



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MURILO MOREIRA DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES DE
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS* PRÉ E PÓS
EXPOSIÇÃO AO FLUCONAZOL**

Londrina
2022

MURILO MOREIRA DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES DE
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS* PRÉ E PÓS
EXPOSIÇÃO AO FLUCONAZOL**

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

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

Londrina
2022

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

S237 Santos, Murilo Moreira.
Alterações celulares e moleculares de morfotipos de *Candida tropicalis* pré e pós exposição ao fluconazol / Murilo Moreira Santos. - Londrina, 2022.
64 f. : il.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. *Candida tropicalis* - Tese. 2. Switching fenotípico - Tese. 3. Fluconazol - Tese. 4. Resistência antifúngica - Tese. I. Furlaneto, Marcia Cristina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

MURILO MOREIRA DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES DE
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS* PRÉ E PÓS
EXPOSIÇÃO AO FLUCONAZOL**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Kelly Ishida
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panaggio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de janeiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À minha família, acima de tudo ao meu pai, que durante toda a minha vida me ensinou a pensar no próximo, me mostrou o verdadeiro significado de caráter, humanidade e religião, além de me incentivar a estudar e buscar sempre o que me deixa feliz.

Aos meus amigos de laboratório, pelo apoio, compreensão e conforto. Nos dias bons e nos dias ruins todos nós, Hugo, Cássia, Eloiza, Nathália, Matheus, Renan e Thamires, nos unimos e vencemos o que a vida impõe de dificuldade.

À minha orientadora, Professora Doutora Marcia Cristina Furlaneto, que tornou esse sonho possível através da oportunidade disponibilizada, ensinamentos construídos e apoio irrestrito durante toda a minha trajetória.

À minha namorada, Lavínia Zaborne, que foi a principal ouvinte das minhas angústias e frustrações ao longo da minha formação, sempre me compreendeu e sempre me fez o maior bem possível.

Aos meus amigos que fiz durante a vida, que sempre me apoiaram e fizeram eu me sentir bem quanto ao rumo que minha vida toma.

À Deus, que, personificado nos ensinamentos de meu pai, me confortou e me ajudou a, dia-a-dia, realizar meu trabalho com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À equipe Genoma, pelos ensinamentos e apoio durante a realização do trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Marcia Cristina Furlaneto, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pela confiança depositada em mim ao longo da minha trajetória.

À banca examinadora, composta pela Dr^a. Kelly Ishida e pelo Dr. Luciano Aparecido Panagio, que ajudaram a lapidar meu trabalho e o fizeram melhor.

Aos professores que cederam equipamentos e materiais que possibilitaram o andamento da pesquisa, dentre eles: Lucy Megumi, Sueli Ogatta, Luciano Panagio, Silvia Helena, Mário Sérgio e seus respectivos laboratórios: NIP 9, NIP 5, NIP 3, LAPA, LMEM, GenTox.

Ao corpo docente da UEL, que ao decorrer da graduação me deram muita bagagem e aprendizado, depositado em grande parte neste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina.

Aos órgãos de fomento, que incentivam a ciência em nosso país, e, sobretudo à instituição que apoiou financeiramente minha pesquisa: CNPq.

SANTOS, Murilo Moreira. **Alterações celulares e moleculares de morfotipos de *Candida tropicalis* pré e pós exposição ao fluconazol.** 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Candida tropicalis é uma das 15 espécies do gênero *Candida* que são patogênicas ao ser humano. A espécie tem sua relevância epidemiológica traduzida como a segunda ou terceira espécie mais isolada do gênero, com prevalência registrada em regiões tropicais e subtropicais, como América Latina e Ásia, incluindo o Brasil. A levedura tem capacidade de promover infecções com taxa de mortalidade semelhante à de *Candida albicans* e superiores às de outras espécies não-*Candida albicans*. O *switching* fenotípico, considerado um fator de virulência descrito como capaz de promover variabilidade a partir de linhagens isogênicas, podendo acarretar em aumento na virulência. Neste sentido, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do *switching* fenotípico em aspectos moleculares e celulares de morfotipos (linhagem parental, Variante Crepe e Revertente de Crepe – RC) de *C. tropicalis* expostos ao fluconazol. Para isso, as metodologias utilizadas visaram avaliar a influência do *switching* fenotípico pré e pós exposição ao fluconazol na concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco, na expressão dos genes *ERG11* (gene que codifica a enzima lanosterol 14- α -desmetilase da via de síntese do ergosterol) e *CDR1* (gene que codifica uma bomba de efluxo para múltiplas drogas para o gênero *Candida*), na porosidade de parede celular, no tamanho e granulosidade celular, na quantidade de componentes de parede celular e na integridade de membrana plasmática. Os resultados demonstraram o morfotipo (RC) com o maior valor de CIM50, menor porosidade de parede celular e superexpressão do gene *CDR1*. Além disso, destaca-se a superexpressão do gene *ERG11* para o morfotipo Crepe, sugerindo que há uma maquinaria molecular morfotipo-dependente para morfotipos de *C. tropicalis* em resposta ao fluconazol. Para todas as análises foi possível evidenciar o efeito do *switching* fenotípico, mostrando que o fator de virulência tem a capacidade de modificar características moleculares e celulares em *C. tropicalis*.

Palavras-chave: levedura; *switching* fenotípico; adaptação; estresse.

SANTOS, Murilo Moreira. **Cellular and molecular alterations of *Candida tropicalis* morphotypes before and after fluconazole exposure.** 2022. 64 p. Dissertation (Master degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Candida tropicalis is one of 15 species of the *Candida* genus that are pathogenic to humans. The species has its epidemiological relevance, identified as the second or third most isolated species of the genus, with a prevalence recorded in tropical and subtropical regions, such as Latin America and Asia, including Brazil. The yeast is capable of promoting infections with a mortality rate similar to *Candida albicans* and higher than other non-*Candida albicans* species. The phenotypic switching virulence factor is described as an event capable of promoting variability from isogenic strains, which may lead to clinical difficulties. In this sense, the present work aimed to evaluate the effect of phenotypic switching on molecular and cellular aspects of *C. tropicalis* morphotypes (parental strain, crepe variant and revertant of crepe - RC) exposed to fluconazole. For this, the methodologies used aimed to evaluate the influence of phenotypic switching before and after exposure to fluconazole on the minimum inhibitory concentration (MIC) of the drug, on the expression of ERG11 genes (gene encoding the enzyme lanosterol 14- α -demethylase of the ergosterol pathway) and CDR1 (gene encoding an efflux pump for multiple drugs for the *Candida* genus), cell wall porosity, cell size and granularity, amount of cell wall components and plasma membrane integrity. The results demonstrated the RC morphotype with the highest MIC₅₀ value, lowest cell wall porosity and *CDR1* gene overexpression. Furthermore, the overexpression of the *ERG11* gene for the Crepe morphotype stands out, suggesting that there is a morphotype-dependent molecular machinery for *C. tropicalis* morphotypes in response to fluconazole exposure. For all analyzes, it was possible to evidence the effect of phenotypic switching, showing that the virulence factor has the ability to modify molecular and cellular characteristics in *C. tropicalis*.

Key words: yeast; virulence factor; adaptation; stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Filogenia de <i>Candida</i> spp. e espécies próximas relacionadas (Ene, Hickman & Gerstein., 2021 adaptado de Muñoz et al., 2018).....	18
Figura 2 -	Patogênese da candidíase invasiva. Fonte: Pappas et al. (2018), com adaptações	23
Figura 3 -	Sistema de switching 49.07, isolado traqueal de <i>Candida tropicalis</i> proveniente do Hospital Universitário de Londrina (HU-UDEL).....	24
Figura 4 -	Arquitetura da membrana plasmática e parede celular de <i>Candida</i> spp. Fonte: Childers et al. (2019), com adaptações.....	27
Figura 6 -	Expressão relativa do gene ERG11 em morfotipos derivados de switching em <i>C. tropicalis</i> sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).....	38
Figura 7 -	Expressão relativa do gene CDR1 em morfotipos derivados de switching em <i>C. tropicalis</i> sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).....	39
Figura 8 -	Porosidade relativa (%) de morfotipos derivados de switching fenotípico sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).....	40
Figura 9 -	Quantificação de β-glucana da parede celular de morfotipos de <i>C. tropicalis</i> sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL)...	41
Figura 10 -	Quantificação de manoproteínas da parede celular de morfotipos de <i>C. tropicalis</i> sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL)...	42
Figura 11 -	Quantificação de quitina da parede celular de morfotipos de <i>C. tropicalis</i> sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).....	43
Figura 12 -	Comparação da média da complexidade/granulosidade celular na área sob a curva (SSC-A) e complexidade/granulosidade celular pela altura do histograma (SSC-H) de citometria de fluxo entre morfotipos derivados de switching fenotípico em condição controle e pós exposição ao fluconazol (1µg/mL)	44
Figura 13 -	Comparação da média do tamanho celular na altura do histograma (FSC-H) e média do tamanho celular na área sob a curva (FSC-A) de citometria de fluxo entre morfotipos derivados de switching fenotípico em condição controle e pós exposição ao fluconazol (1µg/mL)	45

- Figura 14** - Dot Blot dos morfotipos derivados de switching fenotípico na condição controle e expostos ao fluconazol (1µg/mL) num histograma SSC-A x FSC-A, onde SSC: Complexidade celular; FSC: Tamanho celular; A: Área sob a curva. FLC = fluconazol 46
- Figura 15** - Influência do fluconazol na integridade de membrana celular do morfotipo Crepe derivado de switching em *C. tropicalis* pré (controle) e pós exposição ao fluconazol (1µg/mL)..... 47
- Figura 16** - Influência do fluconazol na integridade de membrana celular do morfotipo RC derivado de switching em *C. tropicalis* pré (controle) e pós exposição ao fluconazol (1µg/mL)..... 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características estruturais do sistema de switching 49.07	30
Quadro 2 -	Oligonucleotídeos iniciadores de <i>C. tropicalis</i> usados para a análise da expressão gênica empregando qPCR.....	36

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Critério interpretativo para fluconazol em <i>Candida tropicalis</i> para o teste de microdiluição em caldo pelo documento E. Def. 7.3.2 (EUCAST 2020)	32
-------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

FLC	Fluconazol
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
CNCA	<i>Candida não-Candida albicans</i>
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
DAM's	Danger Associated Molecules
ISG's	Interferon Signaling Genes
SAP	Secreted Aspartyl Proteinases
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
CIM	Concentração Inibitória Mínima
RC	Revertente de Crepe
YPD	Yeast Peptone Dextrose
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	16
3.2	<i>CANDIDA TROPICALIS</i>	17
3.3	EPIDEMIOLOGIA DE <i>C. TROPICALIS</i>	19
3.4	PATOGÊNESE DE <i>CANDIDA</i> SPP.....	21
3.5	<i>SWITCHING</i> FENOTÍPICO.....	23
3.6	RESPOSTAS ADAPTATIVAS MOLECULARES E ESTRUTURAIS AO FLUCONAZOL... 26	
3.7	RESISTÊNCIA A AZOIS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
4.2	PRÉ-CULTIVO.....	30
4.3	EXPOSIÇÃO AO FLUCONAZOL.....	31
4.4	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO FLUCONAZOL POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO	31
4.5	POROSIDADE DE PAREDE CELULAR.....	32
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DE PAREDE CELULAR POR FLUOROMETRIA	32
4.6.1	Preparação das Amostras	33
4.6.2	Adição dos Corantes	33
4.7	AVALIAÇÃO DE TAMANHO E COMPLEXIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	34
4.8	INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA	35
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	35
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36

5	RESULTADOS	36
5.1	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE MORFOTIPOS DE <i>C. TROPICALIS</i> PRÉ E PÓS EXPOSIÇÃO AO FLUCONAZOL.....	37
5.2	EXPRESSÃO GÊNICA.....	37
5.3	POROSIDADE DE PAREDE CELULAR.....	39
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DE PAREDE CELULAR POR FLUOROMETRIA	40
5.5	CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
5.6	INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1. Introdução

Candida tropicalis é uma das 15 espécies do gênero *Candida* que são patogênicas ao ser humano. Como vários atributos de virulência são expressos por fungos em resposta às condições de estresse induzidas pelo ambiente, *C. tropicalis* é conhecida por ser intrinsecamente tolerante a altas concentrações de sal, desenvolvendo mecanismos fisiológicos e genéticos para neutralizar o estresse osmótico, sem sofrer ações de toxicidade e perda de água (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA & CHAVES., 2017; NG et al., 2015).

C. tropicalis tem sua relevância clínica traduzida como a segunda ou terceira espécie de *Candida* mais isolada, com prevalência registrada em regiões tropicais e subtropicais, como América Latina e Ásia, incluindo o Brasil (BRAGA et al., 2018). A espécie é associada a infecções superficiais e sistêmicas, principalmente em pacientes geriátricos, respiratórios e internados em unidades de terapia intensiva, mas com incidência em toda a gama de nichos que o hospedeiro humano dispõe (WANG et al., 2021). Infecções sistêmicas provocadas por *C. tropicalis* carregam taxas de mortalidade mais altas do que as relatadas para as espécies *Candida* não-*Candida albicans* e semelhantes em comparação à *Candida albicans*, que é a espécie mais prevalente e conhecida do gênero (OLIVEIRA et al., 2020).

Dentro do quadro epidemiológico apresentado pela espécie, a resistência antifúngica tem sido muito discutida. Isolados clínicos de *C. tropicalis* resistentes aos azóis estão emergindo no mundo todo. As explorações dos mecanismos moleculares de resistência aos azóis incluem mutações e/ou regulação positiva do gene *ERG11*, que codifica a enzima alvo lanosterol 14- α -desmetilase (CHEN et al., 2021). Diante disso, já é recomendado o uso das equinocandinas como primeira linha de tratamento contra infecções leves e moderadas promovidas por *Candida* spp. ao invés do fluconazol (FLC) (PAPPAS et al., 2018). Especificamente, essa prática funciona para *C. tropicalis*, que demonstra baixos níveis de tolerância a equinocandina e responde de forma muito efetiva ao tratamento (PRISTOV & GHANNOUM., 2019).

Nosso grupo de pesquisa apresenta estudos acerca da epidemiologia e dos fatores de virulência de *C. tropicalis*, com ênfase para o *switching* fenotípico. É sabida a alta capacidade da levedura de adesão e de formação de biofilme, bem como a crescente incidência de resistência a antifúngicos, principalmente aos azóis. Na epidemiologia,

nossas pesquisas já evidenciaram a alta incidência regional da espécie, com 33% dos registros (FURLANETO et al., 2011). No contexto do modelo biológico do *switching* fenotípico, foi exposta a alteração morfológica causada pelo evento em linhagens isoladas de infecções sistêmicas e de secreções traqueais e a consequência deste fator de virulência nas características celulares dos morfotipos. A microevolução pontual demonstrou capacidade de modificar a adesão e formação de biofilme, relação parasita-hospedeiro, expressão gênica, estrutura celular e sensibilidade antifúngica (FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014, 2016; SOUZA et al., 2020, 2021; PERINI et al., 2018, 2019).

A proposta investigativa trazida aqui é de que o fluconazol tem um papel na modificação estrutural da levedura, nos desdobramentos que o estresse induzido pela exposição ao fármaco provoca na levedura, bem como no efeito do *switching* fenotípico na diferença de interação entre linhagens isogênicas sob uma pressão seletiva imposta pelo fluconazol em concentração subinibitória.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar o papel do *switching* fenotípico em alterações celulares e moleculares associadas a resistência ao fluconazol em resposta ao estresse conferido por este fármaco.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Obter o perfil de sensibilidade de morfotipos derivados de *switching* fenotípico ao fluconazol.

2.2.2. Analisar o efeito do *switching* fenotípico na sensibilidade pós exposição ao fluconazol.

2.2.3. Analisar o efeito do *switching* fenotípico e do fluconazol na expressão de genes relacionados à resistência ao fármaco (ERG11 e CDR1).

2.2.4. Analisar o efeito do *switching* fenotípico e do fluconazol na quantificação de quitina, β -glucana e manana da parede celular).

2.2.5. Analisar o efeito do *switching* fenotípico e do fluconazol na porosidade de parede celular.

2.2.6. Analisar o efeito do *switching* fenotípico e do fluconazol na complexidade, granulidade e tamanho celular.

2.2.7. Analisar o efeito do *switching* fenotípico e do fluconazol na integridade de membrana plasmática.

3. Referencial teórico

3.1. Gênero *Candida*

É crescente em todo o mundo a recorrência e dados de estudos multicêntricos mostrando infecções fúngicas invasivas como um grande problema em hospitais (SARDI et al., 2013). Entre as espécies de fungos, infecções invasivas causadas por *Candida* spp. apresentam incidência estimada em 72,8 casos por milhão de habitantes ao ano. Espécies de *Candida* são isoladas em 84-88% de superfícies mucocutâneas em pacientes hospitalizados ou mesmo adultos saudáveis, demonstrando sua prevalência (STANISZEWSKA., 2020).

O gênero *Candida* é um vasto gênero de leveduras do filo Ascomycetes, composto por cerca de 150 espécies, dentre as quais mais de 20 espécies são de importância clínica. Espécies de *Candida* são habitantes comuns da pele e membranas mucosas do trato traqueal, gastrointestinal e geniturinário, pertencentes, portanto, ao microbioma normal humano. Por este fato, são descritos como patógenos oportunistas (NG et al., 2015). A incidência de infecções provocadas por *Candida* spp. têm aumentado dramaticamente, sobretudo desde os anos 80. As candidemias (infecções que atingem a corrente sanguínea), estão se tornando uma das principais causas de morbidade e mortalidade para diferentes tipos de pacientes, sobretudo os que estão em estado de imunocomprometimento (MARINS et al., 2018).

Sendo algumas espécies do gênero habitantes do microbioma humano, é importante destacar que na maioria dos casos clínicos, a população comensal dá origem à patogenia. Em ambientes hospedeiros, *Candida* spp. interage com uma complexa rede de pressões seletivas bióticas e abióticas, somado aos vários estresses impostos pelo

hospedeiro, incluindo a carência nutricional, níveis de oxigênio, defesas imunológicas e interação com antifúngicos (ENE, HICKMAN & GERSTEIN., 2021).

A espécie mais isolada, caracterizada e estudada do gênero é *C. albicans*, mas outras espécies têm se mostrado como patógenos emergentes importantes (DOI et al., 2016). O estado fisiológico do hospedeiro é o fator determinante para definir a etiologia da candidíase. Desta forma, o fato de pequenas alterações no metabolismo do hospedeiro poderem transformar leveduras comensais em agentes infecciosos capazes de causar sérios danos, aponta para o potencial patogênico das espécies de *Candida*. A linha para a transição de organismo comensal inofensivo para uma interação parasítica é tênue e atribuível a um extenso repertório de fatores de virulência expressos sob uma pressão seletiva específica (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE., 2003).

Os fatores de virulência expressos pelas espécies de *Candida*, tais como produção de adesinas, polimorfismo (produção de hifas), síntese e secreção de enzimas líticas, produção de biofilme e *switching* fenotípico, influenciam diretamente na possibilidade e na capacidade de causar infecções, variando conforme o nicho e a resposta imune do hospedeiro. Apesar destes atributos de virulência estarem envolvidos no processo de infecção, nenhum fator isolado é responsável pela virulência de *Candida* e nem todos os atributos de virulência expressos podem ser necessários para um estágio específico do processo infeccioso. A fisiopatologia de *Candida* spp. é complexa, multifacetada e tem variações espécie-específicas (CUTLER., 1991; ODDS., 1994; STANISZEWSKA., 2020).

3.2. *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é filogeneticamente próxima à *C. albicans* (Figura 1), mas ambas diferem em seus habitats naturais. As amplas relações filogenéticas relacionadas a virulência parecem ter evoluído independentemente em *Candida* spp. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apesar de desencadearem respostas semelhantes no hospedeiro, apresentam respostas transcricionais únicas e exclusivas (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA & CHAVES., 2017; ZHENG et al., 2017; KÄMMER et al., 2020; ENE, HICKMAN & GERSTEIN., 2021). *C. albicans* reside comensalmente em humanos ou em animais endotérmicos, raramente é isolada de ambientes não contaminados. Já *C. tropicalis* não é apenas um comensal, a levedura também existe de forma onipresente no

ambiente. A espécie é amplamente distribuída em ambientes marinhos tropicais e subtropicais como água do mar, sedimentos do mar e praias. Os mecanismos subjacentes que contribuem para as diferentes habilidades de adaptação de *C. albicans* e *C. tropicalis* ainda demandam mais pesquisa (ZHENG et al., 2017)

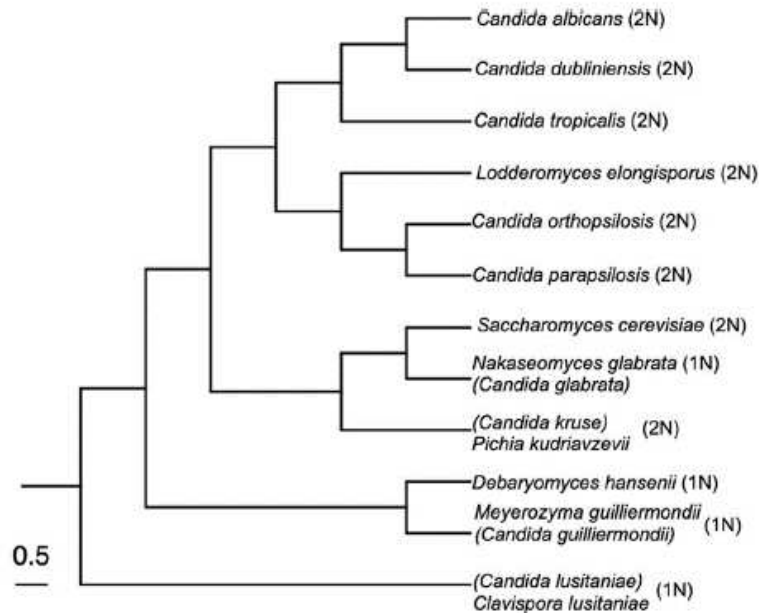


Figura 1. Filogenia de *Candida* spp. e espécies próximas relacionadas (Ene, Hickman & Gerstein., 2021 adaptado de Muñoz et al., 2018).

Uma característica marcante das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* é a capacidade de alternar entre a forma leveduriforme e a forma filamentosa (hifal), habilidade intimamente relacionada à virulência em ambas as espécies. Esta mudança morfológica reversível permite que os patógenos se adaptem rapidamente aos nichos do hospedeiro (ZHENG et al., 2016).

C. tropicalis apareceu para a comunidade científica isolada de um paciente com bronquite fúngica em 1910 e foi descrita inicialmente pelo epíteto *Oidium tropicale* (CASTELLANI., 1912). A levedura pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Saccaromycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetales incertae sedis*, que contém um subgrupo conhecido como o Clado CTG, cujos membros traduzem de forma incomum o códon CTG como serina ao invés de leucina, onde se apresenta *C. tropicalis* (McManus & Coleman., 2014). A espécie também se destaca pela alta capacidade de adesão e forte

produção de biofilme, fatores decisivos para a patogênese (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; DE SOUZA et al., 2020).

As colônias de *C. tropicalis* em meio *Sabouraud-Dextrose-Agar* (SDA) são de coloração branca a creme, com uma textura lisa e aparência suave, podendo ter bordas levemente enrugadas, indistinguindo-se morfológicamente entre espécies do gênero. A morfologia celular se apresenta em blastoconídios esféricos ou ovóides com cerca de $4-8 \times 5-11 \mu\text{m}$, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Metabolicamente, sabe-se que *C. tropicalis* é capaz de fermentar galactose, sacarose, maltose e trealose, assimilando-os pela via oxidativa (KURTZMAN, FELL & BOECKHOUT., 2011).

O genoma foi sequenciado em 2009 (cepa MYA-3404, GenBank) num trabalho de Butler et al. (2009). A levedura é diplóide, com 5-6 cromossomos e tamanho genômico de 14,5Mb, contendo 6.254 genes (CIUREA et al., 2020). A levedura é descrita como assexuada, entretanto, há forte registro do ciclo parassexual, onde células diplóides A e α conjugam-se gerando células A/ α tetraplóides. Esse processo é regulado pelo *switching* fenotípico, marcado por alterações morfológicas tanto em cor, como em estrutura das colônias (SEERVAI et al., 2013; PORMAN et al., 2011). A recombinação genética promove alterações de ploidia (aneuploidias e poliploidias), além de afetar a expressão gênica das células e a produção de proteínas (MORROW & FRASER., 2013). A redução da ploidia é considerada um mecanismo de adaptação que pode estar associada ao estresse celular (BERMAN & HADANY., 2012). Esse mecanismo adaptativo também pode gerar variação de cariótipo dentro do hospedeiro e pode ser induzido por vários estressores, tais como choque térmico, exposição à luz UV, crescimento em fonte de carbono de l-sorbose ou d-arabinose e outros tipos de estresses ambientais. Não há descrição de ciclo sexual e meiose em *C. tropicalis* (MORROW & FRASER et al., 2013; ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA & CHAVES., 2017).

3.3. Epidemiologia de *C. tropicalis*

Candidemia, ou infecção da corrente sanguínea, causada por espécies de *Candida*, é um subconjunto de candidíase invasiva com incidência crescente nas últimas décadas. A patologia é considerada um problema de saúde pública com grande impacto nos custos associados aos cuidados de saúde e alta taxa de mortalidade (35% a 75%), apesar dos avanços alcançados no diagnóstico e tratamento (MEDEIROS et al., 2020).

C. albicans ainda se mantém como a levedura responsável pela maior parte dos casos de infecção por leveduras do gênero *Candida*, porém, nos últimos anos (desde 2016), *C. tropicalis* têm se firmado como a terceira levedura mais isolada, com incidência bem próxima à segunda colocada *Candida glabrata*, com valores crescentes de acordo com estudos epidemiológicos. *C. tropicalis* se mostra mais presente em isolados provenientes de vias aéreas, seguido de isolados provenientes de urina, fezes, brônquios/alvéolos e secreção respectivamente, e com maior distribuição nas unidades hospitalares respiratórias, geriátricas e de cuidado intensivo (UTI), respectivamente (WANG et al., 2021).

Na Ásia, a prevalência de candidíase varia de 0,16 a 4,53 casos por 1000 admissões em hospitais e 11,7 casos a cada 1000 admissões em unidades de terapia intensiva (UTI), taxa de 20-30 vezes maior do que no mundo ocidental. Destes casos, 70-90% são causados por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA), com *C. tropicalis* sendo a espécie mais comum (35-40%) (SINGH & CHAKRABARTI., 2017).

No Oriente Médio, dados libaneses indicam 0,39 casos por 1.000 admissões em hospitais, além de mostrarem a tendência de decréscimo da taxa de incidência de *C. albicans* de 86% em 2005 para 60% em 2014, e um aumento na incidência de espécies NAC de 14% em 2005 para 40% em 2014, com *C. tropicalis* sendo a NAC mais incidente (34%–45%), seguido por *C. glabrata* (25%–36%), *C. parapsilosis* (9%–22%) e *C. krusei* (5%–11%). De forma semelhante, a espécie prevalece como a NAC mais isolada na Arábia Saudita e Emirados Árabes Unidos (GHAZI et al., 2019).

Na Europa, dados da Grécia apresentam *C. albicans* se mantém no topo como a mais isolada (39,6%), seguida por *C. parapsilosis* (36,6%), *C. glabrata* (11,1%), *C. tropicalis* (9,9%), *C. krusei* (0,2%), *C. lusitaniae* (<0,1%) e *C. guilliermondii* (<0,1%). No continente, a epidemiologia de *C. tropicalis* é predominantemente inferior a outras espécies NAC, como *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2019).

Nacionalmente, 65,7% dos casos de candidemia estão associados a espécies NAC, com epidemiologia distribuída entre *C. albicans* (37,5%), seguido por *C. tropicalis* (28,1%), *C. parapsilosis* (18,4%) e *C. glabrata* (6,9%), mostrando *C. tropicalis* como a segunda espécie mais isolada segundo Braga et al. (2018). Há ainda alguns estudos que mostram *C. tropicalis* como a terceira espécie mais isolada nacionalmente (DOI et al.,

2016) ou quarta espécie mais isolada do gênero (MARINS et al., 2018). Furlaneto et al. (2011) evidenciou nos dados regionais para a região de Londrina 33,2% dos isolamentos de *Candida* spp. atribuídos à *C. tropicalis*.

Adicionalmente, Hammoud et al. (2013) levantam que a candidemia persistente, definida como a falha da eliminação da infecção da corrente sanguínea, está diretamente associada com aumento da mortalidade. A taxa de mortalidade registrada foi de 54% entre as infecções persistentes e apenas 3% entre aqueles com candidemia não persistente, revelando a preocupação que se deve ter com o gerencialmente clínico de candidemias.

3.4. Patogênese de Candida spp.

Algumas espécies de *Candida* têm habilidade de realizar dimorfismo, que envolve a conversão de blastoconídeo em hifas ou hifas em blastoconídeos. Cada uma dessas fases do crescimento é vital para a virulência e patogenicidade, pois influenciam como a levedura escapa do sistema imunológico. Levedura e hifa desempenham papéis independentes durante a infecção. Enquanto a forma de levedura está envolvida na disseminação, a forma hifal participa da invasão de tecidos e patogênese (SEMAN et al., 2018).

A patogênese se inicia com a colonização do hospedeiro e posterior adaptação a restrições ambientais como temperatura, oxigênio, pH, níveis distintos de dióxido de carbono, baixa disponibilidade de nutrientes, sistema imunológico, e outras células bacterianas e fúngicas coexistentes no microbioma. A resposta positiva a essas restrições tem um efeito instantâneo na adaptação e promoção de virulência e patogenicidade de *Candida* spp. (MBA & NWEZE et al., 2020).

Antes do reconhecimento epitelial mediado por receptor em *Candida*, várias vias de sinalização são ativadas. Mudança de temperatura, carência de nutrientes, estresse oxidativo, estresse osmótico e detecção de pH desencadeiam resposta via proteína ativada por mitogênio quinase (MAPK), além de vias baseadas em AMP cíclico e sinal Rim 101 de transdução, que invariavelmente induzem ação de muitos genes, sendo a maioria deles associados com filamentação e formação de biofilme. As vias de sinalização e adaptação desempenham papéis cruciais em vários aspectos fisiológicos e processos celulares

envolvidos na patogênese de espécies de *Candida*, sendo estas: 1) Proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK); 2) Via Ras-CAMP-PKA; 3) Transdução de sinal RIM 101; 4) Vias de resposta ao estresse; 5) Vias de biossíntese de ergosterol; 6) Plasticidade do genoma e 7) Vias do cálcio-calcineurina. A consequência dessas cascatas reativas pode incluir formação de biofilme, ativação de genes associados à morfologia e virulência, liberação de DAM's (Danger Associated Molecules), candidalinas e enzimas hidrolíticas, dentre outras respostas que interferem diretamente na interação da levedura com o hospedeiro (HAN et al., 2011; MBA & NWEZE., 2020).

Em geral, a patogênese da *Candida* começa com a colonização, infecção superficial e invasão tecidual profunda antes da infecção alcançar a corrente sanguínea (caso ocorra). As etapas gerais na invasão de tecidos descritas para *C. albicans* incluem: 1) Adesão às células epiteliais; 2) Colonização; 3) Penetração/invasão epitelial por hifas; 4) Disseminação vascular; 5) Colonização /penetração endotelial. A infecção pode atingir diversos sítios no hospedeiro, tais como a cavidade abdominal, ossos, cérebro, olhos, coração, rins, fígado, baço, pulmões e sangue. A candidíase disseminada (infecção sanguínea e forma mais grave) ocorre apenas quando a levedura evade o sistema imunológico, penetra nos vasos sanguíneos dos tecidos e chegam na corrente sanguínea. Este processo ocorre por duas vias: 1) Rotas naturais (penetração em células epiteliais da mucosa das superfícies celulares); 2) Rotas artificiais (implantação de dispositivos médicos/cirúrgicos ou esgotamento da microbiota natural por antibioticoterapia) (PAPPAS et al., 2018; MBA & NWEZE., 2020) (Figura 2).

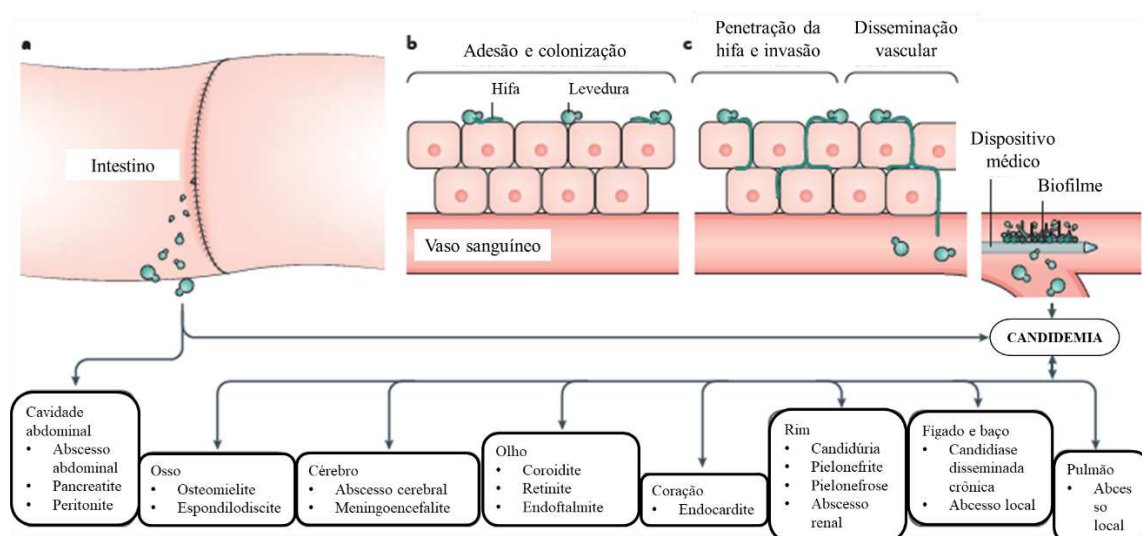


Figura 2. Patogênese da candidíase invasiva. Fonte: Pappas et al. (2018), com adaptações.

C. tropicalis é uma das espécies CNCA mais prevalentes na Ásia, África e América do Sul. O aumento na incidência da espécie é motivo de preocupação devido a sua capacidade de desenvolver resistência rápida ao fluconazol (DEORUKHKAR, SAINI & MATHEW., 2014). A fisiopatologia de *C. tropicalis* no epitélio vaginal tem alguns componentes espécie-específicos, característica comum dentro das leveduras do gênero. Em infecções precoces, a levedura aciona vias de biossíntese ribossomal e de ergosterol, provocando na célula um estresse mitocondrial durante a invasão, resultando na liberação de mtROS e mtDNA pela mitocôndria da célula epitelial. Isso culmina na regulação positiva de genes regulados por interferon (ISG's). Em infecções tardias, há ação das vias de transporte transmembrana e processos a nível de RNA, provocando danos no tecido e alteração espécie-específica na célula a nível de transporte do íon sódio (PAPON & NAGLIK et al., 2021).

C. tropicalis possui quatro genes SAP (Secreted Aspartyl Proteinases) conhecidos (SAP1, SAP2, SAP3 e SAP4). Sabe-se que a expressão deles desempenha um papel na capacidade do fungo de causar infecções disseminadas e de combater os macrófagos do sistema imunológico, com exceção da ação dos genes SAP na cavidade oral, onde não há registro de aumento de virulência (CIUREA et al., 2020).

A duração do tratamento antifúngico é geralmente determinada pela resposta clínica e fúngica individual. Entre os pacientes com candidemia, as hemoculturas são acompanhadas, no mínimo, a cada dois dias até a eliminação documentada de *Candida* spp. da corrente sanguínea. Na ausência de acometimento de órgãos, a duração da terapia antifúngica sistêmica (intravenosa ou oral) deve ser de 14 dias após a eliminação de *Candida* spp. da corrente sanguínea e resolução de todos os sinais de infecção (PAPPAS et al., 2018).

3.5. *Switching fenotípico*

Sabemos que a complexidade epidemiológica é agravada pela expressão dos diversos fatores de virulência já descritos aqui, relacionados com a capacidade da levedura de causar infecção. Dentre os vários, destaca-se um evento microevolutivo que

ocorre em uma fração diminuta da população de forma aleatória e reversível, alternando a morfologia de colônia, chamado *switching* fenotípico (SOLL, 1992, PORMAN et al., 2011).

O fenômeno de *switching* fenotípico foi descrito primariamente para a espécie modelo do gênero, *C. albicans*, conhecido como sistema de *switching White/opaque*, onde há a alteração das colônias e células a nível de coloração (SLUTSKY; BUFFO & SOLL et al., 1985). O evento de *switching* também foi descrito para outras espécies patogênicas do gênero, como *Candida krusei* (ARZMI et al., 2011), *C. parapsilosis* (LAFHEY & G. BUTLER., 2005), *C. glabrata* (LACHKE et al., 2002), *Candida lusitaniae* (FAVEL et al., 2003), e também em *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011; PORMAN et al., 2011; XIE et al., 2012; JONES et al., 2014; MORALEZ et al., 2014).

Sabe-se que *C. tropicalis* pode realizar múltiplas formas de *switching* fenotípico. Soll et al. (1988) descreveu pela primeira vez que a espécie pode apresentar *switching* de alta frequência durante o curso de uma infecção prolongada por *Candida* em um hospedeiro imunocomprometido. Nosso grupo somou informações ao demonstrar a ocorrência de um modelo distinto de *switching* isolado-específico em isolados clínicos de *C. tropicalis* (Moralez et al., 2014).

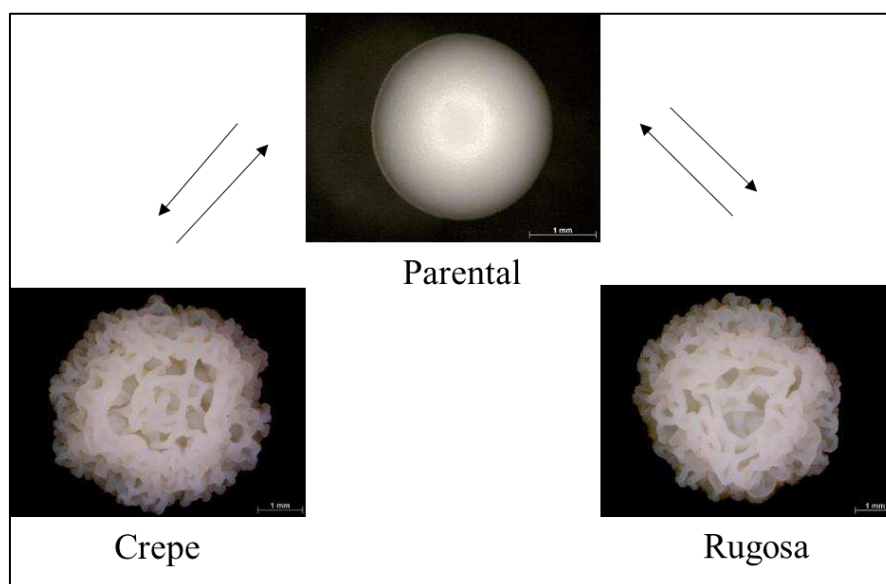


Figura 3. Sistema de *switching* 49.07, isolado traqueal de *Candida tropicalis* proveniente do Hospital Universitário de Londrina (HU-UEL).

As colônias de isolados clínicos de *C. tropicalis* se apresentam com bordas arredondadas e superfície celular lisa, enquanto as colônias derivadas de *switching*

fenotípico têm bordas irregulares e superfície celular estruturada (FRANÇA et al., 2011; MORALES et al., 2014) (Figura 3). O *switching* fenotípico pode causar alterações a níveis epigenéticos, alterações macroscópicas e alterações celulares, bem como mudança de vias sinalizadoras e metabólicas (PORMAN et al., 2013). Como consequência, há a alteração da rede de virulência da levedura *C. tropicalis*, propiciando a geração de indivíduos que, embora isogênicos, demonstrem algum nível de variabilidade e padrões distintos de virulência e sensibilidade à antifúngicos (PERINI et al., 2018).

Para *C. tropicalis*, o gene *WOR1* parece ser o principal regulador transcricional relacionado ao evento de *switching White-Opaque*, um fenômeno que está relacionado à transição reversível de células de uma fase branca para uma fase opaca, em que as células são maiores e alongadas, enquanto as colônias apresentam aparência irregular e estruturada, além de características associadas a virulência, como formação de biofilme e morfogênese (PORMAN et al., 2013; ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA & CHAVES., 2017).

A literatura que abrange o efeito do *switching* fenotípico em infecções promovidas por *C. tropicalis*, mesmo que escassas, já evidenciam que o evento epigenético interfere no potencial de virulência da levedura, alterando as características celulares da espécie, sensibilidade a antifúngicos, adesão, formação de biofilme e interação parasita hospedeiro (PERINI et al., 2019; DE SOUZA et al., 2020; MORALES et al., 2020). Essas alterações podem resultar num variante morfológico mais virulento do que o isolado clínico. Assim, linhagens variantes de *C. tropicalis* que apresentam alterações morfológicas causadas pelo *switching* fenotípico podem representar um problema importante no contexto clínico, visto que a aleatoriedade do evento pode resultar na dificuldade do tratamento e ainda no aumento do tempo de internação, afetando a sobrevivência do paciente de forma substancial. O conhecimento da rede reguladora desse fenômeno epigenético pode ajudar no desenvolvimento de estratégias para prevenir infecções por *C. tropicalis* (PERINI et al., 2018).

Morales et al. (2014) demonstraram que o *switching* fenotípico afeta múltiplos atributos biológicos de isolados clínicos de *C. tropicalis*, dentre eles o perfil de sensibilidade a azóis. Nesse sentido, comprova-se que células de colônias derivadas do evento de *switching* podem exibir expressão fenotípica alterada da maioria dos fatores de virulência.

3.6. Respostas adaptativas moleculares e estruturais ao fluconazol

Estudos genômicos são cruciais para elucidar o modo de ação de fármacos e os respectivos mecanismos de resistência associados. Tais trabalhos fazem uso de cepas mutantes e/ou cepas com superexpressão de algum gene alvo. A biologia molecular tem a capacidade de revelar não apenas o alvo dos agentes antifúngicos, mas também identificar vias metabólicas acessórias ou mecanismos de compensação na ação dos fármacos (SANGLARD, 2019). A literatura acerca da genética da resistência já foi capaz de revelar vários exemplos de genes que atuam na resistência das principais classes químicas antifúngicas, como *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* e *UPC2* para fluconazol em *C. tropicalis*, sendo *ERG11* responsável por codificar o alvo do fármaco (ergosterol), *CDR1*, *CDR2* e *MDR2* principais responsáveis por mediar efluxo e serem associados à multiresistência e *UPC2* responsável por regular a transcrição global do gene *ERG11* (SHAO et al., 2016; JIN et al., 2018).

A nível estrutural, existem vários tipos de mecanismos que se opõem aos efeitos adversos de compostos químicos. Primeiro, as células evitam a acumulação dos compostos tóxicos no citoplasma, limitando a captação ou absorção desses compostos no compartimentos extracelulares, como vesículas extracelulares. Em seguida, as células sequestram componentes tóxicos em compartimentos intracelulares específicos, como vacúolos ou gotículas lipídicas. Além disso, vários sistemas permitem degradação metabólica dos compostos tóxicos, tal como a ação dos transportadores de membrana em *Candida* spp. (KNORRE et al., 2020).

Estresses ambientais induzem modificações na parede celular que impedem o reconhecimento imunológico (GOW, LATGE e MUNRO., 2017; LIMA et al., 2019). A plasticidade morfológica é uma estratégia adaptativa de microrganismos às mudanças ambientais, traduzida no caráter polimórfico intrínseco à *C. albicans* e *C. tropicalis* (ZHENG et al., 2017).

A maioria das paredes celulares têm duas camadas: a camada interna que normalmente compreende um esqueleto estrutural conservado e a camada externa que é mais heterogênea e varia de forma espécie-específica (GOW, LATGE e MUNRO., 2017). A parte interna da parede celular fúngica se traduz no componente estrutural de suporte da parede que resiste à pressão hidrostática interna exercida pelo citoplasma e membrana.

Esta camada é formada por quitina e glucana, onde 50-60% do peso seco da parede celular é composto de β -(1-3)-glucano. A estrutura da camada externa consiste em maior parte de glicoproteínas manosiladas com oligossacarídeos N- e O- modificadas. A estrutura destas cadeias laterais oligossacarídicas diferem entre as espécies fúngicas (LIMA et al., 2019; Figura 4).

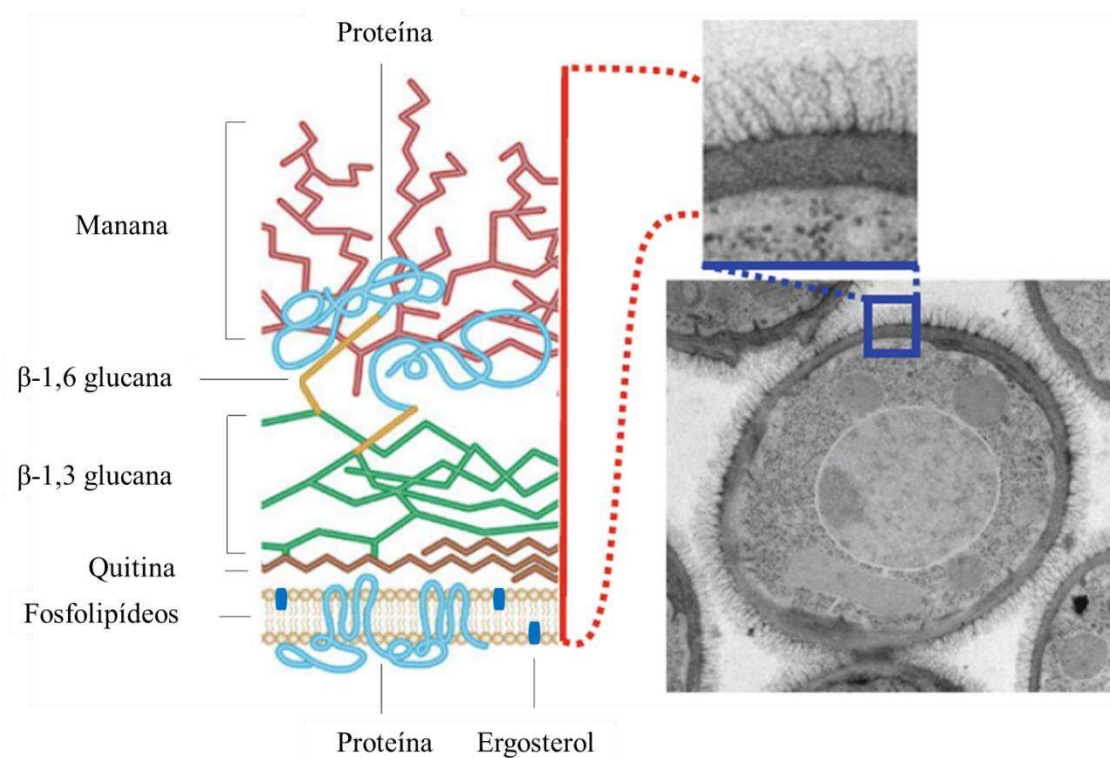


Figura 4. Arquitetura da membrana plasmática e parede celular de *Candida* spp. Fonte: Childers et al. (2019), com adaptações.

Além de desempenhar um papel importante na manutenção e viabilidade do microrganismo, a parede celular é essencial na interação com as células hospedeiras, sendo o componente β -1,3-glucano considerado o principal padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (DUAN et al., 2018). Quando submetida a condições adversas, uma célula promove rapidamente mudanças na arquitetura da parede. Essa resposta ao estresse depende de vias de sinalização metabólica primordiais que participam da homeostase (ENE et al., 2015). Um dos mecanismos utilizados para responder a essas situações é por meio da indução da cascata MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), que auxilia na manutenção e fisiologia da parede celular (BROWN et al., 2017). A dinâmica da parede celular pode desempenhar um papel decisivo para o desenvolvimento de resistência antifúngica. Modificações na composição estrutural são frequente alvo de investigação

em *Candida* no contexto da resistência antifúngica (MESA-ARANGO et al., 2016; LIMA et al., 2019).

Quando fármacos alcançam a parede celular, podem aderir ou se acumular e promover processos estruturais e/ou modificações químicas como mudanças na hidrofobicidade. Depois que um medicamento penetrou na célula e alterou a membrana plasmática, este processo pode, por sua vez, afetar a estrutura da parede celular. Pesquisas anteriores mostraram que expor *C. albicans* a azóis, fármaco que tem como alvo o ergosterol de membrana plasmática, a síntese de quitina é afetada (SUCHODOLSKI et al., 2020; MILEWSKI, MIGNINI & BOROWSKI et al., 1991).

3.7. Resistência a azóis

A resistência a azóis apresentada por espécies de *Candida* tem sido um problema crescente. Bombas de efluxo superexpressas e mudanças na via de biossíntese de ergosterol são os principais mecanismos conhecidos de resistência aos azóis. Há uma gama de pequenas moléculas que aumentam a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, como inibidores de Hsp90, calcineurina e TOR. A terapia combinada com uso de antifúngicos juntamente com tais inibidores foi proposto como uma estratégia promissora para estender a eficácia do atual drogas (COWEN et al., 2009). Além disso, vários agentes psicoterapêuticos, como fluoxetina, flufenazina (FNZ) ou sertralina podem aumentar a atividade ao fluconazol contra espécies fúngicas, mas as implicações terapêuticas ainda precisam ser elucidados (ZHAI et al., 2012).

Os mecanismos que contribuem para uma candidemia persistente podem incluir variabilidade na ação do fármaco, dosagem subótima, presença de biofilmes fúngicos em cateteres internos e redução da imunidade do hospedeiro. Algumas respostas ao fármaco não são obtidas medindo apenas o a concentração inibitória mínima (CIM), portanto, parâmetros adicionais podem ser usados para prever a probabilidade de um isolado clínico responder mal aos tratamentos antifúngicos. Além disso, compreender esses parâmetros é crítico para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra infecções persistentes por *Candida* spp. (ROSENBERG et al., 2018).

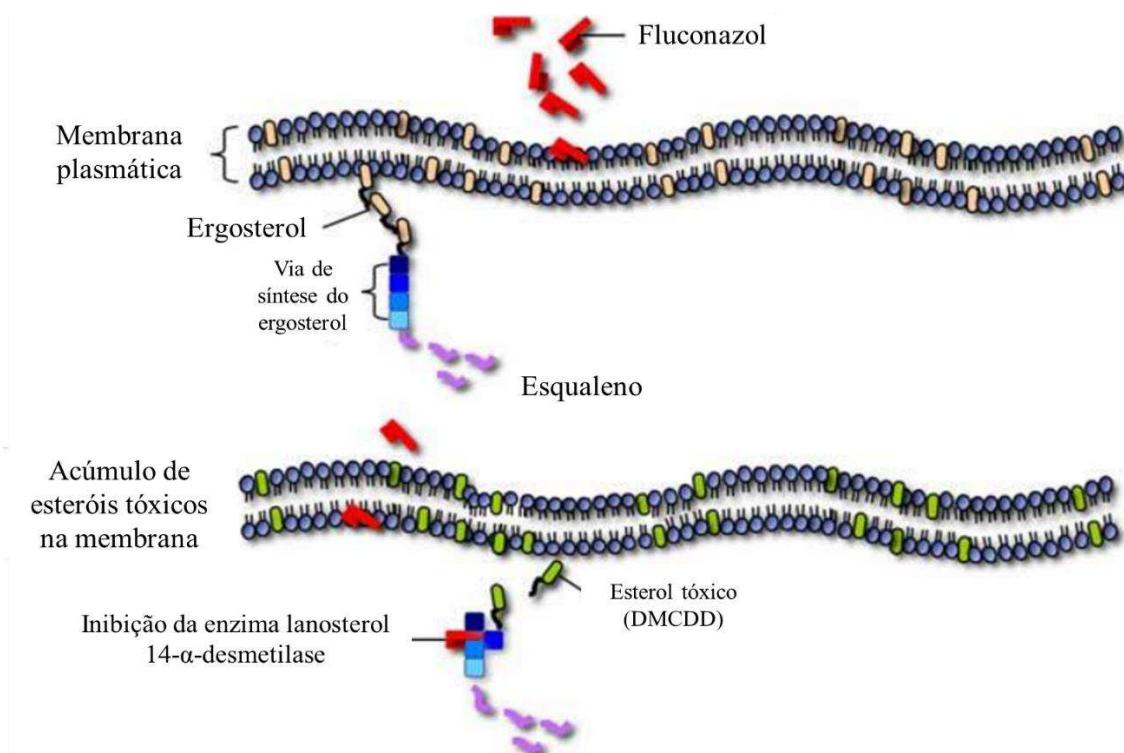


Figura 5. Mecanismo de ação do triazol fluconazol. Moreira. (2010), com adaptações.

Os triazóis são os agentes antifúngicos mais comumente usados para o tratamento de candidíase invasiva em países em desenvolvimento. Alguns exemplos de triazóis presentes no mercado são: fluconazol, itraconazol, isavuconazol, posaconazol e voriconazol. Todos esses fármacos citados agem inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, um componente vital da via de biossíntese de ergosterol, esterol de membrana codificado pelo gene *ERG11* (Figura 5). Vários estudos relataram o surgimento e aumento de resistência aos azóis em *C. tropicalis*, juntamente com o aumento também da incidência nos últimos anos (WANG et al., 2021; FAN et al., 2017). Este fenômeno pode estar associado ao uso de drogas antifúngicas, duração inadequada da terapia antifúngica e falta de restrições ao uso de drogas nas indústrias de agricultura e horticultura. Sabe-se também que isolados de *C. tropicalis* resistentes a azóis podem até ocorrer em pacientes nunca antes expostos à droga (PAUL et al., 2021).

Wu et al. (2017) demonstram que dos isolados não-*albicans* responsáveis por candidemia, 8,8% eram resistentes a fluconazol *in vitro*, com a espécie *C. tropicalis* apresentando a maior taxa de resistência ao fluconazol, sendo, recorrentemente, a espécie CNCA com resistência mais elevada. (13,9%). O perfil de resistência emergente ao fluconazol, somado à maquinaria metabólica de resistência e ao *switching* fenotípico,

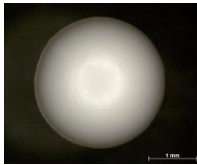
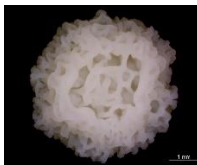

configuram um cenário epidemiológico preocupante, exigindo mais dados para que, cada vez mais, soluções clínicas espécie-dependentes estejam à disposição.

4. Material e métodos

4.1. Material biológico

No presente trabalho foram utilizados 3 morfotipos de *C. tropicalis* que compreendem o isolado clínico 49.07 advindo de uma infecção traqueal ocorrida no Hospital Universitário de Londrina (HU) (Parental); e duas linhagens derivadas de *switching* fenotípico (Variante Crepe e Revertente de Crepe - RC) (Quadro 1) (MORALEZ et al., 2016). As linhagens ficam armazenados em meio YPD suplementado com 40% de glicerol a -20°C e fazem parte do banco de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da UEL.

Quadro 1 - Características gerais do sistema de *switching* 49.07.

Morfotipos do sistema de <i>switching</i> 49.07	Padrão de Complexidade	Padrão de Morfologia	Foto da colônia
Isolado Clínico (Parental)	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular	
Variante (Crepe)	Estruturada/+++	Superfície estruturada, borda irregular	
Revertente (Revertente de Crepe - RC)	Liso - Parental-Like/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular	

4.2. Pré-cultivo

Os morfotipos foram inoculados em 3 mL de meio complexo YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) caldo padrão (1% extrato de levedura, 2% glicose, 2% peptona), e

incubados durante 24 horas a 28°C e 180 rpm. A seguir, foi feito o plaqueamento das suspensões celulares em meio YPD solidificado (1% extrato de levedura, 2% glicose, 2% peptona, 2% ágar) para obtenção de colônias com morfologia típica.

4.3. Exposição ao fluconazol

A metodologia de exposição ao fluconazol foi realizada conforme descrito por Claudino et al. (2009) com modificações. Os morfotipos foram expostos ao fluconazol difundido em meio YPD solidificado em concentração subinibitória correspondente a maior concentração na qual todos os morfotipos foram capazes de crescer em testes anteriores (1µg/mL), que também corresponde a 50% do valor de CIM descrito como sensibilidade segundo o EUCAST.

Para tal, cada suspensão celular de densidade 6×10^3 leveduras/mL foi ajustada em água destilada estéril e inoculada em placa de petri contendo aproximadamente 20mL de meio YPD acrescido da concentração de antifúngico (1µg/mL). Após 96 horas a 28°C as colônias foram obtidas e utilizadas nas metodologias adicionais.

4.4. Avaliação da sensibilidade ao fluconazol por microdiluição em caldo

O teste empregado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada grupo morfológico foi o de Microdiluição em Caldo, de acordo com o documento E. Def. 7.3.2 do *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) para fluconazol (SIGMA com $\geq 98\%$ de pureza).

O preparo das diluições seriadas foi feito com o meio RPMI 1640, tamponado com ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS) em pH 7,0 e suplementado com 2% de glicose, em microplacas de 96 poços. A obtenção das colônias típicas de cada morfotipo se dá pelo plaqueamento em YPD + 1µg/mL de FLC comparado às colônias crescidas na ausência do fármaco.

Antifúngico e inóculos foram preparados em concentrações duas vezes superiores as de uso na metodologia. As suspensões celulares foram ajustadas na densidade celular de 1×10^5 leveduras/mL em meio RPMI 1640. Posteriormente, 100µL

da suspensão foi inoculada a placa de microtitulação em conjunto com 100µL de meio com antifúngico, em concentrações a partir de 0,125µg/mL até 64µg/mL, resultando em um volume final de 200µL por poço. Os ensaios foram incubados a 35°C, por 24 horas a 100 rpm e a densidade óptica mensurada por leitura espectrofotométrica à 490nm para obtenção do valor da CIM.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de antifúngico capaz de promover 50% de inibição de crescimento do isolado, denominado CIM 50. O método foi empregado para a mensuração da CIM de cada grupo morfológico. Os dados foram interpretados conforme o documento E. Def. 7.3.2 (EUCAST) e expressos como: sensível (S) e resistente (R) (Tabela 1).

Tabela 1 - Critério interpretativo para fluconazol em *Candida tropicalis* para o teste de microdiluição em caldo pelo documento E. Def. 7.3.2 (EUCAST 2020).

Antifúngico	S	R
Fluconazol	≤ 2 ug/mL	4 ug/mL >

Fonte: EUCAST, 2020.

4.5. Porosidade de parede celular

A porosidade da parede celular foi avaliada segundo Ene et al. (2012) com modificações. Células de colônias das linhagens fenotípicas não expostas ao fluconazol (cultivo em YPD) e expostas (cultivo em YPD + FLC) por 96 horas foram ressuscitadas em água destilada estéril. Aliquotas de 1×10^8 células/mL foram incubadas à 28 °C, 200 rpm por 30 min, nas seguintes condições: 1) Ressuscitadas em 10 mM de Tris-HCl pH 7,4 (controle); 2) Com o mesmo tampão contendo 5mg/mL de DEAE-dextran; 3) Outra amostra contendo o tampão e 15 µg/mL de Poli-L-lisina. As células foram centrifugadas e 200 µL do sobrenadante foram lidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm. A porosidade relativa da parede celular é dada segundo a fórmula:

$$\text{Porosidade relativa} = 100 \times (A_{\text{DEAE}} - A_{\text{tampão}}) / (A_{\text{Poli-L-lisina}} - A_{\text{tampão}})$$

4.6. Quantificação de componentes de parede celular por fluorometria

4.6.1. Preparação das amostras

Células das colônias de *C. tropicalis* com morfologia característica de cada morfotipo foram suspensas em meio YPD caldo. Na sequência, as células foram fixadas pela adição de formaldeído na concentração final de 3,7% por 30 minutos a 180 rpm/28°C.

Após fixadas, as células foram sedimentadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Após, foi adicionado 1 mL de PBS seguido de homogeneização com auxílio de seringa e agulha fina para dispersar as células. Em seguida, as células foram centrifugadas em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante novamente descartado.

Cada análise foi realizada antes e após exposição de 96 horas ao fluconazol (cultivo em YPD + FLC a 1µg/mL).

4.6.2. Adição dos Corantes

Calcofluor White - Quitina

Foi preparada uma solução de Calcofluor White (SIGMA/MERCK) a 35 µg/mL em água deionizada (10x concentrada em relação a concentração de uso - 3.5 µg/mL por 5 minutos a temperatura ambiente). Após o preparo das células, foi adicionado 900 µL de H₂O deionizada estéril e 100 µL da solução de Calcofluor White, seguido de homogeneização em vortex e incubada por 5 minutos. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado para posterior adição de 1 mL de água destilada estéril seguido de homogeneização por agitação em vortex.

Após, as células foram coletadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de H₂O deionizada estéril para realização a contagem do número de células em câmara hemocitométrica e posterior ajuste de densidade celular para 2x10⁶ células/mL.

As suspensões foram vortexadas e analisadas em citometria de fluxo em microtubos de propileno (10.000 eventos serão analisados). As análises foram realizadas empregando-se os filtros: Excitação: 340-380 nm, e Emissão: 440-450 nm. A análise permitiu a quantificação de quitina por célula.

Aniline Blue - 1,3 β -Glucana

Foi preparada uma solução de Aniline Blue (SIGAM/MERCK) a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água deionizada (10x concentrada em relação a concentração de uso - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 minutos). Após o preparo da amostra, foi adicionado 900 μL de PBS e 100 μL da solução contendo Aniline Blue a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram coletadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. 1 mL de PBS foi adicionado e vortexado vigorosamente para dispersar as células.

Após, as células foram coletadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem do número de células em câmara hemocitométrica e ajuste de densidade celular para 2×10^6 células/mL. As suspensões foram vortexadas e analisadas em citometria de fluxo em microtubos de propileno (10.000 eventos serão analisados). As análises foram realizadas empregando-se os filtros: Excitação: 340-380 nm, e Emissão: 440-450 nm. A análise permitiu a quantificação de β -1-3-glucana por célula.

Concanavalina A conjugada com FITC - Manana

Foi preparada uma solução de Concanavalina A conjugada com FITC (SIGMA/MERCK) a 1 mg/mL em água deionizada (10x concentrada em relação a concentração de uso - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 minutos). Após o preparo da amostra, foi adicionado 900 μL de PBS e 100 μL da solução contendo ConA conjugado com FITC contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, as células foram coletadas por centrifugação em 3.500 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem do número de células em câmara hemocitométrica e ajuste de densidade celular para 2×10^6 células/mL.

As suspensões foram vortexadas e analisadas em citometria de fluxo em microtubos de propileno (10.000 eventos serão analisados). As análises foram realizadas empregando-se os filtros: Excitação: 450-495 nm, e Emissão: 490-570 nm. A análise permitiu a quantificação de Manana por célula.

4.7. Avaliação de tamanho e complexidade celular por citometria de fluxo

Suspensões celulares dos morfotipos pré e pós exposição ao fluconazol foram ajustadas em PBS na densidade celular de 1×10^6 células/mL e levadas ao citômetro onde 10 mil eventos foram analisados para cada amostra. A análise permitiu a mensuração do tamanho e complexidade das células. O experimento foi feito em três repetições em triplicata.

4.8. Integridade de membrana plasmática

Cada morfotipo foi cultivado em meio YPD solidificado e o inoculado sob densidade celular de $2,5 \times 10^3$ levedura/mL em meio RPMI 1640 com fluconazol em concentrações variando de 64 a $0,125 \mu\text{g} / \text{mL}$. Após, a placa será incubada a 37°C por 48h. A determinação de integridade de membrana foi realizada previamente à exposição ao fluconazol e pós exposição (YPD + FLC) por 96 horas.

Posteriormente, $100 \mu\text{L}$ dos cultivos foram retirados e transferidos para um tubo com $100 \mu\text{L}$ de solução de azul de trypan 0,4%. Após 15 minutos em temperatura ambiente, a quantificação do número de células viáveis e danificadas foi realizada na câmara de Neubauer por observação em microscopia óptica. Células integras são impermeáveis ao azul de trypan, portanto, qualquer dano à nível de membrana permite com que as células se tornem permeáveis ao corante e passíveis de serem contadas, expressando o número de células/mL como a média de três experimentos independentes com três repetições.

4.9. Análise da expressão gênica

Os morfotipos foram avaliados quanto a expressão de genes associados a resistência a azóis *ERG11* (codificador da enzima lanosterol 14- α -desmetilase da via de biossíntese de ergosterol) e *CDR1* (codificador de transportador dependente de energia para efluxo celular) (Quadro 2) empregando a PCR quantitativa (qPCR). Para tal, o RNA dos morfotipos foi extraído pelo método manual de Trizol-clorofórmio. Após extração do RNA, foi realizada a reação de transcriptase reversa (kit de RT-PCR-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada a 42°C durante 60 min.

Reações de síntese foram realizadas por meio do sistema GeneAmp® PCR (Eppendorf, Gradiente Mastercycler). O DNA complementar (cDNA) obtido foi

armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As condições de ciclagem consistiram em 2 min à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 40 ciclos a $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 60 segundos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada amostra foi analisada em duplicata por PCR em tempo real efetivada em StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). A reação foi executada utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com volume final de $20\text{ }\mu\text{L}$.

Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão do gene constitutivo da β -Actina (ACT). Uma vez normalizados, foi realizada análise dos níveis de expressão gênica relativa, pela equação $2^{-(\Delta-\Delta\text{ct})}$. Onde o primeiro Δ trata da condição teste normalizada e o segundo trata do controle, também normalizado. As análises de expressão gênica foram realizadas previamente à exposição ao fluconazol e após 24 horas de exposição (YPD + FLC).

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores de *C. tropicalis* usados para a análise da expressão gênica empregando qPCR.

Genes	Gene - Sequência (5' a 3')	Referência
<i>ERG11</i>	F: CTACTCCCAAAAAAAAAACCATA R: TAAACCTAATCCCAAGACATC	Jin et al. (2018)
<i>CDR1</i>	F:CCAGAGGTTTGGATTCCGCT R:TGGCTTTGTCTGCTTTCCCA	Jin et al. (2018)

4.10. Análises estatísticas

A significância dos dados obtidos foi avaliada no software Graph-Pad Prism 7, com uso do teste t-pareado, considerando como significância estatística $p < 0,05$, onde $p < 0,05$: *; $p < 0,001$: **; $p < 0,0001$: ***.

5. Resultados

5.1. Sensibilidade antifúngica de morfotipos de *C. tropicalis* pré e pós exposição ao fluconazol

O método de microdiluição em caldo evidenciou valores de concentração inibitória mínima distintos para diferentes morfotipos derivados de *switching* fenotípico. Enquanto o morfotipo Parental (isolado clínico) apresentou CIM50 = 0,125µg/mL sem exposição ao fluconazol e CIM50 = 0,25µg/mL após exposição ao fluconazol, valor traduzido em sensibilidade, o morfotipo Crepe apresentou CIM50 = 1µg/mL em ambas condições (controle e exposto ao fluconazol). O morfotipo RC apresentou uma CIM50 = 1µg/mL pré exposição e CIM50 = 2µg/mL pós exposição, valores que ainda traduzem sensibilidade, porém são superiores aos vistos para o morfotipo Parental.

5.2. Expressão gênica

Dados de expressão relativa do gene *ERG11* em morfotipos de *C. tropicalis* sem exposição ao fluconazol (controle) e pós exposição estão apresentados na Figura 6.

Na condição controle, o morfotipo Crepe apresentou superexpressão de *ERG11*, a qual foi aproximadamente 4 vezes ($4,14 \pm 0,096$) superior que a expressão observada para os demais morfotipos (Parental = 1 e RC = $0,72 \pm 0,62$). Já a expressão de *ERG11* pelo morfotipo RC não diferiu da observada para a linhagem Parental.

Na presença do antifúngico, a expressão de *ERG11* pelo morfotipo Crepe não diferiu da expressão observada para o morfotipo Parental. Nesta condição, o morfotipo RC apresentou o menor nível de expressão deste gene, sendo inferior ao dos demais morfotipos. Interessante destacar que a expressão de *ERG11* pelo morfotipo Crepe foi significativamente inferior pós exposição ao fluconazol comparativamente ao observado na ausência de exposição (Figura 6).

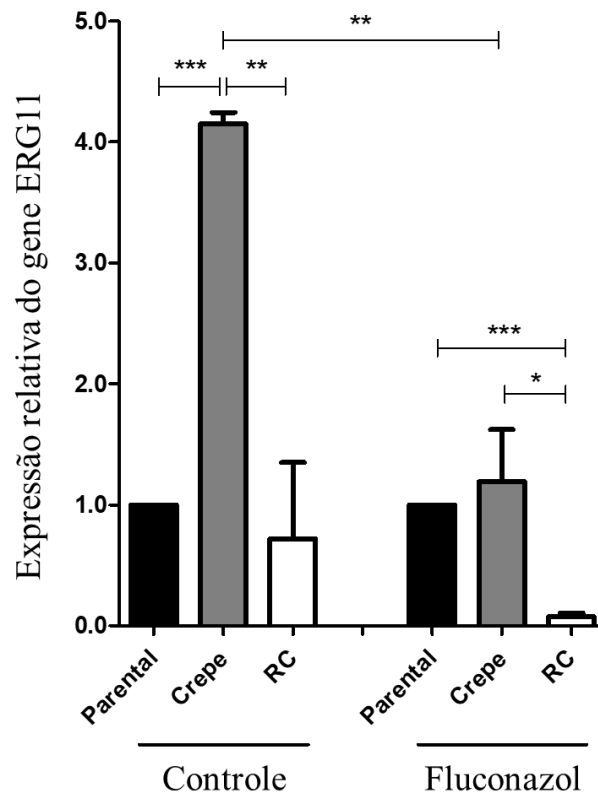


Figura 6. Expressão relativa do gene ERG11 em morfotipos derivados de *switching* em *C. tropicalis* sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).

Quanto a expressão do gene *CDR1*, na ausência de fluconazol (controle) o morfotipo RC apresentou superexpressão deste gene, com expressão relativa aproximadamente 9 vezes superior ($9,73 \pm 0,77$) à dos morfotipos Parental (1) e Crepe ($1,07 \pm 0,47$), revelando uma maquinaria molecular morfotipo-dependente. Ao serem expostos ao fluconazol, ambas linhagens de *switching* apresentaram expressão superior comparativamente ao observado para o isolado clínico (linhagem Parental) (Figura 7). Nesta condição, a expressão de *CDR1* pelos morfotipos Crepe ($2,18 \pm 0,21$) e RC ($2,81 \pm 0,015$) foram aproximadamente 2 e 3 vezes superior, respectivamente.

A exposição ao fluconazol resultou em aumento de 2 vezes na expressão do gene *CDR1* pelo morfotipo Crepe, comparativamente à expressão na condição controle. Diferentemente, a expressão deste gene pelo morfotipo RC foi significativamente inferior pós exposição ao fármaco (Figura 7).

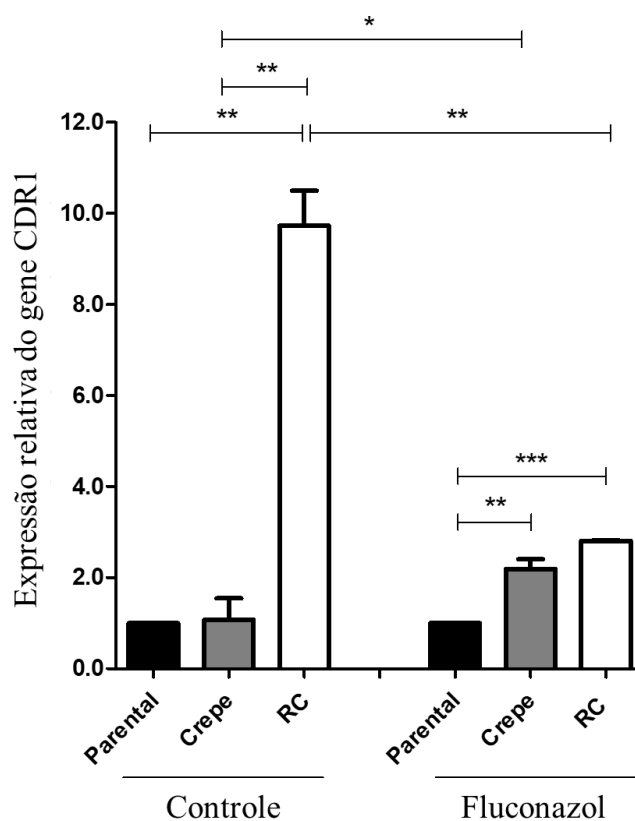


Figura 7. Expressão relativa do gene CDR1 em morfotipos derivados de *switching* em *C. tropicalis* sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1 µg/mL).

5.3. Porosidade de parede celular

Os dados de porosidade da parede celular de células dos morfotipos de *C. tropicalis* sem exposição ao fluconazol e pós exposição estão apresentados na Figura 8.

A porosidade relativa das paredes celulares variou de forma morfotipo-dependente, tanto na condição controle quanto pós exposição ao fluconazol. Na ausência de exposição ao fluconazol, o morfotipo Parental apresentou maior porosidade da parede celular (72%), seguido pelos morfotipos Crepe (68,2%) e RC (65,4%), com diferença significativa entre todos os morfotipos. Já na condição pós exposição ao fluconazol, o perfil se manteve, com o morfotipo Parental apresentando 64,8% de porosidade na parede celular, o morfotipo Crepe 62,1% e o morfotipo RC 48,9%, com diferença significativa entre Crepe/RC e Parental/RC. Após exposição ao fluconazol, houve redução significativa na porosidade da parede celular dos morfotipos Parental e RC, comparativamente ao observado na condição controle (Figura 8).

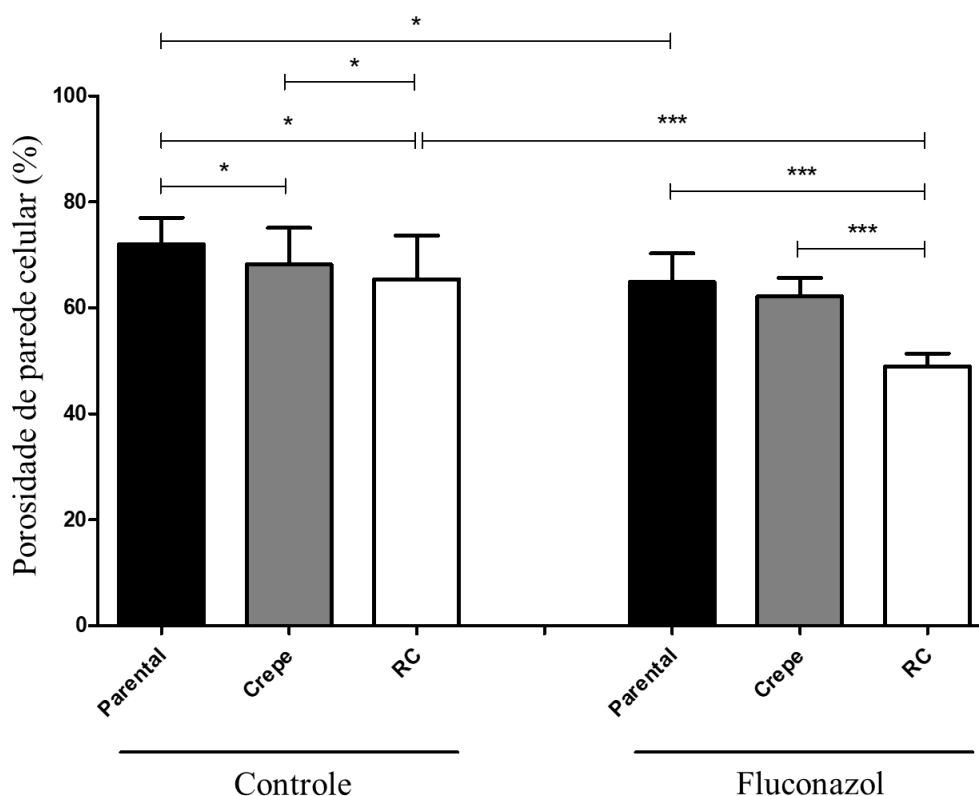


Figura 8. Porosidade relativa (%) de morfotipos derivados de *switching* fenotípico sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1 μ g/mL).

5.4. Quantificação de componentes de parede celular por fluorometria

A quantidade de β -glucana na parede celular de *C. tropicalis* foi significativamente diferente entre os morfotipos em detrimento do *switching* fenotípico (Figura 9). O morfotipo Parental apresentou um conteúdo de β -glucana inferior aos demais morfotipos, sendo que células da linhagem RC demonstraram maior quantidade do componente (RC > Crepe > Parental).

Após a exposição ao fluconazol foi observada diferença significativa do teor de β -glucana entre os morfotipos Crepe e RC. Nesta condição, as linhagens derivadas de *switching* apresentaram mesma quantidade deste componente de parede em comparação ao observado para o isolado clínico.

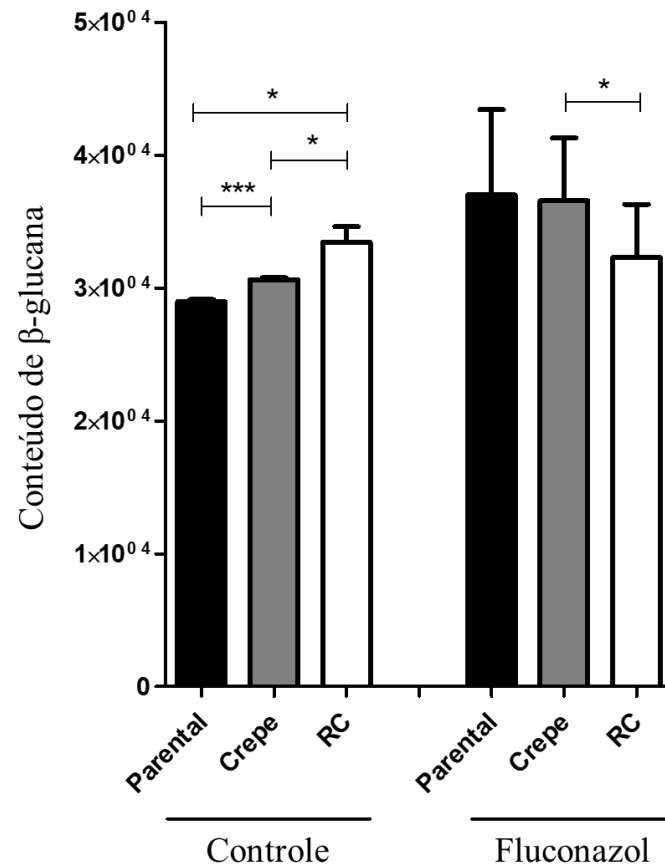


Figura 9. Quantificação de β-glucana da parede celular de morfotipos de *C. tropicalis* sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1 µg/mL).

Como mostrado na Figura 10, não foi observada diferença significativa na quantidade de manoproteínas de parede celular dos morfotipos de *C. tropicalis*, em nenhuma das condições testadas. Foram observadas, no entanto, redução no conteúdo de manoproteínas em células dos morfotipos pós exposição ao fluconazol, comparativamente ao observado na condição controle.

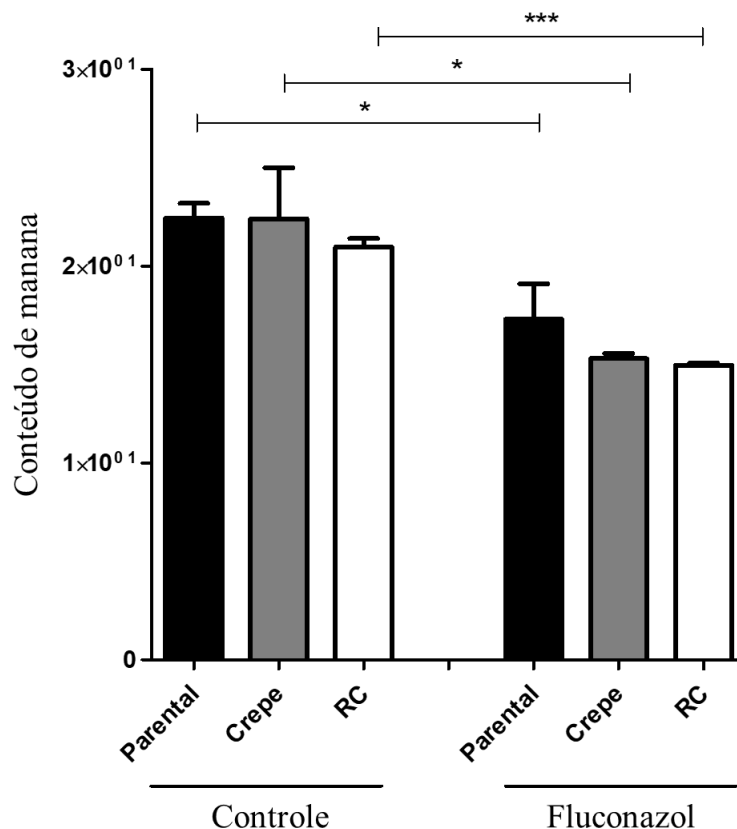


Figura 10. Quantificação de manoproteínas da parede celular de morfotipos de *C. tropicalis* sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1µg/mL).

Quanto ao conteúdo de quitina, houve variação na quantidade deste componente da parede celular de morfotipos de *C. tropicalis* em ambas condições testadas (Figura 11). Na condição controle, o morfotipo derivado de *switching* RC apresentou quantidade inferior de quitina comparativamente ao do morfotipo parental e ao morfotipo Crepe. Já pós exposição ao fluconazol, somente o RC apresentou quantidade de quitina superior ao do observado para células do morfotipo Parental. Nesta condição, houve redução significativa deste componente de parede tanto para o morfotipo Parental quanto para os morfotipos derivados de *switching* em comparação ao controle (Figura 11). Destaca-se, também, o morfotipo RC, que demonstrou conteúdo de quitina pós exposição ao fluconazol 2 vezes superior ($63,83 \pm 11,54$) ao conteúdo de quitina da linhagem Parental ($31,86 \pm 9,10$) e do morfotipo Crepe ($33,76 \pm 6,05$).

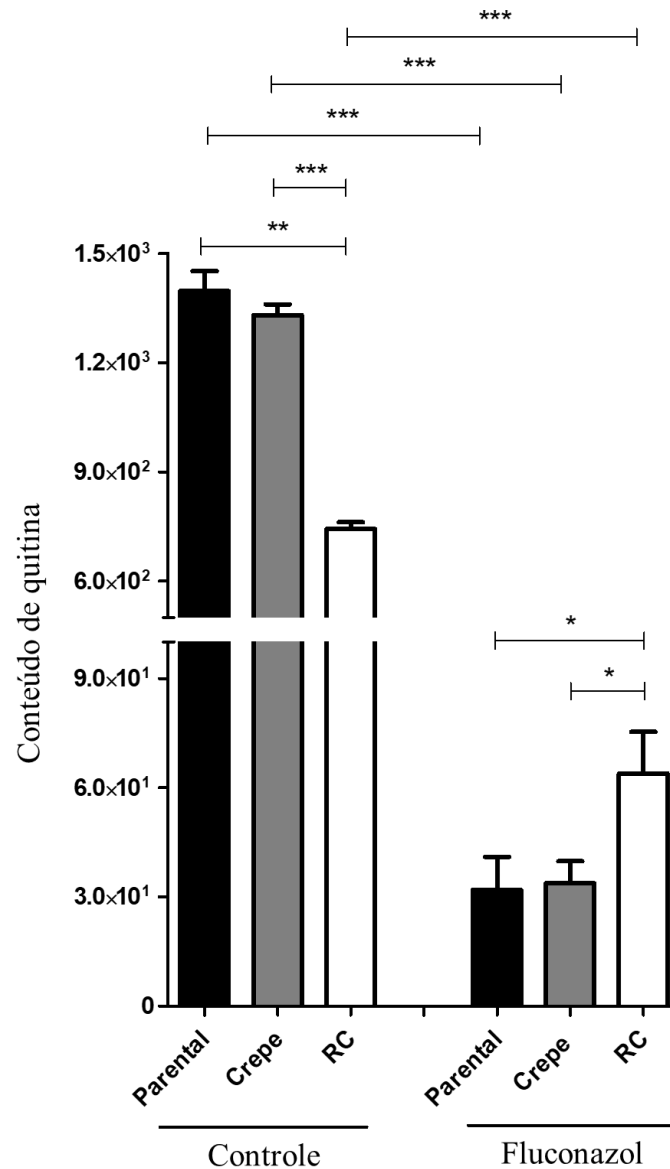


Figura 11. Quantificação de quitina da parede celular de morfotipos de *C. tropicalis* sem fluconazol (controle) e exposto ao fluconazol (1 μ g/mL).

5.5. Citometria de fluxo

A Figura 12 mostra diferenças observadas entre os morfotipos quanto a complexidade/granulosidade celular. Os dados mostram que, tanto no controle como no tratamento pós exposição ao fluconazol, há um padrão na complexidade/granulosidade celular, com a linhagem parental se mostrando mais complexa que seus morfotipos derivados de *switching* (Parental > Crepe > RC). Para o morfotipo RC, é possível

evidenciar alteração na complexidade celular após exposição ao fluconazol no gráfico SSC-H, sugerindo um efeito do fármaco na composição estrutural da levedura.

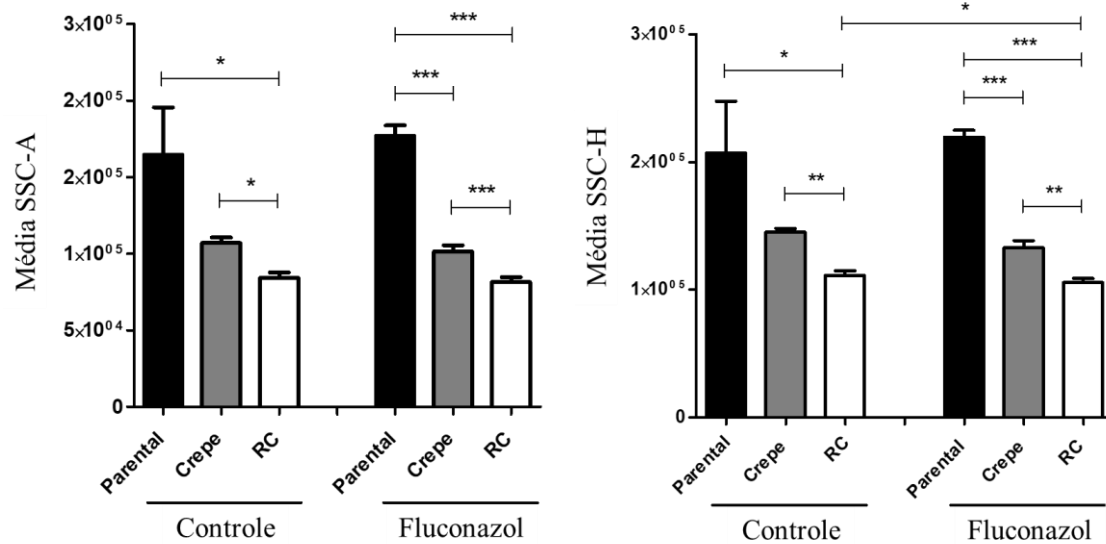


Figura 12. Comparação da média da complexidade/granulosidade celular na área sob a curva (SSC-A) e complexidade/granulosidade celular pela altura do histograma (SSC-H) de citometria de fluxo entre morfotipos derivados de *switching* fenotípico em condição controle e pós exposição ao fluconazol ($1 \mu\text{g/mL}$).

Na análise do tamanho celular, foi observado o mesmo padrão, sendo que, tanto na condição controle, como na exposição ao fluconazol, células da linhagem parental apresentaram maior tamanho do que seus morfotipos derivados de *switching* (Parental > Crepe > RC) (Figura 13).

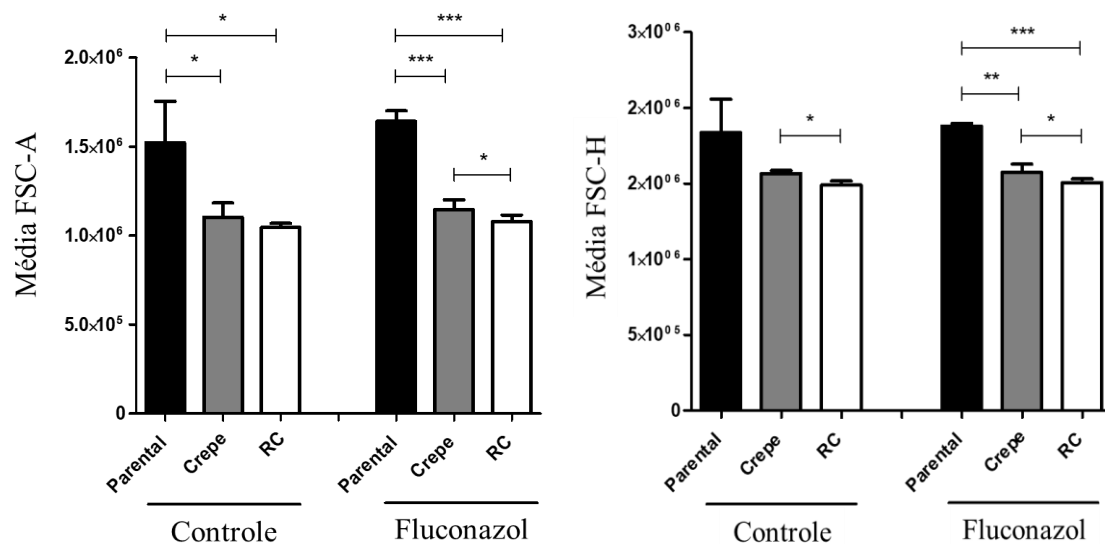


Figura 13: Comparação da média do tamanho celular na altura do histograma (FSC-H) e média do tamanho celular na área sob a curva (FSC-A) de citometria de fluxo entre morfotipos derivados de *switching* fenotípico em condição controle e pós exposição ao fluconazol (1 μ g/mL).

A Figura 14 ilustra, qualitativamente, o Dot Blot dos dados brutos relativos à complexidade/granulosidade e tamanho celular (medidas de FSC e SSC) das células de *C. tropicalis* ao longo dos dez mil eventos analisados para cada morfotipo. As imagens confirmam as diferenças tanto na complexidade/granulosidade, como no tamanho celular de morfotipos derivados de *switching* fenotípico.

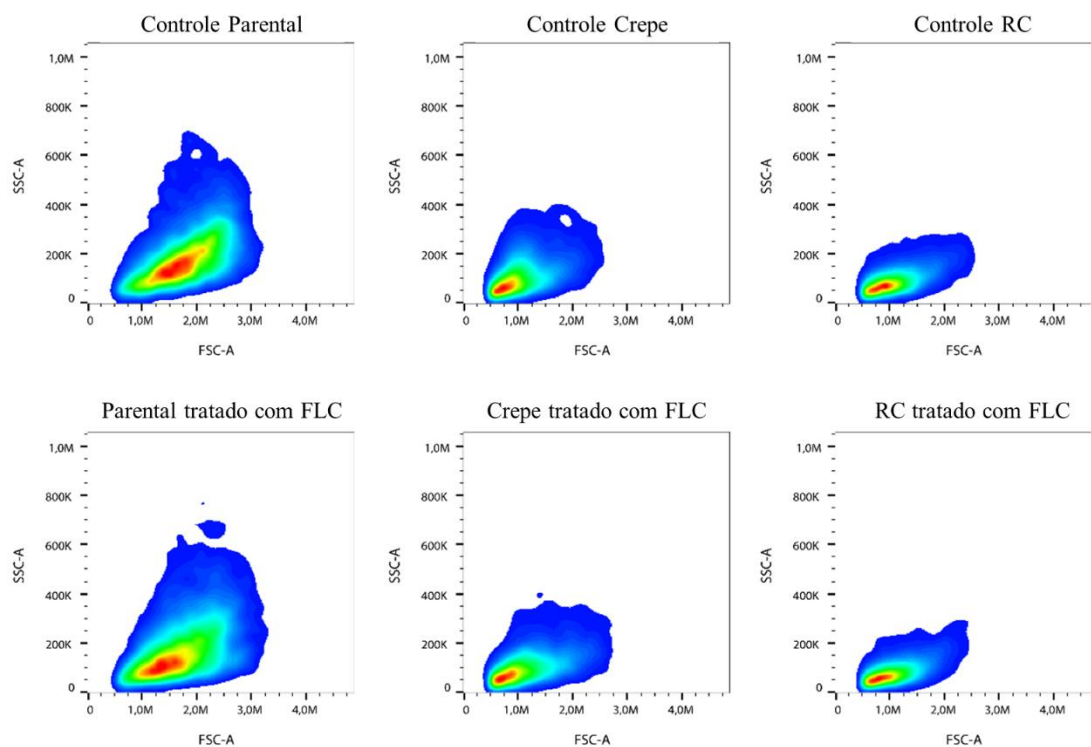


Figura 14. Dot Blot dos morfotipos derivados de *switching* fenotípico na condição controle e expostos ao fluconazol ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) num histograma SSC-A x FSC-A, onde SSC: Complexidade celular; FSC: Tamanho celular; A: Área sob a curva. FLC = fluconazol.

5.6. Integridade de membrana plasmática

A análise de integridade de membrana plasmática foi realizada com os morfotipos derivados de *switching* Crepe e RC. A linhagem Parental não cresceu na concentração de fluconazol testada ($1\mu\text{g}/\text{mL}$). Para o morfotipo Crepe, foi observado aumento no número de células viáveis na presença do fármaco, com manutenção da quantidade de células danificadas em relação à condição controle (sem fluconazol). O número de células viáveis foi significativamente superior ao número de células danificadas em ambas condições de cultivo (Figura 15). Da mesma forma, é possível evidenciar o mesmo padrão para o morfotipo RC. Houve aumento no número de células viáveis na presença do fármaco, com manutenção da quantidade de células danificadas em relação à análise controle (Figura 16).

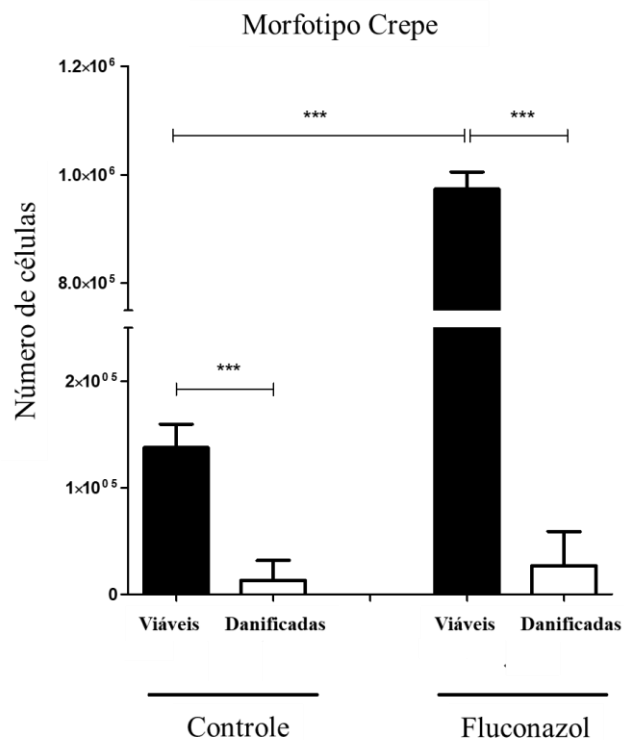


Figura 15. Influência do fluconazol na integridade de membrana celular do morfotipo Crepe derivado de *switching* em *C. tropicalis* pré (controle) e pós exposição ao fluconazol (1 μ g/mL).

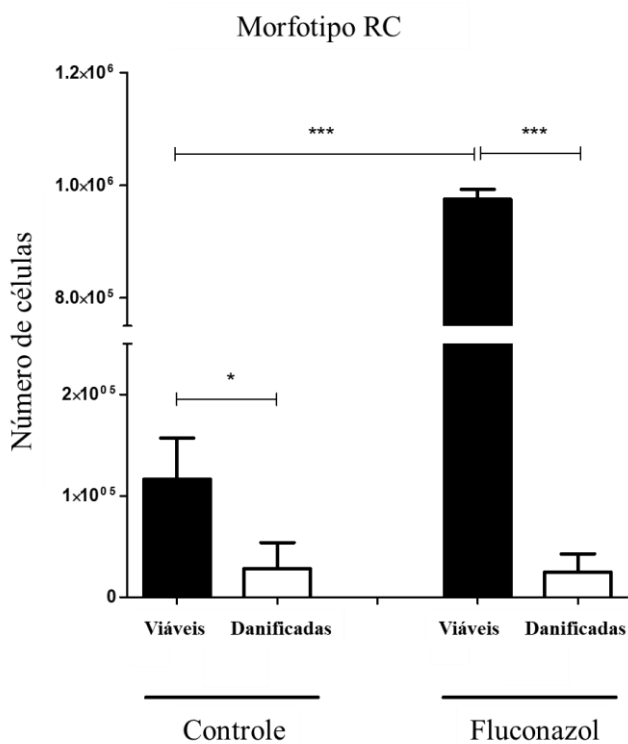


Figura 16: Influência do fluconazol na integridade de membrana celular do morfotipo RC derivado de *switching* em *C. tropicalis* pré (controle) e pós exposição ao fluconazol (1µg/mL).

6. Discussão

Os dados de Concentração Inibitória Mínima para a condição controle mostram os morfotipos derivados de *switching* com valor de CIM50 superior (Crepe = 1µg/mL e RC = 1µg/mL) ao da linhagem Parental (0,125 µg/mL). Após a exposição ao fluconazol, a linhagem Parental e o morfotipo RC apresentaram aumento no valor de CIM50 (Parental = 0,5µg/mL e RC = 2µg/mL), o perfil do morfotipo Crepe se manteve, mostrando que o *switching* fenotípico é capaz de alterar os valores de CIM50 em morfotipos de *C. tropicalis*. É interessante destacar a relação observada entre Concentração Inibitória Mínima e porosidade. Interessantemente, o morfotipo RC foi o morfotipo que mostrou o menor valor de porosidade, dado que pode se relacionar com o maior valor de CIM50 para o fluconazol. Em consonância com os dados apresentados, Yoon et al. (1999) já demonstraram o efeito do *switching* fenotípico na alteração de sensibilidade a anfotericina B por *C. lusitaniae*. Para *C. tropicalis*, Perini et al. (2018) evidenciam alteração na sensibilidade induzida por *switching* fenotípico para fluconazol.

Apesar dos valores de CIM50 ainda conferirem sensibilidade *in vitro* segundo os critérios interpretativos do EUCAST (Edef 7.3.2, 2020), Sanglard e Odds (2002) dissertam sobre a ambiguidade que há ao se discutir o conceito de resistência antifúngica e falha do tratamento clínico com um agente antifúngico. Um paciente cuja infecção persista mesmo após o tratamento antifúngico ocorrer é comumente descrito como “cl clinicamente resistente”. No entanto, o patógeno pode evidenciar sensibilidade inalterada *in vitro*. A falha do tratamento pode ocorrer pelo fármaco não conseguir atingir o sítio de infecção em quantidade suficiente devido ao sistema imunológico do paciente ser incapaz de erradicar um microrganismo cujo crescimento é retardado por um agente fungistático, como o fluconazol.

Tal dado alerta para o fato de que a atenção não deve ser voltada apenas para a dualidade diagnóstica *in vitro* de resistência/sensibilidade, mas também para a ação efetiva do fármaco *in vivo* e para a biologia do microrganismo, afim de conhecer mecanismos adaptativos que dificultem o tratamento clínico, e, assim, evitando margem

para surgimento de resistência. Tendo este raciocínio em mente, e considerando o aumento dos valores de CIM50 após exposição ao fluconazol e a diferença na sensibilidade antifúngica provocada pelo *switching* fenotípico, necessita-se de ainda mais atenção ao cenário epidemiológico de *C. tropicalis* e de todo o gênero *Candida*, evidenciando um sinal de alerta para a resistência antifúngica crescente.

Em adição, num estudo com isolados de *C. tropicalis*, Paul et al. (2020) apresentam que a aquisição de resistência na espécie é mediada pela superexpressão de diferentes genes relacionados à resistência sem quaisquer alterações moleculares. Para isolados de *C. tropicalis* resistentes a azóis, foi descrito a ocorrência de superexpressão para *ERG11* e regulação positiva de diferentes genes que codificam bombas de efluxo celular, como *MDR1* e *CDR1* (Paul et al., 2020). Os dados vão de encontro com o presente trabalho, que evidenciou superexpressão de *ERG11* para o morfotipo Crepe, principalmente pré exposição (4 vezes superior ao Parental). Os dados sugerem que a via de síntese de ergosterol foi prejudicada pela ação do fármaco, como esperado. Porém, é possível ver a influência do *switching* fenotípico na expressão diferencial do gene *ERG11*, demonstrando a maquinaria metabólica morfotipo-dependente.

Quanto ao gene *CDR1*, o morfotipo RC apresentou superexpressão principalmente pré exposição (9 vezes superior ao Parental), mas também pós exposição ao fluconazol (3 vezes superior ao Parental). Para este gene, o morfotipo Crepe apresenta expressão relativa 2 vezes superior à do Parental (Fig. 6 e 7). Os dados mostram que as ferramentas moleculares, além de atuarem de forma morfotipo-dependente em morfotipos derivados de *switching*, também atuam na resistência de forma distinta. Como os morfotipos Crepe e RC apresentaram os valores de CIM maiores e o morfotipo RC ainda evidenciou aumento no valor de CIM pós exposição ao fluconazol, é possível inferir a presença de ferramentas de resistência em detrimento do morfotipo Parental. Ainda nesta análise, é possível sugerir que os morfotipos se utilizam de vias de resistência distintas, um pela superexpressão de *ERG11* e outro pela superexpressão de *CDR1*. Isso mostra como o *switching* altera a expressão gênica de morfotipos em *C. tropicalis* e provoca um alerta para a problemática clínica, visto que, cada vez mais, estudos moleculares expõem a heterogeneidade tanto a nível de cepa, como a nível de morfotipo (como evidenciado aqui), demandando atenção não apenas para o epíteto específico *tropicalis*, mas para seus morfotipos derivados *switching*.

Apesar dos morfotipos não serem classificados como resistentes, mas sim com a sensibilidade alterada, é possível associar os resultados aos dados de Choi et al. (2016), que demonstraram que isolados de *C. tropicalis* não sensíveis ao fluconazol apresentaram a superexpressão dos genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11*, além da infecção fúngica disseminada se desenvolver após a exposição ao azol em pacientes com imunossupressão.

Lee et al. (2007) apresentam que a regulação positiva do gene *ERG11*, bem como um alto número de substituições de nucleotídeos na sequência do *ERG11* podem levar a sensibilidade reduzida ou, segundo Chou et al. (2007), conferir um vantagem seletiva na presença de droga. Silva et al. (2020) verificam que isolados expostos a drogas azólicas aumentam a expressão dos genes *ERG6* e *ERG11*.

Pandey et al. (2020) evidenciaram aumento significativo nos níveis de expressão dos genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* apenas em cepas resistentes de *C. tropicalis*. Em contraste, Jiang et al. (2013) não encontraram nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão de *CDR1* e *MDR1* de isolados de *C. tropicalis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. É importante destacar que os dados da participação dos genes *MDR1* e *CDR1* na promoção de resistência em *C. tropicalis* ainda são muito heterogêneos. Há trabalhos que mostram a atividade dos genes, mas também há trabalhos que descrevem a ação dos mesmos como insignificante. Berkow & Lockhart. (2017) demonstram que a ação do gene *MDR1* não deve ser considerada em isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol em comparação aos sensíveis, além disso, o aumento da expressão de *CDR1* só foi detectado em isolados resistentes ao fluconazol em tratamentos laboratoriais (BARCHIESI et al., 2000; JIN et al., 2018), mas não em derivados clínicos, não existindo demonstração confiável do papel deste mecanismo de resistência. No presente trabalho, foi observada a superexpressão do gene *CDR1 in vitro* (Fig. 6).

Paul et al. (2021) identificam que, na presença do fluconazol, a expressão do gene *ERG11* foi significativamente maior em isolados resistentes. Os autores ainda investigaram a atividade de diferentes genes da via do ergosterol, fatores de transcrição e genes associados ao estresse em isolados sob indução experimental de resistência. Entre os fatores de transcrição, as expressões de *TAC1* e *UPC2* foram significativamente maiores, correlacionados com seus genes alvo (genes *CDR1* e *ERG11*, respectivamente) que fizeram parte dos dados aqui apresentados. As investigações do presente trabalho poderiam se expandir para mais informações a nível genético, sobretudo na direção dos

genes *TAC1* e *UPC2* em morfotipos derivados de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* para mais respostas do background genético de cada morfotipo e do papel do fator de virulência na promoção de resistência.

O fluconazol é um triazol fungistático que atua na enzima lanosterol 14- α -desmetilase (*ERG11*), inibindo a fase tardia da via de biossíntese de ergosterol. A ação do fármaco induz mudanças significativas na rigidez citoplasmática e na integridade da membrana. Childers et al. (2019) discutem que as drogas azólicas não têm como alvo a parede celular e não parecem afetá-la diretamente. Entretanto, Suchodolski et al. (2020) observaram um acúmulo de quitina no mutante ausente para *ERG11*, sugerindo um possível mecanismo compensatório de *C. albicans* na falta de ergosterol. Essa afirmação se relaciona com a depleção do conteúdo de quitina e com a diminuição do conteúdo de manana vistas após exposição ao fluconazol, estabelecendo uma relação entre o fluconazol, manana e quitina da parede celular, sugerindo a influência do *switching* fenotípico sobre o conteúdo de quitina e manana, além da redução desses componentes causadas pelo fluconazol, sugerindo que ausência parcial ou total de ergosterol (com síntese interrompida por azóis) causam alterações na parede celular (Fig. 10 e 11). Estes autores também relataram a influência dos azóis na síntese de quitina, contribuindo para uma distribuição irregular da molécula na parede celular. No presente trabalho também trazemos o dado de que não foi encontrada influência do fluconazol na alteração do teor de β -glucana da parede celular de morfotipos derivados de *switching* em *C. tropicalis*. Apesar disso, é interessante destacar que, como para os outros componentes, há um caráter morfotipo-dependente tanto do teor de β -glucana na parede celular de morfotipos derivados de *switching*, como de quitina e manana, sugerindo que o *switching* fenotípico foi capaz de alterar o conteúdo de β -glucana da parede celular de morfotipos de *C. tropicalis*. (Fig. 9, 10 e 11). Partindo do fato de que a estrutura é a primeira a interagir quimicamente com o fármaco, os resultados sugerem que o estresse provocado pelo fluconazol seja capaz de causar uma perturbação a nível de parede celular.

Angiolella et al. (2008), em estudo com *C. albicans* fluco-resistentes, observaram que os dois isolados resistentes (um a fluconazol e outro a micafungina) tinham uma porcentagem muito maior de material na parede celular por célula do que o do cepa parental, indicando um enriquecimento no teor de carboidratos complexos e proteínas (principalmente manana, β -glucana e complexos proteicos), dado que justifica a aparência anormal da parede celular em microscopia eletrônica. Portanto, respostas

distintas em relação ao fármaco podem ser atribuídas a fatores celulares que incluem alteração na composição e espessura de parede celular, tanto é que as vias de sinalização e os fatores de transcrição que medeiam essa resposta de reparo são denominados mecanismos de salvamento da parede celular ou mecanismos compensatórios da parede celular (WALKER et al., 2008).

Quanto à integridade de membrana plasmática, os resultados mostraram que os morfotipos que apresentaram o CIM superior (Crepe e RC) ao do morfotipo Parental também demonstraram mesmo perfil quanto à integridade de membrana plasmática. Os morfotipos Crepe e RC apresentaram maior densidade celular na presença de 1µg/mL de fluconazol, com maior número de células viáveis após exposição ao fármaco e manutenção da quantidade de células danificadas (Fig. 15 e 16). Sabe-se que o lipídio ergosterol é o principal componente da membrana plasmática de *Candida* spp. e é essencial na manutenção da integridade da estrutura. A ação do fluconazol induz anormalidades da membrana celular, levando a interrupção do crescimento da levedura, culminando em morte (FATTOUH et al., 2021). Dupont et al. (2011) mostram que a composição de esteróis é um fator determinante para a estrutura da membrana plasmática, governando seu comportamento mecânico. Os dados observados para os morfotipos Crepe e RC (Fig. 15 e 16) podem se relacionar com o gene *ERG11* (Fig. 7). No morfotipo Crepe, a superexpressão do gene sugere um teor maior de ergosterol na membrana plasmática, que pode responder pelo comportamento encontrado no experimento de integridade de membrana plasmática. Para o morfotipo RC, a expressão do gene *ERG11* não justifica tal comportamento, o que demanda mais análises e sugere a existência de diferentes maquinarias moleculares morfotipo-dependentes em *C. tropicalis*.

Quanto à porosidade de parede celular, o morfotipo RC se mostrou menos poroso, com uma redução significativa da porosidade pós exposição ao fluconazol, juntamente com o morfotipo Parental, que apresentou o mesmo perfil, mas em menor proporção, tornando as linhagens menos permissíveis a agentes externos, tais como o próprio antifúngico. Além disso, os dados evidenciam o efeito do *switching* fenotípico na alteração da porosidade de parede celular em morfotipos de *C. tropicalis*, dado inédito na literatura (Fig. 8). O comportamento de alteração de porosidade afeta diretamente a influência de moléculas exógenas no funcionamento celular. Liu et al. (2019) identificaram a correlação entre a porosidade da parede celular e a maior penetração de fármacos antifúngicos, porém, é importante ter cautela com este resultado, pois a relação

estrutural entre parede celular e membrana plasmática é muito tênue. Pode ser possível que a desestabilização da parede celular afete a membrana plasmática e facilite a ação dos antifúngicos através desta estrutura. Seria importante mais investigações em maior escala para determinar o potencial total dos agentes modificadores da parede celular e suas relações com fármacos antifúngicos.

Navarro-Arias et al. (2019) observaram uma porosidade média para a parede celular de *C. tropicalis* de 62,8% ($\pm 8,9\%$). Apenas o morfotipo RC pós exposição ao FLC difere desse valor, com porosidade de 48,9% ($\pm 2,5\%$), menor valor observado no trabalho, ou seja, o *switching* fenotípico foi capaz de produzir um morfotipo com a parede menos porosa permissiva a fármacos do que a média que a espécie costuma apresentar (Fig. 8).

Modificações da parede celular fúngica surgem em detrimento de tensões provocadas pelo microambiente hospedeiro e pela exposição da levedura a fármacos antifúngicos (LIMA et al., 2019). Alguns exemplos de alterações de parede relacionados ao estresse estão descritos na literatura, como a via da integridade celular ativando a biogênese da parede celular, a alteração no comprimento e na complexidade da cadeia de manana quando as células são cultivadas em meio com sangue ou soro ao invés do crescimento em meio laboratorial padrão (KRUPPA et al., 2011; ENE et al., 2012) e a ativação da proteína quinase ativada por estresse via gene HOG1, influenciando a biossíntese da parede celular e, em parte, regulando a síntese de quitina (WALKER et al., 2008). Além disso, recentemente foi demonstrado que os estressores influenciam as estruturas de mananas em *C. albicans* (ENE et al., 2012). De Nobel et al. (1990) relacionou o aumento da porosidade com cadeias laterais de manana mais curtas.

Quanto à citometria de fluxo, Malavia et al. (2017) utilizaram a metodologia para demonstrar o aumento do tamanho de células de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* na privação de zinco. O trabalho revelou que há correlação entre o volume celular e o potencial de adesão para células de *C. albicans* com restrição de zinco, indicando que o tamanho das células contribui para maior adesão. O dado sugere que algum estresse que desencadeia uma mudança no tamanho celular da levedura pode ter desdobramento na virulência. Sasse et al. (2013) relataram alteração do tamanho e formato celular em células derivadas de *switching* fenotípico em *C. albicans* no sistema *White/opaque*, dado que corresponde com o sistema de *switching* 49.07 estudado aqui, onde há clara diferenciação celular entre os morfotipos (Fig. 12, 13 e 14).

Por conta do ineditismo dos dados expostos no trabalho, é difícil estabelecer comparações que fizeram uso do modelo biológico e metodologia apresentados, porém, Neto et al. (2014) evidenciaram alterações no tamanho/granulosidade celular quando as cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol foram expostas aos compostos químicos naftoquinoidais por 24h. Sendo assim, faz sentido retomar o comportamento evidenciado pelo morfotipo RC, que na presença do fármaco fluconazol apresentou significativa redução na complexidade/granulosidade celular (Fig. 12).

Em suma, o *switching* fenotípico foi capaz de produzir morfotipos que demonstraram protagonismo para todas as análises expostas. O morfotipo Crepe apresentou superexpressão do gene ERG11, menor porosidade de parede celular, maior teor de quitina e β -glucana na parede celular, membrana plasmática mais íntegra e maior valor de CIM quando comparado ao isolado clínico (Parental). Além disso, e com mais destaque, o morfotipo RC apresentou superexpressão do gene CDR1, menor porosidade de parede celular, maior teor de quitina e β -glucana na parede celular, membrana plasmática mais íntegra e maior valor de CIM em relação ao isolado clínico (Parental) e também ao variante morfológico (Crepe), se mostrando o morfotipo com o perfil de resposta mais acentuado frente as metodologias testadas. Dessa forma, postulamos o apelo clínico do trabalho no fato de que variantes de *switching* fenotípico podem conter uma maquinaria metabólica diferente do isolado clínico, podendo culminar em complicações no tratamento de uma infecção por *Candida tropicalis*.

7. Conclusão

No presente estudo foi possível evidenciar o efeito do *switching* fenotípico na promoção do aumento da concentração inibitória mínima ao fluconazol, na superexpressão dos genes de resistência ERG11 (para o morfotipo Crepe) e CDR1 (para o morfotipo RC), na diminuição da porosidade de parede celular, no aumento do teor de β -glucana e quitina da parede celular, no aumento da integridade de membrana plasmática, complexidade e tamanho celular para morfotipos de *C. tropicalis*, evidenciando o comportamento morfotipo-depende para todas as variáveis testadas. Além disso, com o emprego do modelo biológico de *switching* fenotípico foi possível observar a influência do fluconazol na expressão de genes de resistência (*ERG11* superexpresso para o morfotipo Crepe e *CDR1* superexpresso para o morfotipo RC), adaptabilidade dos

morfortipos Crepe e RC ao mostrar uma CIM superior e quantidade de leveduras viáveis superiores após exposição fármaco, bem como o papel do triazol além do alvo, alterando a quantidade de componentes de parede celular (principalmente quitina e manana) e o tamanho da célula do morfortipo RC.

Referências

ANGIOLELLA, Letizia et al. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 927-936, 2008.

ARZMI, M. H.; ABDUL RAZAK, F.; YUSOFF MUSA, M.; WAN HARUN, W. H. A. Effect of phenotypic switching on the biological properties and susceptibility to chlorhexidine in *Candida krusei* ATCC 14243. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 3, p. 352-353, 2012.

BARCHIESI, Francesco et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1578-1584, 2000.

BERKOW, Elizabeth L.; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BERMAN, Judith; HADANY, Lilach. Does stress induce (para) sex? Implications for *Candida albicans* evolution. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 5, p. 197-203, 2012.

BRAGA, Paula Rocha et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273-277, 2018.

BROWN, A. J. P.; COWEN, L. E.; DI PIETRO, A.; QUINN, J. Stress Adaptation. **Microbiology Spectrum**, 2017.

BUTLER, Geraldine et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657, 2009.

CASTELLANI, Aldo. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **The Lancet**, v. 179, n. 4610, p. 13-15, 1912.

CHILDERS, Delma S. et al. Impact of the environment upon the *Candida albicans* cell wall and resultant effects upon immune surveillance. **The Fungal Cell Wall**, p. 297-330, 2019.

CHOI, Min Ji et al. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3653-3661, 2016.

CHOU, Hsiao-Hui et al. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 4, p. 427-433, 2007.

CLAUDINO, A. L. R. et al. Mutants with heteroresistance to amphotericin B and fluconazole in *Candida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 943-951, 2009.

COWEN, Leah E. et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2818-2823, 2009.

CUTLER, Jim E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 187-218, 1991.

DE NOBEL, Johannes G. et al. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast**, v. 6, n. 6, p. 483-490, 1990.

DE SOUZA, Cássia Milena et al. Changes in Adhesion of *Candida tropicalis* Clinical Isolates Exhibiting Switch Phenotypes to Polystyrene and HeLa Cells. **Mycopathologia**, v. 186, n. 1, p. 81-91, 2020.

DEORUKHKAR, Sachin C.; SAINI, Santosh; MATHEW, Stephen. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.

DOI, André Mario et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOI, Matsuko et al. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. **Microbiology**, v. 138, n. 10, p. 2243-2251, 1992.

DUAN, Zhimin et al. *Candida tropicalis* induces pro-inflammatory cytokine production, NF- κ B and MAPKs pathways regulation, and dectin-1 activation. **Canadian journal of Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 937-944, 2018.

DUPONT, Sebastien et al. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 6, p. 1520-1528, 2011.

ENE, I. V.; WALKER, L. A.; SCHIAVONE, M.; LEE, K. K.; MARTIN-YKEN, H.; DAGUE, E.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A.; BROWN, A. J. P. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **mBio**, 2015.

ENE, Iuliana V. et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 1319-1335, 2012.

ENE, Iuliana V.; HICKMAN, Meleah A.; GERSTEIN, Aleeza C. The Interplay Between Neutral and Adaptive Processes Shapes Genetic Variation During *Candida* Species Evolution. **Current Clinical Microbiology Reports**, p. 1-10, 2021.

EUCAST. *EUCAST Antifungal MIC Method for Yeasts. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts*; (E.DEF 7.3.2); EUCAST Development Laboratory for Fungi: Copenhagen, Denmark, 2020; Available online: https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/ (Acessado em 27 de Outubro de 2021).

FAN, Xin et al. Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 464, 2017.

FATTOUH, Nour et al. Molecular mechanism of fluconazole resistance and pathogenicity attributes of Lebanese *Candida albicans* hospital isolates. **Fungal Genetics and Biology**, p. 103575, 2021.

FAVEL, Anne et al. Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 331-339, 2003.

FRANÇA, Emanuele J. G. et al. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypes *switching* of *Candida tropicalis*. **Micron**, v.42, p.726-732, 2011.

FURLANETO, Márcia Cristina et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 595-599, 2011.

GHAZI, S. et al. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 3, p. 245-252, 2019.

HAMMOUD, Majeda S. et al. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e624-e628, 2013.

HAN, Ting-Li; CANNON, Richard D.; VILLAS-BÔAS, Silas G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 8, p. 747-763, 2011.

HORNBY, Jacob M. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.

JIANG, Cen et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 778-785, 2013.

JIN, Longyang et al. MDR1 overexpression combined with ERG11 mutations induce high-level fluconazole resistance in *Candida tropicalis* clinical isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2018.

JONES JR, Stephen K.; HIRAKAWA, Matthew P.; BENNETT, Richard J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. **Molecular microbiology**, v. 92, n. 2, p. 383-398, 2014.

KÄMMER, Philipp et al. Survival strategies of pathogenic *Candida* species in human blood show independent and specific adaptations. **Mbio**, v. 11, n. 5, p. e02435-20, 2020.

KNORRE, D. A. et al. Do Multiple Drug Resistance Transporters Interfere with Cell Functioning under Normal Conditions?. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 12, p. 1560-1569, 2020.

KOVÁCS, Renátó; MAJOROS, László. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 99, 2020.

KRUPPA, Michael et al. *C. albicans* increases cell wall mannoprotein, but not mannan, in response to blood, serum and cultivation at physiological temperature. **Glycobiology**, v. 21, n. 9, p. 1173-1180, 2011.

KURTZMAN, Cletus; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, 2011.

LACHKE, Salil A. et al. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2661-2674, 2002.

LAFFEY, Sean F.; BUTLER, Geraldine. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1073-1081, 2005.

LEE, Mi-Kyung et al. Susceptibility and trailing growth of *Candida albicans* to fluconazole: results of a Korean multicentre study. **Mycoses**, v. 50, n. 2, p. 148-149, 2007.

LIMA, Soraia L.; COLOMBO, Arnaldo L.; DE ALMEIDA JUNIOR, João N. Fungal cell wall: emerging antifungals and drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2573, 2019.

LIU, Xiaohui et al. Novel tool to quantify cell wall porosity relates wall structure to cell growth and drug uptake. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 4, p. 1408-1421, 2019.

LOCKHART, Shawn R. Current epidemiology of *Candida* infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131-136, 2014.

MALAVIA, Dhara et al. Zinc limitation induces a hyper-adherent goliath phenotype in *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2238, 2017.

MARCOS-ZAMBRANO, Laura Judith et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1192-1198, 2014.

MARINS, Tatiana Aporta et al. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2018.

MBA, Ifeanyi Elibe; NWEZE, Emeka Innocent. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797-1819, 2020.

MCMANUS, Brenda A.; COLEMAN, David C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 166-178, 2014.

MEDEIROS, Mariana Araújo Paulo de et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MEGRI, Youcef; ARASTEHFAR, Amir; BOEKHOUT, Teun; DANESHNIA, Farnaz; HÖRTNAGL, Caroline; SARTORI, Bettina; HAFEZ, Ahmed; PAN, Weihua; LASS-FLÖRL, Cornelia; HAMRIOUI, Boussad. *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, p. 1-10, 2020.

MILEWSKI, Slawomir; MIGNINI, Fiorenzo; BOROWSKI, Edward. Synergistic action of nikkomycin X/Z with azole antifungals on *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 137, n. 9, p. 2155-2161, 1991.

MOKOCHINSKI, João Benhur et al. Biomass and Sterol Production from Vegetal Substrate Fermentation Using *Agaricus brasiliensis*. **Journal of Food Quality**, v. 38, n. 3, p. 221-229, 2015.

MORALEZ, Alane T.P. et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379-386, 2016.

MORALEZ, Alane TP et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 106-114, 2014.

MORALEZ, Alane T P.; PERINI, Hugo F.; PAULO, Eloiza A.; FURLANETO-MAIA, Luciana.; FURLANETO, Marcia C. Effect of phenotypic switching on biofilm traits in *Candida tropicalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104346, 2020.

MOREIRA, Maria Inês de Macedo Carrilho Gonçalves. **Azóis: farmacologia e interações medicamentosas**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso.

MORROW, Carl A.; FRASER, James A. Ploidy variation as an adaptive mechanism in human pathogenic fungi. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2013. p. 339-346.

MUÑOZ, José F. et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

NAVARRO-ARIAS, Maria J. et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and **Candida auris** by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 783, 2019.

NETO, João B. A. et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e93698, 2014.

ODDS, Frank C. Pathogenesis of *Candida* infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3, p. S2-S5, 1994.

OLIVEIRA, Jonathas Sales de et al. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 377-388, 2020.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, Matthaios et al. Increasing incidence of candidaemia and shifting epidemiology in favor of *Candida non-albicans* in a 9-year period (2009–2017) in a university Greek hospital. **Infection**, v. 47, n. 2, p. 209-216, 2019.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PAUL, Saikat et al. Dynamics of in vitro development of azole resistance in *Candida tropicalis*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 553-561, 2020.

PAUL, Saikat et al. Rapid detection of ERG11 polymorphism associated azole resistance in *Candida tropicalis*. **Plos One**, v. 16, n. 1, p. e0245160, 2021.

PERINI, Hugo F. et al. Phenotypic switching alters virulence and fluconazole susceptibility profile in *Candida tropicalis* clinical isolate. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, vol.23, n.2, pp.07-11, 2018.

PERINI, Hugo F.; MORALES, Alane T P.; ALMEIDA, Ricardo S C.; PANAGIO, Luciano A.; JUNIOR, Admilton O G.; GOMES BARCELLOS, Fernando; FURLANETO-MAIA, Luciana; FURLANETO, Marcia C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis* alters host-pathogen interactions in a *Galleria mellonella* infection model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

PORMAN, Allison M. et al. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21158-21163, 2011.

PORMAN, Allison M. et al. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003369, 2013.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

SANGLARD, Dominique. Finding the needle in a haystack: Mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 1, p. e1007478, 2019.

SANGLARD, Dominique; ODDS, Frank C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SASSE, Christoph et al. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 50-58, 2013.

SEERVAI, Riyad NH et al. Parasexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 12, p. 1629-1640, 2013.

SEMAN, Brittany G. et al. Yeast and filaments have specialized, independent activities in a zebrafish model of *Candida albicans* infection. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 10, p. e00415-18, 2018.

SHAO, Jing et al. Antiproliferation of berberine in combination with fluconazole from the perspectives of reactive oxygen species, ergosterol and drug efflux in a fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolate. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1516, 2016.

SILVA, Maria Claudia et al. Modulation of ERG Genes Expression in Clinical Isolates of *Candida tropicalis* Susceptible and Resistant to Fluconazole and Itraconazole. **Mycopathologia**, v. 185, p. 675-684, 2020.

SINGH, Rachna; CHAKRABARTI, Arunaloque. Invasive candidiasis in the Southeast-Asian region. In: ***Candida albicans: Cellular and Molecular Biology***. Springer, Cham, 2017. p. 25-40.

SLUTSKY, Bernice; BUFFO, Jeffrey; SOLL, David R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, v. 230, n. 4726, p. 666-669, 1985.

SOLL, DAVID R. et al. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1448-1459, 1988.

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

STANISZEWSKA, Monika. Virulence factors in *Candida* species. **Current Protein and Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 313-323, 2020.

SUCHODOLSKI, Jakub et al. Fluconazole and lipopeptide surfactin interplay during *Candida albicans* plasma membrane and cell wall remodeling increases fungal immune system exposure. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 314, 2020.

WALKER, Louise A. et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000040, 2008.

WANG, Dan et al. *Candida tropicalis* distribution and drug resistance is correlated with ERG11 and UPC2 expression. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2021.

WU, Ping-Feng et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans* *Candida* species from cancer patients: Non-*albicans* candidemia in cancer patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2017.

XIE, Jing et al. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 6, p. 773-782, 2012.

YOON, Stephanie A. et al. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 836-845, 1999.

ZHAI, Bing et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3758-3766, 2012.

ZUZA-ALVES, Diana L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1927, 2017.