



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Fernando César Bizerra

**Características da formação do biofilme de
Candida tropicalis e resistência a
antifúngicos**

Londrina
2006

Fernando César Bizerra

**Características da formação do biofilme de
Candida tropicalis e resistência a
antifúngicos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta.

**Londrina
2006**

Bizerra, Fernando César

Características da formação do biofilme de *Candida tropicalis* e resistência a antifúngicos. Fernando César Bizerra – Londrina, 2006.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Microbiologia. Pós-graduação em Microbiologia.

Título em Inglês: Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance.

1. *Candida tropicalis*;
2. Biofilme;
3. Resistência;
4. Fluconazol;
5. Anfotericina B.

Fernando César Bizerra

**Características da formação do biofilme de
Candida tropicalis e resistência a
antifúngicos**

Banca Examinadora:

Profª Drª Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Andréa Rodrigues Ávila
Instituto de Biologia Molecular do
Paraná. Fundação Instituto Oswaldo
Cruz.

Londrina, 15 de Setembro de 2006.

Dedico este trabalho à minha família, que em nenhum momento deixou de acreditar em mim e sempre esteve presente em todos os momentos.

Agradecimentos

À minha família, meu pai Manoel Pedro Bizerra, minha mãe Vera Lúcia Bizerra, meu irmão Flávio Augusto Bizerra, minha irmã Cintia Maria Bizerra, minha cunhada Luciana Cristina Messagi Bizerra e minha querida sobrinha Luana Beatriz Messagi Bizerra, por todo incentivo, paciência e, principalmente, por todo amor que me foi dado, elementos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e conquista deste momento único.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela confiança em mim depositada e pelo valioso aprendizado, levarei comigo toda essa experiência pelo resto de minha vida.

À Prof^a Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo e Prof^a Dr^a Andréa Rodrigues Ávila, pela participação da Banca Examinadora e ajuda na correção de todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela contribuição e apoio nos experimentos de microscopia eletrônica os quais tornaram possível o bom andamento e sucesso desta etapa.

A Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto pela troca de experiência, apoio sempre prestados e principalmente por nossa grande amizade.

Aos companheiros e amigos do laboratório: Erika Izumi, Fábio Hidalgo, Graziela Navarro, Janaína Ferro, Natália S. Botelho, Paulo R. C. Correa, Tatiana A. C. B. Souza, Vanessa Di Raimo, Viviane K. Graça de Souza, pela amizade e companheirismo que, de forma direta ou indireta, muito me ajudaram nesta realização.

Aos colegas do Mestrado em Microbiologia: Luís Gustavo (Guga), Letícia, Alessandra Motta (Lela), Alessandra Cristina, Raquel, Paulo, Kathelin, Erika, Ariane, Marcelo Carneiro, Marcelo Tempesta, Leandro, Nádia, Mariana, pela convivência durante as disciplinas e entre os corredores do CCB, mas principalmente pelos momentos de descontração durante os inúmeros churrascos realizados durante nosso curso.

Às minhas grandes amigas Renata Cristina Picão e Tharcila Chaves, por todos os momentos de entusiasmo, partilha e alegria, nossa amizade é eterna.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo aprendizado e experiências trocadas não somente durante as disciplinas do Mestrado, como também no dia-a-dia nos laboratórios da UEL.

Ao João Alexandre Lopes e Marinalva Moreira dos Santos da Secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia e Secretaria do Departamento de Microbiologia, respectivamente, pelo auxílio durante todos os processos necessários para realização desse trabalho.

A todos, mesmo aqueles, cujo nome não esteja presente aqui, saibam da sua importância em cada fase da minha vida durante essa longa e difícil caminhada...

... o meu sincero MUITO OBRIGADO!

"Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos; nossa inteligência, emperdenidos e cruéis. Pensamos em demasia e sentimos bem pouco. Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que de inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas duas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido."

Charles Chaplin

BIZERRA, F.C. **Características da formação do biofilme de *Candida tropicalis* e resistência a antifúngicos**. Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, 2006.

RESUMO

Candida tropicalis é um dos principais agentes de candidíase, destacando-se em casos de infecções da corrente sanguínea e urinária em pacientes hospitalizados. Grande parte das infecções por *Candida* spp. estão associadas com a formação de biofilme na superfície de materiais médicos ou epitélio do hospedeiro. As células sésseis que constituem o biofilme apresentam fenótipos drasticamente diferentes das células planctônicas, tais como resistência aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro que são de importância do ponto de vista clínico. Nesse trabalho, analisamos as características *in vitro* do biofilme de *C. tropicalis*. O ensaio de redução do sal XTT-tetrazolium foi utilizado para monitorar a atividade metabólica das células sésseis durante as etapas de desenvolvimento do biofilme. Os resultados mostraram que a atividade metabólica foi crescente até o período de 24 horas mantendo-se estável até o período de 48 horas, sendo proporcional à camada de biofilme formada. Através de microscopia eletrônica de varredura analisamos a estrutura do biofilme. Nas primeiras horas as células encontraram-se aderidas à superfície com presença de leveduras e pseudo-hifas. Após 24 horas de formação, foi detectada uma densa camada celular composta por leveduras e estruturas filamentosas. O teste de suscetibilidade ao fluconazol e anfotericina B mostrou o aumento da resistência das células sésseis.

Palavras chave: *Candida tropicalis*, biofilme, resistência, fluconazol, anfotericina B.

ABSTRACT

Candida tropicalis is a common non-*albicans* species related to nosocomial candidemia and candiduria. Most of *Candida* spp. infections are associated with biofilm formation on the implanted medical devices or host epithelial cells surfaces. Sessile cells display phenotypic traits dramatically different from their free-living planktonic counterparts, such as increased resistance to antimicrobial agents and host defenses. Here, we describe the characteristics of *C. tropicalis* biofilm formation *in vitro*. The XTT-reduction assay was used to monitor metabolic activities of the sessile cells during the biofilm development. Raising metabolic activity was observed until 24 h of biofilm formation and this activity showed a linear relationship with sessile cellular density. Scanning electron microscopy was used to further characterize *C. tropicalis* biofilms. The initial adherence of yeast cells was followed by germination, micro-colony formation, filamentation and maturation over 24 to 48h. Mature biofilms consisted of a dense network of yeast cells and filamentous forms of *C. tropicalis*. Increased resistance of sessile cells against fluconazole and amphotericin B was also demonstrated.

Keywords: *Candida tropicalis*, biofilm, resistance, fluconazole, amphotericin B.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Gênero <i>Candida</i>	01
1.2. <i>Candida tropicalis</i>	09
1.3. Formação de biofilme por <i>Candida</i> spp.....	12
1.3.1. Importância clínica do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	18
1.3.1.1. Infecções por <i>Candida</i> spp relacionadas à formação de biofilme.....	18
1.3.1.2. Resistência do biofilme de <i>Candida</i> spp aos antimicrobianos.....	20
1.3.1.3. Expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento do biofilme.....	23
2. OBJETIVOS	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4. ANEXO: Artigo	I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Candida*

Há aproximadamente 30 anos, somente algumas espécies de *Candida* eram conhecidas e estavam associadas a infecções humanas. Contudo, mais recentemente o número de espécies emergentes (cerca de 20 espécies) relacionadas a infecções humanas aumentou consideravelmente (GUARRO *et al.*, 1999).

Entre as principais espécies de interesse clínico estão: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guillhermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas envolvendo o isolamento de *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua* e outras têm sido descrito (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Algumas espécies do gênero *Candida* apresentam a habilidade de alterar sua forma de crescimento unicelular leveduriforme para forma filamentosa (FIGURA 1). Essa alteração morfológica, denominada dimorfismo ou morfogênese, pode ser induzida por determinadas condições ambientais, tais como: temperatura; pH do meio; e presença de soro (WEIG *et al.*, 1998; NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 2001; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; PÉREZ-MARTIN, 2001).



Figura 1: Microscopia óptica de *C. albicans*, obtida de fluido vaginal de paciente com vulvovaginite, visualizado através da coloração de Gram. Presença de formas leveduriformes (→) e filamentosas (→).
Fonte: www.sciencephotolibrarys.com.

Algumas espécies ainda são capazes de formar pseudo-hifas, originadas a partir de brotamentos de leveduras que não se desligaram da célula-mãe, formando uma cadeia de células (CSANK; HAYNES, 2000; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; PÉREZ-MARTIN, 2001; HORNBY *et al.*, 2004). *C. albicans* é a espécie mais polimórfica, podendo apresentar-se sob diversas morfologias, como leveduras, hifas, pseudo-hifas e tubo germinativo. O tubo germinativo é o estágio inicial da transição entre a forma de levedura e hifas (SUDBERY *et al.*, 2004) e pode ser empregada como um critério preliminar para diferenciar *C. albicans* das espécies não-*albicans*.

As espécies do gênero *Candida* possuem a habilidade de colonizar diversos sítios anatômicos do corpo humano, incluindo o trato gastrointestinal, bem como o epitélio vaginal de indivíduos saudáveis e podem inclusive atingir altas densidades celulares sem causar sintomas de infecção. Contudo, essas leveduras são patógenos oportunistas, ou seja, requerem alguma disfunção do hospedeiro para causar doença (CALDERONE; FONZI, 2001; SOLL, 2002).

Embora sejam comensais, essas leveduras possuem alguns fatores que contribuem para promoção da infecção: a) reprodução relativamente rápida; b) capacidade de adesão ao epitélio do hospedeiro e materiais médicos implantados; c) alteração morfológica (morfogênese); d) mudança fenotípica (*switching* fenotípico); e) produção de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e fosfolipases (STAIB *et al.*, 2000; HAYNES, 2001). Diferenças na expressão desses fatores têm sido descritas durante infecções em sítios anatômicos distintos (HUBE, 2004), bem como entre espécies diferentes (HAYNES, 2001).

O evento inicial na patogênese das doenças infecciosas é a adesão microbiana aos tecidos do hospedeiro. Alguns microrganismos permanecem aderidos à superfície epitelial enquanto outros promovem a invasão tecidual. Vários estudos associam a capacidade de adesão de *Candida* spp. como um importante fator de virulência (BAILEY *et al.*, 1995; CORMACK *et al.*, 1999; SUNDSTROM, 2002; PENDRAK *et al.*, 2004). *C. albicans* é capaz de aderir às células epiteliais e endoteliais, fatores solúveis, como colágeno e fibrinogênio, matriz extracelular de células do hospedeiro como fibronectina e laminina, além de materiais inertes implantados no corpo do hospedeiro (CALDERONE; BRAUN, 1991; CHAFFIN *et al.*, 1998; HAYNES, 2001). Diversos genes que codificam proteínas que participam do processo de adesão já foram identificados, como por exemplo: *ALS1p* – *agglutininin-like sequence proteins* (FU *et al.*, 1998); *INT1p* – *'integrin'-like protein* (GALE *et al.*, 1998); *MNT1p* – *Type 1 mannosyl transferase* (BUURMAN *et al.*, 1998).

Os eventos que ocorrem após a adesão do fungo às células do hospedeiro não são completamente conhecidos. Provavelmente, a conversão

das formas leveduriformes para hifas e pseudo-hifas e a secreção de enzimas hidrolíticas promovem a invasão dos tecidos subepitelial e subendotelial, atingindo o compartimento vascular. Várias observações sugerem a morfogênese como fator de virulência de *C. albicans*, tais como: os tubos germinativos são mais aderentes às células de mamíferos quando comparadas às formas leveduriformes (STAAB, *et al.*, 1999); as formas filamentosas são mais resistentes à lise pelos macrófagos (LO *et al.*, 1997); para a maioria dos fungos dimórficos, as formas filamentosas parecem favorecer a invasão tecidual do hospedeiro (GOW *et al.*, 2002); a inativação de genes que participam do processo de filamentação diminui a virulência do fungo em modelos animais (BRAUN; JOHNSON, 1997; GALE *et al.*, 1998); e a formação de filamentos é estimulada a 37 °C em presença de soro e em pH 7,0, condições que mimetizam o ambiente humano. Outro tipo de resposta que ocorre após a adesão é a formação de biofilme que será discutido posteriormente.

Switching fenotípico é um evento que pode ser visualizado pela alteração da morfologia de colônia e da superfície celular de *C. albicans*. A participação do *switching* fenotípico na virulência de *C. albicans* é inferida através de estudos com amostras de fungos isoladas de processos infecciosos ou modelos animais de infecção experimental. Isolados clínicos de candidíase de mucosa vaginal (SOLL *et al.*, 1987; 1989) ou oral (VARGAS *et al.*, 2000) e candidíase sistêmica (JONES *et al.*, 1994) apresentam alta frequência de *switching*. Além disso, mudanças na propriedade de adesão, expressão de antígenos, atividade de proteases, morfogênese e afinidade a tecidos acompanham o fenômeno de *switching* (CALDERONE; FONZI, 2001).

A ação das enzimas hidrolíticas de microrganismos, durante o estado patogênico, parece estar relacionada com a degradação e invasão das células e tecidos do hospedeiro. Nesse sentido, danos teciduais e celulares nos sítios onde se encontram esses microrganismos são características de muitas infecções fúngicas (VAN BURIK; MAGEE, 2001). Essas enzimas também são importantes durante o processo de evasão do sistema imune do hospedeiro (IBRAHIM *et al.*, 1995; NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 2001; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). Entre os fatores que contribuem para esse processo estão as fosfolipases e proteases.

A atividade de fosfolipase como fator de virulência foi mostrada para alguns quadros de candidíase invasiva. Ibrahim *et al.* (1995) mostraram que isolados sanguíneos de *C. albicans* apresentavam maior atividade de fosfolipase, e esta estava associada à capacidade de invasão da mucosa do local infectado e disseminação hematogênica. Além disso, foi observada maior taxa de mortalidade de camundongos infectados com esses isolados.

Quatro tipos de fosfolipases (PI) foram identificadas em *C. albicans*, PIA, PIB, PIC e PID, mas somente PIB parece estar relacionado à virulência. Leidich *et al.* (1998) mostraram que mutantes para o gene *PLB1* apresentavam habilidade diminuída para invasão tecidual, sugerindo dessa forma, que a produção de PLB1 contribui para a patogenicidade de *C. albicans*. Em espécies não-*albicans*, também foi detectada a presença de atividade de fosfolipase *in vitro* (DAGDEVIREN *et al.*, 2005; FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005).

As aspartil proteases secretadas (“Sap: secreted aspartyl proteinase”) são as principais responsáveis pela atividade proteolítica extracelular de *C.*

albicans. A família das Saps é composta por 10 genes (SAP1-10). Os produtos da expressão desses genes diferem em relação ao pH ótimo de atividade, estabilidade termal e na cinética de expressão. Esse conjunto de genes, que expressam diferentes Saps, permite que *C. albicans* persista em diferentes superfícies e tecidos do hospedeiro e resista aos mecanismos de defesa do mesmo (HUBE *et al.*, 2004). A presença das Saps não é limitada a *C. albicans*, sua presença já foi mostrada em *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* (PICHOVÁ *et al.*, 2001).

As infecções causadas por *Candida* spp. podem ser divididas em duas classes principais: infecção superficial e sistêmica. A candidíase superficial (mucosa ou cutânea) resulta quando há um desequilíbrio nas condições locais e ocorre um aumento no número de células fúngicas, causando danos ou invasão do epitélio local. As infecções de mucosa são mais freqüentes na cavidade oral (orofaringe - “sapinho” e esôfago – esofagite) e vaginal (vaginite).

O isolamento de *Candida* spp. de amostras de fluido vaginal é um achado muito freqüente. Estima-se que em cerca de 20% das mulheres assintomáticas durante a fase reprodutiva, seja possível isolar *Candida* spp., ocorrendo um acentuado declínio após a menopausa (FERRER, 2000).

A principal fonte de candidíase vulvovaginal (CVV) é o trato gastrointestinal, de onde as leveduras são transportadas até a vagina por auto-contaminação (FIDEL; SOBEL, 1996). Estimativas apontam que cerca de 75% de todas as mulheres terão ao menos um episódio de CVV durante a vida e aproximadamente metade delas sofrerão um segundo evento. Além disso, 5%

dos casos desenvolverão quadros recorrentes, ocorrendo episódios freqüentes e refratários ao tratamento (SOBEL, 1999; FERRER, 2000).

A candidíase oral é relatada principalmente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esse quadro de candidíase está relacionado principalmente a imuno-deficiência estabelecida pela infecção viral. O quadro clínico nesses indivíduos apresenta uma severidade incomum, podendo ocorrer cronicidade e manifestações recorrentes (OLLERT *et al.*, 1995; ANIL *et al.*, 2001).

Entre as infecções sistêmicas por *Candida* spp. vale salientar a infecção da corrente sangüínea e acometimento de órgãos como resultado da disseminação hematogênica das leveduras (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Geralmente essas complicações são documentadas em pacientes que possuem fatores de risco importantes, como longo período de internação, tratamento quimioterápico, imunodeficiência, antibioticoterapia e uso de cateter venoso central (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; AQUINO *et al.*, 2005). A ocorrência de candidemia aumentou substancialmente nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, no início dos anos 80, *Candida* spp. apresentava-se como o sétimo patógeno mais freqüente, já nos anos 90 foi responsável por cerca de 8% das infecções da corrente sanguínea, sendo considerada a quarta principal causa dessa infecção (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A principal espécie isolada em diferentes amostras clínicas ainda é *C. albicans*, no entanto, nota-se um aumento de isolados de espécies não-*albicans*. A razão para o aumento de casos de candidíase causada por *C. não-albicans* ainda é obscura. Contudo, a menor sensibilidade dessas espécies aos

agentes antifúngicos de uso clínico parece ser parcialmente responsável por esse quadro (COLLIN *et al.*, 1999). Além disso, pode ser observado um aumento de infecções recorrentes causadas por *Candida* spp. associadas com o crescente uso de antifúngicos, provavelmente como resultado da seleção de cepas resistentes (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002). De fato, o uso indiscriminado dos derivados azólicos tem sido identificado como a maior causa para a diminuição da suscetibilidade de isolados clínicos de várias espécies de fungos (MIYAZAKI *et al.*, 1998). É provável que o desenvolvimento de resistência a esses agentes seja um processo gradual resultante de alterações seqüenciais devido à contínua pressão exercida pelo antifúngico durante o uso prolongado e indiscriminado (FRANZ *et al.*, 1998; CANUTO; RODERO, 2002).

Até o momento, três mecanismos principais de resistência aos derivados azólicos foram descritos em *C. albicans* e *C. glabrata*: a) falha no acúmulo intracelular da droga; b) produção aumentada da enzima alvo, lanosterol 14- α -demetilase, ou Erg11, que participa da biossíntese do ergosterol (WHITE, 1997; PEREA *et al.*, 2001); c) mutações pontuais no gene *ERG11*, cujo produto apresenta afinidade reduzida aos azólicos (GEBER *et al.*, 1995; FRANZ *et al.*, 1998; MARICHAL *et al.*, 1997; SANGLARD *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 2002). O primeiro mecanismo pode ser causado por uma dificuldade de penetração da droga devido a mudanças nos lipídeos e esteróis de membrana. Além da ação de efluxo dos antifúngicos, resultado do aumento da expressão dos genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida* drug resistance), que codificam membros da superfamília de transportadores ligados ao ATP (transportadores ABC: "ATP binding cassette"), efetivo contra muitas drogas azólicas, ou *MDR1* (multiple

drug resistance), pertencente à superfamília dos facilitadores principais específico para fluconazol (ALBERTSON *et al.*, 1996; FRANZ *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 2002; SANGLARD *et al.*, 1997).

1.2. *Candida tropicalis*

C. tropicalis é um microrganismo oportunista encontrado no ambiente (PETERS *et al.*, 2000) e como comensal em vários locais do corpo humano (KAM; XU, 2002; SOLL, 2002). Contudo, constitui-se em uma das espécies não-*albicans* isoladas com maior frequência em amostras clínicas.

Em geral, vários fatores predisponentes têm sido associados a infecções por *C. tropicalis*, sendo os mais frequentes: neutropenia; uso prolongado de antibióticos de largo espectro; e danos na mucosa gastrintestinal.

Vários autores relatam uma maior frequência de candidemia causada por *C. tropicalis*, principalmente em pacientes apresentando distúrbios hematológicos como neutropenia, leucemia aguda ou que sofreram transplante de medula óssea (WEINBERGER *et al.*, 2005; GOLDANI; MÁRIO, 2003; LEUNG *et al.*, 2002; MATHEWS *et al.*, 2001; VIGOUROUX *et al.*, 2006; HAJJEH *et al.*, 2004; KONTOYIANNIS *et al.*, 2001). Surtos de candidemia em unidades de terapia intensiva neonatal provocados por *C. tropicalis* têm sido relatados (ROILIDES *et al.*, 2003).

Em países da América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é bastante frequente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia nos

principais hospitais públicos (COLOMBO *et al.*, 1999; GODOY *et al.*, 2003; GOLDANI; MÁRIO, 2003).

C. tropicalis é a terceira espécie de *Candida* mais frequentemente isolada de culturas de urina (KAUFFMAN *et al.*, 2000; ALVAREZ-LERMA *et al.*, 2003). Em 1998, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP, no Brasil, 53% dos casos de candidúria foram causados por *C. tropicalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Além disso, *C. tropicalis* também tem sido relacionada a surtos de infecção urinária em Unidade de Terapia Intensiva (JANG *et al.*, 2005; RHO *et al.*, 2004). Como fatores de risco para o desenvolvimento de candidúria, destacam-se o uso de cateter urinário e antibioticoterapia por período prolongado (RICHARDS *et al.*, 1999; KAUFFMAN *et al.*, 2000; ÁLVAREZ-LERMA *et al.*, 2003).

Dois fatores importantes corroboram a importância clínica de *C. tropicalis*: a) alta taxa de mortalidade dos pacientes infectados, mesmo quando o microrganismo é sensível aos agentes antimicrobianos (GOLDANI; MÁRIO, 2003; LEUNG *et al.*, 2002; WEINBERGER *et al.*, 2005); b) *C. tropicalis* normalmente é sensível a anfotericina B e a grande maioria dos derivados azólicos, mas é freqüentemente resistente a flucitosina (KRCMERY; BARNES, 2002). Contudo, tem aumentado o número de isolados resistentes ao fluconazol (WINGARD, 1995; HAJJEH *et al.*, 2004; MYOKEN *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004). Além disso, a resistência ao fluconazol pode ser induzida *in vitro* e esta foi correlacionada com o aumento da expressão de um gene homólogo a *CDR1* de *C. albicans* e *CtMDR1* de *C. tropicalis*, ambos associados ao efluxo de drogas (BARCHIESI *et al.*, 2000).

Mais recentemente, Vandeputte *et al.* (2005) mostraram que em isolados resistentes de *C. tropicalis* não houve alteração nos níveis de expressão do gene CtMDR1. Contudo, um aumento da expressão do gene CtERG11, bem como a presença de uma mutação pontual observada na seqüência nucleotídica desse gene, contribuíram para a resistência ao fluconazol.

C. tropicalis é considerada uma das espécies mais virulentas após *C. albicans*, possuindo alguns determinantes de virulência importantes, tais como: atividade de fosfolipase *in vitro* (ANIL; SAMARANAYAKE, 2003); atividade de Sap *in vitro* em meio contendo apenas soro-albumina bovina (BSA) como fonte de nitrogênio. A presença de Sap em *C. tropicalis* tem sido mostrada na superfície de células fúngicas durante invasão do tecido do hospedeiro, bem como para evasão da atividade microbicida de macrófagos (BORG *et al.*, 1988; BORG *et al.*, 1990). Quatro genes SAPt (SAPT1-4) já foram descritos em *C. tropicalis* (ZAUGG *et al.*, 2001).

A identificação de *C. tropicalis* pode ser realizada através de métodos convencionais (TABELA 1) baseados na micromorfologia celular, assimilação de açúcares e testes de fermentação (KURTZMAN & FELL, 1998).

Tabela 1: Testes utilizados para identificação de *C. tropicalis*. Fonte: Kurtzman & Fell, 1998, modificado.

Teste		Cel	Gal	Gli	Ino	Lac	Mal	Mel	Raf	Sac	Tre	Xil
CHROMAagar®	Colônias azuis											
Tubo germinativo	Ausente											
Formação de clamidoconídeos	Ausente											
Fermentação		NA	+	+	NA	NA	+	NA	-	V	T+	NA
Assimilação		T+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+

+: positivo; -: negativo; T+: tardio positivo; NA: não analisado; Cel: celobiose; Gal: galactose; Gli: glicose; Ino: inositol; Lac: lactose; Mel: melibiose; Raf: rafinose; Sac: sacarose; Tre: trealose; Xil: xilose.

1.3. Formação de biofilme por *Candida* spp.

Em muitos ambientes naturais, a maioria dos microrganismos existe predominantemente como biofilme. O biofilme pode ser caracterizado como uma comunidade altamente organizada de microrganismos aderidos a uma superfície e embebidos em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS). As células do biofilme (sésseis), quando comparadas com as células livres (planctônicas), apresentam um fenótipo diferente, principalmente em relação à resistência aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (DONLAN; CONSTERTON, 2002). A formação dessa “comunidade” microbiana pode ocorrer em resposta a diversos sinais, tais como, densidade celular, pH, disponibilidade de nutrientes e temperatura (DONLAN, 2002).

A capacidade de formação de biofilme também está relacionada com o tipo de superfície utilizada para adesão inicial, sendo que alguns materiais

suportam o crescimento extensivo do biofilme, enquanto outros não. Vários autores têm mostrado que os microrganismos aderem-se mais facilmente em superfícies hidrofóbicas e apolares, tais como teflon e outros materiais plásticos (FLETCHER; LOEB, 1979; PRINGLE; FLETCHER, 1983; BENDINGER *et al.*, 1993). Em vista disso, modificações nas propriedades da superfície de biomateriais visando inibir a formação de biofilme têm sido realizadas (CHANDRA *et al.*, 2005).

Alguns estudos de biofilme têm sido focados para se determinar as etapas de desenvolvimento, a estrutura observada durante cada etapa e as interações célula-célula e célula-superfície. Em procaríotos, o desenvolvimento do biofilme ocorre basicamente em cinco etapas (FIGURA 2): a) adesão inicial das células à superfície; b) produção de EPS, resultando em adesão irreversível; c) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme; d) maturação da arquitetura do biofilme; e) dispersão de células do biofilme para outros locais (STOODLEY *et al.*, 2002).

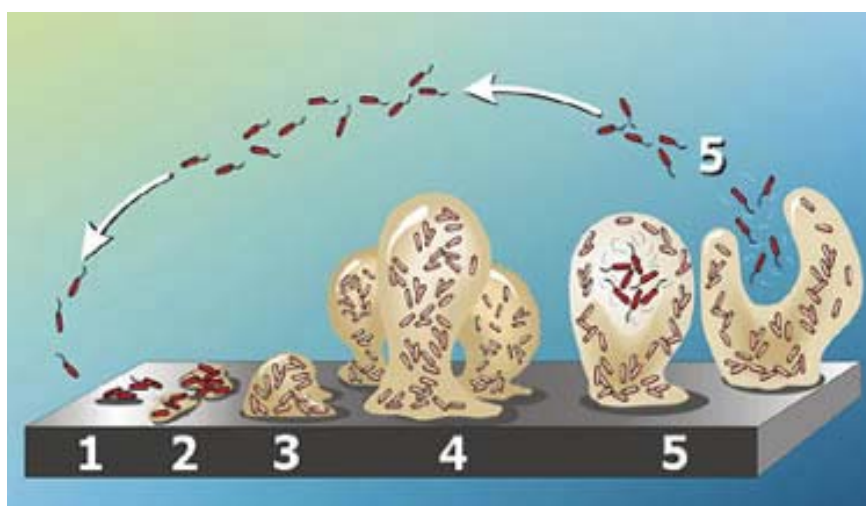


Figura 2: Diagrama mostrando as cinco etapas de desenvolvimento do biofilme bacteriano. 1) adesão inicial das células a superfície. 2) produção de EPS. 3) início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme. 4) maturação da arquitetura do biofilme. 5) Dispersão de células do biofilme. Fonte: STOODLEY *et al.* (2002), com modificações.

Estudos com bactérias mostraram também que a estrutura do biofilme é heterogênea. Foram observados espaços entre as microcolônias, denominados “canais de água”, os quais permitem o fluxo de nutrientes e oxigênio para o crescimento das células no interior do biofilme (DONLAN, 2002; LEWANDOWSKI, 2000).

Diferentes sistemas *in vitro* para análise do biofilme de *Candida* spp têm sido desenvolvidos. A maioria desses modelos envolve a adesão das células à superfície abiótica em diferentes condições ambientais. A formação de biofilme pode ser analisada através de várias metodologias, entre elas: a) incorporação de [³H]-leucina pelas células do biofilme (HAWSER; DOUGLAS, 1994); b) reação colorimétrica baseada na redução de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil-amino)carboxil]-2H tetrazólio hidróxido-(XTT) a formazam (HAWSER; DOUGLAS, 1994; HAWSER *et al.*, 1998; CHANDRA *et al.*, 2001); c) a fresco (SHIN *et al.*, 2002) ou após coloração com cristal violeta (JIN *et al.*, 2003); d) determinação do peso seco do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2005); e e) análise microscópica (FIGURA 3) (RAMAGE *et al.*, 2001c).

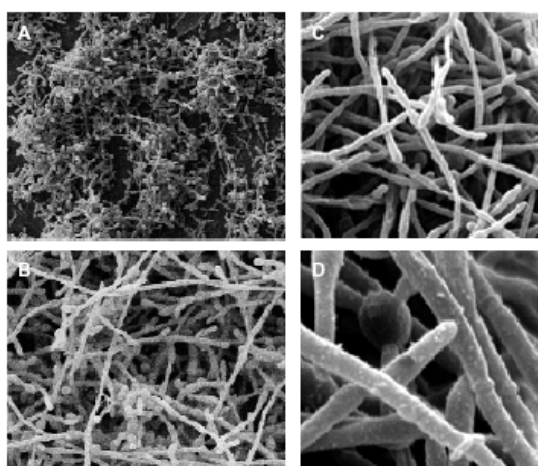


Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura mostrando imagens do biofilme maduro de *Candida albicans* com 48 horas de formação em lâminas de polimetilmetacrilato. A) 100x; B e C) 500x; D) 1000x. Fonte: Ramage *et al.*, 2001c.

Segundo Chandra *et al.* (2001), a formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de polimetilmetacrilato, ocorre basicamente em três fases distintas: a) fase inicial (0 a 11 horas); b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas); c) fase de maturação (aproximadamente 38 horas a 72 horas). Inicialmente as células leveduriformes de *C. albicans* aderem-se à superfície da lâmina, formando posteriormente microcolônias. Nas primeiras 11 horas, as comunidades de *C. albicans* aparecem como uma camada espessa de células, devido ao crescimento e agregação das colônias. O desenvolvimento da fase intermediária foi caracterizado pela emergência e predominância de material não celular, o qual se assemelha a uma “névoa” que forma um filme e cobre as microcolônias do fungo. Durante a fase de maturação, a quantidade de material extracelular aumenta com o tempo de incubação e as comunidades de *C. albicans* são completamente cobertas por esse material. Além disso, foi observado que o biofilme formado em diferentes superfícies, polimetilmetacrilato e elastômero de silicone, apresenta células com morfologias distintas. As comunidades do fungo e o material extracelular no qual elas estão embebidas constituem o biofilme (FIGURA 4).

A EPS do biofilme de *C. albicans* consiste de proteínas, carboidratos e DNA. O conteúdo total dos dois primeiros varia durante os diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme. A quantidade de carboidratos aumenta gradativamente e concomitantemente com a evolução do biofilme (NETT; ANDES, 2006). Além disso, a composição de carboidratos pode variar entre as espécies de *Candida*, como ocorre em *C. albicans* e *C. tropicalis*, cujas EPS são formadas predominantemente por glicose e hexosamina, respectivamente (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

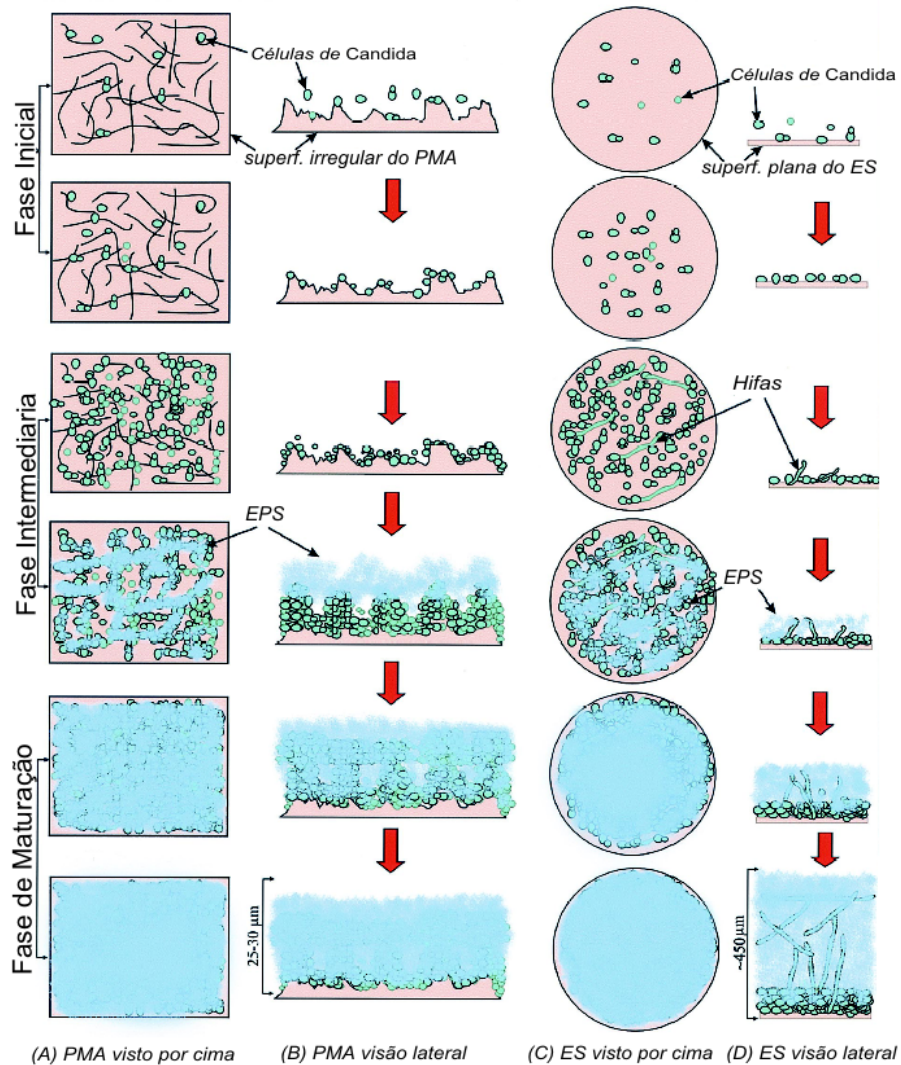


Figura 4: Representação esquemática da formação de biofilme de *C. albicans* mostrando as fases de desenvolvimento e as diferenças na morfologia celular em materiais distintos. (A e B) Crescimento do biofilme em lâmina de polimetilmetacrilato (PMA). (C e D) Crescimento do biofilme em discos de elastômero de silicone (ES). O biofilme formado em PMA (B) é menos espesso quando comparado com ES (D). Além disso, em PMA ocorre predomínio de células leveduriformes, enquanto em ES predominam as formas filamentosas. A e C representam o biofilme visto por cima, enquanto B e D mostram uma visão lateral do biofilme. EPS, substância polimérica extracelular. Fonte: Chandra *et al.* (2001), com modificações.

Vários autores mostraram a capacidade de espécies não-*albicans* em formar biofilme (HAWSER; DOUGLAS, 1994; RAMAGE *et al.*, 2001a; KUHN *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2002). Os estágios de desenvolvimento e a estrutura dos biofilmes formados por *C. dubliniensis* (RAMAGE *et al.*, 2001a) e *C. parapsilosis* (KUHN *et al.*, 2002) foram similares aos observados para *C. albicans*. Entretanto, a camada de biofilme formada por *C. parapsilosis* foi menos espessa e complexa (KUHN *et al.*, 2002).

Shin *et al.* (2002), utilizando meio de cultura suplementado com 8% de glicose e vários isolados clínicos, constataram que a frequência de formação de biofilme entre as amostras de *C. albicans* foi menor em relação às não-*albicans* (8% e 61%, respectivamente). As principais espécies formadoras de biofilme foram *C. tropicalis* (80%) e *C. parapsilosis* (73%). Além disso, entre os isolados positivos de *C. tropicalis*, a maior parte (59%) foi classificada como fortemente produtora de biofilme.

Dois modelos animais de infecção associada a cateter venoso central foram desenvolvidos para estudos do biofilme *in vivo*. No coelho foram testados dois tipos de cateter, poliuretano e silicone, e não houve diferença na formação de biofilme (SCHINABECH *et al.*, 2004). Em ratos, foi implantado um cateter de polietileno (ANDES *et al.*, 2004). Em ambos os sistemas, os biofilmes de *C. albicans* apresentavam-se estruturalmente semelhantes àqueles descritos *in vitro*. Contudo, várias células do hospedeiro (hemáceas, plaquetas, macrófagos e neutrófilos) também estavam embebidas na EPS. Além disso, não houve redução do número de células sésseis após tratamento com fluconazol. E, segundo Andes *et al.* (2004) essa resistência parece estar associada à expressão aumentada dos genes *CDR1* e *CDR2*.

Como mencionado anteriormente, a composição e a superfície do dispositivo médico a ser implantado influenciam na formação do biofilme. Essa diferença de resposta em ensaios *in vivo* pode ser decorrente da formação de um “filme condicionante” na superfície desses materiais (RAMAGE *et al.*, 2006). Vários fatores do hospedeiro, tais como soro (NIKAWA *et al.*, 2000) e saliva (NIKAWA *et al.*, 1999) aumentam a formação de biofilme nesses dispositivos.

1.3.1. Importância clínica do biofilme de *Candida* spp.

1.3.1.1. Infecções por *Candida* spp. relacionadas à formação de biofilme

Infecções associadas com a formação de biofilme constituem-se em um sério problema de saúde humana. Como mencionado anteriormente, as células presentes no biofilme são resistentes a agentes antimicrobianos. Além disso, também são resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Em vista disso, o biofilme representa uma fonte permanente de infecção de difícil tratamento (DONLAN, 2001).

Várias infecções hospitalares estão associadas a esse fenômeno, cujo biofilme pode ser composto por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas ou fungos. Bactérias comumente isoladas desses sistemas incluem as espécies Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus viridans*. Entre as bactérias Gram-negativas são isoladas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (O'TOOLE *et al.*, 2000; DONLAN, 2001).

As espécies de fungos geralmente isoladas pertencem ao gênero *Candida*, sendo *C. albicans* a mais freqüente.

A maioria dos quadros de candidíase está associada com a formação de biofilme em uma superfície inerte (dispositivos médicos) ou biológica (epitélio) (TABELA 2). Entre os dispositivos médicos podemos citar implantes dentários, cateter central intravascular, cateter urinário, válvulas cardíacas, marca-passo e próteses articulares (DONLAN; CONSTERTON, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2006). Embora a formação de biofilme esteja mais relacionada com o uso de dispositivos implantados, infecções nas quais os pacientes não utilizam esses materiais também podem ser resultado da formação de biofilme (O'TOOLE, *et al.*, 2000; DONLAN; CONSTERTON, 2002).

Tabela 2: Principais tipos de dispositivos médicos e formação de biofilme de *Candida* spp. Modificado de Ramage *et al.* (2006) e Kojic & Darouiche (2004).

Dispositivo	Infecção	Fonte de Infecção	Fatores de risco para infecção por <i>Candida</i> spp.
Cateter venoso central e periférico	Endocardite Candidemia	Pele; Disseminação hematogênica a partir de uma infecção distal ou após invasão do epitélio gastrointestinal.	Candidemia; Nutrição parenteral
Cateter para hemodiálise ou diálise peritoneal	Candidemia		Hemodiálise: não determinada; Diálise peritoneal: peritonite; hospitalização; antibioticoterapia; lúpus
Cateter urinário	Infecção urinária	Inoculação dos microrganismos durante o implante do dispositivo; Disseminação a partir da superfície peri-uretral.	Diabetes mellitus; Infecção do trato urinário; Presença de tumores; Antibioticoterapia; Internação em unidade de terapia intensiva.
Tubo endotraqueal	Candidíase orofaríngea	Refluxo gastro-pulmonar; Orofaringe.	Não determinado

Continuação, Tabela 2.

Prótese intracardíaca; Válvulas cardíacas	Endocardite	Durante processo cirúrgico; Disseminação hematogênica.	Uso de fármacos intravenosos; Presença de válvulas prostéticas; Candidemia; Imunossupressão; Nutrição parenteral; Antibioticoterapia; Endocardite bacteriana.
Dispositivo intra-uterino; Epitélio vaginal	Candidíase vulvovaginal	Microbiota vaginal.	Não determinado.
Implantes dentários; Tecido dentário	Periodontite	Microbiota da cavidade oral.	Colonização da cavidade oral.
Lentes de contato	Ceratite		Solução desinfetante de lentes contaminadas.

1.3.1.2. Resistência do biofilme de *Candida* spp. aos antimicrobianos

A estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos das células sésseis conferem uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos sejam estes, antibióticos, desinfetantes ou germicidas.

Vários estudos têm mostrado uma menor atividade dos agentes antifúngicos em presença do biofilme de *Candida* spp. tanto *in vitro* (HAWSER; DOUGLAS, 1995; RAMAGE *et al.*, 2001a; 2001b; 2001c) como *in vivo* (ANDES *et al.*, 2004; SCHINABECK *et al.*, 2004). A atividade dos antifúngicos sobre o biofilme pode ser analisada *in vitro*. Combinações de fluconazol, anfotericina B e caspofungina também não foram eficazes na erradicação do biofilme de *C. albicans* (BACHMANN *et al.*, 2003). Por outro lado, o biofilme mostrou-se suscetível *in vitro* a formulações lipídicas de anfotericina B e ecnocandinas (BACHMANN *et al.*, 2002; KHUN *et al.*, 2002). A concentração terapêutica de

caspofungina (2 mg/mL) foi capaz de reduzir significativamente a atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* independente do estágio de desenvolvimento do biofilme (COCUAUD *et al.*, 2005).

Outras substâncias foram testadas sobre o biofilme de *Candida* spp.. Nesse sentido, Raad *et al.* (2003), utilizando um sistema *in vitro*, mostraram que uma solução de minociclina-EDTA diminuiu significativamente a colonização do cateter de silicone por *C. albicans*. Alem & Douglas (2004) mostraram que inibidores de cicloxigenases, enzima que participa da síntese de prostaglandinas, inibem a formação de biofilme de *C. albicans*. O ácido acetil salicílico apresentou 95% de inibição.

Os mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme aos antifúngicos ainda são obscuros. Atualmente quatro mecanismos estão sendo investigados para explicar a resistência do biofilme bacteriano aos agentes antimicrobianos (FUX *et al.*, 2005):

- a) Dificuldade de penetração do agente antimicrobiano;
- b) Microambientes químicos dentro do biofilme que conduzem a regiões de crescimento lento ou nulo (LEWIS, 2001);
- c) Resposta adaptativa ao estresse ambiental (expressão de genes de resposta ao estresse), tornando as células do biofilme mais tolerantes a essa condição;
- d) Existência de células persistentes que são protegidas de todos os agentes antimicrobianos. Essas células não crescem nem morrem em presença dos antimicrobianos, exibindo tolerância aos mesmos (SHAH *et al.*, 2006).

Em relação ao biofilme fúngico, Al-Fattani & Douglas (2004) analisaram a penetração de agentes antifúngicos (fluconazol, voriconazol, flucitosina e anfotericina B) em biofilme de várias espécies de *Candida*. A taxa de difusão das substâncias foi similar no biofilme de *C. albicans* e após 3 a 6 horas a concentração das mesmas encontrava-se muito alta. Embora tenha ocorrido a penetração, as células do biofilme não foram eliminadas pelos antifúngicos, sugerindo que esse não é o principal mecanismo de resistência.

O papel da EPS na resistência do biofilme é controverso (BAILLIE; DOUGLAS, 2000). Ramage *et al.* (2002b) mostraram que mutantes defectivos para filamentação formavam biofilme desprovido de EPS e estes ainda mostravam-se resistentes aos agentes antifúngicos.

Em biofilmes bacterianos, camadas de células metabolicamente inativas têm sido mostradas (MAH; O'TOOLE, 2001) o que contribuiria para a resistência aos antibacterianos. Já em *C. albicans*, a progressão da resistência ao fluconazol tem sido associada com o aumento da atividade metabólica do biofilme (CHANDRA *et al.*, 2001). Anteriormente, Baillie e Douglas (1998), utilizaram um sistema que permitia controlar a taxa de crescimento do biofilme para analisar o perfil de resistência dessa comunidade celular a anfotericina B. Os resultados mostraram que a resistência apresentada pelo biofilme não estava associada à taxa de crescimento reduzida. Além disso, a presença de células persistentes ainda não foi mostrada em biofilmes de *Candida* spp.

Finalmente a expressão de genes específicos induzidas pelo contato pode contribuir para o fenótipo de resistência do biofilme dessas leveduras. Alguns genes têm seu nível de expressão aumentado durante a formação do biofilme, o que leva a um fenótipo diferenciado das células sésseis em relação

às células planctônicas. Dentre esses genes, alguns estão relacionados à resistência aos antimicrobianos.

A resistência das células planctônicas de *C. albicans*, como mencionada anteriormente, tem sido vinculada à expressão aumentada de genes relacionados ao efluxo de drogas (*CDR1*, *CDR2* e *MDR1*) e de *ERG11*. Em biofilme, a resistência também é um processo multifatorial e em cada estágio de desenvolvimento parece predominar um evento. Assim, a resistência da fase inicial do biofilme pode ser detectada nas primeiras duas horas após adesão das células planctônicas de *C. albicans* e é dependente de *MDR1* e *CDR1* e *CDR2* (MATEUS *et al.*, 2004; MURILLO *et al.* 2005). Já no biofilme maduro, a resistência parece estar associada à diminuição do conteúdo de ergosterol (MUKHERJEE *et al.*, 2003) e expressão alterada dos genes que participam da biossíntese do ergosterol (GARCIA-SANCHEZ *et al.*, 2004).

1.3.1.3. Expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento do biofilme

A adaptação estrutural e inter-relação que ocorrem no biofilme são possíveis devido à expressão de genes específicos que resultam em fenótipos que diferem profundamente daqueles das células planctônicas da mesma espécie (STOODLEY *et al.*, 2002).

Como em vários processos de transformação que ocorrem em outros organismos, a adesão das células planctônicas de *C. albicans* a uma superfície pode desencadear vários tipos de respostas entre elas, invasão (decorrente da formação de hifas) ou produção de biofilme (KUMAMOTO; VINCES; 2005).

Nesse sentido, o contato celular com um substrato afetaria o “programa” da expressão gênica conduzindo a expressão diferencial de grupos de genes envolvidos com determinado processo celular. Em *P. aeruginosa*, foi mostrado que nos primeiros 15 minutos do contato célula-substrato ocorre expressão aumentada do cluster gênico envolvido com a produção de alginato, um componente da EPS do biofilme. Esse evento inicia o processo de formação do biofilme (DAVIES; GEESEY, 1995).

Vários autores, estudando o desenvolvimento do biofilme de diferentes espécies bacterianas detectaram a presença de proteínas de superfície associadas à formação desse processo. Essas constituem a família das proteínas associadas a biofilme (Bap: *biofilm-associated protein*) (LASA; PENADÉS, 2005). A primeira Bap foi identificada em *Staphylococcus aureus* e ela participa da interação bactérias em superfícies abióticas e celulares (CUCARELLA *et al.*, 2004). Além disso, a presença do gene *ESP* (*Enterococcus faecalis* surface protein), proteína de superfície de *E. faecalis*, parece necessária para formação do biofilme (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001) e o gene *ALGC*, responsável pela biossíntese de um componente da EPS do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (DAVIES *et al.*, 1993).

Estudos envolvendo mutações em *C. albicans* que afetam a superfície celular e comprometem a aderência mostram uma redução na capacidade de formação de biofilme dessas leveduras. Nesse sentido, mutantes nulos *efg1*, um gene regulador do desenvolvimento da forma filamentosa (STOLDT *et al.*, 1997) e de outras proteínas de superfície celular (SOHN *et al.*, 2003) apresentam aderência reduzida a vários tipos de substratos e capacidade diminuída de formação de biofilme nos mesmos (RAMAGE *et al.*, 2002b;

LEWIS *et al.*, 2002). E mutantes nulos para *ace2*, um fator transcricional que regula a expressão de quitinase e proteínas da parede celular apresentam capacidade reduzida de formação de biofilme (KELLY *et al.*, 2004).

A análise de expressão gênica diferencial para seleção de genes tem sido aplicada em vários eventos celulares tais como, processos relacionados à ação de drogas antifúngicas (NIEWERTH *et al.*, 2003), formação de hifas (BRAUN; JOHNSON, 2000), interação com hospedeiro (ZHAO *et al.*, 1998), resposta a determinados meios de cultivo (FRADIN *et al.*, 2003) e também ao processo de formação de biofilme (MURILLO *et al.*, 2005; GARCIA-SANCHEZ *et al.*, 2004; CAO *et al.*, 2005). Em relação ao biofilme, expressão aumentada de vários genes foi detectada nessa condição. De maneira geral, todas as condições de formação de biofilme analisadas mostraram expressão aumentada de genes que participam da biossíntese de aminoácidos e proteínas. A tabela 3 mostra vários genes que estão envolvidos na formação do biofilme.

A presença acentuada de hifas em biofilme maduros de *C. albicans* (CHANDRA *et al.*, 2001) levanta a hipótese que as mesmas estejam relacionadas e sejam necessárias para a formação dessa comunidade celular. Nesse sentido, vários relatos descrevem a importância do processo de filamentação na formação do biofilme. Lo *et al.* (1997) mostraram que mutantes duplos de *C. albicans* para *efg1/efg1* e *cph1/chp1* não formam filamentos em resposta a muitos estímulos, tais como meios de culturas diferentes e presença de soro. Esses mutantes também são incapazes de formar biofilme (LEWIS *et al.*, 2002; RAMAGE *et al.*, 2002b).

Tabela 3: Genes que participam do desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*. Fonte: NOBILE; MITCHELL (2006), com modificações.

Gene	Função	Fenótipo mutante	Referências
<i>ACE2</i>	Regulador transcricional	Aderência e biomassa do biofilme reduzidas e estrutura do biofilme alterada.	Kelly <i>et al.</i> (2004)
<i>ALS3</i>	Agglutinin-like sequence	Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Nobile <i>et al.</i> (2006)
<i>BCR1</i>	Regulador transcricional	Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Nobile; Mitchell (2005); Nobile <i>et al.</i> (2006)
<i>CDR1^a</i>	<i>Candida</i> drug resistance 1	Biofilme maduro de mutante duplo (<i>cdr1/cdr1, cdr2/cdr2</i>) apresenta suscetibilidade aumentada aos derivados azólicos.	Mukherjee <i>et al.</i> (2003); Mateus <i>et al.</i> (2004)
<i>CDR2^a</i>	<i>Candida</i> drug resistance 2	Biofilme maduro de mutante duplo (<i>cdr1/cdr1, cdr2/cdr2</i>) apresenta suscetibilidade aumentada aos derivados azólicos.	Mukherjee <i>et al.</i> (2003); Mateus <i>et al.</i> (2004)
<i>CHK1</i>	Histidine kinase	Formação de biofilme em presença do farnesol.	Kruppa <i>et al.</i> (2004)
<i>CPH1</i>	Regulador transcricional da morfogênese	<i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> mutante duplo é incapaz de formar biofilme.	Lewis <i>et al.</i> (2002); Ramage <i>et al.</i> (2002b)
<i>EAP1</i>	Adesina	Aumento da expressão melhora a aderência de mutantes <i>efg1/efg1</i> .	Li; Palecek (2003)
<i>EFG1</i>	Regulador transcricional da morfogênese	Mutante simples <i>efg1/efg1</i> e mutante duplo <i>efg1/efg1 cph1/cph1</i> são defeituosos na formação de biofilme.	Lewis <i>et al.</i> (2002); Ramage <i>et al.</i> (2002b)
<i>GCN4</i>	Ativador transcricional do anabolismo de amino ácidos	Biomassa do biofilme reduzida.	Garcia-Sanchez <i>et al.</i> (2004)
<i>KEM1</i>	Atividade de exorribonuclease	Capacidade de formação do biofilme diminuída em meio Sabouraud Dextrose. Conteúdo de hifas reduzido no biofilme em meio Spider.	Richard <i>et al.</i> (2005)

Continuação, Tabela 3.

<i>MDR1^b</i>	<i>Candida</i> multidrug resistance 1		Mutante duplo <i>mdr1/mdr1 cdr1/cdr1</i> e mutante triplo <i>mdr1/mdr1 cdr1/cdr1 cdr2/cdr2</i> apresenta suscetibilidade bastante aumentada no biofilme imaturo aos azólicos.	Mukherjee <i>et al.</i> (2003); Mateus <i>et al.</i> (2004)
<i>MDS3</i>	Promotor da resposta a condições de crescimento em meio alcalino	da	Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Richard <i>et al.</i> (2005)
<i>MKC1</i>	Mitogen-activated protein kinase		Conteúdo de hifas reduzido no biofilme e aumento da suscetibilidade a azólicos.	Kumamoto (2005)
<i>NUP85</i>	<i>Nucleoporin</i> : Exportação do RNA (poli A+) para citoplasma	do	Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Richard <i>et al.</i> (2005)
<i>PGA10</i> (RBT51)	GPI ^c – anchored proteins		Alteração na estrutura do biofilme. Células fracamente aderidas.	Pérez <i>et al.</i> (2006)
<i>SUV3</i>	Helicase de RNA mitocondrial		Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Richard <i>et al.</i> (2005)
<i>TEC1</i>	Regulador transcricional para formação de hifas		Capacidade de formação do biofilme diminuída.	Nobile; Mitchell (2005)
<i>YWP1</i> 1	Yeast wall protein		Capacidade de adesão aumentada	Granger <i>et al.</i> (2005)

a: bombas de efluxo ABC (ATP-binding cassette); b: bombas de efluxo – principais facilitadores do transporte; c: glicosyl-phosphatidylinositol.

Além disso, a existência de várias proteínas regulatórias do processo de filamentação que também afetam a produção de biofilme (STOLDT *et al.*, 1997; RAMAGE *et al.*, 2002b; RICHARD *et al.*, 2005); e a inibição do biofilme em presença de altos níveis de farnesol, uma molécula do quorum sensing de *C. albicans* que controla o processo de filamentação (RAMAGE *et al.*, 2002a), corroboram a importância da filamentação no processo de formação do

biofilme. Contudo, Nobile & Mitchell (2005) mostraram que a proteína *bcr1*, um fator transcricional, é requerido para a formação de biofilme, mas não ao processo de filamentação. Mutantes nulos para esse gene perdem a capacidade de produção de biofilme, sem afetar o processo de filamentação em cultura líquida. Recentemente foi mostrado que essa proteína regula a expressão de *ALS3*, uma proteína de superfície com propriedade de adesina. A superexpressão desse gene restaura a capacidade de formação de biofilme de mutantes *bcr1/bcr1 in vitro* (NOBILE *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Diversos tipos de infecções por *Candida* spp. podem estar relacionados com a formação de biofilme. Esses tipos de infecções constituem-se em um sério problema de saúde humana, uma vez que a sensibilidade das células sésseis aos antifúngicos é reduzida em relação às células planctônicas (HAWSER; DOUGLAS, 1995; RAMAGE, *et al.*, 2001c). Como resultado disso, o tratamento torna-se mais complicado e o biofilme pode tornar-se uma fonte permanente de infecção (DONLAN, 2001).

O biofilme bacteriano e seu papel no desenvolvimento de doenças têm sido estudados extensivamente nos últimos anos (DOUGLAS, 2003). Os estudos sobre o biofilme formado por fungos iniciaram-se mais recentemente e a maioria dos trabalhos utiliza a espécie *C. albicans* como modelo. Embora tenha sido mostrada a capacidade de formação de biofilme por espécie não-*albicans*, o conhecimento sobre o padrão de desenvolvimento e estrutura do biofilme dessas espécies é escasso.

C. tropicalis é uma das espécies de não-*albicans* mais freqüentemente isoladas em amostras clínicas. Essa espécie tem sido relatada como o 2º ou 3º agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias (WINGARD, 1995). Em países da América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é extremamente freqüente, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia nos principais hospitais públicos (GODOY *et al.*, 2003; GOLDANI; MÁRIO, 2003; COLOMBO *et al.*, 1999). Além disso, tem sido freqüentemente isolada de pacientes apresentando candidúria.

Resultados similares aos obtidos por Shin *et al.* (2002) foram obtidos em nosso laboratório. Assim a partir de um ensaio inicial, isolados de *C. tropicalis* de diferentes origens mostraram-se fortemente produtores de biofilme.

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo:

- Analisar a capacidade de formação de biofilme, em placa de poliestireno, de amostras de *Candida tropicalis* isoladas de urina.
- Analisar o perfil de suscetibilidade das células planctônicas ao fluconazol e anfotericina B;
- Analisar o perfil de suscetibilidade das células sésseis ao fluconazol e anfotericina B;
- Analisar a cinética de formação do biofilme;
- Analisar a estrutura do biofilme formado em disco de cateter através de microscopia eletrônica de varredura, verificando os estágios de desenvolvimento do biofilme.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSON, G.D.; NIIMI, M.; CANNON, R.D.; JENKINSON, H.F. (1996). Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 40(12): 2835-2841.
- ALEM, M.A.S.; DOUGLAS, J.L. (2004). Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother., 48(1): 41-47.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, J.L. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J. Med. Microbiol., 55(8): 999-1008.
- ÁLVAREZ-LERMA, F.; JUAN NOLLA-SALAS, J.; LEÓN, C.; PALOMAR, M.; JORDÁ, R.; CARRASCO, N.; BOBILLO, F. (2003). Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. Intensive Care Med., 29:1069–1076.
- ANDES, D.; NETT, J.; OSCHEL, P.; ALBRECHT, R.; MARCHILLO, K.; PITULA, A. (2004). Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. Infect. Immun., 72(10): 6023–6031.
- ANIL,S.; ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. (2001). The impact of polyene, azole, and DNA analogue antimycotics on the cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in HIV infection. Mycopathologia, 153: 179–185.
- ANIL, S.; SAMARANAYAKE, L.P. (2003). Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Chemotherapy, 49(5): 243-247.
- AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. (2005). Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 9(5): 411-418.
- BACHMANN, S.P.; RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; PATTERSON, T.F.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2003). Antifungal Combinations against *Candida albicans* Biofilms In Vitro. Antimicrob. Agents Chemother., 47(11): 3657–3659.
- BACHMANN, S.P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T.F.; WICKES, B.L.; GRAYBILL, J.R.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2002). In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother., 46(11): 3591-3596.

- BAILEY, A.; WADSWORTH, E.; CALDERONE, R. (1995). Adherence of *Candida albicans* to Human Buccal Epithelial Cells: Host-Induced Protein Synthesis and Signaling Events. Infect. Immun., 63(2): 569–572.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, J.L. (1998). Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother., 42(8): 1900-1905.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J. Ant. Chem., 46: 397-403.
- BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; FALCONI DI FRANCESCO, L.; CASELLI, F. (2000). Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. Antimicrobiol. Agents Chemother., 44:1578-1584.
- BENDINGER, B.; RIJNAARTS, H.H.M.; ALTENDORF, K.; ZEHNDER, A.J.B. (1993) Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Appl Environ Microbiol, 59:3973–77.
- BORG, M.; RUCHEL, R. (1988). Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect. Immun., 56: 626-631.
- BORG, M.; RUCHEL, R. (1990). Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J. Med. Vet. Mycol., 28: 3-14.
- BRAUN, B.R.; JOHNSON, A.D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. Science, 277(5322):105-109.
- BRAUN, B.R.; JOHNSON, A.D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. Genetics, 155(1):57-67.
- BUURMAN, E.T.; WESTWATER, C.; HUBE, B.; BROWN, A.J.P.; ODDS, F.C.; GOW, N.A.R. (1998). Microbiology Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 7670–7675.
- CALDERONE, R.A.; BRAUN, P.C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol. Rev., 55(1): 1-20.
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol., 9(7):327-35.
- CANUTO, M.M.; RODERO, G. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect. Dis., 2: 550-563.

- CAO, Y.Y.; CAO, Y.B.; XU, Z.; YING, K.; LI, Y.; XIE, Y.; ZHU, Z.Y.; CHEN, W.S.; JIANG, Y.Y. (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. Antimicrob. Agents Chemother., 49(2):584-9.
- CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTINEZ, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(01): 130-180.
- CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J. Bacteriol., 183 (18): 5385-5394.
- CHANDRA, J.; PATEL, J.D.; LI, J.; ZHOU, G.; MUKHERJEE, P.K.; MCCORMICK, T.S.; ANDERSON, J.M.; GHANNOUM, M.A. (2005). Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. Appl Environ Microbiol., 71(12): 8795-8801.
- COCUAUD, C.; RODIER, M.H.; DANIAULT, G.; IMBERT, C. (2005). Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. J. Antimicrob. Chemother., 56(3): 507-512.
- COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. (1999). Antifungal resistance in non-*albicans* *Candida* species Drug Resistance Updates, 2: 9-14.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 36(5): 599-607.
- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. (1999). high rate of non-*albicans* candidemia in brazilian tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis, 34:281–286.
- CORMACK, B.P.; GHORI, N.; FALKOW, S. (1999). An adhesin of the yeast pathogen *candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. Science, 285: 578-582.
- CSANK, C.; HAYNES, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiology, 189: 115-120.
- CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immun., 72(4):2177-2185.

- CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCIA-EFFRON, G.; RODRIGUES-TUDELA, J. L. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida* sp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. J. Antimicrobiol Chemother., 49: 981-987.
- DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. (2005). Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. Mycoses, 48, 321-326.
- DAVIES, D. G.; CHAKRABARTY, A. M.; GEESEY, G. G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 59(4): 1181-1186.
- DAVIES, D.G.; GEESEY, G.G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. Appl Environ Microbiol, 61:860-867.
- DONLAN, R.M. (2001). Biofilms and device-associated infections. Emerg. Infect. Dis., 7(2): 27-280.
- DONLAN, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8(9): 881-889.
- DONLAN, R.M.; CONSTERTON, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev., 15(2): 167-193.
- DOUGLAS, J.L. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol., 11(1): 30-36
- FERRER, J.(2000). Vaginal candidosis: epidemiological and aetiological factors. Internat. J. Gynecol. Obstet., 71: S21-S27.
- FIDEL Jr, P.L.; SOBEL, J.D. (1996). Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin. Microbiol. Rev., 9 (3): 335-348.
- FLETCHER, M; LOEB GI. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. Appl Environ Microbiol, 37:67-72.
- FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. (2005). Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Mycoses, 48, 62-67.
- FRADIN, C.; KRETCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; GAILLARDIN, C.; D'ENFERT, C.; HUBE, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. Mol. Microbiol., 47(6):1523-1543.
- FRANZ, R.; KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; RUNKHE, M.; MORSCHHAUSER, J. (1998). Multiple molecular mechanisms contribute

to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 42(12): 3065-3072.

- FU, Y.; RIEG, G.; FONZI, W.A.; BELANGER, P.H.; EDWARDS JR, J.E.; FILLER, S.G. (1998). Expression of the *Candida albicans* Gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* Induces Adherence to Endothelial and Epithelial Cells. Infect. Immun., 66(4): 1783–1786.
- FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. TRENDS in Microbiology, 13(1): 34-40.
- GALE, C.A.; BENDEL, C.M.; MCCLELLAN, M.; HAUSER, M.; BECKER, J.M.; BERMAN, J.; HOSTETTER, M.K. (1998). Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, INT1. Science, 279.
- GARCIA-SANCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J.M.; D'ENFERT, C. (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic Cell., 3(2):536-45.
- GEBER, A.; HITCHCOCK, C.A.; SWARTZ, J.E.; PULLEN, F.S.; MARSDEN, K.E.; KWON-CHUNG, K.J.; BENNETI, J.E. (1995). Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition and antifungal susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother., 39(12): 2708-2717.
- GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from latin american hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(3): 401-405.
- GOLDANI, L. Z.; MÁRIO, P. S. S. (2003). *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. Journal of Infection, 46: 155-160.
- GOW, N. A. R.; BROWN A. J. P.; ODDS, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. Cur. Opin. Microbiol., 5: 366-371.
- GRANGER, B.L.; FLENNIKEN, M.L.; DAVIS, D.A.; MITCHELL, A.P.; CUTLER, J.E. (2005). Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. Microbiology, 151: 1631-1644.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews, 12 (3):454-500.
- HAIJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BENJAMIN, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. (2004). incidence of bloodstream infections due to *candida* species and in vitro susceptibilities of isolates

- collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J. Clin. Microbiol., 42(4): 1519-1527.
- HAWSER, S.P.; DOUGLAS, J.L. (1994). Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials In Vitro. Infect. Immun., 62(3): 915-921.
- HAWSER, S.P.; DOUGLAS, J.L. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., 39(9): 2128-2131.
- HAWSER, S.P.; NORRIS, H.; JESSUP, C.J.; GHANNOUM, M.A. (1998). Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino) carbonyl]-H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of testing clinical yeast isolates for the susceptibility to antifungal agents. J. Clin. Microbiol., 36(5): 1450-1452.
- HAYNES, K. (2001). Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol., 9(12): 591-596.
- HORNBY, J.M.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K.W. (2004). High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. J. Microbiol. Methods, 56: 119-124.
- HUBE, B. (2004) From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. Cur. Op. Microbiol., 7: 336-341.
- IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANNO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS Jr, J.E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect. Immun., 63(5): 1193-1198.
- JANG, S.J.; HAN, H.L.; LEE, S.H.; RYU, S.Y.; CHAULAGAIN, B.P.; MOON, Y.L.; KIM, D.H.; JEONG, O.J.; SHIN, J.H.; MOON, D.S.; PARK, Y.J. (2005). PFGE-Based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. Jpn. J. Infect. Dis.; 58: 263-267.
- JIN, Y.; YIP, H. K.; SAMARANAYAKE, Y. H.; YAU, J. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. (2003). Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of Human Immunodeficiency Virus infection. J. Clin. Microbiol., 41(7): 2961-2967.
- JONES, S.; WHITE, G.; HUNTER, P.R. (1994). Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. J. Clin. Microbiol., 32(11): 2869-2870.
- KAM, A.P.; XU, J. (2002). Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. Diag. Microbiol. Infect. Dis., 43: 19-28.

- KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses, 45: 160–165.
- KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D.; GALLIS, H.A.; MCKINSEY, D.S.; KARCHMER, A.W.; SUGAR, A.M.; SHARKEY, P.K.; WISE, G.J.; MANGI, R.; MOSHER, A.; LEE, J.Y.; DISMUKES, W.E.; National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. (2000). Prospective Multicenter Surveillance Study of Funguria in Hospitalized Patients. Clin. Infect. Dis., 30:14–18.
- KELLY, M.T.; MACCALLUN, D.M.; CLACY, S.D.; ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; BUTLER, G. (2004). The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. Mol. Microbiol., 53(3): 969–983.
- KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. Clinical Microbiology Reviews, 17(2): 255–267.
- KONTOYIANNIS, D.P.; VAZIRI, I.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G.P.; RAAD, I.I. (2001). Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. Clinical Infectious Diseases, 33:1676–1681.
- KRCMERY, V.; BARNES, A.J. (2002). Non-albicans *Candida* spp causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. Journal of Hospital Infection, 50: 243-260.
- KRUPPA, M.; KROM, B.P.; CHAUHAN, N.; BAMBACH, A.V.; CIHLAR, R.L.; CALDERONE, R.A. (2004). The Two-Component Signal Transduction Protein Chk1p Regulates Quorum Sensing in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 3(4): 1062-1065.
- KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infection and Immunity, 70(2): 878–888.
- KUMAMOTO, C.A. (2005). A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. PNAS, 102(15): 5576-5581.
- KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. (2005). Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. Ann. Rev. Microbiol., 59: 113-33
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (1998). The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- LASA, I.; PENADES, J.R. (2005). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Res Microbiol., 157(2):99-107. Review.
- LEIDICH, S.D.; IBRAHIM, A.S.; FU, Y.; KOUL, A.; JESSUP, C.; VITULLO, J.; FONZI, W.; MIRBOD, F.; NAKASHIMA, S.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM,

- M.A. (1998). Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. The Journal Of Biological Chemistry, 273(40): 26078-26086.
- LEUNG, A. Y. H.; CHIM, C. S.; HOY, P. L.; CHENGY, V. C. C.; YUENY, K. Y.; LIE, A. K. W. ; AU, W. Y. ; LIANG, R. ; KWONG, Y. L. (2002). *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. Journal of Hospital Infection, 50: 316-319.
- LEWANDOWSKI, Z. (2000). Structure and function of biofilms. In: Evans LV, ed. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers:1-17.)
- LEWIS K. (2001). Riddle of biofilm resistance Antimicrob Agents Chemother., 45(4): 999-1007.
- LEWIS, R.E.; LO, H.J.; RAAD, I.I.; KONTOYIANNIS, D.P. (2002). Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. Antimicrob Agents Chemother., 46(4):1153-5.
- LI, F.; PALECEK, S.P. (2003). *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. Eukaryot Cell., 2(6): 1266-73.
- LO, H.J.; HLER, J.R.K.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. Cell, 90: 939-949.
- MACEDO, J.F.S.; SANTOS, J.B. (2005). Bacterial and fungal colonization of burn wounds. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100(5): 535-539.
- MAH, T.F.C.; O'TOOLE, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TRENDS in Microbiology, 9(1): 34-39.
- MARICHAL, P.; VANDEN BOSSCHE, H.; ODDS, F.C.; NOBELS, G.; WARNOCK, D.W.; TIMMERMAN, V.; VAN BROECKHOVEN, C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P. (1997). Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob. Agents Chemother., 41(10): 2229-2237.
- MATEUS, C.; CROW, S.A. JR.; AHEARN, D.G. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother., 48(9):3358-66.
- MATHEWS, M.S.; SAMUEL, P.R.; SURESH, M. (2001). Emergence of *Candida tropicalis* as the major cause of fungaemia in India. Mycoses, 44: 278-280.
- MIYAZAKI, H.; MIYAZAKI, Y.; GEBER, A.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C.; FALCONER, D.J.; WARD, D.J.; MARSDEN, K.; BENNETI, J.E. (1998). Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased

transcription of a drug transporter gene PDH1 in *Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother., 42(7): 1695-1701.

- MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. (2003) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun., 71(8):4333-40.
- MURILLO, L.A.; NEWPORT, G.; LAN, C.Y.; HABELITZ, S.; DUNGAN, J.; AGABIAN, N.M. (2005). Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. Eukaryot Cell., 4(9):1562-73.
- MYOKEN, Y.; KYO, T.I.; FUJIHARA, M.; SUGATA, T.; MIKAMI, Y. (2004). Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. Haematologica, 89(3): 378-380.
- NAVARRO-GARCÍA, F.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; PLA, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. FEMS Microbiology Reviews, 25: 245-268.
- NETT, J.; ANDES, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Current Opinion in Microbiology, 9: 340-345.
- NIEWERTH, M.; KUNZE, D.; SEIBOLD, M.; SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; HUBE, B. (2003) Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. Antimicrob. Agents Chemother., 47(6):1805-17.
- NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; SAMARANAYAKE, L.P. (1999). Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses, 42(1-2): 37-40
- NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; MAKIHIRA, S.; HAMADA, T.; SADAMORI, S.; SAMARANAYAKE, L. P. (2000). Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses, 43: 139-143.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. (2005). Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. Curr Biol., 15(12):1150-5.
- NOBILE, C.J.; ANDES, D.R.; NETT, J.E.; SMITH JR., F.J.; YUE, F.; PHAN, Q.T.; EDWARDS JR, J.E.; FILLER, S.G.; MITCHELL, A.P. (2006). critical role of BCR1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. PLoS Pathogens, 2(7): 636-649.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cellular Microbiology, 1-10.

- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu.Rev.Microbiol., 54: 49-79.
- OLIVEIRA, R.D.R.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R. (2001). Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev Ass Med Brasil, 47(3): 231-235.
- OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GORLICH, M.; MCMULLAN-VOGEL, C.G.; BORG-VON ZEPELIN, M.; VOGEL, C.W.; KORTING, H.C. (1995). Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. J. Clin. Microbiol., 33(10):2543-2549.
- PENDRAK, M.L.; YAN, S.S.; ROBERTS, D.D. (2004). Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 426: 148–156.
- PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; McATEE, R.K.; SANTILLÁN, R.A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T.F. (2001). Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. Antimicrob. Agents Chemother., 45(10): 2676-2684.
- PÉREZ, A.; PEDRÓS, B.; MURGUI, A.; CASANOVA, M.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; MARTÍNEZ, J.P. (2006). Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. FEMS Yeast Res.; xx 000–000.
- PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. (2000). Sucession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. Applied and environmental microbiology, 66(3): 930-936.
- PICHOVÁ, I.; PAVLÍCKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJSÍ, E.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUMLT, T.; SOUCEK, M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae* Inhibition with peptidomimetic inhibitors Eur. J. Biochem., 268, 2669-2677.
- PRINGLE, J.H.; FLETCHER, M. (1983) Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. Appl Environ Microbiol, 45:811–17.
- RAAD, I.; CHATZINIKOLAOU, I.; CHAIBAN, G.; HANNA, H.; HACHEM, R.; DVORAK, T.; COOK, G.; COSTERTON, W. (2003). In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. Antimicrob. Agents Chemother., 47(11): 3580-3585.

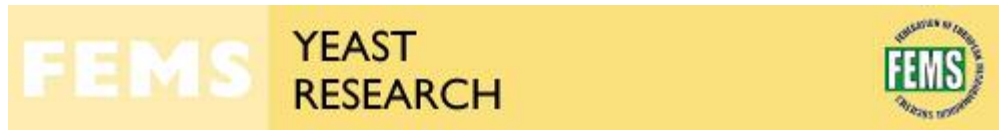
- RAMAGE, G.; WALLE, K.V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2001a). Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol., 39(9): 3234-3240.
- RAMAGE, G.; WALLE, K. V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2001b). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother., 45(9): 2475-2479.
- RAMAGE, G.; WALLE, K. V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2001c). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev. Iberoam. Micol., 18: 163-170.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. (2002a). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol., 68(11):5459-63.
- RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; WICKES, B.L. (2002b). The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett., 214: 95-100.
- RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res, xx: 1–8.
- RHO, J.; SHIN, J.H.; SONG, J.W.; PARK, M.; KEE, S.J.; JANG, S.J.; PARK, Y.K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. (2004). Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel. Electrophoresis The Journal of Microbiology, 42(2): 80-86.
- RICHARD, M.L.; NOBILE, C.J.; BRUNO, V.M.; MITCHELL, A.P. (2005). *Candida albicans* Biofilm-Defective Mutants. Eukaryotic Cell, 4(8): 1493–1502.
- RICHARDS, M.J.; EDWARDS, J.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. (1999). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med., 27(5):887-892.
- ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; KREMEPOULOS, G.; WALSH, T.J. (2003). *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol., 41(2):735-741.
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; PÉREZ-MARTIN, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. Current Opinion in Microbiology, 4:214-221.

- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. (1998). Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother., 42(2): 241-253.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiol., 143: 405-416.
- SCHINABECK, M.K.; LONG, L.A.; HOSSAIN, M.A.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; MOHAMED, S.; GHANNOUM, M.A. (2004). Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. Antimicrob. Agents Chemother., 48(5): 1727-1732.
- SHAH, D.; ZHANG, Z.; KHODURSKY, A.; KALDALU, N.; KURG, K.; LEWIS, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. BMC Microbiol., 6: 53
- SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S.K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J. Clin. Microbiol., 40 (4): 1244-1248.
- SOBEL, J.D. (1999). Limitations of antifungal agents in the treatment of *Candida* vaginitis: future challenges. Drug Resist. Updat., 2: 148-152.
- SOHN, K.; URBAN, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. (2003). EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. Mol Microbiol., 47(1): 89-102.
- SOLL, D.R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica, 81: 101-110.
- SOLL, D.R.; GALASK, R.; ISLEY, S.; RAO, T.V.G.; STONE, D.; HICKS, J.; SCHMID, J.; MAC, K.; HANNA, C. (1989). Switching of *Candida albicans* during Successive Episodes of Recurrent Vaginitis. J. Clin. Microbiol., 27(4): 681-690.
- SOLL, D.R.; LANGTIMM, C.J.; McDOWELL, J.; HICKS, J.; GALASK, R. (1987). High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. J. Clin. Microbiol., 25(9): 1611-1622.
- STAAB, J.F.; BRADWAY, S.D.; FIDEL, P.L.; SUNDSTROM, P. (1999). Adhesive and Mammalian Transglutaminase Substrate Properties of *Candida albicans* Hwp1. Science, 283.
- STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. (2000). Differential activation of a *Candida*

- albicans* virulence gene family during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(11): 6102-6107.
- STOLDT, V.R.; SONNEBORN, A.; LEUKER, C.E.; ERNST, J.F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. EMBO J., 16(8):1982-1991.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol., 56: 187-209.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol., 12(7): 317-324.
- SUNDSTROM, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. Cellular Microbiology, 4(8), 461-469
- TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 67(10): 4538-4545.
- VAN BURIK, J-A. H.; MAGEE, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. Ann. Rev. Microbiol., 55: 743-772.
- VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGE'S, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. (2005). Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob. Agents And Chemother., 49(11): 4608-4615.
- VARGAS, K.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.; LOCKHART, S.R.; STAPLETON, J.T.; HELLSTEIN, J.; SOLL, D.R. (2000). Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. J. Clin. Microbiol., 38(10): 3595-3607.
- VIGOUROUX, S.; MORIN, O.; MOREAU, P.; HAROUSSEAU, J.L.; MILPIED, N. (2006). Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. Haematologica, 91(5): 137-138.
- WEIG, M.; GROB, U.; MÜHLSCHLEGEL, F. (1998). Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. TRENDS in Microbiology, 6 (12): 468-470.
- WEINBERGER, M.; LEIBOVICI, L.; PEREZ, S.; SAMRA, Z.; OSTFELD, I.; LEVI, I.; BASH, E.; TURNER, D.; GOLDSCHMIED-REOUVENG, A.; REGEV-YOCHAY, G.; PITLIK, S.D. ; KELLER, N. (2005). Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality. Journal of Hospital Infection, 61: 146-154.

- WHITE, T. C.; HOLLEMAN, S.; LAURENCE, F. D.; STEVENS, D. A. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother., 46(6): 1704-1713.
- WHITE, T.C. (1997). Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR* and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob. Agents Chemother., 41(7): 1482-1487.
- WINGARD, J.R. (1995). Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis., 20(1):115-125.
- ZAUGG, C.; BORG-VON ZEPPELIN, M.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. (2001). Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infect. Immun., v. 69, n. 1, p. 405-412.
- ZHAO, X.J.; NEWSOME, J.T.; CIHLAR, R. (1998). Up-regulation of Two *Candida albicans* genes in the rat model of oral candidiasis detected by differential display. Microbial Pathogenesis, 25:121-129.
- YANG, Y.L.; HO, Y.A.; CHENG, H.H.; HO, M.; LO, H.J. (2004). Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin b and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. Infection Control And Hospital Epidemiology, 60-64.

ANEXO I: ARTIGO



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance

Journal:	<i>FEMS Yeast Research</i>
Manuscript ID:	FEMSYR-07-05-0088.R1
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bizerra, Fernando; Universidade Estadual de Londrina, Microbiologia Nakamura, Celso; Universidade Estadual de Maringá, de Análises Clínicas Poersch, Celina; Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Svidzinski, Terezinha; Universidade Estadual de Maringá, Análises Clínicas; Universidade Estadual de Maringá, de Análises Clínicas Quesada, Regina; Universidade Estadual de Londrina., Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas Goldenberg, Samuel; Instituto de Biologia Molecular do Paraná.; FIOCRUZ, Bioquímica e Biologia Molecular Krieger, Marco; Instituto de Biologia Molecular do Paraná.; FIOCRUZ, Bioquímica e Biologia Molecular Yamada-Ogatta, Sueli; Universidade Estadual de Londrina, Microbiologia
Keywords:	<i>Candida tropicalis</i> , biofilm, fluconazole, amphoterecin B, resistance



Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance

Fernando César Bizerra¹, Celso Vataru Nakamura², Celina de Poersch³, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski², Regina Mariuza Borsato Quesada⁴, Samuel Goldenberg^{3,5}, Marco Aurélio Krieger^{3,5} & Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; ²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil; ³Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; ⁴Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil and ⁵Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence: Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil, CEP 86051-990.

Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4192.

e-mail: ogatta@uel.br

Abstract

Candida tropicalis is a common species related to nosocomial candidemia and candiduria. Most of *Candida* spp. infections are associated with biofilm formation on implanted medical devices or on host epithelial cell surfaces. Sessile cells display phenotypic traits dramatically different from those of their free-living, planktonic counterparts, such as increased resistance to antimicrobial agents and to host defenses. We describe the characteristics of *C. tropicalis* biofilm formation *in vitro*. By XTT-reduction assay, a rise in metabolic activity was observed up to 24 h of biofilm formation, and this activity showed a linear relationship with sessile cell density. Scanning electron microscopy was used to further characterize *C. tropicalis* biofilms. The initial adherence of yeast cells was followed by germination, micro-colony formation, filamentation and maturation at 24 to 48 h. Mature biofilms consisted of a dense network of yeast cells and filamentous forms of *C. tropicalis*. Increased resistance of sessile cells against fluconazole and amphotericin B was also demonstrated. Real-time reverse transcription-PCR quantification showed that sessile cells overexpressed *CtERG11* (coding for *C. tropicalis* lanosterol 14 α -demethylase) and *CtMDR1* (coding for *C. tropicalis* an efflux protein belonging to the major facilitator superfamily). These mechanisms can contribute to the fluconazole resistance of *C. tropicalis* biofilm.

Keywords: *Candida tropicalis*; biofilm; fluconazole; amphotericin B; resistance.

Introduction

Species of the genus *Candida* are endogenous commensals of the gastrointestinal and urogenital tracts in healthy individuals. However, as opportunistic pathogens, they can cause diseases ranging from mucosal candidiasis to life-threatening disseminated infections, mainly in immunocompromised hosts (Soll, 2002).

Candida albicans has been regarded as the most common causative agent of fungal infection in humans. However, *Candida* species other than *C. albicans* have become a significant cause of infection, particularly in invasive candidal infections, and the population at risk includes cancer patients and transplant recipients treated with immunosuppressive drugs. In addition, healthcare-related factors, including intravascular catheter, broad-spectrum antibiotic use and surgical procedure are risk factors for *Candida* invasive infections (Ruhnke, 2006).

In some parts of the world, *C. tropicalis* has emerged as the second or third-most common agent of candidemia mainly in oncological patients (Kontoyiannis *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002; Goldani & Mário, 2003; Weinberger *et al.*, 2005; Vigouroux *et al.*, 2006; Nucci & Colombo, 2007). In Latin America, particularly in Brazil, this species is also frequently isolated from blood of hospitalized nononcological patients (Godoy *et al.*, 2003; Goldani & Mário, 2003; Colombo *et al.*, 2006; Nucci & Colombo, 2007). Moreover, the increased incidence of *C. tropicalis* as a causative agent of nosocomial urinary tract infections has been reported (Kauffman *et al.*, 2000; Alvarez-Lerma *et al.*, 2003; Rho *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005). Although *C. tropicalis* is less prevalent than *C. albicans*, it remains an important cause of human infections especially because of the high mortality rate of the patients (Costa *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2002; Goldani & Mário, 2003; Bedini *et al.*, 2006). In addition, the emergence of isolates less susceptible to azoles has been rising (Hajjeh *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004).

A substantial proportion of candidal infections are associated with biofilm formation, especially on the surface of implanted medical devices (Douglas, 2003; Ramage *et al.*, 2006). Biofilm consists of surface-attached communities of cells embedded within an exopolymeric matrix which these cells produce. Sessile cells within the communities display an altered phenotype with respect to growth rate and gene transcription compared to

1
2
3 that of planktonic cells (Donlan & Costerton, 2002). The marked clinical significance of
4 biofilm concerns the enhanced resistance of yeast to a variety of antimicrobial agents
5 (Hawser & Douglas, 1995; Ramage *et al.*, 2001a, b, c) and its ability to withstand host
6 defenses (Vuong *et al.*, 2004). Thus, biofilm-associated infections are difficult to treat,
7 representing a source of re-infections (Ramage *et al.*, 2006).
8
9

10
11 Similar to bacterial biofilms, *C. albicans* biofilms display a complex, three-
12 dimensional architecture with structural heterogeneity, the presence of exopolymeric
13 material, and decreased susceptibility to antimicrobial agents (Chandra *et al.*, 2001;
14 Ramage *et al.*, 2001c). In contrast to the extensive literature dealing with *C. albicans*
15 biofilms (Hawser & Douglas, 1995; Ramage *et al.*, 2001 b, c; Chandra *et al.*, 2001), little
16 attention has been paid to *C. tropicalis*. It has been reported that this yeast can form
17 extensive biofilms *in vitro* on the surface of different types of catheters (Hawser &
18 Douglas, 1994) and polystyrene (Shin *et al.*, 2002; Parahitiyawa *et al.*, 2006). Therefore,
19 the purpose of this study was to investigate the characteristics of *C. tropicalis* biofilm
20 development with respect to identifying growth phases, morphology and antifungal
21 susceptibility. The results of these studies can contribute to our understanding of the
22 antifungal resistance of *C. tropicalis* biofilm as well as to its biology.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Materials and methods**

37 ***C. tropicalis* isolates and growth conditions**

38
39 *C. tropicalis* strain 112MC was isolated from a patient with vulvovaginal candidiasis who
40 was seen at the Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá,
41 Paraná, Brazil. *C. tropicalis* strain U9815 was isolated from the urine of a patient admitted
42 to Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, Londrina, Paraná, Brazil. All strains
43 were maintained on Sabouraud dextrose (SD) agar (Himedia, India) and subcultured
44 monthly. The yeasts were also stored in sterile distilled water at 25 °C (McGinnis *et al.*,
45 1974). Species identification was confirmed by a PCR-based method using specific primers
46 directed against the 3' end of 5.8S and 5' end of 28S rDNA regions (Ahmad *et al.*, 2002).
47 Genomic DNA was extracted following procedures described previously (Jain *et al.*, 2001).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Biofilm formation and growth kinetics on surface of polystyrene microtiter plates

Biofilm production by the different *C. tropicalis* isolates was performed in polystyrene, flat-bottomed 96-well microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland) using a procedure described previously (Shin *et al.*, 2002). Briefly, the yeast isolates were grown at 37 °C for 24 h in SD broth pH 6.0, and the cells were counted with a hemocytometer (Neubauer Improved Chamber). A suspension of 6×10^5 yeast cells in 20 μL RPMI 1640 pH 7.0 (Invitrogen-Gibco, USA) was placed in each well containing 180 μL of the same medium. The plates were incubated for various time intervals (3, 6, 9, 12, 24 and 48 h) at 37 °C. After each incubation period, the medium was aspirated off and non-adherent cells were removed by washing thoroughly three times with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). Biofilm formation was quantified using the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)-reduction assay as described elsewhere (Ramage *et al.*, 2001b). A 100- μL aliquot of XTT-menadione [0.1 mg mL^{-1} XTT, 1 μM menadione (Sigma Chemical Co, USA)] was added to each well, and the plates were incubated in the dark for 2 h at 37 °C before spectrophotometric readings at 490 nm with a microtiter plate reader (Universal Microplate Reader ELx 800, Bio-Tek Instruments, USA). Experiments were carried out in triplicate on three different occasions. The differences in biofilm metabolic activity among the isolates were compared with a *t*-test using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). Significance level for *P* values is given in the figure legend.

Scanning electron microscopy

Strips of polyvinyl chloride (PVC, surface area 0.5 cm^2) were aseptically cut and placed in wells of 24-well tissue culture plates (Techno Plastic Products, Switzerland). A standard inoculum of 3.0×10^6 cells, from overnight cultures of the yeast strains, was prepared in 1 mL of RPMI 1640 pH 7.0 medium and used to form biofilm on this surface. The strips were then immersed in these cell suspensions and incubated statically at 37 °C for 48 h. After this incubation, non-adherent organisms were removed by washing gently three times with PBS pH 7.2. Data collections were carried out at the different times of biofilm development as described above. Biofilms formed on these strips were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature. Post-

1
2
3 fixation, the cells were dehydrated with a series of ethanol washes (15, 30, 50, 70, 80, 90,
4 95 and 100%), critical-point dried in CO₂, coated with gold and examined with a
5 SHIMADZU SS-550 scanning electron microscope.
6
7
8
9

10 **Antifungal susceptibility testing**

11 The minimum inhibitory concentrations (MIC) of fluconazole (Pfizer Central Research,
12 United Kingdom) and amphotericin B (Sigma Chemical Co, USA) for planktonic cells of
13 all isolates were determined by broth microdilution assays for yeasts according to the
14 Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI (M27-A2 document, NCCLS, 2002)].
15 Quality control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) was
16 included in each experiment. Two wells of each plate served as growth and sterility
17 controls. The following breakpoint definitions for fluconazole were used according to CLSI
18 guidelines to categorize the isolates: MIC $\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$, resistant; MIC of 16-32 $\mu\text{g mL}^{-1}$,
19 susceptible dose dependent; and MIC $\leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$, susceptible. For amphotericin B,
20 isolates with MIC $> 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ were considered resistant (Pinto *et al.*, 2006). To determine
21 antifungal susceptibilities of sessile cells, biofilms were formed as described above. After
22 24 h of biofilm formation, the medium was aspirated off and each well was washed three
23 times with sterile PBS. A 200- μL aliquot of RPMI 1640 medium containing serially
24 double-diluted concentrations of antifungal (fluconazole 512.0 - 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, amphotericin
25 B 8.00 - 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added and the plates were incubated further for 48 h at 37 °C.
26 Controls included antifungal-free wells and biofilm-free wells. Sessile minimum inhibitory
27 concentrations were determined at 50 % inhibition (SMIC₅₀) and at 80 % inhibition
28 (SMIC₈₀) compared to antifungal-free control wells using the XTT-reduction assay
29 described above. Experiments were carried out in triplicate in three different assays.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Real-time PCR**

49 Real-time PCR was performed to determine the relative Ct*ERG11* and Ct*MDR1* mRNA
50 levels of *C. tropicalis* biofilm. The planktonic cells were obtained from the supernatant of
51 the *C. tropicalis* cultures incubated with agitation (200 rpm) for 24 h. The 24 h-sessile cells
52 from polystyrene plate were harvested by gentle scraping with a sterile toothpick. The total
53 RNAs were extracted using the RNAeasy kit (Qiagen Inc., USA) following the
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 manufacturer's instruction and were treated with DNase-RQ1 (Promega, Brazil). The
4 nucleotide sequences of *CtERG11* (accession number AY942646), *CtMDR1* (accession
5 number AF194419) and *CtACT1* (coding for actin, accession number AJ237918) deposited
6 in the GenBank/EMBL databases were used for specific primer design. Primer pairs were:
7 *CtERG11*, 5' ATGGCTATTGTTGATACTGC 3' and 5' GCATTGTAAATGAATTCGTG
8 3'; *CtMDR1*, 5' CCCAGAAGTTTTTCATTCCA 3' and 5' CCCCAAGCAACAGGATAAT
9 3'; *CtACT1*, 5' ATGGACGGGGGTATGTTTCA 3' and 5'
10 GACATAAGTAATTTCCAATGTG 3'. Total RNA (1 µg) was converted to cDNA by
11 incubation with oligo(dT) and ImProm-II™ reverse transcription (Promega, USA) for 2 h
12 at 42 °C. Samples were purified by centrifugation through a Microcon YM-30 filter
13 (Millipore, Brazil). Two-step real-time RT-PCR assays were performed in an ABI PRISM
14 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Brazil). Fifteen ng of cDNA and
15 the recommended concentration of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Brazil)
16 were added to a 25 µL reaction mixture. The specific primers were added at a concentration
17 of 200 nM in all cases. PCR conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C,
18 followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. Thermal
19 dissociation confirmed that RT-PCR generated a single amplicon. We used a standard
20 curve method, based on Ct values, to assess the expression of the genes studied. We used
21 triplicate 1:2 dilutions of known concentrations of cDNA to generate curves extending from
22 20 ng to 0.16 ng of cDNA. Dilution series of eight known concentrations (20 ng-0.15 ng) of
23 cDNA were used in triplicate. A standard curve was constructed for each of the genes
24 studied and for the control gene (*CtACT1*). We calculated cDNA concentration by dividing
25 the value obtained for the gene under investigation by the value obtained for the control
26 gene. Differences in expression are reported, using planktonic cells as the reference
27 population.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Results

50 Biofilm formation by *C. tropicalis*

51
52
53
54
55 Biofilm formation by *C. tropicalis* on the surface of polystyrene wells was monitored using
56 the XTT-reduction assay. This method is based on the ability of mitochondrial
57
58
59
60

1
2
3 dehydrogenases in viable cells to convert the substrate into a reduced-formazan product
4 which can be measured in a spectrophotometer. The kinetics of biofilm formation over 48
5 h, as revealed by these assay, is illustrated in Fig. 1. An initial rapid increase in biofilm
6 metabolic activity was detected in the first 12 h, which indicated the increase in cell
7 density. After 24 h, the metabolic activity remained high but reached a plateau. The growth
8 kinetics was similar for the two *C. tropicalis* strains, but variations in the metabolic activity
9 level of the biofilms were detected in the individual strains ($P < 0.01$). The highest activity
10 was observed in the 112MC strain, a vaginal isolate. The initial inoculum of the cells
11 consisted mainly of yeast cells (data not shown).
12
13
14
15
16
17
18
19

20 21 **Scanning electron microscopy of *C. tropicalis* biofilm**

22 Biofilm formation by *C. tropicalis* on PVC strips was examined by scanning electron
23 microscopy (Fig. 2). In the first 3 h, distinct microcolonies of yeast and filamentous cells
24 were visualized on the surface of the strip. Interestingly, during the biofilm growth, the
25 majority of *C. tropicalis* cells were present as filamentous forms (6 – 24 h). Mature biofilm
26 consisted of a dense and heterogeneous network of yeast, pseudohyphae and hyphae. In
27 addition, intense hyphal budding was observed in this film (Fig. 3). Overall, these results
28 indicate that biofilm growth kinetics on polystyrene surface is similar to that on catheter
29 surfaces.
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Antifungal susceptibility pattern of planktonic and sessile cells of *C. tropicalis***

40 A clear difference in antifungal susceptibilities was seen between planktonic and sessile
41 cells of the same *C. tropicalis* strain. Fluconazole and amphotericin B showed decreased
42 activity against biofilm of both yeast strains tested. The results, determined by XTT-
43 reduction assay and expressed as SMIC_{50s} and SMIC_{80s}, are shown in Table 1. Biofilms
44 were intrinsically resistant to fluconazole and amphotericin B, although their counterpart
45 planktonic cells remained sensitive to the same antifungals.
46
47
48
49
50
51
52

53 **Expression of genes *CtERG11* and *CtMDR1* in the *C. tropicalis* biofilm**

54 To determine the expression of the genes *CtERG11* and *CtMDR1* in the biofilm, real-time
55 PCR was performed using RNAs extracted from *C. tropicalis* mature biofilm and
56
57
58
59
60

1
2
3 planktonic cells. The pattern of expression observed for these genes was similar between
4 the vaginal and urinary isolates (Fig. 4). The analysis of expression revealed that both genes
5 were overexpressed in the sessile cells compared to their planktonic counterparts. *CtMDR1*
6 overexpression was 3.1- and 2.7-fold for the U9815 and 112 MC isolates, respectively. For
7 gene *CtERG11*, a slight increase in expression of 2.2- and 1.5-fold was observed in the U-
8 9815 and 112 MC isolates. Moreover, the expression of both genes was noted to be higher
9 in the biofilm cells of the urinary isolate.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 Discussion

21 The formation of biofilms by *Candida* species has been demonstrated on a number
22 of abiotic surfaces, including medical devices (Ramage *et al.*, 2006). The initial phase of *C.*
23 *albicans* biofilm formation begins with the adherence of yeast cells to the substrate surface
24 followed by germination and microcolony formations. The metabolic activity is intense and
25 the extracellular material emerges during the intermediate phase. Mature biofilms consist of
26 a dense network of yeast and hyphal elements embedded within exopolymeric material
27 (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001c). Similar structural features have been observed
28 in biofilm formed in rat (Andes *et al.*, 2004) and rabbit (Schinabeck *et al.*, 2004) central
29 venous catheter models. Additional host cells, including neutrophils, macrophages, red
30 blood cells and platelets, have been observed within biofilm formed *in vivo*.
31
32
33
34
35
36
37
38

39 In this study, we demonstrated the ability of *C. tropicalis* to adhere and form
40 biofilm on polystyrene and polyvinyl chloride surfaces under static conditions. In both, the
41 development of biofilm proceeds through three distinct phases, adhesion, proliferation and
42 maturation, as occurs with *C. albicans* and the other species (Chandra *et al.*, 2001; Ramage
43 *et al.*, 2001a; Kuhn *et al.*, 2002). In spite of the similar developmental phases, variations in
44 the metabolic activities of the biofilm formed on the polystyrene surface were detected
45 between the *C. tropicalis* strains tested. These results probably reflect the physiological
46 differences between the strains.
47
48
49
50
51
52

53 The overall organization of *Candida* biofilm is similar but the details of the
54 structure are highly dependent on the biofilm formation conditions (Hawser & Douglas,
55
56
57
58
59
60

1994; Chandra *et al.*, 2001, 2005) and yeast species (Hawser & Douglas, 1994; Ramage *et al.*, 2001a, c; Kuhn *et al.*, 2002; Parahitiyawa *et al.*, 2006).

Mature biofilms of *C. tropicalis* on polyvinyl chloride surface are structurally similar to those described for *C. albicans* on the same surface (Hawser & Douglas, 1995). The extrapolymeric material could not be identified because of the destructive nature of SEM. Recently, Al-Fattani & Douglas (2006) reported that *C. tropicalis* biofilm synthesized large amounts of extrapolymeric material even when grown statically, and such matrix is composed of hexosamine (the major component), carbohydrate, protein, phosphorus and uronic acid. Clearly, an enormous quantity of hyphal elements was observed during the growth and maturation phase of the biofilm development of *C. tropicalis*. The biofilms were formed in RPMI medium, which induces hyphal formation in *C. albicans* (Hoyer *et al.*, 1995). Using a yeast nitrogen base medium supplemented with glucose, Kuhn *et al.* (2002) observed that *C. tropicalis* mature biofilm on the surface of serum-preconditioned silicone elastomer disks displayed only blastospore forms. Similar results were obtained on the polystyrene surface (Calgary biofilm device) by Parahitiyawa *et al.* (2006). We did not test other media, but the mixture of yeasts, pseudohyphae and hyphae was not seen when the microorganism was grown in liquid culture alone. In broth medium, *C. tropicalis* undergoes reversible morphological transitions between yeast cells and pseudohyphae, which can be induced by ethanol (Tani *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 2006).

It has been suggested that morphogenesis is triggered when the organism contacts a surface (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001c; Douglas, 2003; Kumamoto & Vines, 2005), and hyphae may have an important role in the structural integrity and multilayered architecture of mature biofilm (Baillie & Douglas, 1999; Ramage *et al.*, 2002b). Indeed, the surface contact results in various cellular behaviors, including biofilm formation and invasion. These phenotypic changes involve differential gene expression, which will ultimately cause the organism to respond accordingly to the environmental conditions. In this context, Davies & Geesey (1995) reported that the production of alginate, an exopolymeric material of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, occurs in the early phase of the process. In fact, cells attached to a glass surface for at least 15 min exhibited up-regulation of *algC*, the main gene in the alginate biosynthesis pathway.

1
2
3 The molecular mechanisms involved in the triggering and regulation of the biofilm
4 formation process in *Candida* are still unknown. It has been shown that the mitogen-
5 activated protein kinase (Mkc1p), a component of the fungal cell integrity pathway controls
6 biofilm development and invasive growth in *C. albicans*. There is an accumulation of
7 Mkc1p in cells that are grown on a surface, and *C. albicans mkc1*-null mutants are
8 defective in invasive hyphal growth in agar medium and biofilm formation (Kumamoto,
9 2005). This signal transduction pathway is known to be activated by cell wall stress in
10 *Saccharomyces cerevisiae* (Kamada *et al.*, 1995), and in *C. albicans*, Mkc1p may then
11 detect the cell wall substrate surface contact in order to produce an appropriate response.
12 Recently, several reports described the global transcriptional pattern of *C. albicans* biofilm
13 development in *in vitro* conditions. In general, the significant differential expression in
14 sessile cells was observed in genes involved in protein synthesis, amino acid, nucleotide
15 and lipid metabolism, transcription and control of cellular organization (Garcia-Sanchez *et*
16 *al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005; Murillo *et al.*, 2005).

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28 The planktonic cells of the *C. tropicalis* strains tested were susceptible to both
29 fluconazole and amphotericin B, agents commonly used in the treatment of candidiasis. Not
30 surprisingly, biofilm of these cells exhibited an enhanced resistance to both antifungals.
31 Overexpression of CtMDR1 and CDR1 [ATP-binding cassette pump (Barchiesi *et al.*,
32 2000)] and CtERG11 (Vandeputte *et al.*, 2005) has been associated with the resistance of
33 planktonic cells of *C. tropicalis* to fluconazole, but the molecular mechanisms of resistance
34 during biofilm growth are unclear. Our results showed the increased expression of *mdr1_{Ct}*
35 and CtERG11 in biofilm of *C. tropicalis*. The expression of gene CtMDR1 was greater than
36 that of CtERG11, suggesting an active role of CtMDR1 in the resistance of biofilm of this
37 yeast, at least in the first 24 h of its formation. Currently available lines of evidence indicate
38 that the mechanisms of biofilm resistance are complex and multifactorial in *C. albicans*. In
39 the early phase of biofilm formation, drug resistance can be detected in the few hours after
40 cellular adhesion. Transcripts from CDR1, CDR2 e MDR1 are increased in the early phase-
41 biofilm of *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2002a; Mukherjee *et al.*, 2003). On the other hand, a
42 decreased content of ergosterol at intermediate and mature phases of biofilm formation
43 (Mukherjee *et al.*, 2003) can contribute to the resistance of mature biofilms.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

We showed that the development and architecture of *C. tropicalis* biofilm are similar to those described for other *Candida* species. In addition, an elevated resistance of the sessile cells to fluconazole and amphotericin B was demonstrated. The sessile cells overexpressed *CtERG11* and *CtMDR1*, and these mechanisms can contribute to the drug resistance of *C. tropicalis* biofilm.

Acknowledgement

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of F.C. Bizerra. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

References

- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS & Khan ZU (2002) Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* **40**: 2483-2489.
- Al-Fattani MA & Douglas LJ (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**: 999-1008.
- Alvarez-Lerma F, Nollas-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N & Bobillo F (2003) Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med* **29**: 1069-1076.
- Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K & Pitula A (2004) Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* **72**: 6023-6031.
- Baillie GS & Douglas LJ (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* **48**:671-679.

- 1
2
3 Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi Di Francesco L, Caselli F, Giannini D,
4
5 Giacometti A, Gavaudan S & Scalise G (2000) Experimental induction of fluconazole
6
7 resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1578-
8
9 1584.
- 10
11 Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F,
12
13 Barchiesi F & Esposito R (2006) Epidemiology of candidaemia and antifungal
14
15 susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect* **12**: 75-
16
17 80.
- 18
19 Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS & Jiang YY (2005)
20
21 cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm
22
23 exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:584-589.
- 24
25 Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T & Ghannoum MA (2001)
26
27 Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture,
28
29 and drug resistance. *J Bacteriol* **183**: 5385-5394.
- 30
31 Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM &
32
33 Ghannoum MA (2005) Modification of surface properties of biomaterials influences the
34
35 ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8795-8801.
- 36
37 Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Noue'r SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D
38
39 & Morgan J for the Brazilian Network Candidemia Study (2006) Epidemiology of
40
41 candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven
42
43 medical centers. *J Clin Microbiol* **44**: 2816-2823.
- 44
45 Costa SF, Marinho I, Araujo EA, Manrique AE, Medeiros EA & Levin AS (2000)
46
47 Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect* **45**:69-72.
- 48
49 Davies DG & Geesey GG (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in
50
51 *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl*
52
53 *Environ Microbiol* **61**:860-867.
- 54
55 Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant
56
57 microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
58
59
60

- 1
2
3 Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30-
4 36.
5
6
7 Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM & D'Enfert C (2004) *Candida*
8 *albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene
9 expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**: 536-545.
10
11
12 Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, Matta DA &
13 Colombo AL (2003) Species distribution and antifungal susceptibility profile of
14 *Candida* spp. bloodstream isolates from latin american hospitals. *Mem Inst Oswaldo*
15 *Cruz* **98**: 401-405.
16
17
18 Goldani LZ & Mário PSS (2003) *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J*
19 *Infect* **46**: 155-160.
20
21
22 Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan
23 M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF,
24 Brandt ME & Warnock DW (2004) Incidence of bloodstream infections due to *Candida*
25 species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a
26 population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**: 1519-1527.
27
28
29 Hawser SP & Douglas LJ (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of
30 catheter materials *in vitro*. *Infect Immun* **62**: 915-921.
31
32
33 Hawser SP & Douglas LJ (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal
34 agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2128-2131.
35
36
37 Hoyer LL, Scherer S, Shatzman AR & Livi GP (1995) *Candida albicans* ALS1: domains
38 related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif.
39 *Mol Microbiol* **15**: 39-54.
40
41
42 Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E & Ranade SA (2001) Variation in random amplified
43 polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and –sensitive
44 strains of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**: 113-119.
45
46
47 Jang SJ, Han HL, Lee SH, Ryu SY, Chaulagain BP, Moon YL, Kim DH, Jeong OY, Shin
48 JH, Moon DS & Park YJ (2005) PFGE-Based epidemiological study of an outbreak of
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of
4 nosocomial infection. *Jpn J Infect Dis* **58**: 263-267.

7 Kamada Y, Jung US, Piotrowski J & Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP
8 kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock
9 response. *Genes Dev* **9**:1559-1571.

13 Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar
14 AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE & National
15 Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group (2000).
16 Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin*
17 *Infect Dis* **30**: 14-18.

22 Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP &
23 Raad II (2001) Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer.
24 *Clin Infect Dis* **33**: 1676-1681.

28 Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2002) Comparison of biofilms
29 formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect*
30 *Immun* **70**: 878-888.

34 Kumamoto CA (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive
35 growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 5576-5581.

38 Kumamoto CA & Vences MD (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on
39 surfaces. *Ann Rev Microbiol* **59**:113-133.

42 Leung AYH, Chim CS, Ho PL, Cheng VCC, Yuen KY, Lie, AKW, AU WY, Liang R &
43 Kwong YL (2002) *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological
44 malignancies: clinical features and risk factors. *J Hosp Infect* **50**: 316-319.

48 McGinnis MR, Padhye AA & Ajello L (1974) Storage of stock cultures of filamentous
49 fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol*
50 **28**: 218-222.

54 Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM & Ghannoum MA (2003) Mechanism of fluconazole
55 resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and
56 membrane sterols. *Infect Immun* **71**:4333-4340.

- 1
2
3 Murillo LA, Newport G, Lan CY, Habelitz S, Dungan J & Agabian NM (2005) Genome-
4 wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida*
5 *albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1562-1573.
6
7
8
9 National Committee For Clinical Laboratory Standards - NCCLS. (2002). Reference
10 method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard
11 M27-A2. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa, USA.
12
13
14 Nucci M & Colombo AL (2007) Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical,
15 epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary
16 care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**: 77-82.
17
18
19
20 Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Ye J, Tsang PWK, Cheung BPK,
21 Yau JYY & Yeung SKW (2006) Interspecies variation in *Candida* biofilm formation
22 studied using the Calgary biofilm device. *APMIS* **114**: 298-306.
23
24
25
26 Pinto PM, Weikert-Oliveira RCB, Lyon J, Cury VF, Arantes RR, Koga-Ito C, Resende MA
27 (2006) *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained
28 from patients with different predisposing factors to candidosis. *Microbiol Res*, doi:
29 10.1016/j.micres.2006.08.007
30
31
32
33 Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL & López-Ribot JL (2001a) Biofilm formation by
34 *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* **39**: 3234-3240.
35
36
37
38 Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL & López-Ribot JL (2001b) Standardized method
39 for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob*
40 *Agents Chemother* **45**: 2475-2479.
41
42
43
44 Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL & López-Ribot JL (2001c) Characteristics of
45 biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* **18**:163-170.
46
47
48 Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL (2002a) Investigation
49 of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans*
50 biofilms. *J Antimicrob Chemother* **49**:973-980.
51
52
53
54 Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL & Wickes BL (2002b) The filamentation
55 pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm
56 formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **214**: 95-100.
57
58
59
60

- 1
2
3 Ramage G, Martinez JP & López-Ribot JL (2006) *Candida* biofilms on implanted
4 biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**: 979-986.
5
6
7 Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP & Ryang DW
8 (2004) Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida*
9 *tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol* **42**: 80-86.
10
11
12 Ruhnke M (2006) Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida*
13 *albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* **7**:495-504.
14
15
16
17 Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S &
18 Ghannoum MA (2004). Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal
19 amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1727-1732.
20
21
22
23 Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP & Ryang DW (2002)
24 Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic
25 patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin*
26 *Microbiol* **40**: 1244-1248.
27
28
29
30
31 Soll DR (2002) *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic
32 plasticity. *Acta Tropica* **81**:101-110.
33
34
35 Suzuki T, Omi K, Ito T, Takata T, Kikutsugi H, Fujimura T, Kono K & Kamihara T (2006)
36 Ethanol-induced pseudohyphal transition in the cells of *Candida tropicalis*:
37 participation of phosphoinositide signal transduction. *FEMS Yeast Res* **6**: 177-185.
38
39
40
41 Tani Y, Yamada Y & Kamihara T (1979) Morphological change in *Candida tropicalis* pK
42 233 caused by ethanol and its prevention by myo-inositol. *Biochem Biophys Res*
43 *Commun* **91**: 351-355.
44
45
46
47 Vandeputte P, Larcher G, Berges T, Renier G, Chabasse D & Bouchara JP (2005)
48 Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob*
49 *Agents Chemother* **49**: 4608-4615
50
51
52
53 Vigouroux S, Morin O, Moreau P, Harousseau JL & Milpied N (2006) Candidemia in
54 patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single
55 center. *Haematologica* **91**: 137-138.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR & Otto M (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.

Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, Bash E, Turner D, Goldschmied-Reouveng A, Regev-Yochay G, Pitlik SD & Keller N (2005) Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality. *J Hosp Infect* **61**: 146–154.

Yang YL, Ho YA, Cheng HH, Ho M, Lo HJ (2004) Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**: 60-64.

Figure Legends

Fig. 1: Kinetics of *C. tropicalis* biofilm formation on polystyrene plate at 37 °C as determined by XTT readings. (□) urinary strain U9815; (▲) vaginal strain 112MC. Values represent the mean ± standard deviation and are representative of three independent experiments. Differences in biofilm metabolic activity were compared by *t*-test. *P<0.001

Fig. 2: Scanning electron microscopy images of *C. tropicalis* strain U9815 biofilm formation on PVC-catheter over a period of times (3, 6, 9, 12, 24 and 48 h) at 37 °C. (bar: 20 µm).

Fig. 3: Scanning electron microscopy image of *C. tropicalis* strain U9815 mature biofilm (48h) on PVC-catheter. (bar: 10 µm).

Fig. 4: Pattern of *CtERG11* (black bars) and *CtMDR1* (gray bars) expression in *C. tropicalis* biofilm. mRNAs from planktonic and sessile cells (24 h-biofilm formation) of U9815 and 112MC strains were obtained and the expression were quantified by real time PCR using SYBR green system and cycle threshold method. The height of the bars represents the fold change in expression of biofilm versus planktonic cells. Bars represent data from three replicates. Error bars represent standard deviations.

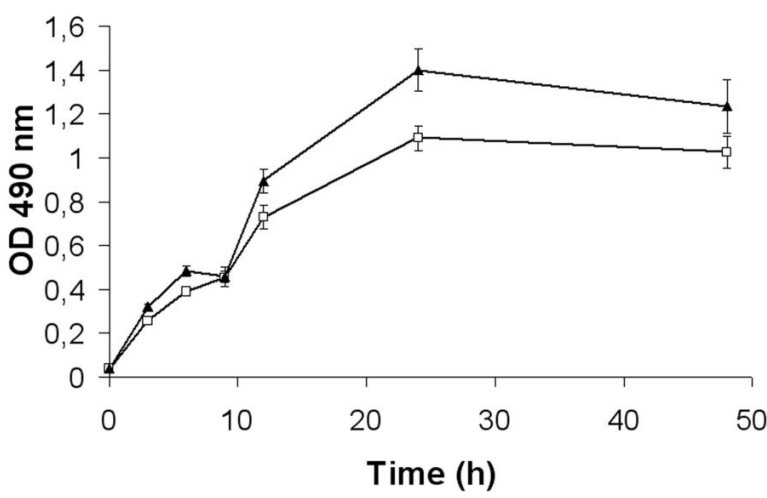
Table 1: Antifungal susceptibility testing of *C. tropicalis* under planktonic (MIC) and sessile (SMIC) growing conditions. Values are in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Strain	Planktonic		Sessile			
	Fcz	Amp B	Fcz		Amp B	
	MIC	MIC	SMIC ₅₀	SMIC ₈₀	SMIC ₅₀	SMIC ₈₀
U9815	1.0	0.50	> 512	> 512	4	>8
112MC	8.0	0.25	> 512	> 512	2	>8

Fcz: Fluconazole; Amp B: Amphotericin B.

Bizerra *et al.*, Table 1.

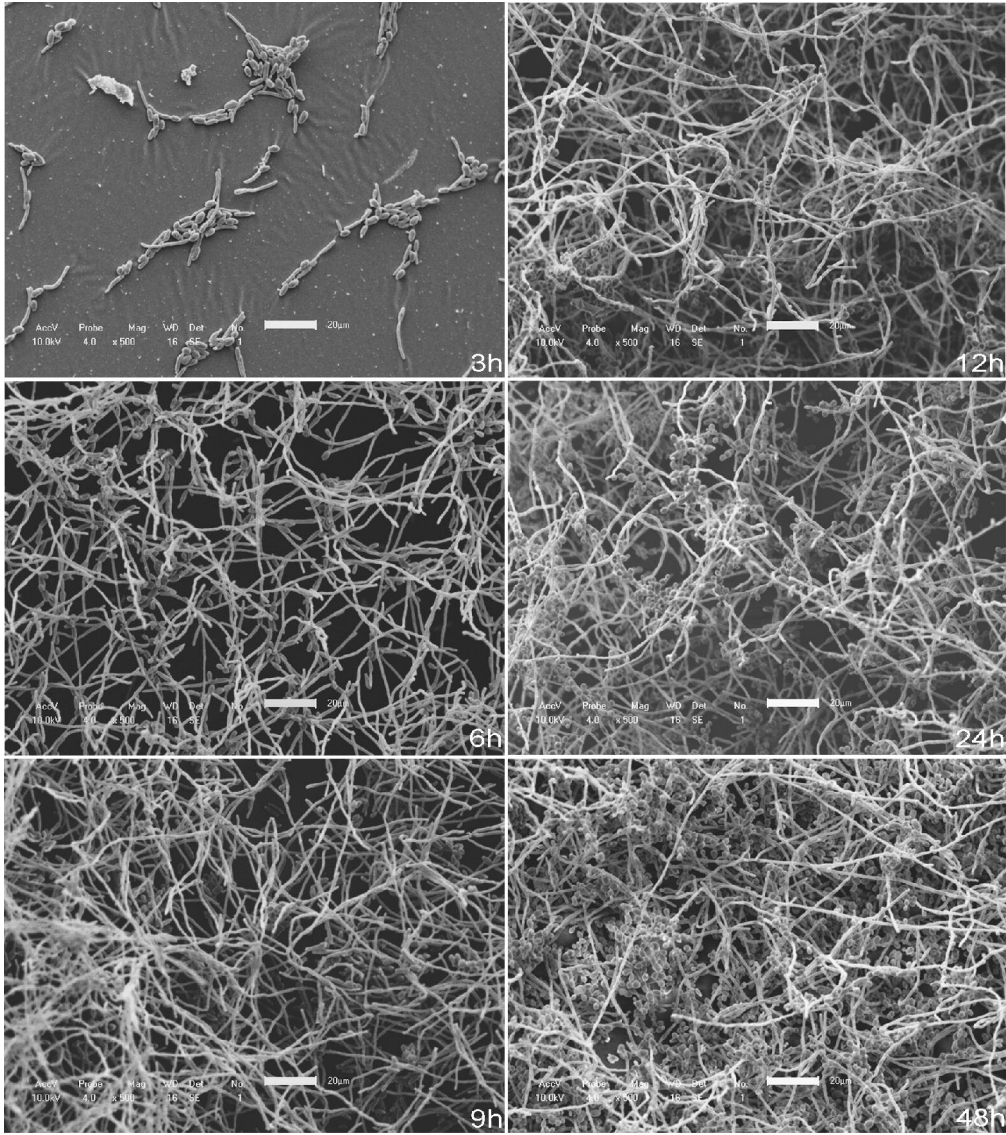
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



49x30mm (600 x 600 DPI)

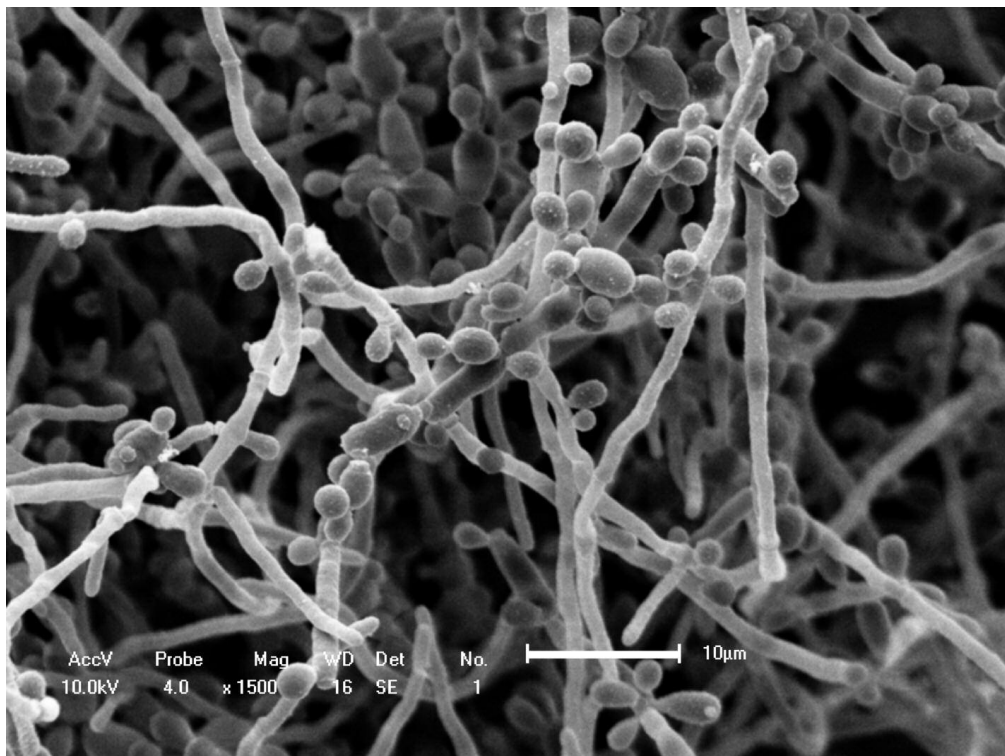
Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



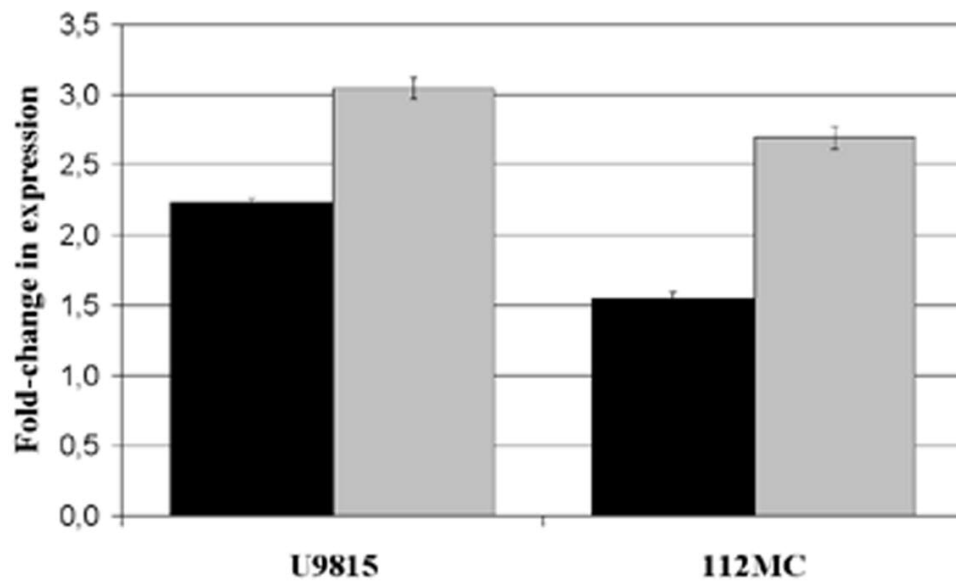
167x192mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



59x45mm (600 x 600 DPI)

Review



49x31mm (600 x 600 DPI)

Review