WARNOCK, D. W. Trends in epidemiology of invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, p. 1-13, 2007.

XIE, J.; DU, H.; GUAN, G.; TONG, Y.; KOURKOUMPETIS, T. K.; ZHANG, L.; BAI, F.Y.; HUANG, G. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic Cell**, v.11, p.773-782, 2012.

XIE, TAO, L.; NOBILE, C. J.; TONG, Y.; GUAN, G.; SUN, Y.; CAO, C.; HERNDAY, A. D.; JOHNSON, A. D.; ZHANG, L.; BAI, F. Y. HUANG, G. White-opaque switching in natural MTL $\alpha$ /alpha isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. **Plos Biology**, v. 11, p. e1001525, 2013.

YAP, H. Y.; KWOK, K. M.; GOMERSALL, C. D.; FUNG, S. C.; LAM, T. C.; LEUNG, P. N.; HUI, M.; JOYNT, G. M. Epidemiology and outcome of *Candida* bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong. **Hong Kong Medical Journal**, v. 15, p. 255-261, 2009.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95- 105, 2014.

YOON, S.A.; VASQUEZ, J. A.; STEFFAN, P. E.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. High frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.836-845, 1999.

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.

## **ARTIGOS**

## ARTIGO 1

### **Phenotypic switching in *Candida tropicalis* is associated with changes in cell-damaging potential in oral epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella***

#### **ABSTRACT**

Although *Candida tropicalis* is a human pathogen associated with high mortality rates, little is known regarding its virulence. We analyzed the effect of phenotypic switching in *C. tropicalis* regarding cell-damage in FaDu cells and virulence in *Galleria mellonella*. For this, we employed *C. tropicalis* isolate 49.07 and strains that arose by phenotypic switching denoted crepe and rough variants. Revertants strains derived from variants were also employed in order to evaluate if they return the virulence capacity of the original strain. The crepe variant and its derived revertant caused increased FaDu cells damage compared to unswitched parental strain ( $P<0.05$ ); differently, for rough variant and its revertant no differences were observed. Switched variants exhibited distinct virulence in *G. mellonella*. Infected larvae with crepe variant had faster death compared to parental-strain infected larvae ( $P<0.05$ ); besides, fungal burden was about 6.1-fold higher in infected larvae with crepe variant compared to parental strain. The rough variant was less virulent compared to the parental strain. No differences in the median survival were detected when we compared revertants and the parental strain. In addition, we showed for the first time that the event of phenotypic switching may occur during *G. mellonella* larvae infection. These findings indicate that phenotypic switching affect virulence in *C. tropicalis*. Further, the employment of the revertants strains revealed that although the colonial morphology of revertants resembles the original phenotype of the parental strain, the virulence of revertants may not be at same extent of that of the parental strain.

**Key words:** *Candida tropicalis*, phenotypic switching, *Galleria mellonella*, virulence factors, cytotoxicity, virulence.

## 1. INTRODUCTION

*Candida* species are the most common causes of human fungal infection worldwide (PFALLER et al., 2015). The pathogenic status of *Candida* spp is associated with modulation of virulence determinants in response to environmental changes, and impairment of host defenses (Reviewed by SOLL et al., 2002). *Candida tropicalis* together with the majority of the medically relevant *Candida* species belongs to the CTG clade and is genetically close to *Candida albicans*. The species of *Candida* clade are known to translate the original CUG codons as serine instead of leucine (BUTLER et al., 2009). The frequency of infections caused by *C. tropicalis* has increased over the last years, particularly in tropical regions (COSTA et al., 2014; NUCCI et al., 2013; ZHANG et al., 2012); in some settings, bloodstream infections due to *C. tropicalis* have been associated with higher mortality than other *Candida* species (COLOMBO et al., 2007; KONTOYIANNIS et al., 2001).

Phenotypic switching is a biological event associated with generation of phenotypic heterogeneity. It occurs in a small fraction of the population, is random, reversible and represents an epigenetic state that is not necessarily induced by external signals. In yeast, phenotypic switching drives variable changes, leading to the emergence of colonies with altered morphologies. Among *Candida* putative virulence factors, phenotypic switching is associated with fungal adaptability to environmental changes during invasion of host organism (SOLL, 1992).

Soll et al. (1988) were the first to assess switch phenotypes in *C. tropicalis* during the course of a prolonged *Candida* infection in a compromised host. According to these authors, *C. tropicalis* is capable of undergoing high-frequency phenotypic switching. More recently, a white-opaque phenotypic switch was described for *C. tropicalis* that shows some similarities to that in *C. albicans* (PORMAN et al., 2011, 2013; JONES et al., 2014; XIE et al., 2012). Although these studies have begun to explore the mechanism of phenotypic switching in *C. tropicalis*, the role of switching in this species remains an open question. Porman et al. (2011) demonstrated that a white-opaque phenotypic switching in *C. tropicalis* regulates a cryptic program of sexual mating, potentially giving rise to strains with increased virulence. The white-opaque transition also is associated with sexual biofilm formation in *C. tropicalis*, where biofilms are formed exclusively by opaque cells (JONES et al., 2014).

Our group has previously described a high-frequency switching of colony morphology in several clinical isolates of *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014). The isolates could switch spontaneously, heritably and reversibly between at least six different phenotypes, not including the white-opaque transition (FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014). One of the identified switching system that include three colony phenotypes: smooth (parental phenotype) and two related switch variants (crepe and rough) was associated with *in vitro* changes in virulence traits, including biofilm formation, morphogenesis and hemolysis, as well as switching from itraconazole susceptibility to resistance (MORALEZ et al., 2014).

In the present study, we address for the first time in the literature, if phenotypic switching in *C. tropicalis* affects virulence. To this end, we employed all three colony phenotypes (smooth, crepe and rough) described previously (MORALEZ et al., 2014) and their revertants (strains that switched back from variant to parental phenotype) for the evaluation of the capacity of damaging epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella*. The invertebrate model *G. mellonella* has gained widespread acceptance for the analyses of fungal pathogenesis and produce results comparable to those that can be obtained using mammals (FUCHS et al., 2010; MYLONAKIS et al., 2005). Our data revealed that *G. mellonella* provides a useful *in vivo* model system to evaluate the role of phenotypic switching in *C. tropicalis* virulence.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. *Candida tropicalis* strains**

*C. tropicalis* 49/07 from clinical source (parental strain), displaying smooth colony morphology (smooth dome), and two related strains that arose *in vitro* by phenotypic switching (crepe variant and rough variant) were used in the present study. The switch variants have ability to create complex structured colonies (irregular and structured dome surface) as described previously (MORALEZ et al., 2014). The strains were obtained as a stock culture from the Fungal Genetics Laboratory, The University of Londrina-Brazil.

## **2.2. Determination of reversibility of crepe and rough variants phenotypes (switch back to parental wild-type phenotype)**

The reversion rates of the switched variants to the smooth phenotype (parental phenotype) were determined by visually scoring of four days old growth colonies on YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) medium at 28 °C. To calculate the reversibility frequencies, a total of 6,000 colonies from each variant were scored. Colonies that arose from variants and exhibited morphology similar to the parental phenotype (smooth pattern) were considered revertant colonies. Successive culture of revertant colonies on YPD medium for up to 10 times was used to assess the stability of the phenotype.

## **2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

To verify the colony ultrastructure of parental, switched variants and revertant strains, whole yeast colonies were removed from YPD agar plates after an incubation period of 4 days using a scalpel blade. Colonies were fixed for approximately 18 h at 4 °C in 3.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. They were then immersed in liquid nitrogen for 30 sec and freeze-dried for 2 h at 0.12 mba MPa (Alpha 1-2 LD plus). Then, colonies were coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and viewed in a FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope at 30kV.

## **2.4. Epithelial cell monolayer damage assay**

The degree of cell damage caused by *C. tropicalis* parental, switch and revertant strains during interaction with monolayers of FaDU (human epithelial cell line from a squamous cell carcinoma of the hypopharynx) cells was evaluated quantitatively through the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity. The cell line FaDu was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

FaDU cells were grown on RPMI 1640 medium (Difco) with serum 10% until 95% confluency in 24 well culture plates. Subsequently this cell was infected with  $1 \times 10^6$  cells in RPMI 1640 (Difco) in the absence of serum. For control

samples, FaDU were incubated with RPMI 1640 (Difco) medium only. Additionally cells of the *C. tropicalis* strains were incubated without epithelial cells. After 24 h extracellular LDH release into medium was measured spectrophotometrically at 490 nm using a LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical Company, www.caymanchem.com). The LDH activity of *Candida* cells in cell culture medium devoid of tissue was subtracted from the LDH activity of the tissue infected with yeasts. The assays were performed according to the manufacturer instructions and the measurements were performed in triplicates for each condition and repeated twice. For statistical analysis, *P*-value <0.05 was considered significant.

## **2.5. *Galleria mellonella* survival assay**

Wax moth larvae killing assays were carried out as described previously by Mylonakis et al. (2005). Briefly, groups of 10 larvae (0.3–0.6 grams) were each infected with suspension 10  $\mu$ l of a  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  yeast cells of parental strain per larvae in PBS buffer. Therefore, the resulting the final inoculum concentration for each group was  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  yeast cells per larvae. The yeast cells were directly instilled into the haemocoel of the larva by injection with a 10  $\mu$ l Hamilton syringe in the last right proleg. The larvae were incubated at 37 °C after inoculation, and survival was monitored every day by 240 h with intervals of 12 h.

For the analyzes of the effect of switching on virulence, the switching system strains (parental, switch variants and revertants) were used to infect *G. mellonella* larvae at concentration of  $2 \times 10^6$  yeast cells per larvae. The assay was carried as described above.

The larvae were considered to have died when they did not respond to physical stimulation (slight pressure with forceps). As controls, a group of larvae injected with PBS were studied in parallel in every infection investigation. Each experiment was repeated at least three times, and representative experiments are presented.

## 2.6. Fungal burden determination

Fungal burden was determined by colony-forming-unit (CFU) counts at 12 and 24 h post-infection. Groups of 10 larvae were infected with  $2 \times 10^6$  cells per larvae of each switching system strain and incubated at 37 °C for up to 24 h. Three larvae infected with each strain were selected in different times of infection and macerated. A volume of 1 ml of PBS ampicillin [200mg/ml] was added and the mix was gently homogenized in a vortex with glass beads for 3 minutes. Different dilutions were made for each sample and 50 ml of these dilutions were placed on YPD- chloramphenicol agar plates [0.05g/L]. The plates were incubated at 37 °C for 96 h and the number of colony forming units (CFUs) was determined.

## 2.7. Statistical analysis

Differences in cell damage potential, and fungal burden and the reversibility of the strains (parental, switched and revertant strains) during infection in *G. mellonella* were estimated using Student's *t*-test. *P* value < 0.05 was considered significant. Killing curves were plotted and estimation of differences in survival (log rank and Wilcoxon tests) analyzed by the Kaplan-Meier method using Graph Pad Prism 3 software (La Jolla CA, USA). *P* value < 0.05 was considered significant.

## 3. RESULTS

### 3.1. Reversibility of switched variants phenotypes occurred at high frequencies

In previous studies carried out using the switching system that included three colony phenotypes (smooth, crepe and rough) we evaluated the *in vitro* expression of virulence factors (MORALEZ et al., 2014); however, colonies that switched back to the parental phenotype (smooth-like colonies) named revertants were not consider in the analyses. In the present study, we firstly obtained spontaneously revertant strains from crepe and rough variants. In order to evaluate the reversion rates, a total of 6,000 colonies of each variant were visually scored following growth on YPD medium. The crepe variant exhibited higher reversibility rate

( $5.2 \times 10^{-1}$ ) than that observed for rough variant ( $2.2 \times 10^{-2}$ ). Revertant colonies from crepe variant were named revertant of crepe (RC) and from rough variant were named revertant of rough (RR). Both revertants colonies exhibit high morphological similarity to the smooth phenotype (Fig. 1a, b, c), although RC colonies display slight variation in morphology, including less bright surface and slightly irregular edges (Fig. 1b).

### **3.2. Architecture of colonies is distinct among switched phenotypes**

Unlike the parental phenotype that exhibit smooth dome colony both switched variant strains exhibit more structured colonies morphologies (Fig. 1f, i) as described previously (MORALEZ et al., 2014). The ultrastructure of these colony phenotypes is presented in Fig. 1g, j. Under SEM, the crepe variant was characterized by the presence of a deep central depression with a highly wrinkled surface and an irregular periphery (Fig. 1g). The rough phenotype exhibit more complex architecture and is characterized by the presence of bundles of hyphae converging together and peripheral depressions areas (Fig. 1j). On the other hand, the parental phenotype and revertants strains (RC and RR) display a typical smooth colony phenotype with a flatly convex profile (hemispherical shape) as illustrated in Fig. 1d.

The ultrastructural analysis also allowed the observation of the arrangement of individual cells within the colonies. After 4 days of colony development, colonies presenting smooth-pattern phenotype consist entirely of budding yeast cells, as illustrated in Fig. 1e. In contrast, cell morphologies in colonies of the switched variants consist of budding yeast cells and filamentous forms (hyphae and pseudohyphae) (Fig. 1h, k).

### **3.3. Capability to cause epithelial cell damage varies among the switched phenotypes**

We evaluate cell-damaging potential of the switch variants (crepe and rough) and their revertants (RC and RR) in comparison to parental strain (isolate 49.07). The cytotoxicity of these strains was tested in monolayer cultures of oral epithelium cells (FaDu) by measuring LDH released in the culture supernatants

during co-culture system. As shown in Fig. 2, all strains of the switching system (parental, switched strains and revertants) showed detectable cellular damage. The crepe variant promoted greater cellular damage than their parental counterpart ( $P < 0.05$ ). Similarly, the revertant of crepe (RC) exhibited higher cytotoxicity than their parental counterpart ( $P < 0.05$ ), despite of its smooth-like colony morphology. On the other hand, the rough variant and its revertant strain (RR) showed the same extent of cytotoxicity to FaDu cells than parental strain.

### 3.4. Crepe variant is more virulent than its parental counterpart

We also aimed to evaluate the virulence in *G. mellonella* of the switched variants (crepe and rough) and their revertants (RC and RR) in comparison to parental strain (isolate 49.07). We first assessed the pathogenicity of the parental strain in larvae of *G. mellonella*. As shown in Fig. 3, when larvae were infected with yeast inoculum suspensions of different concentrations ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  cells per larvae), we observed a dose-dependent effect on the killing of the insect. Larvae injected with PBS (control) did not die during the time of the experiment (10 days), presenting 100% survival. With the lower inoculum concentration ( $1 \times 10^6$  cells per larvae), the median survival time was 66 h post-infection. When the inoculum concentration was increased to  $2 \times 10^6$  and  $6 \times 10^6$  cells per larvae, 50% survival time decreased to 24 h after infection. With the higher inoculum levels of  $1 \times 10^7$  cells per larvae, the median survival time was 12 h post-infection, demonstrating that this concentration was significantly more lethal than the lower concentrations tested. At this inoculum concentration 100% of infected larvae were dead at 24 h post-infection.

In order to evaluate a possible effect of switching on virulence, a  $2 \times 10^6$  yeast cells per larvae inoculum was assessed to compare differences among the switching system strains (parental, switched strains and revertants). As shown in Fig. 4, the median survival for larvae infected with the crepe variant was significantly lower than that of larvae infected with 49.07 isolate (parental strain) ( $P < 0.05$ ). Besides, this phenotype was also more virulent than the rough variant ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the rough variant was less virulent compared to the parental strain ( $P < 0.05$ ), exhibiting a median survival time of 48 h. Thus, the order of virulence observed from highest to lowest was crepe>smooth>rough cells. No differences in the median survival were detected when we compared revertants phenotypes (RC

and RR) and the parental strain ( $P>0.05$ ) with median survival time of 36 h. Interesting to note that RC and RR restored the virulence capacity exhibited by the parental isolate. In all infected larvae with different strains, a typical dark color due to accumulation of melanin was observed after infection. In contrast, there was no melanization in larvae injected with PBS (control) (data not shown).

### **3.5. Fungal burden is distinct among switch variants in *G. mellonella***

Fungal burden was assessed in addition to virulence. It was determined by recovering yeast cells from infected larvae strains at 12 and 24 h post-infection. Fungal burden increased in infected larvae during time of infection only for crepe variant, where at 24 h post-infection the fungal burden was about 10-fold higher than that observed after 12 h of infection ( $3.14 \times 10^7$  and  $7.56 \times 10^6$ , respectively) ( $P=0.00046$ ). For the remaining strains, no statistical differences were observed in fungal burden between both periods of infection (data not shown).

At 12 h post-infection, the number of CFUs recovered from infected larvae varied among strains. As shown in Fig. 5, larvae infected with crepe variant and its revertant (RC strain) exhibited higher fungal burden than that observed for parental strain ( $P < 0.05$ ). Infected larvae with crepe and RC strains had increased CFUs by approximately 6.1 and 3.5-fold, respectively. On the other hand, larvae infected with rough variant and its revertant (RR strain) showed no statistical difference in fungal burden in relation to parental strain.

### **3.6. Switch and revertants strains were recovered from infected *G. mellonella* larvae**

During CFU counting, we noticed that the majority of the colonies derived from cells recovered from infected larvae with parental strain (isolate 49.07) and switch variants retained their phenotype; however, distinct colonies morphologies were also observed (Fig. 6). For instance, among colonies obtained from larvae infected with parental strain about 13.28% exhibited either crepe or rough phenotype (switch variants) as illustrated in Fig. 6A. On the other hand, smooth-like colonies (revertants) occurred at frequencies of 30.91% and 36.77% derived from cells recovered from larvae infected with crepe variant and rough variant, respectively (Fig. 6B,C).

#### 4. DISCUSSION

The increased frequency of infections caused by *C. tropicalis* raised the importance of studies concerning virulence traits in this species. Phenotypic transitions enable fungal pathogens to better adapt to their ever-changing environments. Phenotypic switching is a putative *Candida* virulence factor most extensively examined in *C. albicans*, where pleiotropic effects on virulence have been described (KVAAL et al., 1997, 1999; TAO et al., 2014).

Considering that clinical isolates of *C. tropicalis* undertake phenotypic switching at high-frequencies (MORALEZ et al., 2014; SOLL, 1988) we aimed to evaluate if this event may raise *C. tropicalis* switch variants with altered virulence. For this, we employed the strains of the system described previously (MORALEZ et al., 2014), comprising the original strain (smooth phenotype) and two switch variants (crepe and rough phenotypes). Revertants strains that arose from variants (RC and RR) were also tested in order to evaluate if they return the virulence capacity of the original strain. According to the literature, although switch variants colonies are stable by sequential cycles of growth, the reversibility is a trait of phenotypic switching event where variants can revert to the parental phenotype (SLUTSKY et al., 1987; SOLL et al., 1992). In the present study we showed that *C. tropicalis* crepe and rough switch variants switched back to a parental phenotype (smooth-like colonies) at high frequencies.

Despite the pioneer studies on colony variant phenotypes in *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011; FURLANETO et al., 2012), little information is available concerning the microstructure of colonies that arose from phenotypic switching. SEM analyses revealed that colonies of switch variants exhibited a complex architecture (Fig. 1g,j) and that filamentation was associated with crepe and rough colonies (Fig. 1h,k). Change in cellular morphology in switching between colony phenotypes was previously reported for *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011), and other *Candida* species, including *C. albicans* (SOLL et al., 1993), *C. glabrata* (LACHKE et al., 2002) and *C. lusitanae* (MILLER et al., 2006). In this study, the ultrastructural analysis of revertants colonies was reported for the first time. As expected, colonies of the parental phenotype and revertants strains (RC and RR) exhibited a smooth-dome phenotype consisted entirely of budding yeast cells.

Next, we compared virulence of switch variants and their respective revertants with virulence of the parental strain using oral epithelium cells (FaDu). To date, there are few studies regarding the pathogenic potential of non-*albicans* *Candida* species using human cell lines as alternative model of *ex vivo* analyses. According to the literature, *C. tropicalis* has ability to adhere and proliferate in epithelial tissue and may invade and damage oral epithelial cells (NEGRI et al., 2010, 2011). We first investigated the potential of cytotoxicity in FaDu cells by the isolate 49.07 of *C. tropicalis* (Fig. 2). We observed the occurrence of progressive cellular damage related to different times of co-culture (data not shown). This model revealed to be a useful tool for the analysis of virulence of phenotypic switching-derived strains. Compared with isolate 49.07 (unswitched parental), the crepe variant presented significantly higher cytotoxicity in our crepe variant-epithelial cell co-culture system. One of interesting finding was that the revertant of crepe also exhibited higher cytotoxicity than that observed for the unswitched parental, despite its smooth-like colony phenotype. This result suggests that although there are similarities between the colonies morphologies of parental and revertant of crepe, probably there are fundamental differences between the transcriptional programs in the two strains. The epigenetic state (switched state) of these strains may be associated with distinct physiological status and virulence traits that are independent of their colony phenotype. Differently, the other switch variant of our switching system, the rough variant, did not exhibit altered potential do cause cell damage compared to that observed for the parental strain.

Compared to *C. albicans*, relatively few investigations have been performed to assess the virulence of *C. tropicalis*. It has already been showed that *C. tropicalis* can kill the lepidopteran *G. mellonella* larvae, which offers a useful tool to study its virulence (MESA-ARANGO et al., 2013). In the present study, we observed that *G. mellonella* larvae were sensitive to *C. tropicalis* (unswitched isolate) infection in an inoculum-size dependent manner (Fig. 3). With inoculum concentration of  $2 \times 10^6$  cells per larvae a specific virulence-strain was observed where the crepe variant infection exhibited faster rate of killing and higher fungal burden compared to the remaining strains of the system. Taken together, our data revealed that the crepe switch variant exhibit higher cytotoxicity and virulence as well as greater fungal burden in comparison to its parental counterpart (unswitched parental). These data may reflect differential expression of virulence traits by this switched strain. In

previous study, we reported that the crepe variant colonies had increased percentage of filamentous growth forms; besides, the crepe variant formed higher amount of biofilm and increased MIC to the antifungal itraconazole compared to that observed for its unswitched parental (original smooth). These altered traits could potentially affect virulence. Of note, in the present study, the employment of revertants strains raised interesting data. For instance, although the colonial morphology of the revertants resembles the original phenotype of the parental strain (smooth dome), the virulence of revertants was found to be at the same extent of that observed for their switch-variants counterparts or the virulence was restored to the level observed for the parental strain, depending on the virulence model tested. In addition, although no differences in the capability to kill *G. mellonella* larvae were detected between parental strain and the revertant of crepe, the latter exhibited higher fungal burden. These data suggest the occurrence of differences in their proliferation capabilities within the host, possibly as a result of their distinct transcriptional programs. Finally, the *G. mellonella* infection model was also useful to assess the occurrence of phenotypic switching *in vivo*, as both variants and revertants strains were recovered from infected larvae.

In conclusion, we report that phenotypic switching in *C. tropicalis* is associated with changes in virulence. Although the revertants strains exhibit a parental smooth-like colony phenotype, the level of virulence and fungal burden may be the same of that observed for their corresponding switch variants. This is the first report of the employment of the *G. mellonella* infection model for the analyses of virulence of related strains belonging to a phenotypic switching system in *Candida* species. Further studies on the molecular basis of this phenotypic switching system and its role into host adaptation will be important in search of new strategies to manage infections caused by *C. tropicalis*.

## DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brazil, Fundação Araucária/SETI/Governo do Paraná - Brazil and PROPPG/UEL - Brazil. A.T.P.M. and H.F.P. are fellowship holders of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brazil.

## REFERENCES

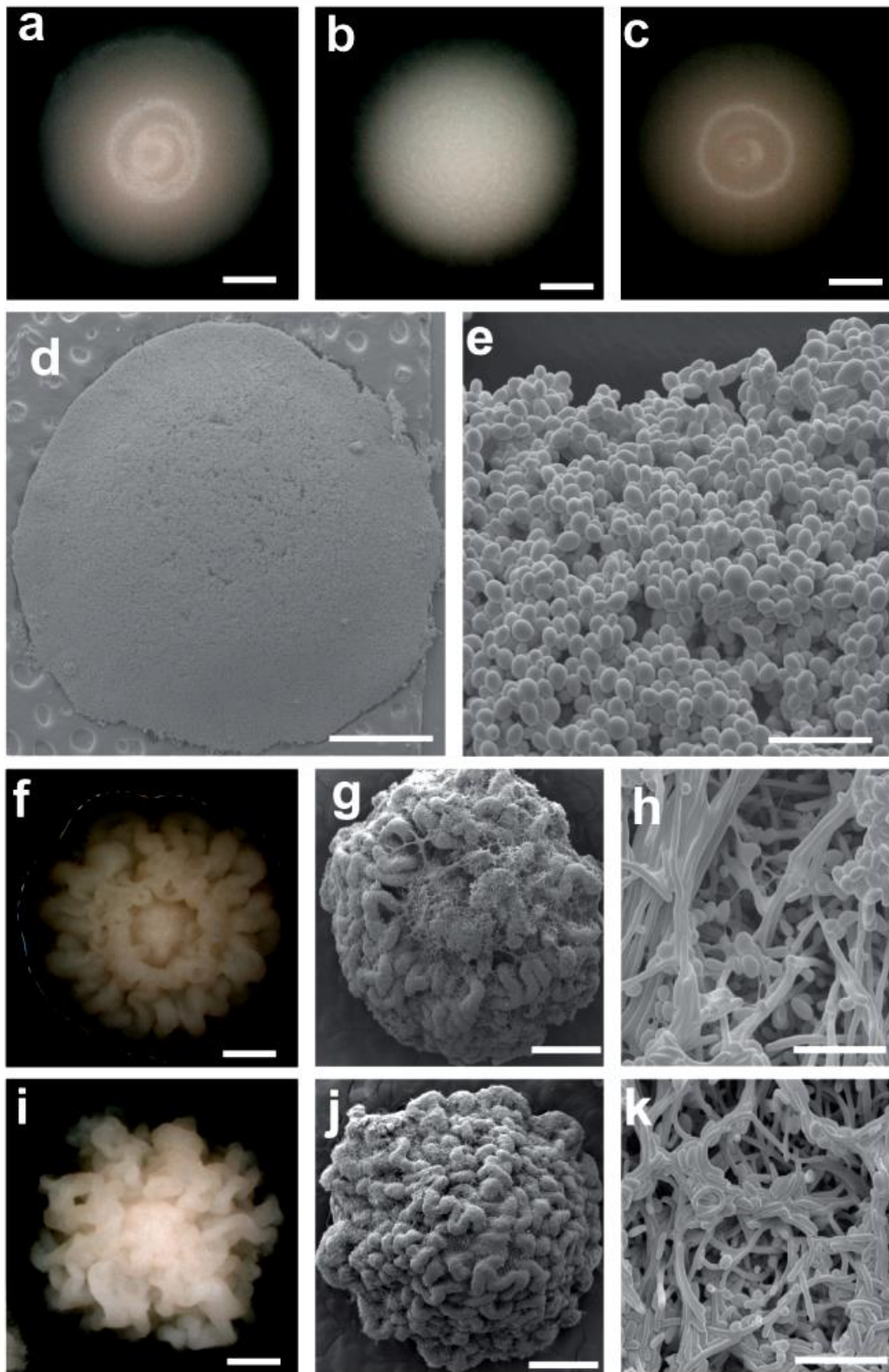
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A, C.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570–576, 2007.
- 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.
- FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypes *switching* of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011.
- FUCHS, B. B; O'BRIEN, E.; EL KHOURY, J .B.; MYLONAKIS, E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, p. 475-482, 2010.
- FURLANETO, M. C.; ANDRADE, C. G. T. J.; ARAGÃO, P. H. A.; FRANÇA, E. J. G.; MORALES, A. T. P.; FERREIRA LCS. Scanning electron microscopy as a tool for the analysis of colony architecture produced by phenotypic switching of a human pathogenic yeast *Candida tropicalis*. **Journal of Physics: Conference Series**, v.371, p.012022. IOP Publishing, 2012.

- JONES, S.K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. **Molecular Microbiology**, v.92, p.383-398, 2014.
- KVAAL, C. A.; SRIKANTHA, T.; SOLL, D. R. Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. **Infection and immunity**, v.1997, p.4469-4475, 1997.
- KVAAL, C.; LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; DANIELS, K.; MCCOY, J.; SOLL, D. R. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. **Infection and immunity**, v. 67, p. 6652-6662, 1999.
- KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical infectious diseases**, v. 33, p. 1676-1681, 2001.
- LACHKE, S. A.; JOLY, S.; DANIELS, K.; SOLL, D. R.; Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v.148, p, 2661-2674, 2002.
- MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍ NEZ, L.; CUENCA ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, v.51, p.461-472, 2013.
- MILLER, N. S.; DICK, J. D.; MERZ, W. G. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, p. 1536-1539, 2006.
- MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J. B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B.; AUSUBEL, F. M.; DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3842-3850, 2005.
- MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 1-9, 2014.
- NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I.; 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.; BOTELHO, N.; SILVA, S.; LOPES, L. M. R. H.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology**. v, 60, p. 12 70-1275, 2011.

- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J., ... & COLOMBO, A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PloS one**, v. 8, p.e59373, 2013.
- PFALLER, M.A.; RHOMBERG, P. R.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, p.303-313, 2015.
- PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.21158-21163, 2011.
- PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M. P.; JONES, S. K.; WANGN, N.; BENNETT RJ. MTL-Independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **Plos Genetics**, v.9, p.e1003369, 2013.
- SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D. R. White-Opaque Transition: a Second High-Frequency Switching System in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.189-197, 1987.
- SOLL, D. R.; STAEBELL, M.; LANGTIMM, C.; PFALLER, M.; HICKS, J.; RAO, T. V. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic. **Journal of clinical Microbiology**, v. 26, p. 1448-1459, 1988.
- SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p.183-203, 1992.
- SOLL, D. R.; MORROW, B.; SRIKANTHA, T. High frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. **Trends in Genetics**, v.9, p.61-65, 1993.
- SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, p. 101-110, 2002.
- TAO, L.; DU, H.; GUAN, G.; DAI, Y.; NOBILE, C. J.; LIANG, W.; CAO, C.; ZHANG, Q.; ZHONG, J.; HUANG, G. Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. **Plos Biology**, v12, p.e1001830, 2014.
- ZHANG, X. B.; YU, S. J.; YU, J. X.; GONG, Y. L.; FENG, W.; SUN, F. J. Retrospective analysis of epidemiology and prognostic factors for candidemia at a hospital in China, 2000–2009. **Japanese journal of infectious diseases**, v.65, p.510-515, 2012.

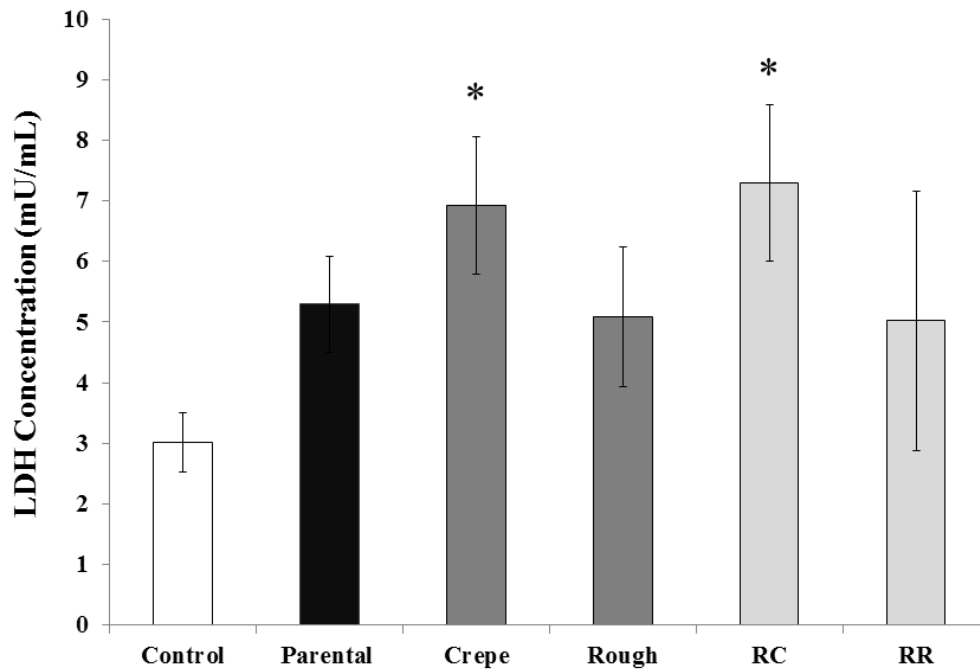
XIE, J.; DU, H.; GUAN, G.; TONG, Y.; KOURKOUMPETIS, T. K.; ZHANG, L.; BAI, F.Y.; HUANG, G. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic Cell**, v.11, p.773-782, 2012.

## FIGURES

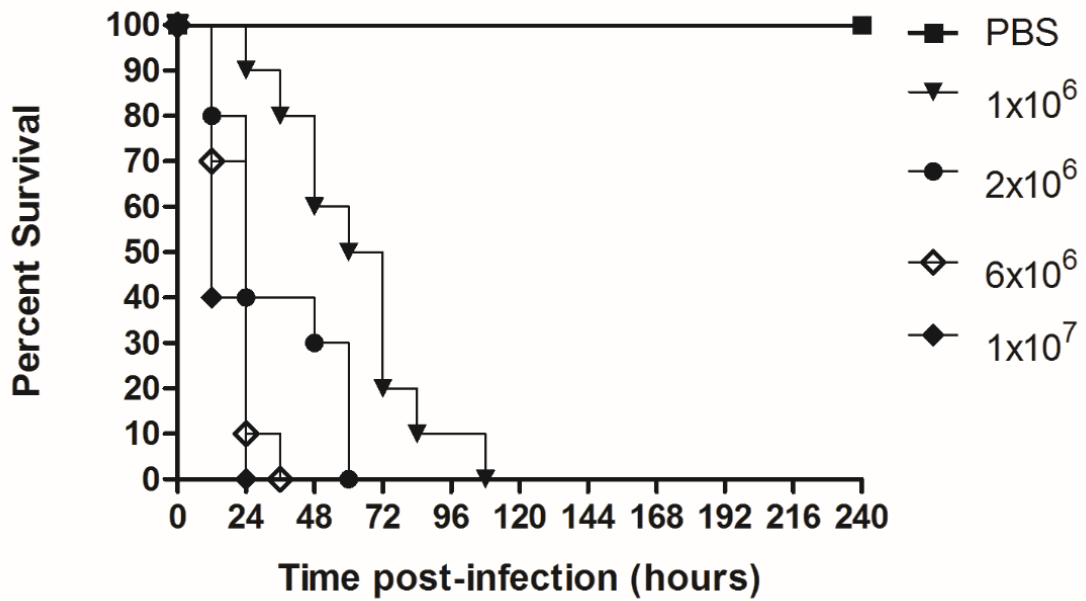


**Figure 1.** Representative colonies of five phenotypes from isolate 49.07 of *C. tropicalis* (a) parental smooth colony; (b) revertant of crepe (RC); (c) revertant rough (RR); (f) crepe colony and (i) rough colony were photographed using a stereoscopic

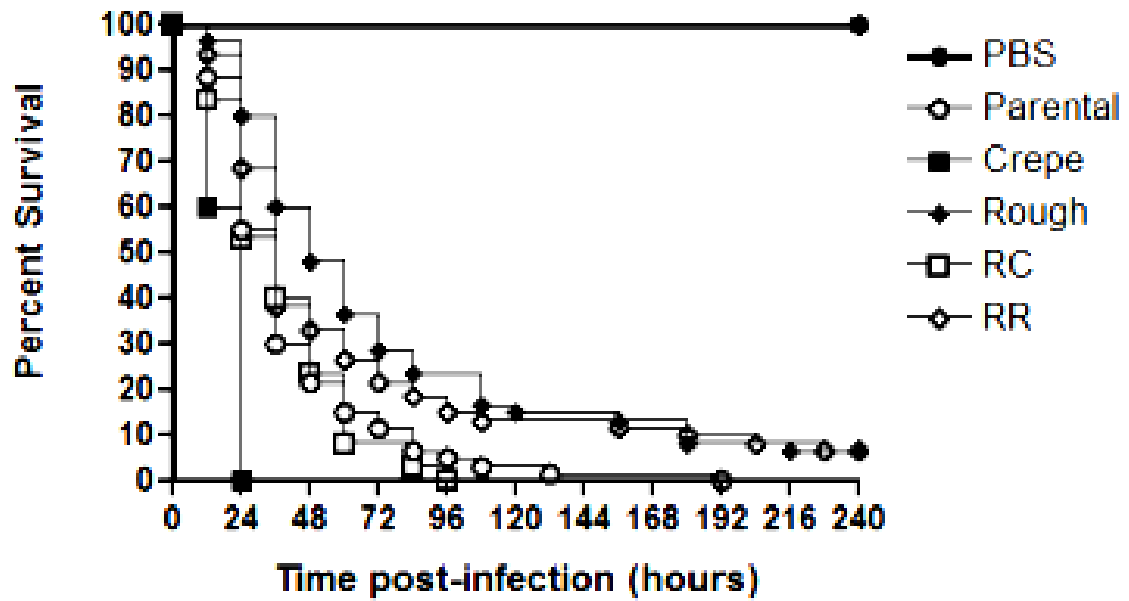
microscope (Nikon SMZ-745). Scanning electron micrographs showing the microarchitecture of colonies following 96 h incubation on YPD agar at 28 °C: (d) electron micrograph of typical pattern of smooth colony; (g) SEM of crepe variant colony and (j) SEM of rough variant colony. Electron micrographs of cells types: (e) cells from smooth colony; (h) cells from crepe variant colony (k) cells from rough variant colony. White bar: 1 mm (a, b, c, f, i); 1 mm (d, g, j); 20µm (e, h and k).



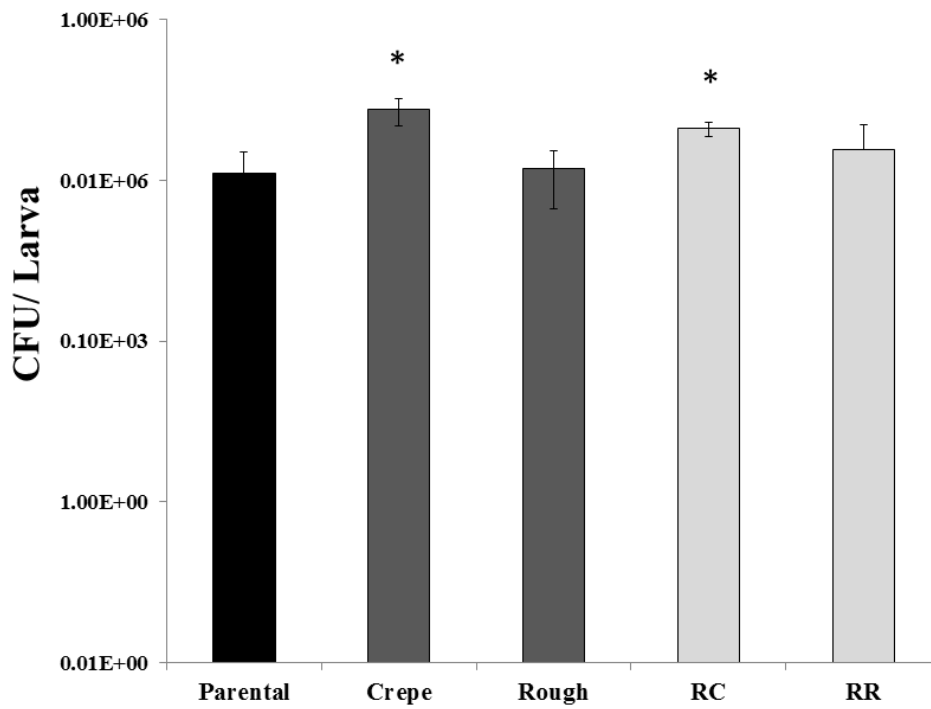
**Figure 2.** Lactate dehydrogenase (LDH) measured in the epithelial cell (FaDu) culture supernatant after 24 h incubation with *C. tropicalis* strains. Control, monolayers preincubated in normal cell culture medium (RPMI 1640 medium with 10% FBS); Parental; switch variants (Crepe and Rough) and respective revertants (RC and RR) were incubated in normal cell culture medium (RPMI 1640 medium). The experiment was performed in triplicates for each condition and repeated twice. Statistical differences between parental and switching strains (variants and revertants) are highlighted (\* $P < 0.05$ ).



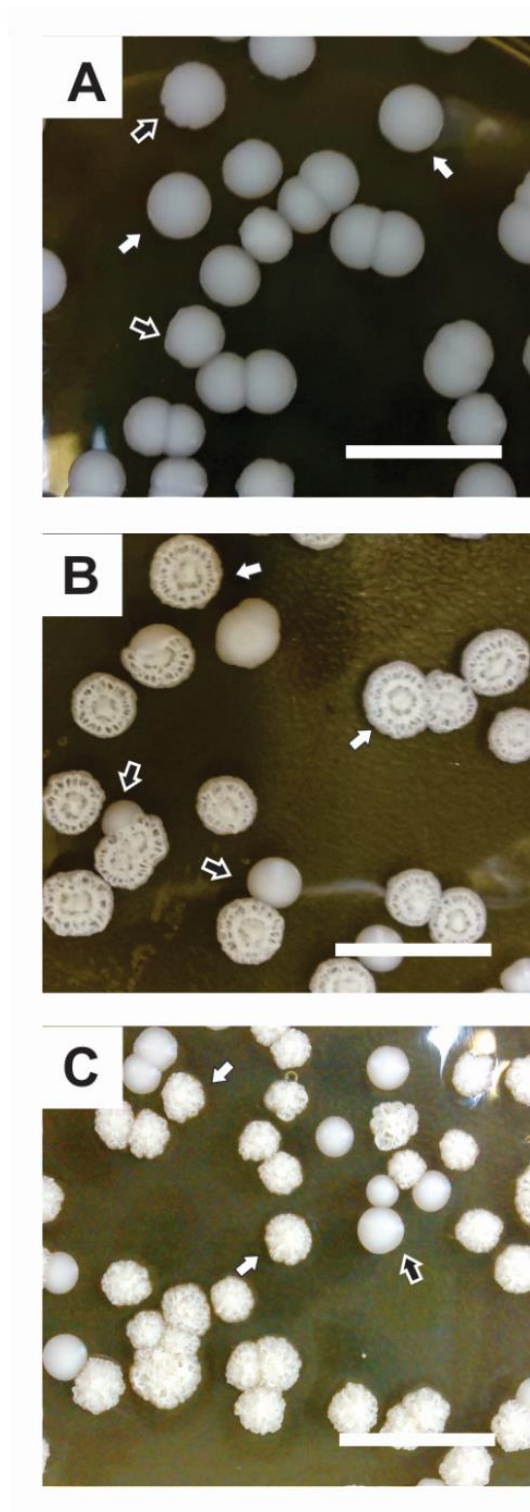
**Figure 3.** Kaplan-Meier survival curves for *G. mellonella* larvae infected with different concentrations of *C. tropicalis* isolate 49.07 (parental strain) yeast cells. Time of larvae death was inoculum dependent. Control included larvae injected with PBS. The results of one representative infection are shown (n=10).



**Figure 4.** Kaplan-Meier survival curves for *G. mellonella* larvae infected with with *C. tropicalis* parental strain (smooth), switched variants (crepe and rough) and revertants (RC and RR). Larvae infected with crepe variant were found to die faster than larvae infected with other strains. Control included larvae injected with PBS. The results of one representative infection are shown (n=10).



**Figure 5.** Fungal burden in *G. mellonella* infected with *C. tropicalis* strains. *Galleria mellonella* larvae were infected with  $2 \times 10^6$  cells per larvae of smooth (original parental), crepe variant, rough variant; (R) crepe (revertant of crepe) and (R) rough (revertant of rough), and CFUs recovered from *G. mellonella* after 12h of infection.



**Figure 6.** Colonies types recovered from infected *G. mellonella* larvae with parental strain (A), crepe variant (B) and rough variant (C). (A) colony of smooth parental (white arrow) with colony of crepe and rough phenotypes (switched variants) (black arrow); (B) colony of crepe variant (white arrow) with colony of smooth parental phenotype revertant (black arrow); (C) colony of rough variant (white arrow) with colony of smooth parental phenotype revertant (black arrow).

## ARTIGO 2

### Switched strains of *Candida tropicalis* produce planktonic and biofilm cells with varied filamentation potential and virulence in *Galleria mellonella*

#### ABSTRACT

*Candida tropicalis* is one of the most frequently encountered human fungal pathogen, however, little is known regarding its virulence. This study was carried out to evaluate the effect of phenotypic switching on biofilm formation and assess filamentous growth and virulence in *G. mellonella* larvae of planktonic and sessile cells recovered from biofilms formed by morphotypes of *C. tropicalis* that arose phenotypic switching. For two of the switching systems tested (related to isolates 49.07 and 46.10) morphotypes (parental, switch variants and revertants) exhibited variable biofilm formation; differently, other two switching systems tested (related to isolates 522.11 and 700.11) morphotypes did not exhibit differences in the amount of biofilm formation. Differentiation in filamentous forms occurred among both planktonic and sessile cells recovered from biofilms of all morphotypes tested. For the majority of morphotypes none differences regarding filamentous growth between planktonic cells and sessile cells; except for the revertant of a crepe variant (49.07) where highest filamentous growth occurred among sessile cells. Filamentation among sessile cells of the switch variant rough (49.07) was higher than that observed for its parental counterpart strain. Concerning planktonic cells, none differences in filamentation between either switch strains or revertants with their parental strains were observed. Virulence was higher for sessile infected-*G. mellonella* larvae than that observed for planktonic infected-larvae ( $P<0.05$ ) for two strains: the revertant of crepe variant (isolate 49.07) and the parental strain (isolate 700.11). Differently, planktonic cells from wrinkle variant (700.11) were more virulent than sessile cells ( $P<0.05$ ). Sessile cells of the crepe variant, the revertant of crepe and the revertant of wrinkle showed higher virulence ( $P<0.05$ ) than their respective parental strains. Concerning planktonic cells, difference between switched strain and parental strain was observed only for the crepe variant ( $P<0.05$ ) where the latter exhibited higher virulence to *G. mellonella* larvae regarding planktonic cells ( $P<0.05$ ). This is the first study to compare virulence of sessile and planktonic cells recovered from biofilms formed by switching phenotypic strains.

**Keywords:** *Candida tropicalis*, phenotypic switching, biofilm, *Galleria mellonella*, virulence factors, filamentation, virulence

## 1. INTRODUCTION

*Candida tropicalis* is one of *Candida* species most commonly associated with human infections in tropical regions, including Latin America (CHAI et al., 2010; QUINDÓS et al., 2014). Invasive candidiasis are leading cause of fungal mortality world-wide; in some settings, bloodstream infections due to *C. tropicalis* may be associated with higher mortality than other *Candida* species (BASSETTI et al., 2015; COLOMBO et al., 2007).

*C. tropicalis* is polymorphic yeast capable of transition among yeast-pseudohyphae-hyphae, and this ability has been associated with the pathogenic potential of this species (CHAI et al., 2010; THOMPSON et al., 2011).

Although *C. tropicalis* has been gained clinical importance there are relatively few studies examining the virulence attributes of this species, in particular the event of phenotypic switching that is known to be putative virulence factor contributing to candidal pathogenesis. This event is a common strategy undergone by fungal pathogens to rapidly adapt to different host niches and facilitate colonization and infection (JAIN et al., 2008). According to the literature, clinical isolates of *C. tropicalis* undertake high-frequencies of phenotypic switching with distinct repertoire of colonies phenotypes (MORALEZ et al., 2014; SOLL, 1992); besides, *C. tropicalis* also undergoes white-opaque phenotypic switch that shows some similarities to that in *Candida albicans*, the most extensively studied switching system in pathogenic yeast (JONES Jr. et al., 2014; PORMAN et al., 2011, 2013).

For *C. tropicalis* it has been showed that phenotypic switching affects distinct morphological and physiological traits, including formation of biofilm (FRANÇA et al., 2011; JONES Jr. et al., 2014; MORALEZ et al., 2014). Our group described the occurrence of switch variants strains with higher production of biofilm compared to their parental counterpart strains (FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014). According to JONES Jr. et al. (2014) the white-opaque phenotypic switch in *C. tropicalis* is associated with sexual biofilm formation, where biofilms are formed exclusively by opaque cells.

The capability of biofilm production by *Candida* species is an important virulence trait closely associated to increasing prevalence of candidal infection and resistance to antifungal therapy (SILVA et al., 2012). According to the literature, the ability to form biofilm is one of the major virulence factors for *C.*

*tropicalis* (CHAI, 2010; SILVA et al., 2009). In addition, antifungal resistance conferred by *C. tropicalis* biofilm has already been described (AL-FATTANI et al., 2006; FERNANDES et al., 2015). Similarly, to *C. albicans*, *C. tropicalis* is able to form structured biofilms with considerable amount of exopolymeric matrix (AL-FATTANI et al., 2006). According to Silva et al. (2009) biofilms of *C. tropicalis* are constituted of a dense network of different cell types comprising blastoconidia, pseudohyphae and hyphae.

At moment, studies related to virulence of cells recovered from biofilm are largely unexplored. In the present study, we assessed biofilm formation by *C. tropicalis* morphotypes of distinct switching systems, comprising parental strains, switch variants and switch revertants. Further, we compared filamentation and virulence in *Galleria mellonella* model between sessile cells and planktonic cells recovered from biofilm formed by morphotypes of two representative switching systems: a switching system where morphotypes showed heterogeneity concerning biofilm formation (HTBF) and a switching system where morphotypes showed homogeneity concerning biofilm formation (HMBF).

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. *Candida tropicalis* strains**

In this study, we used clinical isolates of *C. tropicalis* recovered from tracheal secretion (49.07) and blood (46.10, 522.11 and 700.11). The crepe variant and rough variant strains are related to the 49.07 isolate and arose from phenotypic switching. The mycelial variant strain is related to the 46.10 isolate and arose from phenotypic switching (Moralez et al., 2014). The strains were obtained as a stock culture from the Fungal Genetics Laboratory, The University of Londrina-Brazil.

### **2.2. Screening assay for phenotypic switching**

Switch phenotypic variants were obtained as described by Moralez et al. (2014). Briefly, cells from a single 4-day-old colony of isolates 522.11 and 700.11 were suspended in 3ml of YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) broth medium and grown in submerged culture (180 r.p.m.) for 24 h at 28 °C. The resultant

suspension was diluted in distilled water and plated onto YPD agar plates at a density of 300 colony-forming units (c.f.u.) per plate. Plates were incubated at 28 °C for 4 days, and the colony phenotypes were scored.

Colonies displaying morphological differences from the isolate colonies (parental original phenotype) were considered phenotypic variants. Successively culturing parental and distinct variant colonies on YPD medium for up to ten times assessed colony phenotype stability. The stable colony phenotypes were photographed using a stereoscopic microscope (Motic SMZ-140).

### **2.2.1. Determination of reversibility of variants phenotypes (switch back to parental wild-type phenotype)**

The reversion rates of the switched variants to the parental phenotype were determined by visually scoring of four days old growth colonies on YPD agar medium (Gibco) at 28 °C. To calculate the reversibility frequencies, a total of 6,000 colonies from each variant were scored. Colonies that arose from variants and exhibited morphology similar to their respective parental phenotype were considered revertant colonies. Successive culture of revertant colonies on YPD medium for up to 10 times was used to assess the stability of the phenotype.

### **2.3. Analysis of *in vitro* biofilm formation**

Biofilms were produced as previously described by Moralez et al. (2014), with modifications. Briefly, cell suspensions were obtained from a single colony of morphotypes (parental, variants and revertants strains) following growth for 96 h at 28 °C in YPD agar plate. Standardized cell suspensions (200 µl containing  $1 \times 10^7$  cells/ml in YPD broth) were placed into selected wells of 96-well polystyrene microtiter plates and incubated at 28 °C at 120 rev/min. After 24 h, 100 µl of YPD suspension was removed, and an equal volume of fresh YPD was added. The preparations were then incubated for an additional 48 h. The medium was then aspirated, and non-adherent cells were removed by washing the biofilms twice with sterile ultra-pure water. Biofilm-forming ability was assessed by quantification of the total biomass using crystal violet (CV) staining. After washing, the biofilms were fixed with 200 µl of methanol, which was removed after 15 min. The microtiter plates were

allowed to dry at room temperature, and 200  $\mu$ l of CV (1% v/v) was added to each well and incubated for 5 min. The wells were then gently washed with sterile, ultra-pure water, and 200  $\mu$ l of acetic acid (33% v/v) was added to release and dissolve the stain. The absorbance of the obtained solution was read in triplicate in a microtiter plate reader (Bio-Tek EL 808) at 540 nm. The experiments were performed in triplicate and repeated twice in independent assays. Switching system where morphotypes exhibited variable biofilm formation were named HTBF (heterogeneity biofilm formation), and switching system where morphotypes did not exhibit differences in the amount of biofilm formation were named HMBF (homogeneity biofilm formation).

#### **2.4. Assessment of filamentous growth among planktonic cells and sessile cells recovered from biofilms**

For this analysis we used morphotypes of two switching systems: one HTBF comprising the parental strain (isolate 49.07), crepe and rough variants and their revertants, and one HMBF comprising the parental strain (isolate 700.11), wrinkle variant and its revertant. Planktonic cells and sessile cells were recovered from biofilms obtained as described previously, except that standardized cell suspensions (3ml containing  $6 \times 10^6$  cells/ml in YPD broth) were placed into selected wells of 6-well tissue culture plates and incubated at 28 °C at 120 rev/min. After 24 h, 1.5 ml of YPD suspension was removed, and an equal volume of fresh YPD was added. The preparations were then incubated for an additional 48 h. After this period, the non-adherent cells (planktonic cells) were aspirated and reserved. Subsequently, the sessile cells were scraped from the plates and reserved. To determine the potential for differentiation in filamentous forms, a total of 1,000 cells per sample of both planktonic cells and sessile cells were submitted to direct counting using a Neubauer counting chamber and estimated the percentage of filamentous cells. The experiments were performed in triplicate. To better visualize the filamentous forms (hyphae and pseudohyphae), both types cells were stained with Calcofluor white (10  $\mu$ g/ml) and analyzed by fluorescence microscopy.

## **2.5. Assessment of virulence of planktonic cells and sessile cells in *Galleria mellonella***

For virulence assay we used planktonic and sessile cells recovered from biofilm of morphotypes of the two switching systems as described above, comprising isolate 49.07 (parental strain), crepe and rough variants and their revertants (HTBF), and isolate 700.11 (parental strain), wrinkle variant and its revertant (HMBF).

Wax moth larvae killing assays were carried out as described previously by Mylonakis et al. (2005). Briefly, groups of 10 larvae (0.3–0.6 grams) were each infected with 10 $\mu$ l from suspensions of both planktonic cells and sessile cells containing  $2 \times 10^6$  yeast cells per larvae in PBS buffer. The yeast cells were directly instilled into the haemocoel of the larva by injection with a 10  $\mu$ l Hamilton syringe in the last right proleg. The larvae were incubated at 37 °C after inoculation, and survival was monitored every day by 240 h with intervals of 12 h. The larvae were considered to have died when they did not respond to physical stimulation (slight pressure with forceps). As controls, a group of larvae injected with PBS were studied in parallel in every infection investigation. Each experiment was repeated at least three times, and representative experiments are presented.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Characterization of colony phenotypes**

Colonies phenotypes of morphotypes (parental, switch variants and switch revertants strains) employed in the present study are shown in Fig. 1. Switch variants related to isolate 49.07 named crepe and rough exhibited more structured colonies morphologies (Fig. 1B, C) compared to the smooth colony morphology of the parental strain (Fig. 1 A); the mycelial switch variant related to isolate 46.10 exhibited a slightly more complex morphology showing an irregular edge (Fig. 1 G), compared to a fuzzy phenotype of the parental strain (Fig. 1F) as described previously (MORALEZ et al., 2014).

In the present study, isolates 522.11 and 700.11 underwent switching on YPD agar medium at frequencies of  $2.4 \times 10^{-3}$  and  $9.9 \times 10^{-3}$ , respectively. Both isolates exhibited the commonly smooth phenotype (Fig. 1 I, L), while the switch variant related to the isolate 522.11 exhibited an irregular edge (Fig. 1 J) and the switch variant related to the isolate 700.11 exhibited a wrinkle colony dome with myceliated edge (Fig. 1M).

Reversibility (switching back to the original parental phenotype) was observed in all variants at frequencies equal to or greater than  $10^{-3}$ . The higher reversibility rate was observed for the crepe variant ( $5.2 \times 10^{-1}$ ); on the other hand, the lower reversibility rate was observed for the irregular edge variant ( $5.9 \times 10^{-3}$ ).

Revertant colonies were named as follow: revertant of crepe (RC), revertant of rough (RR), revertant of mycelial (RM), revertant of irregular border (RIE) and revertant of wrinkle (RW). All revertants colonies exhibit high morphological similarities to their respective parental strain (original phenotype) (Fig. 1E, H, K, N), except that observed for the RC colonies that display slight variation in morphology, including less bright surface and slightly irregular edges (Fig. 1D).

### 3.2. Biofilm formation by phenotypic switching morphotypes of *C. tropicalis*

The results of biofilm biomass quantification are shown in Fig. 2. All morphotypes (parental, switch variants and revertants strains) formed biofilms, although the biofilm-forming ability varied among them.

The amount of biofilm biomass generated by the two variant strains (crepe and rough) related to the isolate 49.07 were higher ( $P < 0.05$ ) than the biofilm generated by the unswitched parental exhibiting smooth phenotype. Biofilm biomass following CV staining ( $Abs_{540nm}$ ) were as follow: parental smooth ( $1.73 \pm 0.19$ ), crepe variant ( $3.5 \pm 0.51$ ) and rough variant ( $3.23 \pm 0.41$ ). Revertants strains RC and RR also exhibited higher total biomass than the parental counterpart ( $P < 0.05$ ), despite of their smooth-like colony morphology. The total biomass ( $Abs_{540nm}$ ) were as follow: RC ( $3.23 \pm 1.05$ ) and RR ( $2.95 \pm 1.19$ ).

Differently, the amount of biofilm generated by the mycelial variant phenotype ( $Abs_{540nm}$   $2.4 \pm 0.76$ ) related to the isolate 46.10 did not differ to that observed for its parental counterpart ( $Abs_{540nm}$   $1.84 \pm 0.52$ ) ( $P > 0.05$ ). On the other hand, the revertant strain RM exhibited higher total biomass ( $Abs_{540nm}$   $3.02 \pm 0.53$ )

than its parental counterpart ( $P < 0.05$ ), in spite of its parental-like colony morphology (Fig. 2). For the remaining morphotypes related to isolates 522.11 and 700.11 no differences ( $P > 0.05$ ) in biofilm formation were observed between neither switched variants nor revertants with their parental counterparts (Fig. 2).

Switching systems related to isolates 49.07 and 46.10 where morphotypes exhibited variable biofilm formation were considered HTBF (heterogeneity biofilm formation). On the other hand, switching systems related to isolates 522.11 and 700.11 where morphotypes did not exhibit differences in the amount of biofilm formation were considered HMBF (homogeneity biofilm formation) (Fig. 2).

### **3.3. Morphogenesis to filamentous forms among planktonic cells and sessile cells recovered from biofilms**

As shown in Fig. 3, filamentous forms (hyphae and pseudohyphae) were observed among planktonic cells and sessile cells recovered from biofilms of all morphotypes related to isolates 49.07 (HTBF - heterogeneity biofilm formation) and 700.11 (HMBF-homogeneity biofilm formation). These cellular forms are illustrated in Fig. 4. Calcofluor white staining allowed better differentiation among hyphae, pseudohyphae and yeast cells (Fig. 4).

We first evaluated whether there was difference in filamentous growth between planktonic cells and sessile cells of each morphotype tested. Among morphotypes of the HTBF switching system (isolate 49.07), only the revertant of crepe exhibited difference in the filamentous growth between planktonic and sessile cells where the latter showed higher differentiation in filamentous forms compared to that observed for planktonic cells ( $P < 0.05$ ) (Figure 3 A). Among morphotypes of the HMBF switching system (isolate 700.11) there were no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) regarding filamentous growth between planktonic cells and sessile cells (Figure 3 B).

Considering sessile cells, a comparison of filamentation between either switch strains or revertants with parental strain revealed that the rough variant related to the isolate 49.07 showed higher ( $P < 0.05$ ) filamentous growth than its parental counterpart (original smooth phenotype). For the remaining strains there were no significant differences compared to the parental strain. Morphotypes related

to isolate 700.11 showed no significant differences regarding filamentous growth among sessile cells.

Concerning planktonic cells, none differences in filamentation between either switch strains or revertants with their parental counterparts were observed for neither HTBF nor HMBF phenotypic systems.

### **3.4. Assessment of virulence of planktonic cells and biofilm cells in *Galleria mellonella***

For virulence assays, we employed planktonic and sessile cells from morphotypes of both switching systems HTBF (isolate 49.07) and HMBF (isolate 700.11). We first evaluated whether there were differences in larval survival following infection with either planktonic cells or biofilm cells of each morphotype tested (Figure 5 A,B). Among morphotypes related to the isolate 49.07 (HTBF switching system), only the revertant of crepe exhibited difference of virulence in *G. mellonella* larvae between planktonic and biofilm cells where the latter were more virulent than planktonic cells ( $P < 0.05$ ) (Figure 5 A).

Among morphotypes related to the isolate 700.11 (HMBF switching system), biofilm cells from the parental strain were more virulent than planktonic cells ( $P < 0.05$ ); on the other hand, planktonic cells from wrinkle variant were more virulent than biofilm cells ( $P < 0.05$ ). None differences in virulence between planktonic and biofilm cells were found for revertant of wrinkle (Figure 5 B).

In relation to virulence in *G. mellonella* comparisons were also made between either switch variants or revertants and parental strain using both biofilm cells and planktonic cells singly (Figure 6). Considering sessile cells, the crepe variant and the revertant of crepe (HTBF switching system) showed higher virulence ( $P < 0.05$ ) than the parental counterpart (original smooth phenotype) (Figure 6 B). The revertant of wrinkle (HMBF switching system) showed higher virulence ( $P < 0.05$ ) than the parental strain (original smooth phenotype) (Figure 6 D).

Concerning planktonic cells, the crepe variant (HTBF switching system) showed higher virulence ( $P < 0.05$ ) than the parental counterpart (Figure 6 A). For the remaining strains there were no significant differences compared to the parental strain. Morphotypes related to isolate 700.11 (HMBF switching system) showed no significant differences of virulence in *G. mellonella* larvae regarding planktonic cells ( $P > 0.05$ ) (Figure 6 C).

#### 4. DISCUSSION

For *Candida* species, phenotypic switching has been known to be an important part of fungal adaptability to the changing of environment during invasion of the human organism (Soll, 1992). In previous studies we demonstrated that the epigenetic event of phenotypic switching in *C. tropicalis* had variable effects in some of its virulence factors, including *in vitro* biofilm formation and ability to growth as filamentous forms (MORALEZ *et al.*, 2014). More recently, we showed that phenotypic switching affected *C. tropicalis* virulence in *G. mellonella* larvae model (unpublished data).

Mature biofilm of *C. tropicalis* consists of a dense and heterogeneous network of yeast, pseudohyphae and hyphae embedded within exopolymeric matrix (BIZERRA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2014). According to these authors, the cell morphogenesis during the formation of biofilm is considered an important virulence factor of this species. Filamentous forms of *C. tropicalis* had also been demonstrated to be crucial for *in vitro* invasive penetration of an oral epithelium (SILVA *et al.*, 2011).

In the present study, we aimed to extend the analyses of biofilm formation by morphotypes that arose by phenotypic switching from clinical isolates of *C. tropicalis*. For this, we evaluated morphogenesis and virulence in *G. mellonella* larvae of planktonic and sessile cells recovered from biofilms formed by morphotypes of HTBF, switching system where morphotypes exhibited variable biofilm formation, and HMBF where morphotypes did not exhibit differences in the amount of biofilm formation.

According to our data, differentiation in filamentous forms occurred among both planktonic and sessile cells. For the majority of morphotypes (parental, switch variants and revertants) there were no significant differences regarding filamentous growth between planktonic cells and sessile cells.

Differently, the cell type was more responsive concerning virulence in larvae of *G. mellonella*. According to the literature, sessile cells display an altered phenotype with respect to growth rate and gene transcription compared with that of planktonic cells (BIZERRA *et al.*, 2008; DONLAN & COSTERTON, 2002). In the present study, sessile cells of the crepe variant and the revertant of crepe (HTBF switching system) and the parental strain (HMBF switching system) were more virulent than their corresponding planktonic cells (Figure 5 A and B, respectively).

On the other hand, planktonic cells from wrinkle variant (HTMF switching system) were more virulent than sessile cells. *G. mellonella* has been successfully used to

study *C. tropicalis* virulence (MESA-ARANGO *et al.*, 2013). *G. mellonella* shares several aspects of innate immune response with vertebrate and offers a useful tool to study virulence of *Candida* species (KAVANAGH *et al.*, 2004; MESA-ARANGO *et al.*, 2013). More recently, we demonstrated that *G. mellonella* infection model is suitable for the analyses of virulence of related strains belonging to a phenotypic switching system in *C. tropicalis* (unpublished data).

Furthermore, it is interesting to note that sessile cells from crepe and wrinkle variants were more virulent in comparison to sessile cells from their parental counterparts (unswitched strains), possibly reflecting the occurrence of differential expression of virulence traits by these switched strains.

Our data suggest that phenotypic switching seems do not affect to a great extent filamentous growth among sessile cells, where the majority of switch variants and revertants had the same filamentation ability of the parental strain. This statement is reinforced by data obtained with planktonic cells, where none differences in filamentation between either switch strains or revertants with their parental counterparts were observed.

Although in both systems HTBF and HMBF, the filamentation potential of the morphotypes seems do not be associated with the switching event, nor of potential for biofilm formation in the tested conditions, our data are consistent with previous observations that differentiation in filamentous forms are not essentially required for biofilm formation in *Candida* spp., but can assist in the structural organization of biofilms formed by these species (DOUGLAS, 2003).

On the other hand, in the *C. tropicalis* "White-opaque" switching system an overexpression of the *CtWOR1* gene, a master regulator of the white-opaque switch, had influence over to filamentation and biofilm formation (PORMAN *et al.*, 2013).

In conclusion, our data showed that the effect of phenotypic switching in biofilm formation is dependent of the switching system. Further, our data suggest that phenotypic switching seems do not greatly affect filamentous growth among cells recovered from biofilms formed by distinct morphotypes.

This is the first study to compare virulence of sessile and planktonic cells recovered from biofilms formed by phenotypic variants obtained from the event phenotypic switching. Future studies at molecular level are desirable to assess putative regulators genes associated with the switching systems employed in the present study.

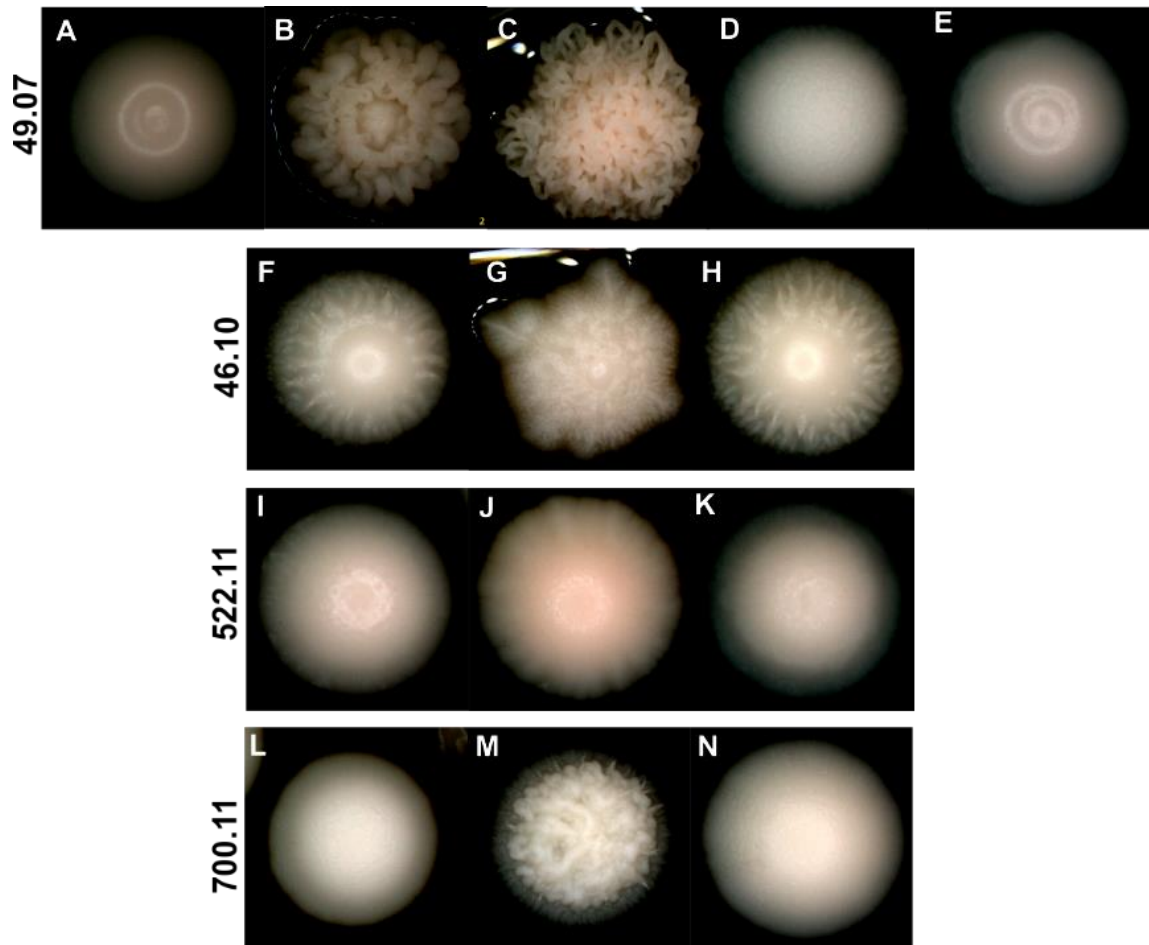
## REFERENCES

- 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. 99-1008, 2006.
- BASSETTI, M.; MERELLI, M.; ANSALDI, F.; de FLORENTIIS, D.; SARTOR, A.; SCARPARO, C.; CALLEGARI, A.; RIGHI, E. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. **Plos One**, v. 10, e0127534, 2015.
- BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; QUESADA, R. M. B.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 442-450, 2008.
- CHAI, L.Y.A.; DENNING, D.W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease **Critical Reviews in Microbiology**, v.36, p.282-298, 2010.
- CHEN, .Y L.; YU, S. J.; HUANG, H. Y.; CHANG, Y. L.; LEHMAN, V. N.; SILAO, F. G. S.; BIGOL, U. G.; BUNGAY, A. A.; AVERETTE, A.; HEITMAN, J. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. **Eukaryotic cell**, v. 13, p. 844-854, 2014.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A, C.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570–576, 2007.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**,v.15, p.167–193, 2002.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in microbiology**, v. 11, p. 30-36, 2003.
- FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm´s matrix-involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, p. 165-169, 2015.
- FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypes switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B.C. Phenotypic switching in fungi, **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.
- JONES JR, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. **Molecular Microbiology**, v.92, p.383-398, 2014.

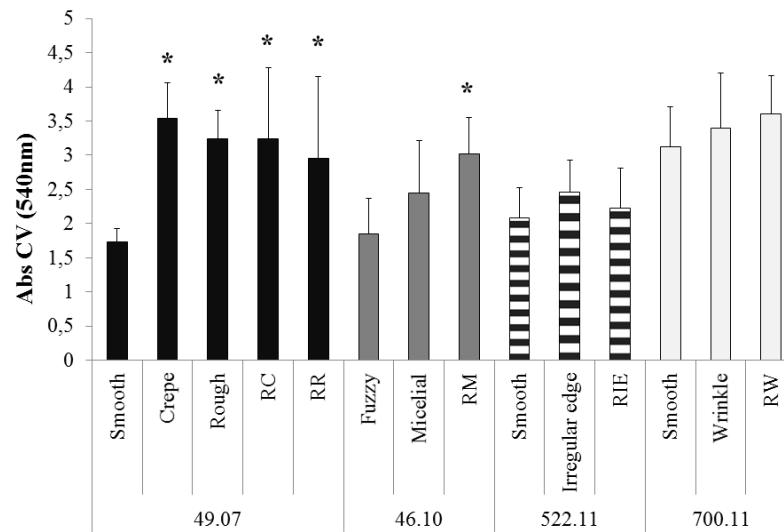
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.101-112, 2004.
- MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L.; CUENCA ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, v.51, p.461-472, 2013.
- MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 1-9, 2014.
- MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal Models to study host-pathogen interactions. **Infection and Immunity**, v. 73, p.3833–3841, 2005.
- PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.21158-21163, 2011.
- PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M. P.; JONES, S. K.; WANG, N.; BENNETT R.J. MTL-Independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **PLoS Genetics**, v.9, p. e1003369, 2013.
- QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 42-48, 2014.
- SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p.681–689, 2009.
- SILVA, S.; HOOPER, S. J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. M. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 264-272, 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.
- SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p.183-203, 1992.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 9, p. 1173-1182, 2011.

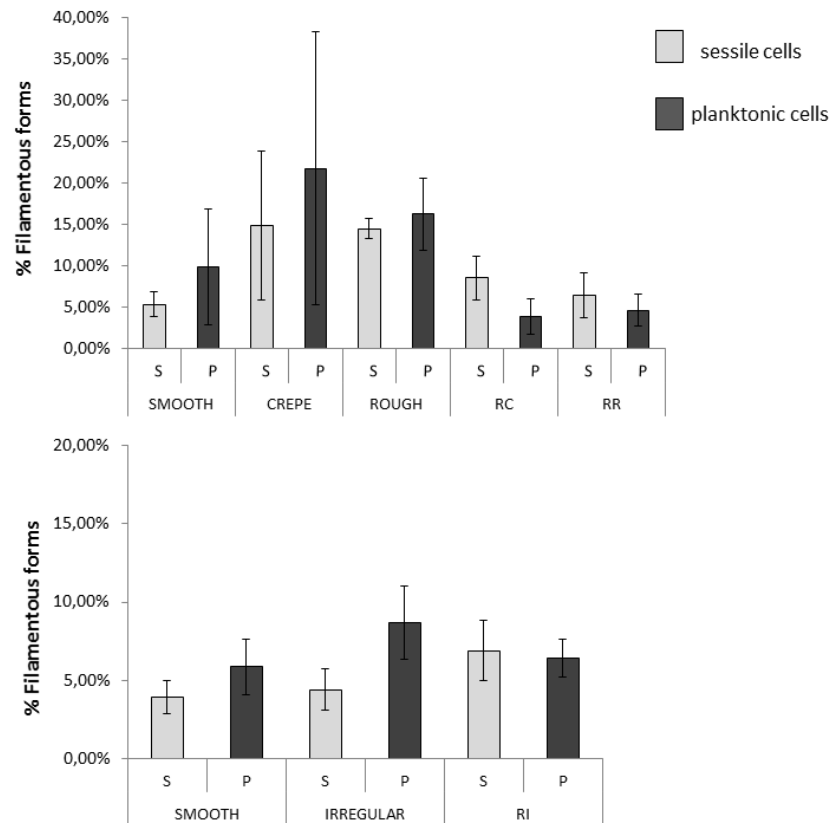
## FIGURES



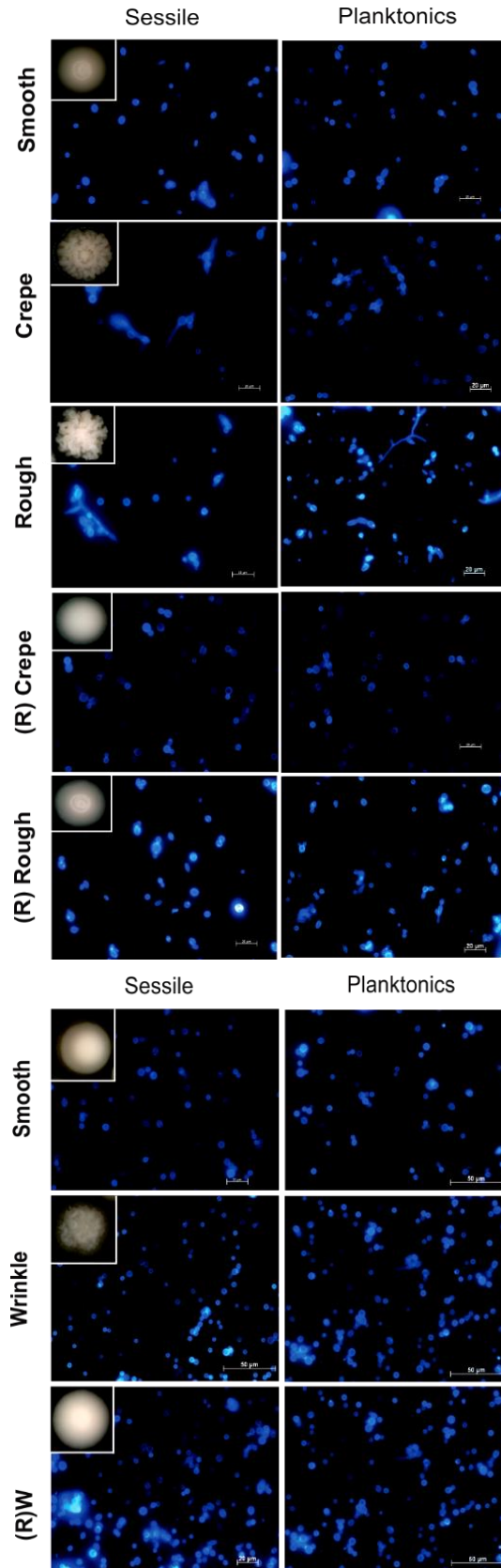
**Figure 1.** Phenotypic switching in *Candida tropicalis*. Representative colonies phenotypes from (A) parental strain 49.07, (B) crepe variant, (C) rough variant, (D) revertant of crepe, (E) revertant of rough, (F) parental strain 46.10, (G) mycelial variant, (H) revertant of mycelial, (I) parental strain 522.11, (J) irregular border variant, (K) revertant of irregular border, (L) parental strain 700.11, (M) wrinkle variant, (N) revertant of wrinkle. Time of incubation was 4 days at 28 °C. Colonies were photographed at 2 x power.



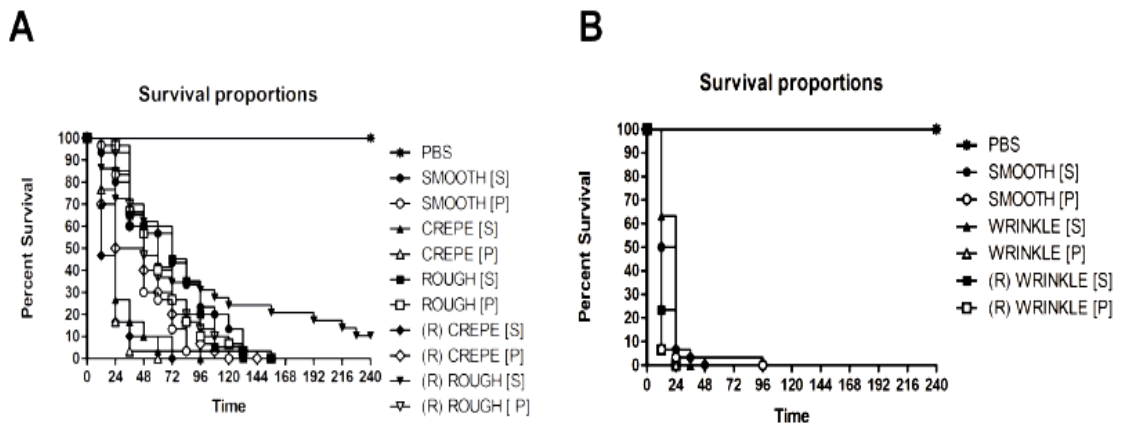
**Figure 2.** *In vitro* biofilm formation by *C. tropicalis* morphotypes derived from phenotypic switching. Mature biofilms were obtained after 72 h and stained with crystal violet solution. RC (revertant of crepe), RR (revertant of rough), RM (revertant of mycelial), RIE (revertant of irregular edge), RW (revertant of wrinkle). Statistical differences between parental and switching strains (variants and revertants) are indicated by asterisks (Student *t*-test,  $P < 0.05$ ).



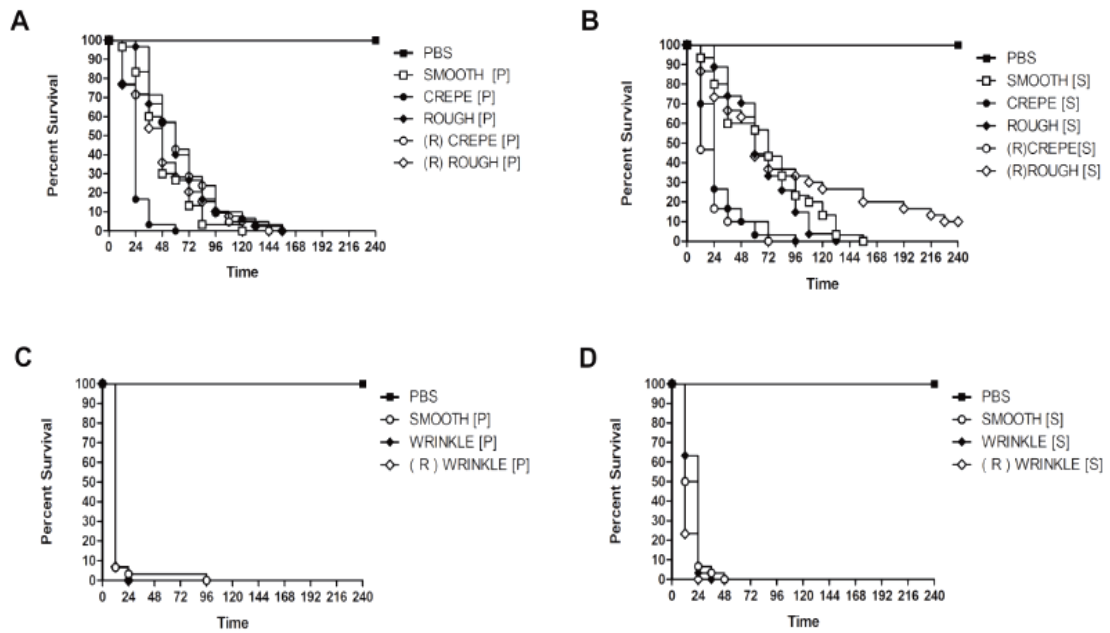
**Figure 3.** Filamentous growth among sessile cells (S) and planktonic cells (P) recovered from biofilms formed by *C. tropicalis* morphotypes of two switching systems (isolate 49.07 and 700.11). RC (revertant of crepe), RR (revertant of rough), RW (revertant of wrinkle). The results are means of three independent experiments (1,000 cells counted per each experiment).



**Figure 4.** Calcofluor white staining of sessile and planktonic cells recovered from biofilms formed by morphotypes related to isolates 49.07 and 700.11. Inset= 1mm.



**Figure 5.** Kaplan-Meier survival curves of *G. mellonella* larvae infected with sessile (S) and planktonic (P) cells of *C. tropicalis*. Morphotypes of the isolates 49.07 or 700.11 of *C. tropicalis* at  $2 \times 10^6$  CFU/larva and monitored over a period of 10 days. RC (revertant of crepe), RR (revertant of rough), RM (revertant of mycelial), RIE (revertant of irregular edge), RW (revertant of wrinkle). PBS injected larvae were included as control. Values represent the mean of three independent experiments for each strain. (n=10).



**Fig. 6.** *Galleria mellonella* killing by different cellular types (sessile or planktonic) recovered from biofilms formed by morphotypes of clinical isolates of *C. tropicalis*. Groups of 10 *G. mellonella* larvae were infected as described in Material and Methods with  $2 \times 10^6$  cells/larva and survival was monitored every day. Survival experiment was performed at 37 °C. **(A)** and **(C)** survival curve of de larvae infected with the planktonic cells from isolates 49.07 and 700.11, respectively. **(B)** and **(D)** survival curve of de larvae infected with the sessile cells from isolates 49.07 and 700.11, respectively. 49.07: (□) Smooth; (●) Crepe, (◆) Rough; (○) RC; (◇) RR. 700.11: (○) Smooth; (◆) Wrinkle; (◇) RW. (■) PBS was use as control. Values represent the mean of three independent experiments for each strain.

## ARTIGO 3

### **Avaliação de colônias de morfotipos de *C. tropicalis* derivados de *switching* fenotípico: organização ultraestrutural e composição de matriz extracelular**

#### **RESUMO**

*Switching* fenotípico é considerado um fator de virulência em *Candida* spp. por promover adaptabilidade em condições adversas. Este evento é caracterizado pela ocorrência de colônias de morfologia alterada. Os objetivos deste estudo foram avaliar a ultraestrutura de colônias de linhagens de dois sistemas de *switching* distintos de *C. tropicalis* que apresentam diferentes padrões morfológicos (padrão liso e padrão estruturado), e avaliar a distribuição de matriz nessas colônias e sua composição quanto aos conteúdos de carboidratos e proteínas totais. A presença de matriz extracelular foi observada em todos os fenótipos avaliados, no entanto, foi possível observar diferenças quanto a sua distribuição nos dois padrões morfológicos de colônia. Os teores de carboidratos e proteínas em matriz obtida de colônias de fenótipo parental liso (isolado 49.07) foram significativamente inferiores aos teores observados para seu variante rugoso ( $P < 0,05$ ). Colônias de padrão estrutural liso do isolado 100.10 apresentaram quantidades superiores de carboidratos e proteínas totais, comparados a colônias do mesmo fenótipo do isolado 49.07 ( $P < 0,05$ ). Diferenças significativas quanto aos conteúdos de carboidratos foram observadas entre colônias de padrão estruturado, quando comparados os fenótipos variante crepe do isolado 100.10 e o variante crepe do isolado 49.07 ( $P < 0,05$ ). No geral, as maiores quantidades de carboidratos e proteínas totais foram obtidas a partir de matriz extraída de colônias de padrão estruturado. O presente estudo demonstra que o padrão de distribuição de material extracelular em colônias de *C. tropicalis* é variável e possivelmente exerce papel estrutural a estas colônias. Nossos dados revelam ausência de correlação entre a quantidade dos componentes de matriz avaliados (carboidrato e proteína) e a complexidade de morfologia de colônias.

**Palavras-chave:** *Candida tropicalis*; *Switching* fenotípico; matriz extracelular.

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas causadas por espécies de gênero *Candida* têm aumentado significativamente nas últimas décadas. O gênero compreende cerca de 20 espécies reconhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas, sendo que *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* compreendem as principais espécies causadoras de infecções invasivas (PFALLER et al., 2007; POLVI et al., 2015).

Embora *C. albicans* ainda seja a espécie mais frequentemente isolada de episódios de infecções fúngicas invasivas, a frequência de espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado consideravelmente, sendo que em alguns estudos tem sido mais frequente que *C. albicans* (DIEKEMA et al., 2012; HORN et al., 2009; SARDI et al., 2013).

*C. tropicalis* tem sido uma das espécies mais frequentemente isolada de infecções sanguíneas (candidemias), particularmente em regiões tropicais, incluindo América do Sul e Ásia (PFALLER et al., 2012, 2014). *C. tropicalis* está frequentemente relacionada às infecções nosocomiais e sua ocorrência tem sido associada a pacientes com neoplasias hematológicas e neutropenia (COLOMBO et al., 2006; JONES et al., 2014; MANCERA et al., 2015; PAPON et al., 2013; SIPSAS et al., 2009; XIE et al., 2012; BASSETTI et al., 2015).

O êxito das espécies de *Candida*, e particularmente de *C. tropicalis*, como patógenos para humanos pode ser atribuído ao seu vasto repertório de determinantes de virulência. Neste contexto, um importante fator de virulência atribuído a isolados de *C. tropicalis* compreende a plasticidade fenotípica, que confere maior resiliência desse fungo a mudanças ambientais por meio do evento chamado *switching* fenotípico (JAIN et al., 2008; PORMAN et al., 2011, 2013; SOLL, 1992).

O evento de *switching* fenotípico em fungos é um atributo que propicia uma micro adaptação por meio de variações transcricionais que conferem diferenciação morfológica em nível de colônias e células (JAIN et al., 2008; MORALEZ et al., 2014; PORMAN et al., 2011; SOLL, 1992, 2014).

O sistema de *switching* mais estudado compreende a transição "white-opaque" em *C. albicans* (SOLL, 2014). Este sistema também já foi descrito para outras espécies de *Candida*, incluindo *C. tropicalis* (PORMAN et al., 2011,

2013; XIE et al., 2012). Além do sistema "*white-opaque*", diversos sistemas de *switching*, envolvendo um vasto repertório de morfologias distintas de colônias, têm sido descritos para isolados clínicos de *C. tropicalis* (SOLL, 1992; FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014). Alguns destes estudos, conduzidos por nosso grupo, têm revelado que *switching* fenotípico promove alterações na expressão fenotípica de outros fatores de virulência, incluindo formação de biofilme e capacidade hemolítica, além de alterações na suscetibilidade a antifúngicos (FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014).

França et al. (2011) demonstraram pelo uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) que colônias de *C. tropicalis* derivadas de *switching* apresentam material extracelular fazendo parte de sua arquitetura. Neste mesmo estudo foi sugerido que esta matriz extracelular possa desempenhar papel estrutural na manutenção da forma em colônias estruturadas.

A presença de matriz extracelular é uma característica de biofilmes microbianos, incluindo biofilmes de *Candida* spp. (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2012; SILVA et al., 2009). No entanto, matriz extracelular tem sido também observada em colônias de *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011), e da levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae* (ŠT'OVÍČEK et al., 2010). Št'ovíček et al. (2010) demonstraram que assim como em *Candida* spp., isolados de *S. cerevisiae* formam colônias derivadas de *switching* com diferentes padrões morfológicos quando cultivados em condições ambientais distintas, as quais foram caracterizadas como "*biofilm-like*" por se assemelharem a biofilmes devido a presença de quantidades relevantes de matriz extracelular.

Embora a presença de matriz extracelular em colônias de *C. tropicalis* obtidas de *switching* possa estar associada a manutenção estrutural dessas colônias, a composição típica de matriz proveniente de fenótipos *switch* permanece desconhecida. Neste estudo foram utilizadas colônias de *C. tropicalis* de diferentes padrões morfológicos (padrão liso e padrão estruturado gerado por *switching*) para avaliação da presença e distribuição de matriz extracelular, bem como a presença de dois dos constituintes de matriz extracelular presentes em biofilmes de *C. tropicalis* (carboidrato e proteína).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Isolados de *Candida* e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas colônias do isolado 49.07 (fenótipo parental), exibindo morfologia de colônia lisa (“cúpula lisa”), e de dois fenótipos relacionados que surgiram *in vitro*, por *switching* fenotípico (variante crepe e variante rugoso), e colônias do isolado 100.10 (fenótipo parental), exibindo morfologia de colônia lisa (“cúpula lisa”), e de um fenótipo relacionado que surgiu *in vitro*, por *switching* fenotípico (variante crepe). Os variantes de *switching* foram caracterizados por apresentarem colônias estruturadas (superfície irregular e estruturada), como descrito anteriormente (MORALEZ et al., 2014). Os isolados e variantes foram obtidos a partir de cultura estoque do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos, Universidade Estadual de Londrina-Brasil. As colônias foram obtidas após cultivo em meio YPD padrão solidificado a 28 °C por 96 h.

### 2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de colônias inteiras

Colônias inteiras foram examinadas por MEV após liofilização para propiciar uma melhor preservação da matriz extracelular (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006). Assim, para verificar a ultraestrutura das colônias de isolados parentais e variantes de *switching* de *C. tropicalis*, colônias inteiras foram removidas de placas de YPD solidificado (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose) após um período de incubação de 96 h. As colônias foram fixadas por 18 h a 4 °C em 3,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2.

Posteriormente, as colônias foram imersas em nitrogênio líquido durante 30 segundos e liofilizadas por 2 h a 0.12 mba MPa (Alpha 1-2 LD plus). Em seguida, as colônias foram revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200 em 30 kV.

## **2.3. Composição de matriz de colônia**

### **2.3.1. Amostras**

Após cultivo em YPD solidificado a 28 °C por 96 h, colônias de fenótipos parental (fenótipo liso) e variantes (fenótipos estruturados) foram submetidas à análise de matriz extracelular. A matriz foi extraída como descrito por Azeredo et al. (2003), com modificações.

### **2.3.2. Pré-Tratamento das Amostras**

Previamente ao procedimento de extração, porções de colônias (amostras) foram pré-tratadas com glutaraldeído (GTA). Porções de colônias (0,3 g de peso úmido) de cada um dos fenótipos foram incubadas a 4 °C durante 3h 30 min em 30 ml de glutaraldeído (1,8% GTA). Após este período, as amostras foram centrifugadas a 9000 g durante 10 minutos, foram suspensas novamente em tampão fosfato e centrifugadas novamente. O sedimento celular final foi ressuspensão novamente em tampão de fosfato (PBS).

### **2.3.3. Extração de Matriz**

As suspensões foram sonicadas por 30", 1' e 2'. Os tubos foram mantidos em gelo durante a sonicação. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado (filtro de nitrocelulose, 0.2 µm) e estocado a -20 °C. Os sedimentos celulares foram secos por liofilização para determinação do peso seco de células após a extração da matriz extracelular. Porções de 0,3 g (peso úmido) de células de cada um dos fenótipos (parental e variantes) também foram secos por liofilização para determinação do peso seco controle (peso seco de células não submetidas a extração de matriz). Os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

## 2.4. A análise química da matriz extracelular: carboidratos e proteínas

O conteúdo de carboidratos totais da matriz obtida a partir de colônias foi estimado de acordo com o procedimento de Dubois et al. (1956) utilizando glicose como padrão. O teor de proteínas da matriz foi mensurado empregando o kit BCA (Bicinchoninic Acid, Sigma-Aldrich, St Louis, USA), utilizando albumina soro bovina (BSA) como padrão. Os conteúdos de ambos componentes foram relativizados com o peso seco das colônias.

## 2.5. Análises estatísticas

Os resultados de componentes de matriz foram comparados utilizando One-Way análises de variância (ANOVA) por aplicação do teste de múltiplas comparações, teste de Tukey, com a utilização do software SISVAR (versão 5.4). Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%.

## 3. RESULTADOS

A Fig. 1 mostra o padrão morfológico de colônias de *C. tropicalis* empregadas neste estudo. Para a análise da presença de matriz extracelular em colônias de *C. tropicalis* de padrões morfológicos distintos foram empregadas linhagens de dois sistemas de *switching* fenotípico distintos: isolado 49.07 (parental liso e variantes crepe e rugoso) e isolado 100.10 (parental liso e variante crepe). Dois grupos foram considerados, de acordo com seus padrões morfológicos. O grupo “padrão liso” o qual incluiu os isolados 49.07 e 100.10, apresentando colônias tipicamente lisas, em formato semiesférico durante todo o período de cultivo (Fig. 1 a, b). O grupo "padrão estruturado" foi estabelecido para colônias de morfologia estruturada, apresentando elevações e superfície e bordas irregulares. Este grupo incluiu os variantes de *switching* denominados crepe e rugoso (derivados do isolado 49.07) e variante crepe (derivado do isolado 100.10) (Fig. 1 c-d). Morfologia dos isolados e variantes foi estável sob condições de cultivo empregadas.

### **3.1. Presença e distribuição de matriz extracelular em colônias *switch* de diferentes padrões morfológicos**

Análises ao nível ultraestrutural (MEV) foram realizadas para avaliar as características fenotípicas de colônias de padrões liso e estruturado (Fig. 2 e 3).

Colônias maduras de padrão morfológico liso (isolados 49.07 e 100.10) apresentam superfície regular caracterizada por uma alta densidade celular constituída majoritariamente por células blastoconidiais (Fig. 2 A-D). A presença de matriz extracelular distribuída homogeneamente nas colônias de padrão morfológico liso, como um filme recobrimdo as células, pode ser observada (Fig. 2 E, F).

As análises revelaram que colônias de padrão morfológico estruturado apresentam superfícies irregulares caracterizadas por elevações centrais e periféricas com alta densidade de células filamentosas (hifas e pseudohifas). As colônias dos variantes de *switching* apresentaram grande quantidade de matriz extracelular (Fig. 3), sendo sua distribuição distinta nos diferentes variantes. Em colônias do variante crepe do isolado 49.07 é possível observar a presença de matriz disposta em “lamelas” preenchendo muitas das depressões ao logo de toda superfície da colônia (Fig. 3 B, C). Por outro lado, as colônias dos variantes rugoso (isolado 49.07) (Fig. 3 E, F) e crepe (isolado 100.10) (Fig. 3 H, I) apresentaram um padrão de distribuição de matriz altamente similares. Nessas colônias, a matriz aparece de forma polarizada, arranjada em densas redes semelhantes a “teias” de diferentes espessuras recobrimdo e conectando as células (Fig. 3 E, F, H, I).

### **3.2. Quantificação de componentes de matriz de colônias *switch* de *C. tropicalis***

O pré-tratamento de colônias com glutaraldeído foi realizado para evitar a contaminação da matriz extracelular com conteúdo de eventual lise celular durante as etapas de extração da matriz. Ao final do procedimento de extração foram obtidos 30 ml de matriz em suspensão.

As preparações de matriz obtidas foram avaliadas quanto ao conteúdo de carboidratos totais e proteínas totais por métodos colorimétricos. A tabela 1 apresenta o os valores de carboidratos e proteínas totais presentes na matriz das colônias avaliadas. Os resultados demonstram que colônias com

diferentes padrões estruturais apresentam diferentes quantidades dos dois constituintes de matriz avaliados.

Análises comparativas entre os diferentes fenótipos do isolado 49.07 demonstraram que o conteúdo de carboidratos e proteínas totais presentes em colônias do fenótipo parental liso ( $13,75 \pm 11,05$  mg de carboidrato e  $1,11 \pm 0,26$  mg de proteína/g de peso seco de colônia) não diferiu dos valores obtidos em colônias de seu variante crepe ( $12,50 \pm 6,94$  mg de carboidrato e  $1,49 \pm 0,19$  mg de proteína/g de peso seco de colônia) ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, diferenças significativas foram observadas quando comparados com os valores obtidos para o variante rugoso ( $33,74 \pm 12,47$  mg de carboidrato e  $3,47 \pm 1,42$  mg de proteína/g de peso seco de colônia) ( $P < 0,05$ ). Para este variante, a quantidade de carboidratos totais e de proteínas totais foi 2,45 e 3,12 vezes, respectivamente superiores a da observada para seu parental. Em contraste, entre os diferentes fenótipos do isolado 100.10 (parental e variante crepe) não houve diferenças significativas entre as quantidades de ambos componentes avaliados ( $P > 0,05$ ).

Considerando os diferentes sistemas de *switching*, fenótipos de mesmo padrão estrutural apresentaram diferenças significativas quanto às quantidades dos componentes de matriz avaliados. Colônias de padrão liso do isolado 100.10 apresentaram quantidades de carboidratos totais 2,45 vezes e quantidades de proteínas totais 3,1 vezes superior a colônias do mesmo fenótipo do isolado 49.07 ( $P < 0,05$ ). Diferenças significativas quanto aos conteúdos de carboidratos foram observadas entre colônias de padrão estruturado, entre estes, o variante crepe do isolado 100.10 apresentou quantidades 3,1 vezes superiores às do variante crepe do isolado 49.07 ( $P < 0,05$ ). Quanto aos conteúdos de proteínas totais, diferenças significativas foram observadas entre as colônias do variante rugoso (isolado 49.07) que foram 1,9 e 2,5 vezes superiores aos de colônias dos variantes de morfologia crepe dos isolados 49.07 e 100.10, respectivamente ( $P < 0,05$ ).

Em análise geral, as maiores quantidades de carboidratos e proteínas totais foram obtidas a partir de matriz extraída de colônias de padrão estruturado. O variante crepe (isolado 100.10) apresentou a maior quantidade de carboidratos totais entre todos os fenótipos avaliados e o variante rugoso (isolado 49.07) apresentou a maior quantidade de proteínas totais entre os demais fenótipos avaliados.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise de colônias ao nível de ultraestrutura permitiu identificar a presença de matriz extracelular em colônias de diferentes padrões morfológicos, incluindo fenótipos padrão liso (linhagens parentais) e padrão estruturado (variantes de *switching*). Matriz extracelular foi observada em colônias de todos os morfotipos avaliados, no entanto, foi possível observar diferenças quanto a sua distribuição nos dois padrões morfológicos de colônia. As colônias de padrão liso apresentam um filme de matriz recobrendo as células (Fig. 2), já as colônias de morfologia estruturada apresentam redes densas de matriz distribuídas desigualmente entre as células (Fig. 3).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo foi levantada a hipótese de que a presença de matriz extracelular em colônias estruturadas de variantes derivados de *switching* possa estar relacionada com a manutenção da forma e arquitetura dessas colônias (FRANÇA et al., 2010). No presente estudo, a microscopia eletrônica de varredura revelou forte associação entre o padrão de distribuição do material celular e a estruturação das colônias. Para *S. cerevisiae*, a formação de colônias estruturadas está relacionada a presença de quantidades abundantes de matriz extracelular (ŠT'OVÍČEK et al., 2010).

A composição de matriz de biofilmes de *C. tropicalis* já foi previamente caracterizada (AL-FATTANI et al., 2006; SILVA et al., 2009); diferentemente, até o presente momento, não há dados relativos aos constituintes de matriz extracelular obtida de colônias de *C. tropicalis*, em particular, de colônias provenientes de *switching* fenotípico.

Polissacarídeos estão frequentemente entre os principais componentes de material extracelular produzida por micro-organismos. Segundo a literatura, matriz de biofilmes de *C. tropicalis* são constituídos por quantidades moderadas de carboidratos e proteínas totais comparativamente a biofilmes formados por *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (SILVA et al., 2009). Outros estudos apontam que matriz de biofilme de *C. tropicalis* é majoritariamente composta por açúcares aaminados (AL-FATTANI et al., 2006).

Considerando a escassez de informação relativa a material extracelular presente em colônias de leveduras, particularmente de *C. tropicalis*, no presente estudo foi realizada a obtenção desse material a partir de colônias que

apresentam diferentes padrões de estruturação morfológica (padrão liso e padrão estruturado) e avaliação do seu conteúdo de carboidratos totais e proteínas totais.

Os conteúdos de ambos componentes avaliados foram encontrados em quantidades moderadas, concordantemente a relatos anteriores que avaliaram a presença destes componentes em matriz de biofilmes de *C. tropicalis*. No entanto, as quantidades de carboidratos e proteínas totais foram variáveis entre isolados, assim como previamente observados em biofilmes desta espécie (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006, SILVA et al., 2009). A relação entre morfologia de colônia de variantes de *switching* de *Candida* spp. e os tipos celulares que as constituem já foi anteriormente descrita (MORALEZ et al., 2014; RADFORD, CHALLACOMBE & WALTER (1994). No entanto, a relação entre diferenças morfológicas e composição de matriz em colônias de *Candida* spp. é desconhecida.

No presente estudo, os dados relativos as diferenças observadas para os conteúdos de carboidratos e proteínas presentes na matriz de colônias diferentemente estruturadas podem reforçar a hipótese de que este material extracelular possa estar envolvido na manutenção da arquitetura dessas colônias de morfologias distintas em *C. tropicalis*. No entanto, estes dados não são conclusivos, uma vez que colônias de mesmo padrão morfológico (parentais lisos) de isolados distintos (49.07 e 100.10) apresentaram quantidades de carboidratos totais significativamente diferentes. Da mesma forma, foram observadas diferenças quanto as quantidades de proteínas totais entre colônias de padrão estruturado altamente semelhantes de isolados distintos (variante rugoso-49.07) e (variante crepe-100.10). Nossos dados sugerem que os conteúdos de carboidratos e proteínas totais em matriz de colônias variantes derivadas de *switching* de *C. tropicalis* não são os fatores determinantes associados a arquitetura dessas colônias.

Em conclusão, o padrão de distribuição de material extracelular em colônias de *C. tropicalis* é variável e parece estar associado a complexidade estrutural dessas colônias. Não houve correlação entre a quantidade dos componentes de matriz avaliados (carboidrato e proteína) e a complexidade de morfologia de colônias. É especialmente importante ressaltar, que estudos futuros são necessários para acessar os possíveis fatores que atuam diretamente na arquitetura de diferentes padrões morfológicos de colônias de *C. tropicalis* originárias de *switching*.

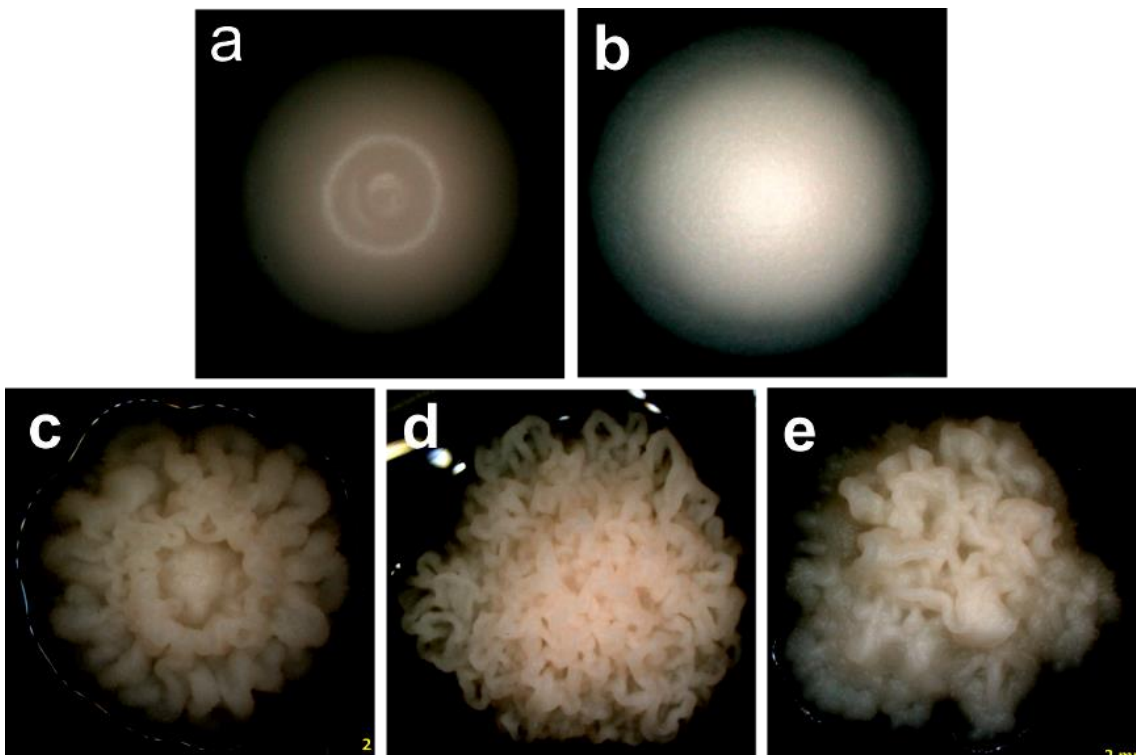
## REFERÊNCIAS

- 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. 99-1008, 2006.
- BASSETTI, M.; MERELLI, M.; ANSALDI, F.; de FLORENTIIS, D.; SARTOR, A.; SCARPARO, C.; CALLEGARI, A.; RIGHI, E. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. **Plos One**, v. 10, e0127534, 2015.
- 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. 53855394, 2001.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA 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.
- 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.
- DUBOIS, M. K. A.; GILLES, J. K.; HAMILTON, P. A.; REBERS, & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FLEMMING, H-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7945-7947, 2007.
- FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypes switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011.
- HORN, DAVID L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p.1695–703. 2009.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. Phenotypic switching in fungi, **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.
- JONES, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. **Molecular Microbiology**, v.92, p.383-398, 2014.
- MANCERA, E.; PORMAN, A. M.; CUOMO, C. A.; BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Finding a Missing Gene: EFG1 Regulates Morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3: Genes | Genomes | Genetics**, v. 5, p. 849-856, 2015.

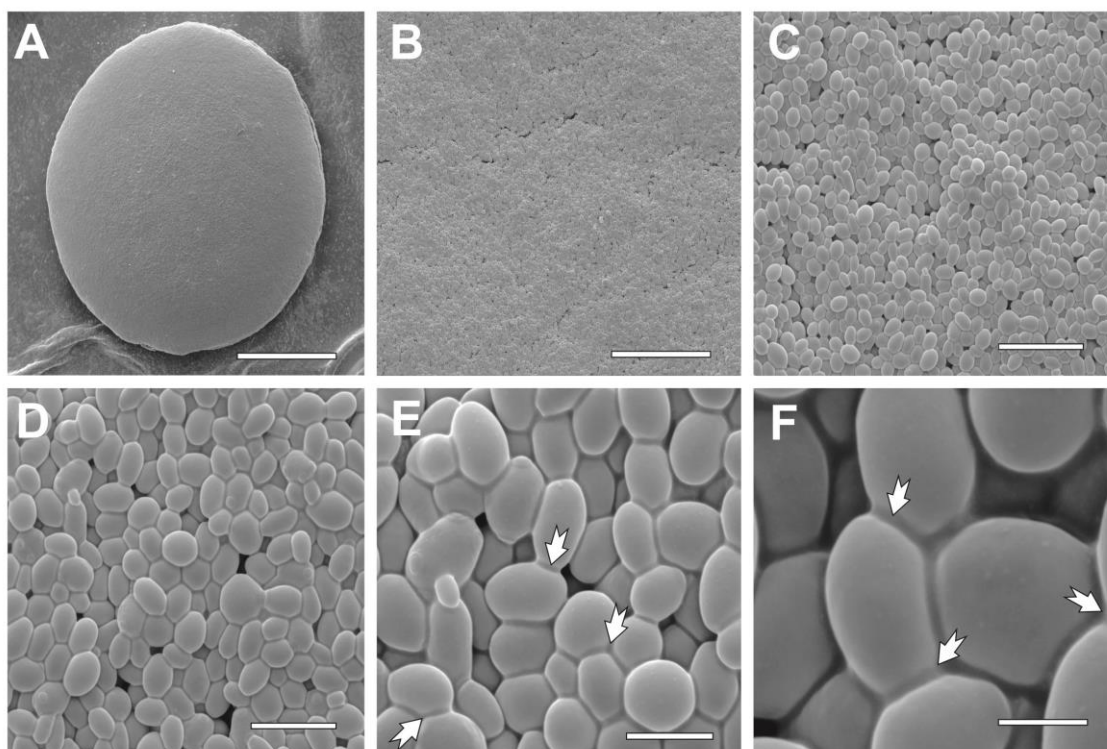
- MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 1-9, 2014.
- PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **Plos Pathogen**, v. 9, p. e1003550, 2013.
- 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. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3-S13, 2012.
- PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. 2014. **Plos One**, v. 9, p. e10510, 2014.
- POLVI, E. J.; LI, X.; O'MEARA, T. R.; LEACH, M. D.; & COWEN, L. E. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, p.2261-2287, 2015.
- PORMAN, A. M., ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.21158-21163, 2011.
- PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M. P.; JONES, S. K.; WANH, N.; NENNETT, R. J. MTL-Independent Phenotypic Switching in *Candida tropicalis* and a Dual Role for Wor1 in Regulating Switching and Filamentation. **Plos Genetics**, v.9, p.e1003369, 2013.
- RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 416-423, 1994.
- RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, 2012, 528521.
- 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

- SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v.47, p.681–689, 2009.
- SIPSAS, N. V.; LEWIS, R. E.; TARRAND, J.; HACHEM, R.; ROLSTON, K. V.; RAAD, I. I.; & KONTOYIANNIS, D. P. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007). **Cancer**, v.115, p.4745-4752, 2009.
- SOLL.D.R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p.183-203, 1992.
- SOLL, D. R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, p. 22993, 2014.
- ŠT'OVÍČEK, V.; VÁCHOVÁ, L.; KUTHAN, M.; PLAKOVÁ, Z. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeasts colonies. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 1012-122, 2010.
- XIE, J.; DU, H.; GUAN, G.; TONG, Y.; KOURKOUMPETIS, T. K.; ZHANG, L.; BAI, F.Y.; HUANG, G. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic Cell**, v.11, p.773-782, 2012.

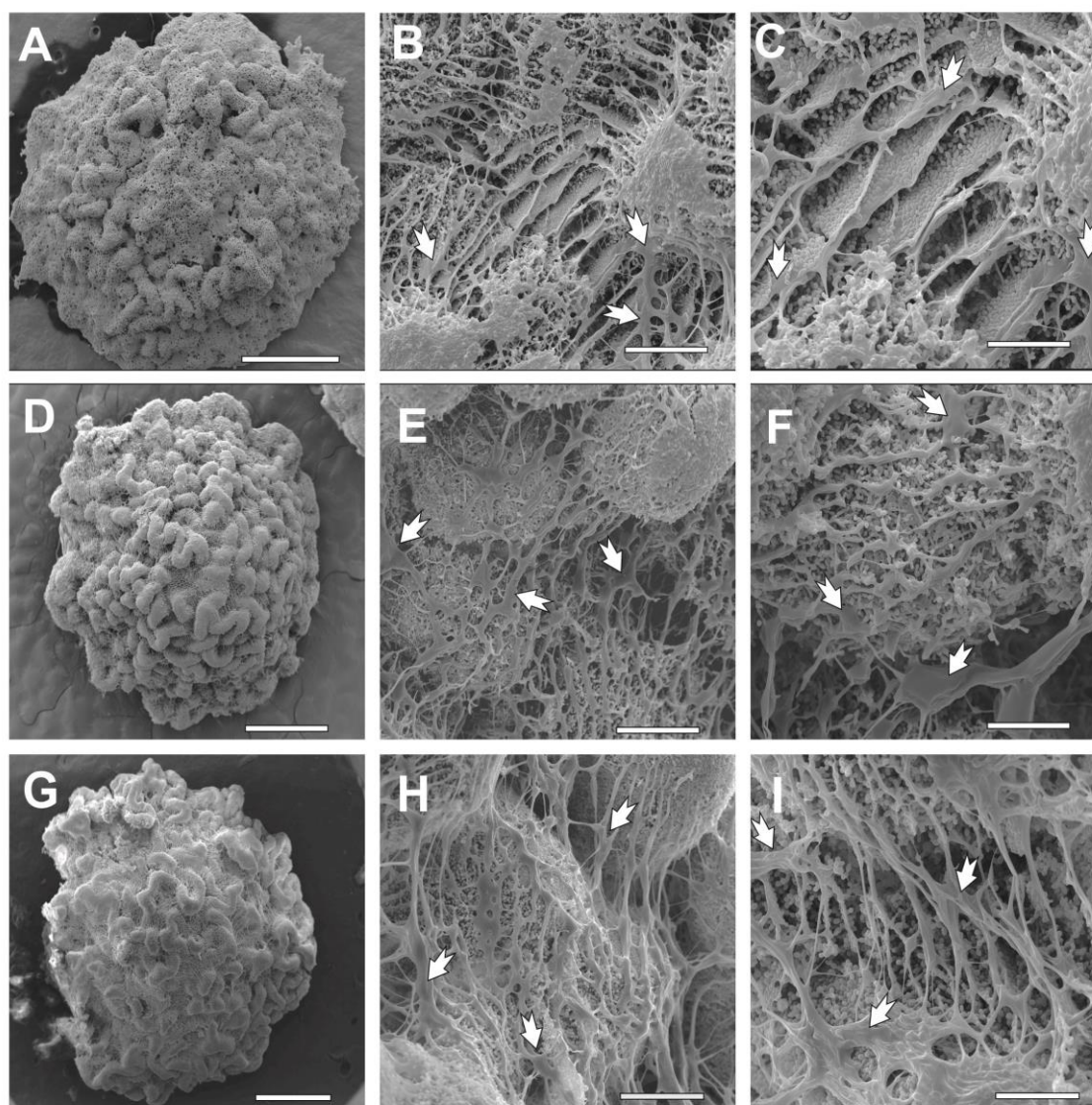
## FIGURAS



**Figura 1.** Padrões morfológicos de colônias de *C. tropicalis*. Colônias de padrão liso de fenótipos parentais: (a) isolado 49.07, (b) isolado 100.10; Colônias de padrão estruturado de fenótipos variantes (c) variante crepe/isolado 49.07, (d) variante rugoso/isolado 49.07 e (e) variante crepe/isolado 100.10. Colônias foram fotografadas em aumento de 2 x.



**Figura 2.** Padrão ultraestrutural de colônias de padrão liso após cultivo de 96 h a 28 °C de em YPD solidificado. (A) Superfície de colônia de fenótipo parental liso, (B, C, D E, F) células de colônia de fenótipo parental liso. Escala das barras: 1mm (A); 100 µm (B); 20 µm (C); 10 µm (D); 5 µm (E) e 2 µm (F).



**Figura 3** Padrão ultraestrutural de colônias de padrão estruturado após cultivo de 96 h a 28 °C em YPD solidificado. (A) Superfície de colônia de fenótipo variante crepe/isolado 49.07; (B e C) matriz extracelular em colônias de fenótipo variante crepe/isolado 49.07; (D) superfície de colônia de fenótipo variante rugoso/isolado 49.07; (E e F) matriz extracelular em colônias de fenótipo variante rugoso/isolado 49.07; (G) superfície de colônia de fenótipo variante crepe/isolado 100.10; (H e I) matriz extracelular em colônias de fenótipo variante rugoso/isolado 100.10. Escala das barras: 1 mm (A, D, G); 100  $\mu$ m (B, E, H) e 50  $\mu$ m (C, F, I).

**Tabela 1** Composição de matriz de colônias de *Candida tropicalis* em termos de quantidades de carboidratos e proteínas totais.

Componentes de matriz extracelular (mg/g peso seco de colônia)			
Isolados	Morfotipos (fenótipos)	Quantidade de Carboidrato (mg carboidrato/g colônia)	Quantidade de Proteína (mg proteína/g colônia)
49.07	Liso	13,75±11,05	1,11±0,26
	Crepe	12,50±6,94	1,49±0,19
	Rugoso	33,74±12,47*	3,47±1,42*+
100.10	Liso	34,32±0,48	1,80±0,11
	Crepe	39,37±15,99+	1,38±0,22

Valores médios ± desvio padrão de carboidratos (mg carboidratos/g de peso seco de colônia) e proteínas totais (mg proteínas/g de peso seco de colônia).

(\*)  $P < 0,05$ : quando comparados fenótipos diferentes em um mesmo isolado.

(+)  $P < 0,05$ : quando comparados padrões morfológicos de colônias entre diferentes isolados.