



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS***

Londrina
2012

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS***

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

Orientadora: Prof^ª Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M828a Moralez, Alane Tatiana Pereira.
Avaliação de fatores de virulência em morfotipos de *Candida tropicalis* /
Alane Tatiana Pereira Moralez. – Londrina, 2012.
59 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Candida – Teses. 2. Candida – Fenótipos – Teses. 3. Virulência
(Microbiologia) – Teses. 4. Micoses fungóides – Teses. I. Furlaneto, Márcia
Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 616.934

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
MORFOTIPOS DE *CANDIDA TROPICALIS***

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a.Dr^a Márcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina - PR

Prof^a.Dr^a Luciana Furlaneto-Maia Universidade
UTFPR – Londrina - PR

Prof^a.Dr^a Margarete Teresa Gottardo de
Almeida
FAMERP – São José do Rio Preto - SP

Londrina, 27 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho a Deus, minha fonte de fé e perseverança; aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e incentivo e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."
(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

A Deus que é luz e sabedoria em meu caminho. Obrigada Senhor, pelos momentos de felicidade e também pelos momentos difíceis, pois pude perceber a grandeza de sua misericórdia e me tornar um ser humano melhor.

Aos meus pais Leão e Teresa, meus maiores exemplos. Porque acreditaram em mim e desde o primeiro instante souberam me compreender. Obrigada por me ajudarem a concretizar mais um sonho. Todas as minhas conquistas são e serão sempre dedicadas a vocês.

Ao Admilton Júnior, meu namorado, amigo, companheiro em todos os momentos, por todas as ajudas e principalmente pelo apoio emocional em todos os momentos difíceis.

A todos os familiares e amigos que mesmo de longe me incentivaram e emanaram pensamentos positivos, tornando minhas dificuldades mais leves.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela confiança, paciência, dedicação e incentivo em todo decorrer desta orientação. Agradeço imensamente por compartilhar comigo seus conhecimentos, sendo para mim exemplo de ética e profissionalismo. Agradeço por me ajudar a evoluir.

À professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, por acompanhar meu trabalho desde sua idealização, por seus ensinamentos e por toda sua contribuição.

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, por compartilhar seus conhecimentos profissionais, pela contribuição direta nos trabalhos de microscopia eletrônica, disponibilizando recursos e equipamentos de seu laboratório sempre com atenção e carinho com nossos trabalhos.

Aos queridos amigos de laboratório Ana Flávia, Daiane, Daniel, Emanuele, Helena, Kátia, Luiz, Marcelo, Marcinha, Rosana e Viviane, pela amizade, boa convivência e por todo apoio durante o período deste trabalho.

À professora Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, pela primeira oportunidade de trabalhar em um laboratório de microbiologia, meus sinceros agradecimentos pelo incentivo, amizade e contribuição ao longo destes anos.

Aos professores Dra. Maria Angélica E. Watanabe, Dr. Galdino Andrade pela disponibilização de recursos e equipamentos de seus laboratórios.

Aos integrantes do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao técnico Osvaldo Capello pela grande ajuda com a realização das microscopias, pela atenção e disponibilidade em contribuir conosco.

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Microbiana pela ajuda com a manipulação dos equipamentos sempre com atenção e presteza.

Ao técnico do laboratório Osvaldo Lopes dos Santos pela contribuição diária na dinâmica do laboratório.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. A todos vocês o meu...

MUITO OBRIGADA!!!

MORALEZ, Alane Tatiana Pereira. **Avaliação de fatores de virulência em morfotipos de *Candida tropicalis***. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Candida tropicalis tem surgido como uma das principais espécies de *Candida* não-*albicans*. *Switching* fenotípico tem sido considerado como um possível fator de virulência em *Candida* spp., além de promover a expressão diferencial de outros fatores de virulência em algumas espécies. O objetivo do presente estudo foi obter e caracterizar variantes morfológicas de colônia (morfotipos) estáveis resultantes do evento de *switching* fenotípico obtidos a partir de 5 isolados clínicos de *C. tropicalis* e realizar uma análise comparativa entre morfotipos variantes e seus respectivos morfotipos parentais quanto à expressão dos seguintes fatores de virulência: atividades hemolítica e proteolítica; capacidade de produzir biofilme; produção de formas filamentosas; potencial de invasão; perfil de formas celulares no processo de invasão do ágar, pela técnica de fratura e avaliação ultraestrutural e perfil de suscetibilidade fúngica. Morfotipos estáveis foram caracterizados e identificados como liso, flor e rugoso (isolado 49.07); liso, cratera e centro irregular (isolado 335.07); felpudo e miceliado (isolado 46.10); liso, crepe e flocado (isolado 100.10) e semi-liso e difuso (isolado 236.10). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas quanto à produção de fator hemolítico entre os morfotipos dos isolados 49.07, 335.07 e 100.10. Nenhum dos isolados apresentou diferenças quanto à atividade proteolítica em seus morfotipos. Dados da produção de biofilme revelaram diferenças significativas entre morfotipos liso e flor e liso e rugoso (isolado 49.07) e entre os morfotipos liso e crepe (isolado 100.10). Morfotipos variantes apresentaram maiores porcentagens de formas filamentosas em relação aos respectivos morfotipos parentais. A técnica de *footprint* revelou que morfotipos de colônias mais estruturadas foram mais invasivos. A microscopia eletrônica de varredura revelou que morfotipos variantes apresentaram maior densidade de células filamentosas no momento da invasão comparados a seus respectivos morfotipos parentais em cada isolado. Segundo o Etest[®], não houve alteração no perfil de suscetibilidade entre morfotipos parentais e variantes para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e cetoconazol. Quanto ao itraconazol, o morfotipo variante flor apresentou resistência enquanto o seu respectivo parental apresentou suscetibilidade (isolado 49.07). Já o morfotipo variante flocado foi sensível e seu respectivo parental foi resistente. Os dados sugerem que *switching* fenotípico em *C. tropicalis* pode promover a expressão diferencial de alguns fatores de virulência, podendo também afetar a suscetibilidade antifúngica nesta espécie.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Fatores de virulência. *Phenotypic Switching*.

MORALEZ, Alane Tatiana Pereira. **Evaluation of virulence factors in morphotypes of *Candida tropicalis***. 2012. 59p. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Candida tropicalis has emerged as a major non-*albicans* *Candida* species. Phenotypic *switching* has been considered as a putative virulence factor in *Candida* spp. and also seems to promote the differential expression of others virulence factors in some species. The objective of this study was to obtain and characterize stable morphological colony variants (morphotypes) resulting from phenotypic *switching* event from 5 clinical isolates of *C. tropicalis* and perform a comparative analysis between morphotypes variants and their parental morphotypes for the expression of the following virulence factors: hemolytic and proteolytic activities, ability to produce biofilm, production of filamentous forms; potential invasion; profile of cellular forms in the process of agar invasion, the technique of fracture and ultrastructural evaluation and profile of fungal susceptibility. Stable morphotypes were identified and characterized as smooth, flower and rough (isolate 49.07), smooth, crater and irregular center (isolate 335.07) fuzzy and mycelial (isolate 46.10); smooth, crepe and flocculated (isolate 100.10) and semi-smooth and diffuse (isolate 236.10). Significant differences ($p < 0.05$) were found regarding the production of hemolytic factor among morphotypes of isolates 49.07, 335.07 and 100.10. None of the isolates showed differences in the proteolytic activity in their morphotypes. Biofilm production data revealed significant differences between morphotypes smooth and flower and smooth and rough (isolate 49.07) and between the smooth and crepe morphotypes (isolate 100.10). Morphotypes variants showed higher percentages of filamentous forms in relation to their respective parental morphotypes. The footprint technique revealed that morphotype colonies more structured were more invasive. The scanning electron microscopy revealed that morphotype variants had a higher density of filamentous cells at the time of invasion compared to their parental morphotypes. According to Etest[®], there was not alteration in the susceptibility profile between parental morphotypes and variants for the antifungal amphotericin B, fluconazole and ketoconazole. Concerning the antifungal itraconazole, the variant morphotype flower (isolate 49.07) exhibited resistance while its respective parental morphotype was susceptible. The morphotype flocculated (isolate 100.10) was susceptible and its respective parental morphotype was resistant. The data suggest that phenotypic *switching* in *C. tropicalis* may promote differential expression of some virulence factors can also affect the antifungal susceptibility in this species.

Keywords: *Candida tropicalis*. Virulence factors. Phenotypic switching.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fotomicrografia (x2) apresentando colônias representativas de morfotipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis* cultivados em YPD ágar a 28 °C por 96 h. Isolado 49.07(A, B e C); isolado 335.07(D, E F); isolado 100.10(G, H e I); isolado 46.10(J, K) e isolado 236.10 (L e M). Em (A) parental liso; (B) flor; (C) rugoso; (D) parental liso; (E) cratera; (F) centro irregular; (G) parental liso; (H) crepe; (I) flocado; (J) parental felpudo; (K) miceliado; (L) parental semi-liso e (M) difuso 54
- Figura 2** - Análise comparativa entre a atividade hemolítica dos morfotipos variantes com seus respectivos morfotipos parentais em cada isolado. (a) 49.07; (b) 335.07; (c) 46.10; (d) 100.10 e (e) 236.10. Valores correspondem à média de três experimentos independentes dados em (Pz)..... 55
- Figura 3** - Formação de biofilme por morfotipos de *Candida tropicalis* (a). Estrutura dos biofilmes formados por células aderentes de morfotipos parentais e variantes dos isolados 49.07; 335.07; 46.10; 100.10 e 236.10 após 48 h (b). A média ± DP foi determinada por dois ensaios independentes realizados em triplicata. (*) p<0,05 56
- Figura 4-** Porcentagens de formas filamentosas em cada morfotipo. Foram analisadas mil células para cada colônia. Valores correspondem a média de três colônias (3.000 células) analisadas quanto ao número de formas filamentosas (hifas e pseudohifas) 57

Figura 5- Fotomicrografia (x2) apresentando a invasão do ágar por morfotipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis* cultivados em YPD ágar a 28 °C por 96 h. Células foram fotografadas após remoção da colônia do ágar por lavagem com água destilada estéril. Isolado 49.07 (A, B e C); isolado 335.07 (D, E e F); isolado 100.10 (G, H e I); isolado 46.10 (J, K) e isolado 236.10 (L e M). Em (A) parental liso; (B) flor; (C) rugoso; (D) parental liso; (E) cratera; (F) centro irregular; (G) parental liso; (H) crepe; (I) flocado; (J) parental felpudo; (K) miceliado; (L) parental semi-liso e (M) difuso58

Figura 6- Eletromicrografia apresentando os tipos e arranjos celulares de morfotipos de *C. tropicalis* ao invadirem o ágar. (A) isolado 49.07, morfotipo parental liso; (B) isolado 335.07, morfotipo variante cratera; (C) isolado 46.10, morfotipo variante miceliado; (D) isolado 100.10, morfotipo variante flocado; (E) isolado 236.10, morfotipo parental semi-liso; (F) isolado 236.10, morfotipo variante difuso. Ágar (*) e tipos celulares (seta)59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade proteolítica de morfotipos de isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i>	54
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade de morfotipos de isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i> pelo método Etest®	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	16
3.2	<i>CANDIDA TROPICALIS</i>	17
3.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
3.3.1	<i>Switching</i> Fenotípico Em <i>Candida</i> spp.	18
3.3.2	Fator Hemolítico	21
3.3.3	Proteases Aspárticas Secretadas (Saps)	21
3.3.4	Biofilme	22
3.3.5	Polimorfismos Em <i>Candida</i> spp.	23
3.3.6	Capacidade De Invasão	24
3.4	PERFIS DE SUSCETIBILIDADE FÚNGICA EM <i>C. tropicalis</i>	25
	REFERÊNCIAS	27
	Artigo - Avaliação de fatores de virulência em morfotipos de <i>Candida tropicalis</i>	34
	CONCLUSÕES	48

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. estão entre as espécies fúngicas mais prevalentes relacionadas a infecções nosocomiais em todo o mundo. *Candida albicans* é reconhecida como a principal espécie relacionada à colonização e infecção em humanos. No entanto, nos últimos anos, a emergência de infecções causadas por espécies não-*albicans* tem aumentado progressivamente. Essa mudança no perfil epidemiológico de espécies do gênero *Candida* pode ser explicada, em parte, pelo avanço tecnológico no desenvolvimento de novas metodologias de identificação e diagnóstico microbiológico, bem como o aumento no uso de fluconazol.

C. tropicalis tem emergido como o segundo agente mais comum em casos de candidemia, acometendo principalmente pacientes com câncer e neutropenia, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Também é relatado o aumento da incidência de *C. tropicalis* como agente causal de infecções nosocomiais do trato urinário.

Determinantes de virulência em *Candida* spp. incluem *switching* fenotípico; capacidade de diferenciação celular (formação de hifas e pseudo-hifas); secreção de enzimas hidrolíticas, a exemplo das proteases aspárticas secretadas (Saps); fator hemolítico; formação de biofilme e capacidade de invasão de tecidos e outros substratos. Até o momento, ainda são poucos os estudos referentes a determinantes de virulência em espécies não-*albicans*.

O evento de *switching* fenotípico em *Candida* spp., caracterizado pela emergência de colônias com morfologia alterada, tem sido descrito por sua possível correlação a outros fatores de virulência, bem como possível impacto na terapia antifúngica.

A resistência a determinados antifúngicos tem sido cada vez mais relatada para espécies não-*albicans* nos últimos anos, principalmente para *C. tropicalis*. As razões para a rápida emergência de resistência nesta espécie ainda não são claras. Provavelmente alguns isolados podem ser inerentemente menos suscetíveis a alguns antifúngicos pela administração profilática e terapêutica dos mesmos, podendo assim selecionar mutantes naturalmente menos suscetíveis.

Dada a relevância epidemiológica de infecções causadas por *Candida* spp., torna-se necessária a elucidação de eventos biológicos referentes aos

determinantes de virulência nestas espécies, especialmente para espécies não-*albicans*, uma vez que a maioria dos estudos utiliza *C. albicans* como modelo.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Obter e caracterizar morfotipos variantes (variantes morfológicos) de isolados clínicos de *C. tropicalis* resultantes de *switching* fenotípico.

Objetivos Específicos

- Realizar uma análise comparativa entre morfotipos variantes e seus respectivos morfotipos parentais quanto à expressão dos seguintes fatores de virulência: atividades hemolítica e proteolítica; capacidade de produzir biofilme; produção de formas filamentosas; potencial de invasão; perfil de formas celulares no processo de invasão do ágar, pela técnica de fratura e avaliação ultraestrutural;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica dos morfotipos variantes e seus respectivos morfotipos parentais frente à anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÊNERO *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* vivem habitualmente como organismos comensais, fazendo parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis em aproximadamente 50% da população. No entanto, se o equilíbrio da microbiota normal é interrompido ou as defesas do sistema imune do hospedeiro estão comprometidas, muitas vezes tornam-se parasitas oportunistas (NAGLIK, 2003).

O gênero *Candida* compreende um dos mais importantes grupos de fungos oportunistas (revisado por RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; revisado por NUCCI et al., 2010). Existem mais de 200 espécies de *Candida*, das quais cerca de 20 já foram relatadas como agentes etiológicos de um amplo espectro de infecções humanas (HA et al., 2010; NUCCI, 2010). Espécies patogênicas do gênero *Candida* podem causar doenças que variam de micoses superficiais a disseminadas e frequentemente são causa de infecções fatais (DOSTÁL et al., 2003). Existem 05 espécies responsáveis por mais de 95% dos casos de infecções provocadas pelo gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo as demais espécies, no momento, consideradas como espécies incomuns, das quais se destacam *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (TORTORANO et al., 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA; MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

A complexidade das interações entre *Candida* e o hospedeiro sugere que estes fungos possuam ampla versatilidade genética, a qual permite sua adaptação aos diferentes microambientes. Assim, estas leveduras podem colonizar e causar infecções em sítios anatômicos distintos, os quais podem ser amplamente variados quanto ao meio fisiológico (revisado por HAYNES, 2001; ROMANI et al., 2003).

Diversas espécies do gênero *Candida* estão relacionadas a episódios de candidemia em hospitais do mundo todo (COLOMBO et al., 2006, FALAGAS et al., 2010). As infecções hematogênicas são de difícil diagnóstico por sua apresentação inespecífica e possuem implicações relevantes quanto aos custos,

dificuldades de tratamento e, principalmente, quanto às taxas de mortalidade, sendo que sua incidência crescente é atribuída a vários fatores predisponentes a doença (OLAECHEA et al., 2004; GAGNE et al., 2006; revisado por RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; SHORR et al., 2009). Dentre os fatores de risco para candidíase invasiva tem-se internação por longos períodos em unidade de terapia intensiva (UTI), neutropenia associada ao câncer, cirurgias, cateterismo, prematuridade de recém-nascidos, quimioterapias e exposição a agentes antimicrobianos de amplo espectro (CONCIA et al., 2009, NUCCI et al., 2010).

Estudos epidemiológicos apontam *C. albicans* como a espécie mais amplamente diagnosticada entre isolados clínicos do gênero. No entanto, nas últimas décadas tem ocorrido um aumento significativo na frequência de outras espécies do gênero *Candida* (COLOMBO et al., 2006; BASSETTI, 2006; FRANÇA et al., 2008). Dados recentes revelam a prevalência de espécies não-*albicans* nos casos de candidíases invasivas (COLOMBO et al., 2007; PFALLER E DIEKEMA, 2007; SILVA et al., 2009; CONDE-ROSA et al., 2010, NUCCI et al., 2010). Alguns fatores predisponentes ao desenvolvimento de candidemia por tais espécies já têm sido relatados (COLOMBO et al., 2006; MULLEN, 2003; PFALLER; DIEKEMA 2007; revisado por CONCIA et al., 2009).

3.2 *CANDIDA TROPICALIS*

C. tropicalis tem sido identificada como uma das espécies mais comuns de leveduras patogênicas dentre as espécies não-*albicans* (FRANÇA et al., 2011), emergindo como o segundo agente mais comum em episódios de candidemias, principalmente em pacientes oncológicos (KONTOYIANNIS et al., 2001; revisado por WEINBERGER et al., 2005; NUCCI; COLOMBO, 2007). No cenário epidemiológico de várias partes do mundo, *C. tropicalis* é reconhecida por sua frequente associação a candidíase nosocomial. Estas características fazem com que esta seja amplamente associada a surtos hospitalares (SHIN et al., 2002; NUCCI; COLOMBO, 2007; COLOMBO et al., 2006). No Brasil, *C. tropicalis* representa cerca de 20 a 24% dos casos de candidemia, superando dados relatados para América do Norte e Europa (NUCCI; COLOMBO, 2007). Além disso, tem sido relatado um aumento na incidência de *C. tropicalis* como agente causal de infecções nosocomiais do trato urinário (NEGRI et al., 2010). Tal aumento está associado a

uma taxa significativa de insucesso no tratamento de candidúria associada a outras espécies de *Candida* (RHO et al., 2004).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Fatores de virulência são definidos como um conjunto de mecanismos desenvolvidos por micro-organismos patogênicos, que propiciam a colonização e infecção do hospedeiro, sendo determinados geneticamente, porém expressos sob determinadas condições (revisado por NAGLIK et al., 2003).

Os fatores de virulência atribuídos a *Candida* spp. incluem *switching* fenotípico; capacidade de diferenciação celular (formação de hifas e pseudo-hifas); secreção de enzimas hidrolíticas, a exemplo de proteases aspárticas secretadas (Saps); fator hemolítico; formação de biofilme e invasão de tecidos e outros substratos (MANNS et al., 1994; LUO et al., 2001; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; GOKCE et al., 2007; NOBILE et al., 2008; NAGLIK et al., 2008; JAYATILAKE, 2011).

Embora *C. albicans* seja a espécie modelo nos estudos de determinantes de virulência, vários estudos apontam diferenças significativas quanto à presença e a expressão de determinados fatores de virulência em espécies não-*albicans* (revisado por YANG, 2003; OKSUZ et al., 2007; COSTA et al., 2010).

3.3.1 *Switching* Fenotípico em *Candida* spp.

O evento de *switching* fenotípico em leveduras tem sido considerado um possível fator de virulência. Estudos recentes têm proposto que o *switching* fenotípico seja um mecanismo de microevolução acelerada que permite a sobrevivência do mais adaptado em novos micronichos do ambiente de crescimento (revisado por JAYALILAKE, 2011).

Switching fenotípico em leveduras é caracterizado pela emergência espontânea de colônias com morfologia alterada, que ocorre a taxas superiores às de mutação, sendo sua ocorrência atribuída a mecanismos epigenéticos (SOLL, 1992).

No geral, os mecanismos epigenéticos incluem processos que alteram a expressão gênica por gerar modificações no material genético que podem ser transmitidas para as células filhas durante as divisões mitóticas e meióticas.

Estes mecanismos compreendem alterações nas histonas e padrão de metilação do DNA, resultando em alterações ao nível transcricional (local ou global) (EGGER et al., 2004; MULLER; PRADO, 2008).

Em leveduras o *switching* fenotípico é um fenômeno randômico com taxas significativas de interconvertibilidade, não necessariamente induzido por sinais externos (SLUTSKY et al., 1987). Diferentemente dos eventos relacionados à transição blastoconídio-hifa, onde todas as células de uma mesma população expressam fenótipos alternativos sob condições ambientais variadas, no mecanismo de *switching*, apenas um número reduzido de células expressa diferentes fenótipos sob uma única condição ambiental (SOLL, 1992).

O processo de *switching* fenotípico permite aos fungos serem resilientes a pressões seletivas, uma vez que mantém a capacidade destes gerarem diversidade (JAIN et al., 2008). Micro-organismos capazes de realizar *switching* fenotípico são submetidos a uma rápida microevolução, o que lhes permitem adaptar-se a um microambiente em constante mudança, além de facilitar o potencial patogênico no hospedeiro (STRAUB et al., 2001; JAIN et al., 2008). A alteração fenotípica também pode estar relacionada a diferentes perfis de suscetibilidade fúngica, o que sugere ser um importante mecanismo de sobrevivência (YOON et al., 1999).

A ocorrência de *switching* fenotípico em leveduras foi primeiramente descrita para *C. albicans* (SLUTSKY et al., 1985; SLUTSKY et al., 1987; SOLL, 1992), sendo que o sistema denominado *white-opaque* tem sido considerado modelo nestes estudos. Neste sistema, um gene regulatório está posicionado próximo a uma região heterocromática que pode existir em dois estados alternativos, um estado de silenciamento e outro estado de relaxamento. A transição entre esses dois estados resulta na ativação ou inativação de genes regulatórios associados, que por sua vez leva a expressão ou repressão de um conjunto de genes específicos, por exemplo, genes *opaque*-específico (SOLL, 1992).

Diferentemente do observado para *C. albicans*, ainda são escassos os estudos relativos ao evento de *switching* em espécies não-*albicans*. Até o momento, a ocorrência de *switching* fenotípico foi descrita para *C. tropicalis* (SOLL et al., 1988; FRANÇA et al., 2011; PORMAN et al., 2011), *Candida parapsilosis* (LOTT et al., 1993; LAFFEY; BUTLER, 2005), *Candida lusitanae* (YOON et al., 1999) e *Candida glabrata* (LACHKE et al., 2000, 2002; SRIKANTHA et al., 2008).

Dados da literatura têm revelado que algumas características adaptativas têm sido associadas aos eventos de *switching* em espécies de *Candida*. Yoon et al. (1999) observaram diferentes perfis de suscetibilidade em variantes morfológicas de *C. lusitaniae*. Laffey e Butler (2005) demonstraram o potencial individualizado de diferentes morfotipos de *C. parapsilosis* quanto à formação de biofilme e capacidade em invasão. Antony et al. (2007) descreveram diferenças na expressão de fatores de virulência como aderência, hidrofobicidade e produção de protease em diferentes morfotipos de *C. albicans*. Srikantha et al. (2008) descreveram que o sistema de *switching* denominado *dark brown* em *C. glabrata* confere vantagem a populações colonizadoras desta espécie.

Em *C. tropicalis*, a ocorrência de *switching* fenotípico foi observada pela primeira vez por Soll et al. (1988). Estes autores relataram que isolados de *C. tropicalis* exibiram alta frequência de *switching* fenotípico durante o desenvolvimento de infecções sistêmicas. Segundo estes autores, esta característica pode estar relacionada à capacidade infecciosa por espécies patogênicas de *Candida*. Mais recentemente, França et al. (2011) demonstraram pela primeira vez a capacidade diferencial de formação de biofilme entre morfotipos de *C. tropicalis*. Neste estudo, foi demonstrada a organização ultra-estrutural de morfotipos, bem como a presença de material extracelular em morfotipos mais estruturados, sugerindo que o material extracelular possa desempenhar papel estrutural nestes morfotipos.

Porman et al. (2011) descreveram a ocorrência de um sistema de *switching* em linhagens de *C. tropicalis* o qual foi denominado de *white-opaque*, por apresentar semelhanças morfológicas ao sistema *white-opaque* de *C. albicans*. No entanto, segundo estes autores, estes sistemas diferem em vários aspectos, particularmente quanto ao perfil transcricional de genes envolvidos em ambos sistemas.

O evento de *switching* também tem sido associado ao processo de *mating* sexual em *Candida* (SOLL, 2009; PORMAN et al., 2011). Em *C. albicans* somente células da fase *opaque* são *mating*-competentes. Essas parecem sinalizar a formação de biofilme por células *white*, facilitando o *mating* e protegendo o frágil gradiente de ferormônios que direcionam o quimiotropismo, um processo necessário para a fusão. Mais recentemente foi também demonstrado que *C. tropicalis* utiliza *switching* para regular o programa de *mating* sexual. Segundo estes autores, tanto o *switching* fenotípico quanto o *mating* sexual são dependentes do fator transcricional

denominado *Wor1*, o qual é regulado por temperatura em outras espécies fúngicas. Segundo estes autores, aproximadamente 400 genes são diferentemente expressos entre os dois estados fenotípicos analisados, incluindo *Wor1* (PORMAN et al., 2011).

3.3.2 Fator Hemolítico

A habilidade de micro-organismos patogênicos em adquirir ferro elementar é de fundamental importância no estabelecimento de infecções em hospedeiros mamíferos. Uma vez que este elemento não é encontrado na forma livre no organismo, muitos patógenos o adquirem a partir de um ou outro composto contendo ferro (MANNNS et al., 1994). Watanabe et al. (1997) e Manns et al. (1994) reportaram que *C. albicans* secreta um fator hemolítico, capaz de disponibilizar hemoglobina a partir de eritrócitos humanos. Posteriormente, estes autores caracterizaram este fator hemolítico como sendo uma manoproteína (WATANABE et al., 1999).

A produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* foi primeiramente descrita por Luo et al. (2001). Segundo estes autores, as diferentes espécies de *Candida* apresentaram um perfil diferencial de expressão de hemolisinas, sendo que *C. tropicalis* apresentou atividade beta-hemolítica em níveis significativamente superiores a de outras espécies.

Mais recentemente foi demonstrado que isolados de *C. tropicalis*, obtidos de diferentes amostras clínicas, apresentam capacidade de promover hemólise *in vitro* (FRANÇA et al., 2010a; NEGRI et al., 2010; FAVERO et al., 2011).

França et al. (2010b) demonstraram que a produção de fator hemolítico *in vitro* por *C. tropicalis* foi variável em relação ao sítio de isolamento, sendo que isolados de candidemia apresentaram-se menos hemolíticos que isolados de urina, lesão ungueal e secreção traqueal. Favero et al. (2011), demonstraram pela primeira vez a secreção, em meio de cultivo líquido, de fator hemolítico por isolados clínicos *C. tropicalis*.

3.3.3 Proteases aspárticas secretadas (Saps)

A produção de proteases aspárticas secretadas (Saps) é considerada um dos principais fatores de virulência atribuídos a *Candida* spp. Em *C.*

albicans, estas proteases estão envolvidas no processo de adesão, dano tecidual, e degradação de componentes do sistema imune como imunoglobulinas do tipo A (HAYNES, 2001; revisado por HUBE, 2001; ZAUGG et al., 2001).

C. tropicalis, assim como *C. albicans*, é capaz de secretar proteases aspárticas *in vitro* (ZAUGG et al., 2001; DOSTÁL et al., 2003). Sabe-se que *C. tropicalis* possui pelo menos quatro genes que codificam proteases aspárticas secretadas (Saps), sendo designados *SAPT1* a *SAPT4* (ZAUGG et al., 2001). Segundo estes autores, *C. tropicalis* foi capaz de expressar *SAPT1* quando cultivada na presença de albumina soro bovina (BSA) como única fonte de nitrogênio, em níveis superiores em relação aos demais genes *SAPTs* os quais foram expressos em níveis basais. Mais recentemente, Silva et al. (2011a) empregaram tecido reconstituído humano para avaliar a expressão de genes *SAPT*. Segundo estes autores, a expressão dos genes *SAPT1* a *SAPT4* por isolados de *C. tropicalis* ocorreu de forma isolado dependente, com maiores expressões de *SAPT2* a *SAPT4* em relação a *SAPT1*, raramente expresso. A expressão diferencial dos genes que codificam proteases aspárticas secretadas em *C. tropicalis* pode refletir em diferenças quanto ao grau de patogenicidade nesta espécie.

3.3.4 Biofilme

Biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil, composta por células fortemente aderidas a um substrato ou umas as outras, embebidas por uma matriz extracelular polimérica. Estas são fenotipicamente distintas de células planctônicas ou células suspensas, particularmente, são menos suscetíveis a agentes antimicrobianos, possivelmente devido à presença de matriz extracelular polimérica (revisado por DOLAN; COSTERTON, 2002, AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; TROFA et al., 2008).

A capacidade de crescimento na forma de biofilme possui importância clínica significativa, uma vez que esta pode estar associada à expressão aumentada de possíveis fatores de virulência (SILVA et al., 2010).

Shin et al. (2002) avaliaram a formação de biofilmes por diferentes espécies de *Candida*, revelando que a porcentagem de isolados de *C. albicans* produtores de biofilme foi significativamente inferior à de isolados de espécies não-*albicans*. Estudos comparativos entre *C. albicans* e *C. tropicalis* quanto à formação

de biofilme, em condição estática, revelaram que *C. tropicalis* apresenta maior capacidade produtora (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

Alterações na imunidade do hospedeiro são requeridas por *Candida* spp. para alterarem seu comportamento de comensais a patógenos, assim sendo, o biofilme possui papel importante na expressão de genes relacionados a outros fatores de virulência (SILVA et al., 2011b).

Estudo referente à formação de biofilme associada à ocorrência de *switching* foi realizado por Laffey e Butler (2005), onde encontraram um potencial diferenciado para formação de biofilme, em superfície abiótica, entre variantes fenotípicos de *C. parapsilosis*. A avaliação do potencial de formação de biofilme em variantes fenotípicos em *C. tropicalis* até o momento é pouco conhecida. Porém, recentemente, França et al. (2011), avaliaram o potencial de formação de biofilme em variantes fenotípicos de *C. tropicalis*. Neste estudo, foi observado um potencial variado para formação de biofilme entre os diferentes fenótipos, sendo colônias de fenótipo liso menos formadoras de biofilme comparadas aos demais fenótipos.

3.3.5 Polimorfismo em *Candida* spp.

Leveduras do gênero *Candida* produzem células filhas por brotamento que são separadas nos locais de septação. Entretanto outras morfologias também ocorrem, em espécies do gênero, incluindo pseudohifas, que também crescem por brotamento possuindo distintas constrições em septos, sendo mais alongadas e não necessariamente separadas. Já as hifas verdadeiras são formadas por tubos finos com parede celulares paralelas sem constrições septais (LACAZ, et al., 2002)

C. tropicalis é considerado um fungo polimórfico por existir em múltiplas formas morfogenéticas, incluindo fases blastoconidiais, hifais e pseudohifais (SILVA et al., 2011b).

Para patógenos fúngicos, é amplamente aceito que a morfologia celular blastoconidial é essencial para uma disseminação no hospedeiro, enquanto formas filamentosas são necessárias para a invasão do tecido. Recentemente, Silva et al. (2011a), demonstrou que apenas formas filamentosas de *C. tropicalis* foram

capazes de invadir o epitélio oral, sugerindo que a filamentação pode facilitar a invasão do tecido por esta espécie.

3.3.6 Capacidade de invasão

A conversão de blastoconídio para formas filamentosas (hifas e pseudohifas) tem sido considerada um importante fator de virulência em *C. albicans*. Estudos utilizando epitélio oral humano reconstituído (RHOE) para avaliação da capacidade invasiva de *Candida* spp. permitiram demonstrar diferenças na capacidade invasiva entre diferentes isolados de *C. albicans* (JAYATILAKE et al., 2006).

Segundo Jayatilake et al. (2008, 2009), as múltiplas interações fungo-hospedeiro como cavitações, tigmotropismo e morfogênese participam durante a invasão tecidual. Jayatilake et al. (2008) ao compararem o potencial invasor de diferentes espécies de *Candida*, em modelos de candidíase oral (mucosa de língua de coelho *ex vivo* – RTME e RHOE), demonstraram que *C. albicans* foi capaz de invadir tanto na forma leveduriforme quanto na forma de hifas, sendo a invasão por hifas estimulada pelo contato, semelhante ao tigmotropismo. O mesmo estudo demonstrou ainda a ocorrência de cavitações em células epiteliais, possivelmente devido à atividade de enzimas extracelulares produzidas pela levedura.

Zucchi et al. (2011) evidenciaram que a filamentação invasiva de *C. albicans* no meio ágar é promovida por uma proteína ligada a parede celular. Para espécies não-*albicans* é sugerido que formas filamentosas (hifas e/ou pseudohifas) também auxiliam na penetração invasiva de barreiras físicas (LAFHEY; BUTLER, 2005; revisado por JAYATILAKE, 2011). No entanto poucos são os dados da literatura relativos à capacidade invasiva de espécies não-*albicans*.

Recentemente Silva et al. (2011a) demonstraram a habilidade de isolados de *C. tropicalis* em invadir epitélio humano reconstituído de forma isolado-dependente, uma vez que apenas isolados capazes de produzir formas filamentosas invadiram o epitélio oral humano reconstituído, acarretando danos significantes ao tecido. Posteriormente, Silva et al. (2011b) revelaram que a capacidade de invasão de *C. tropicalis* foi superior a de *C. glabrata* empregando o mesmo modelo de epitélio humano reconstituído.

Em 2005, Laffey e Butler avaliaram a capacidade invasiva de variantes fenotípicas de *C. parapsilosis* empregando a técnica de “*footprint*”, que consiste na documentação fotográfica de colônias crescidas em meio de cultivo solidificado antes e após remoção das células. Com isso, foi descrito, que o fenótipo interfere na invasão do ágar, uma vez que colônias de fenótipo mais complexo foram mais invasivas por revelarem maior quantidade de células remanescentes no ágar após lavagem. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com variantes fenotípicas de *Saccharomyces cerevisiae*, reforçando a hipótese de que colônias de fenótipos mais estruturados parecem invadir mais o ágar do que colônias de fenótipo liso (ŠT’OVÍČEK et al., 2010).

3.4 PERFIS DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA EM *Candida tropicalis*

Com o aumento do número de infecções causadas por espécies de *Candida*, principalmente por espécies não-*albicans*, tem havido uma redução na suscetibilidade aos antifúngicos comumente empregados. Estudos têm demonstrado diferenças no perfil de suscetibilidade fúngica entre espécies não-*albicans* (NGUYEN et al., 1998; ANTUNES et al., 2004).

A resistência a azóis em *C. tropicalis* têm sido frequentemente investigada (VANDEPUTE, 2005). Menezes et al. (2009) relataram a ocorrência de isolados clínicos obtidos de sangue e urina resistentes ao fluconazol e itraconazol. Conforme revisado por Kothavade et al. (2010), a resistência ao fluconazol em isolados clínicos de *C. tropicalis* têm aumentado, sendo esta devido a superexpressão de gene *CtERG11*. Metin et al. (2011) descreveram a ocorrência de isolados dose-dependentes ao fluconazol e resistentes ao itraconazol (31,5% dos isolados testados). Mais recentemente, Furlaneto et al. (2011) avaliaram o perfil de suscetibilidade ao fluconazol em 69 isolados de *C. tropicalis*, dos quais 7 isolados (5%) foram resistentes. Além dos azóis, resistência a 5-fluorocitosina também já foi descrita em isolados clínicos *C. tropicalis* (COLOMBO et al., 2006).

Favalessa et al. (2010) observaram uma tendência a valores de CIMs mais elevados para azóis em isolados de *C. tropicalis*, os quais registraram a ocorrência de resistência em 50% destes isolados para fluconazol e itraconazol e 37,5% para cetoconazol.

Dados de perfis de suscetibilidade fúngica obtidos de estudos em hospitais terciários brasileiros revelaram um aumento no perfil de resistência de *C. tropicalis* a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica. Em estudos de Bruder-Nascimento et al. (2010), dos 25 isolados de *C. tropicalis* avaliados, 18,4% e 10% dos isolados apresentaram resistência ao fluconazol e itraconazol, respectivamente. Pereira et al. (2010) em suas avaliações encontraram o predomínio de resistência em espécies não-*albicans* incluindo *C. tropicalis*, resistente ao fluconazol.

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 99-1008, 2006.
- ANTONY, G.; SARALAYA, V.; BHAT, G.K.; SHIVANANDA, P.G. Phenotypic *switching* and its influence on expression of virulence by *Candida albicans* causing candidiasis in human immunodeficiency virus- infected patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 241-244, 2007.
- ANTUNES, A. G. V. et al.. Candidemia in brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.
- BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, p. 1-6, 2006.
- BASSETTI, M. et al. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 325-331, 2007.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 87-91, 2008.
- BRUDER-NASCIMENTO A. Et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.
- CHEN, S. C. A. et al. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 662-669, 2009.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.
- COLOMBO, A. L. et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570-576, 2007.
- CONCIA, E.; AZZINI, A. M.; CONTI, M. Epidemiology, Incidence and Risk Factors for Invasive Candidiasis in High-Risk Patients. **Drugs**, v. 69, p.5-14, 2009.
- CONDE-ROSA, A. et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a University-based medical center. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 29, p. 26-29, 2010.

COSTA, C. R. et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p. 139-143, 2010.

DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p. 377-384, 2007.

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

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002.

DOSTÁL, J. et al. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712–716, 2003.

EGGER, G; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 456-463, 2004.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from in patients in various parts of the world:a systematic review. **International Journal of Infectious Disease**, v. 14 p.e954-e1966, 2010.

FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Mycological aspects and susceptibility *in vitro* the yeast of the genus *Candida* from HIV-positive patients in the State Of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 673-677, 2010.

FAVERO, D. et al. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v. 54, p. e816-e820, 2011.

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

FRANÇA, E. J. G. et al. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 318-321, 2010a.

FRANÇA, E. J. G. et al. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, v. 54, p. e44-e51, 2010b.

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

- FURLANETO, M. C. 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.
- GAGNE, J. J. et al. Costs associated with candidemia in a hospital setting. **Pharmacy and Therapy community**, v. 31, p. 589- 619, 2006.
- GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p. 265-269, 2007.
- HA, J. F. et al. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p. 181-195, 2010.
- HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 591-595, 2001.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. Phenotypic *switching* in fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.
- JAYATILAKE, J. A. M. S. et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type. Hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, p. 484-491, 2006.
- JAYATILAKE, J. A .M.; SAMARANAYAKE, Y. H. & SAMARANAYAKE, L. P. A comparative study of Candidal invasion in rabbit tongue mucosal explants and reconstituted human oral epithelium. **Mycopathologia**, v. 165, p. 373–380, 2008.
- JAYATILAKE, J. A. M.; TILAKARATNE, W. M. & PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 168, p. 165–173, 2009.
- JAYATILAKE, J. A. M. S. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, p. 235-250, 2011.
- KONTOYIANNIS, D. P. et al. R. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1676-81, 2001.
- KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873-880, 2010.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica de Lacaz**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LACHKE, S. A. et al. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and newly discovery hemolysin gene HLP. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 884-895, 2000.

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

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

LOTT, T. J. et al. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v. 23, p. 463-467, 1993.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971–2974, 2001.

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

MÉAN M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12, p. 1-9, 2008.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 354-355, 2009.

METIN, D. Y. et al. Evaluation of Antifungal Susceptibility Testing with Microdilution and Etest Methods of *Candida* Blood Isolates. **Mycopathologia**, v. 172, p.187–199, 2011.

MULLEN, C. A. et al. Non-*albicans Candida* in the most common cause of candidemia in pediatric cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 321-325, 2003.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo Da Genética. **Revista Unicenp de Biologia e Saúde**, v. 1, p. 61-69, 2008.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.

NAGLIK, J. R. et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, p. 3266–3280, 2008.

NEGRI, M. et al. Examination of potencial virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, p. 175-182, 2010.

NGUYEN, M. H. et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **Journal Infectious Disease**, v. 177, p. 425-430, 1998.

NOBILE, C. J. et al. Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v. 18, p. 1017-1024, 2008.

- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77-82, 2007.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COMLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, p. 561-570, 2010.
- OKZUS, S. et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 280-283, 2007.
- OLAECHEA, P. M. et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 323–330, 2004.
- PEREIRA, G. H. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, p. 839-842, 2010.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.
- PFALLER, M. A. et al. GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 842-849, 2008.
- PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 108, p. 21158-21163, 2011.
- RHO, J. et al. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. **The Journal of Microbiology**, v. 42, p. 80-86, 2004.
- RICHARDSON, M.; FLÖRL-LASS, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 5-24, 2008.
- ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.
- SHIN, J. H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244–1248, 2002.
- SHORR, A. F. et al. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v. 13, p. 1-10, 2009.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681-689, 2009.

SILVA, S. et al. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species, **Current Microbiology**, v. 61, p. 534-540, 2010.

SILVA, S. et al. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clinical microbiology and Infection**, v. 17, p. 264-272, 2011a.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 241-247, 2011b.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J. & SOLL, D. R. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, v. 230, p. 666-669, 1985.

SLUTSKY, B. et al. "White –Opaque Transition": a Second high-frequency switching systems in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 69, p. 189-197, 1987.

SOLL, D. R. et al. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic. **Journal of clinical Microbiology**, v. 26, p. 1448-1459, 1988.

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

SOLL, D. R. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 143. p. 279-288, 1997.

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

SRIKANTHA, T. et al. Dark brown is the more virulent of the switch phenotypes of *Candida glabrata*. **Microbiology**, v. 154, p. 3309-3318, 2008.

ŠT'OVÍČEK, V. et al. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeasts colonies. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 1012-1022, 2010.

STRAUB, A.; MICHEL, S.; MORSCHHÄUSER. Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3761-3769, 2001.

TORTORANO, A. M. et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 359-366, 2006.

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

VANDEPUTTE, P. et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 49, p. 4608-4615, 2005.

WATANABE, T. H. et al. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350–353, 1997.

WATANABE, T. et al. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.

WEINBERGER, M. et al. Characteristics of Candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, p. 146– 154, 2005.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal Microbiology Immunology Infectious**, v. 36, p. 223-228, 2003.

YOON, S. 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, p. 836-845, 1999.

ZAUGG, C. et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 405–412, 2001.

ZUCCHI, C. P.; DAVIS, T. R.; KUMAMOTO, C. A. *Candida albicans* cell wall-linked protein promotes invasive filamentation into semi-solid medium. **Molecular Microbiology**, v. 76, p. 733-748, 2011.

ARTIGO

Avaliação de fatores de virulência em morfotipos de *Candida tropicalis*

1 INTRODUÇÃO

Estudos apontam *Candida tropicalis* como a segunda ou terceira espécie mais comumente isolada entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, sendo mais frequentemente associada a infecções nosocomiais como candidemia e infecções do trato urinário (COLOMBO et al., 2006; NEGRI et al., 2010; MUÑOZ et al., 2011; FURLANETO et al., 2011).

Vários fatores de virulência parecem estar associados a infecções causadas por *C. tropicalis* (KRCMERY et al., 2002, COSTA et al., 2009). Dentre estes têm-se a capacidade de diferenciação celular (formação de hifas e pseudo-hifas); secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases aspárticas secretadas (Saps), fosfolipases e hemolisinas; formação de biofilme e invasão de tecidos e outros substratos (Revisado por SILVA et al. 2011a, 2011b). Além desses, a ocorrência de *switching* fenotípico tem sido descrita para esta espécie (SOLL et al., 1988; FRANÇA et al., 2011; PORMAN et al., 2011).

O evento de *switching* fenotípico é caracterizado como um mecanismo epigenético e parece permitir aos fungos serem resilientes a pressões seletivas, uma vez que mantém a capacidade destes gerarem diversidade (SOLL, 1992; JAIN et al., 2008).

O *switching* fenotípico em leveduras do gênero *Candida* tem sido correlacionado com variações na expressão de outros fatores de virulência, bem como de suscetibilidade a determinados antifúngicos (YOON et al., 1999; LAFHEY e BUTLER, 2005; ANTONY et al., 2007; FRANÇA et al., 2011).

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação da expressão fenotípica de fatores de virulência por morfotipos variantes, originados de *switching* fenotípico, de isolados clínicos de *C. tropicalis*. Os fatores de virulência avaliados compreenderam: a produção de fator hemolítico e de proteases ácidas secretadas (Saps); formação de biofilme e capacidade invasiva em ágar. Além destes fatores, foi também avaliada a capacidade de diferenciação em formas filamentosas e o perfil

de suscetibilidade fúngica, estabelecendo uma análise comparativa entre morfotipos variantes e seus respectivos morfotipos parentais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente estudo foram utilizados 5 isolados clínicos obtidos a partir de secreção traqueal (49.07 e 335.07) e hemocultura (46.10, 100.10 e 236.10) de *C. tropicalis*. Estes isolados fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina e sua identificação foi realizada utilizando o meio cromogênico CHROMagar® *Candida* e confirmada por PCR, conforme Furlaneto-Maia et al. (2008).

2.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES FENOTÍPICOS

A obtenção dos variantes fenotípicos dos isolados 49.07; 335.07; 46.10; 100.10 e 236.10 de *C. tropicalis* foi realizada conforme descrito por França et al. (2011), com modificações. Células de cada isolado foram inoculadas em 3 mL de meio YPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose), pH 6,5 e cultivadas por 24 h a 28°C, sob agitação. A cultura resultante foi diluída e homogeneamente distribuída em placas de petri contendo meio YPD solidificado a uma densidade de aproximadamente 300 colônias por placa de 90 mm de diâmetro. As placas foram incubadas por 96 h a 28 °C e a proporção de colônias exibindo fenótipos distintos do parental foi mensurada.

Colônias de morfologia parental, juntamente com as colônias de morfologia variante, visualmente homogêneas, foram sub-cultivadas sequencialmente por cerca de dez vezes consecutivas nas mesmas condições. Colônias cuja morfologia permaneceu estável durante este período foram então selecionadas. Fenótipos parentais foram incluídos como morfotipos. Fenótipos distintos dos parentais foram considerados variantes. Os fenótipos estáveis de cada isolado foram fotografados em microscópio estereoscópio (Motic SMZ-140), nomeados e utilizados para avaliação comparativa de expressão de fatores de

virulência entre morfotipos variantes e seus respectivos morfotipos parentais de cada isolado individualmente.

2.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM MEIO SOLIDIFICADO

A atividade hemolítica *in vitro* dos morfotipos foi realizada utilizando o ensaio descrito por França et al. (2010b), com modificações. Uma colônia de cada morfotipo cultivado por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado, foi suspensa em 1 mL de água destilada estéril, diluída e a concentração celular foi ajustada para 2×10^7 células/mL. Desta concentração, 2 μ L correspondentes a 4×10^4 células/mL foram inoculados em gota sobre a superfície de meio Sabouraud solidificado suplementado com 7% de sangue fresco de carneiro. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C, e o perfil de hemólise analisado. A presença de halo interno translúcido ou esverdeado circundando a colônia é o indicativo de atividade hemolítica positiva, que quando confirmada, foi mensurada em milímetros com valores convertidos em Pz (halo da colônia/halo colônia + halo de hemólise).

2.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM MEIO SOLIDIFICADO

Para análise de atividade proteolítica, foi utilizado o ensaio descrito por França et al. (2010b), com modificações, onde uma colônia de cada morfotipo cultivado por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado foi suspensa em 1 mL de água destilada estéril, diluída e a concentração celular foi ajustada para 2×10^7 células/mL. Desta concentração, 2 μ L correspondentes a 4×10^4 células/mL foram inoculados em gota sobre a superfície de meio *Candida* solidificado (20% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,25% de K_2HPO_4 , 0,5% de NaCl e 1,5% de solidificado), pH 4,5, suplementado com 0,2% de albumina soro-bovina (BSA). As placas foram incubadas por 6 dias a 37 °C e atividade proteolítica avaliada de acordo com a formação de halo de degradação do substrato ao redor da colônia. A dimensão do halo de degradação da albumina soro-bovina foi mensurada em milímetros com valores convertidos em Pz (halo da colônia/halo colônia+ halo de proteólise).

2.5 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE BIOFILME

A produção de biofilme *in vitro* dos morfotipos foi determinada segundo Silva et al. (2009), com modificações. Para cada morfotipo, células de colônias cultivadas por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado foram suspensas em 1 mL de meio YPD, diluídas e a concentração celular ajustada para 5×10^7 células/mL utilizando uma câmara hemocitométrica. Suspensões de células padronizadas (200 μ L, contendo 1×10^7 células/mL) foram inoculadas em microplacas de poliestireno de 96 poços, que foram incubadas a 28 °C sob agitação (120 rpm). Após 24 h de incubação, 100 μ L de meio YPD foram removidos e igual volume de YPD fresco foi adicionado. A preparação foi incubada novamente por mais 24 h a 28 °C sob agitação (120 rpm). Posteriormente, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por duas lavagens em água ultra-pura estéril. A habilidade de formar biofilme foi mensurada pela quantificação de biomassa total por coloração com cristal violeta. Assim após lavagens, o biofilme foi fixado com 200 μ L de metanol, que foram removidos após 15 minutos de contato. As microplacas foram secas a temperatura ambiente, e 200 μ L de solução cristal violeta (1%) foram adicionados a cada poço, e removidos após 5 minutos. Os poços foram lavados com água ultra-pura estéril e 200 μ L de ácido acético (33%) foram adicionados para eliminar o corante. A absorbância da solução obtida foi lida em leitor de microplaca (Bio-Tek L 808) a 540 nm. Os experimentos foram repetidos duas vezes e realizados em triplicata.

2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMAS FILAMENTOSAS

A fim de avaliar os tipos celulares (blastoconídios, hifas e pseudohifa) constituintes das colônias dos morfotipos, três colônias de cada morfotipo foram suspensas separadamente em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada esterilizada. Para estimar a quantidade de blastoconídios, hifas e pseudohifas, foi realizada contagem direta de 1000 células em câmara hemocitométrica. O número dos diferentes tipos celulares foi convertido em porcentagem a partir da média de três colônias para cada morfotipo. Posteriormente, foi realizada a análise comparativa das porcentagens de formas filamentosas dos morfotipos variantes em relação aos morfotipos parentais.

2.7 PERFIL DE INVASÃO DO ÁGAR POR “FOOTPRINT”

A avaliação da capacidade invasiva em ágar foi realizada pela técnica e “*footprint*” conforme descrito por Št’oviček et al. (2010). Colônias de cada morfotipo, cultivadas por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado, foram lavadas com água destilada estéril. As células remanescentes foram coradas com solução de 0,1% de Comassie blue R 250 em 40% de metanol e 10% de ácido acético por 1 hora. Posteriormente procedeu-se a lavagem com uma solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético. As células coradas foram fotografadas em microscópio estereoscópio (Motic SMZ-140).

2.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO PERFIL DE TIPOS CELULARES NA INVASÃO DO ÁGAR

Colônias dos diferentes morfotipos, cultivadas por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado, foram fixadas com solução de glutaraldeído 3,5% em tampão fosfato 0,1M, a 4 °C, por aproximadamente 22 h. Após fixação as colônias foram imersas em nitrogênio líquido por cerca de 30 segundos. Em seguida, as colônias foram fraturadas e desidratadas por liofilização na potência 2×10^{-3} MPa (Jouan LP3), por 2 h. Posteriormente, as colônias fraturadas foram recobertas com uma camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, FEI Quanta 200).

2.9 TESTE DE SUSCETIBILIDADE FÚNGICA

O perfil de suscetibilidade fúngica dos morfotipos parentais (isolados 49.07, 335.07, 46.10, 100.10 e 236.10) e seus variantes foi determinado pelo Etest[®] (AB Biodisk, Sweden) frente aos seguintes antifúngicos: fluconazol (FLU), anfotericina B (AMB), itraconazol (ITR) e cetoconazol (CET).

2.9.1 Preparo de Suspensão Padrão de Leveduras

Colônias de cada variante cultivadas por 96 h a 28 °C em meio YPD solidificado foram suspensas em 1 mL de solução salina a 0,85%. As amostras foram diluídas e a concentração celular ajustada para $2,5 \times 10^6$ células/mL.

2.9.2 Gradiente de Difusão em Ágar- Etest®.

O Etest® é um método elipsométrico de gradiente de difusão em ágar, que consiste em uma fita plástica impregnada com diferentes concentrações das drogas capaz de determinar CIMs ($\mu\text{g/mL}$). Os testes foram realizados conforme instruções do fabricante. Suspensão de levedura foi semeada, com o auxílio de um *swab*, em meio RPMI 1640 tamponado (MOPS), suplementado com 1,5% de ágar e 2% de glicose em três direções, de forma a obter uma camada confluenta e cobrir toda a superfície do meio por duas vezes. Após 15 minutos a temperatura ambiente, as fitas de Etest® (AB Biodisk, Sweden) de Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Cetoconazol (4 fitas por placa de 150 mm) foram colocadas na superfície do meio e as placas foram incubadas a 35 °C. Após 24 horas de incubação foi realizada a leitura para determinação dos valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para antifúngicos utilizados. Os valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para anfotericina B foram determinados na concentração onde a elipse interceptou a fita do Etest® no ponto onde ocorreu 100% de inibição do crescimento. Para os azólicos, os valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) foram determinados na concentração onde a elipse interceptou a fita do Etest® no ponto onde ocorreram 80% de inibição do crescimento. De acordo com os pontos de corte estabelecidos, segundo CLSI, as cepas podem ser categorizadas como sensível (S), sensível dependente da dose (SDD) e resistente(R) (CLSI, 2008).

Para a categorização dos isolados, foram utilizados os pontos de corte descritos no documento M 27 A3 (CLSI, 2008). Segundo este documento não existem pontos de corte estabelecidos para anfotericina B. Contudo isolados com CIMs $> 1 \mu\text{g/mL}$ parecem ser resistentes a essa droga (CLSI M27-A3, p.9, 2008). Para cetoconazol devido à ausência de critérios interpretativos, foi considerado como não categorizado (NC), uma vez que não existem pontos de corte estabelecidos para esta droga. O controle de qualidade do teste foi realizado empregando-se a cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, conforme recomendação do documento (CLSI).

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* (t student test), com a utilização do Software SPSS Statistics 17.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE COLÔNIA DE VARIANTES FENOTÍPICOS DE *C. TROPICALIS*

Para a obtenção de morfotipos variantes, derivados de *switching* fenotípico, foram avaliadas cerca de 6000 colônias de cada isolado (49.07; 335.07; 46.10; 100.10 e 236.10) após 96 h de incubação a 28 °C. Colônias de fenótipo parental (morfotipo parental), bem como de fenótipos distintos dos parentais (morfotipos variantes) estáveis foram caracterizados quanto à morfologia de colônia (Figura 1). No total foram avaliados treze morfotipos de colônia que mantiveram-se estáveis durante dez ciclos sequenciais de crescimento.

A partir dos isolados 49.07, 335.07 e 100.10 foram avaliados três morfotipos. O isolado 49.07 apresentou morfotipo parental caracterizado por colônia de fenótipo liso (morfotipo parental liso) e dois variantes denominados de flor (colônia de aspecto irregular com elevação na região central) e rugoso (colônia de superfície rugosa com borda irregular). O isolado 335.07 também apresentou morfotipo parental caracterizado por colônia de fenótipo liso, e dois variantes denominados de cratera (presença de micélio aéreo e depressão central) e centro irregular (colônia de borda lisa e elevações na região central). O isolado 100.10 também apresentou um morfotipo parental com colônia do tipo lisa, e dois variantes denominados de crepe (colônia de superfície pregueada) e flocado (colônia de borda irregular e superfície floculenta). A partir dos isolados 46.10 e 236.10 foi obtido somente um morfotipo variante. O isolado 46.10 apresentou um morfotipo parental com colônia de aspecto felpudo (morfotipo parental felpudo) e o variante apresentando micélio aéreo na superfície da colônia (morfotipo variante miceliado). Já o isolado 236.10 apresentou um morfotipo parental com colônia de aspecto semi-

liso e o variante denominado difuso (colônia com elevações dispersas na superfície) (Figura 1).

Em leveduras, o sistema *white-opaque* de *switching* em *C. albicans* representa o modelo mais estudado, embora a ocorrência de *switching* fenotípico tenha sido descrita para outras espécies do gênero, incluindo *C. tropicalis* (SOLL et al., 1988; FRANÇA et al., 2011; PORMAN et al., 2011).

O repertório de *switching* encontrado nos isolados clínicos de *C. tropicalis*, no presente estudo (Figura 1), difere dos já descritos para esta espécie (SOLL et al., 1988; FRANÇA et al., 2011). Sistemas de *switching* apresentando diferentes repertórios de fenótipos têm sido descrito para outras espécies de *Candida* (JIN et al., 2005; LAFFEY e BUTLER, 2005).

Embora o evento de *switching* fenotípico tenha sido descrito em espécies de *Candida*, poucos são os estudos de avaliação de uma possível associação entre o *switching* fenotípico e expressão diferenciada de outros fatores de virulência (LAFFEY e BUTLER, 2005; MILLER et al., 2006; ANTONY et al., 2007; FRANÇA et al., 2011).

3.2 ATIVIDADE HEMOLÍTICA E PROTEOLÍTICA (ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA)

Em relação à atividade hemolítica em meio Sabouraud suplementado com 7% de sangue de carneiro, todas os isolados analisados (morfotipos parentais e variantes) apresentaram hemólise após 48 h a 37 °C, revelada pela presença de halo interno translúcido ou esverdeado circundando a colônia (dados não mostrados). A dimensão do halo de hemólise foi mensurada em milímetros e os valores convertidos em Pz.

Os morfotipos flor e rugoso, originados do parental 49.07, apresentaram atividade hemolítica significativamente inferior ($p < 0,05$) as do morfotipo parental. O morfotipo cractera, originado do parental 335.07, apresentou atividade hemolítica significativamente superior ($p < 0,05$) ao do morfotipo parental, enquanto o morfotipo centro irregular deste isolado não apresentou diferença quanto à atividade hemolítica em relação ao morfotipo parental (Figura 2). A atividade hemolítica do morfotipo parental felpudo do isolado 46.10, não diferiu da apresentada pelo morfotipo variante miceliado deste isolado. Os morfotipos crepe e flocado, originados do parental 100.10 apresentaram atividade hemolítica

significativamente inferior ($p < 0,05$) ao do morfotipo parental. A atividade hemolítica do morfotipo parental semi-liso do isolado 236.10 não diferiu da apresentada pelo morfotipo variante difuso deste isolado (Figura 2).

A produção de fator hemolítico *in vitro* por *C. tropicalis* é conhecida (LUO, et al., 2001; FRANÇA, et al., 2010a; FAVERO et al., 2011). Além disso, tem sido demonstrada a ocorrência de variação inter-espécies (LUO e al., 2001; FRANÇA et al., 2010a). Luo et al. (2001) demonstraram que a produção de beta-hemólise por isolados de *C. tropicalis* foi superior à de isolados de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Já França et al. (2011a) relataram que isolados de *C. tropicalis* obtidos de hemocultura apresentaram atividade hemolítica significativamente superior à de *C. parapsilosis* obtido do mesmo sítio anatômico.

Os resultados obtidos para as análises de atividade hemolítica em morfotipos de isolados clínicos de *C. tropicalis* utilizados no presente estudo, corroboram com os dados da literatura, em que isolados de *C. tropicalis* obtidos de amostras clínicas distintas são produtores de fator hemolítico (FRANÇA et al., 2010a; FAVERO et al., 2011).

Nossos dados revelam a ocorrência de expressão diferenciada de fator hemolítico por alguns dos morfotipos variantes em relação aos seus respectivos parentais (Figura 2). Morfotipos originados de 03 dos 05 isolados analisados (morfotipos parentais) apresentaram diferenças significativas (Teste *t*, $p < 0,05$) quanto à capacidade de promoção de hemólise em meio solidificado. Este trabalho representa o primeiro relato da análise de produção de fator hemolítico por variantes fenotípicos de *C. tropicalis*.

Em relação à atividade proteolítica, morfotipos variantes originados dos isolados 49.07, 335.07 e 46.10 promoveram proteólise de BSA (Tabela 1). A análise comparativa da expressão de atividade proteolítica entre morfotipos parentais e morfotipos variantes realizada para cada isolado individualmente revelou que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto à promoção de proteólise entre os morfotipos variantes e morfotipos parentais.

Diferentemente, em *C. albicans* a produção de proteases foi diferenciada em variantes fenotípicos (VARGAS et al., 2000; ANTONY et al., 2007, 2009). Em *C. albicans* os genes *SAP1* e *SAP2* foram diferentemente expressos por certos isolados durante o *switching* fenotípico (revisado por HUBE e NAGLIK, 2001). Os autores afirmam que a regulação coordenada da família gênica SAP com vários

fatores de virulência indica que as proteases possam estar envolvidas no realce da patogenicidade de *C. albicans*. A presença dos genes *SAP1 - 4* já foi descrita para *C. tropicalis* (ZAUGG et al., 2001), no entanto, nossos resultados sugerem que, nas condições testadas, estes genes não sejam diferencialmente expressos nos morfotipos variantes analisados.

3.3 BIOFILME

Para avaliar a capacidade dos morfotipos em formar biofilme em superfície abiótica foi mensurada a quantidade de biomassa total utilizando a coloração de cristal violeta. Como mostrado na Figura 3, todas as linhagens (morfotipos parentais e variantes) foram capazes de formar biofilme, nas condições testadas.

Os morfotipos flor e rugoso, originados do isolado 49.07, apresentaram produção de biofilme significativamente superior ($p < 0,05$) a do morfotipo parental. Os morfotipos variantes originados dos parentais 335.07, 46.10 e 236.10 não apresentaram diferenças quanto à produção de biofilme quando comparados a seus respectivos morfotipos parentais. Já o morfotipo variante crepe, originado do parental 100.10, apresentou produção de biofilme significativamente superior ($p < 0,05$) ao do morfotipo parental, enquanto o morfotipo variante flocado deste isolado não apresentou diferenças quanto à produção de biofilme em relação ao morfotipo parental (Figura 3a).

A formação de biofilme está relacionada à adesão das células a superfícies, bem como a maior resistência a drogas antifúngicas. Alguns estudos têm avaliado o surgimento de variantes fenotípicas em biofilme de *C. albicans* (JIN et al., 2005). Nossos dados revelaram a produção diferencial de biofilme por morfotipos variantes e em relação aos seus respectivos morfotipos parentais lisos nos isolados 49.07 e 100.10. Resultados semelhantes foram encontrados em morfotipos de *C. parapsilosis* e *C. albicans*, para os quais foi relatada a menor produção de biofilme no fenótipo “liso” (LAFHEY e BUTLER, 2005; JIN et al., 2005). Para *Cryptococcus neoformans*, também foi demonstrado que o *switching* fenotípico interfere na capacidade de produção de biofilme, no entanto, diferentemente ao observado para *Candida* spp., o fenótipo liso apresentou maior potencial de formação de biofilme que os demais morfotipos (MARTINEZ et al., 2008).

A estrutura dos biofilmes formados por cada morfotipo foi visualizada por microscopia de luz e fotografados *in situ*. Morfotipos variantes que apresentaram fenótipos mais estruturados, como os morfotipos (flor e rugoso), (cratera) e (crepe) originados respectivamente dos isolados 49.07, 335.07 e 100.10 apresentaram biofilme mais densamente estruturado e maior quantidade de formas filamentosas em relação aos seus respectivos morfotipos parentais e demais morfotipos (Figura 3b).

Para morfotipos de *C. parapsilosis* e *C. albicans* foi previamente demonstrado que a capacidade de formação de biofilme está associada ao potencial de filamentação, sendo os fenótipos mais produtores àqueles que apresentaram maior proporção de células hifais e pseudo-hifais (LAFHEY e BUTLER, 2005; JIN et al., 2005).

Em *C. albicans* também foi relatado que mutantes defectivos para a formação de hifas produzem menor quantidade de biofilme comparativamente a mutantes deficientes para a formação de células blastoconidiais (BAILLIE e DOUGLAS, 1999). Assim, as menores taxas de produção de biofilme pelo morfotipo liso em relação às dos morfotipos flor e rugoso (isolado 49.07) e morfotipo liso em relação ao crepe (isolado 100.10), pode ser decorrente de um menor potencial de filamentação nos morfotipos parentais comparativamente aos seus respectivos morfotipos variantes.

3.4 PORCENTAGEM DE FORMAS FILAMENTOSAS

Conforme observado na Figura 4, os morfotipos variantes apresentaram formas filamentosas em quantidades superiores a seus respectivos morfotipos parentais em todos os isolados analisados. Os resultados obtidos corroboram com os dados obtidos nas análises de biofilme, os quais também apresentaram maiores proporções de formas filamentosas em morfotipos variantes.

Recentemente, França e colaboradores (2011) avaliaram o perfil morfológico de células de colônias *C. tropicalis* advindas de *switching* fenotípico. Segundo estes autores, a presença de pseudohifas ocorreu somente em morfotipos de colônias mais estruturadas. Porman et al. (2011) ao analisarem o sistema de *switching white-opaque* em *C. tropicalis* também observaram diferenças ao nível celular.

Em outras espécies não-*albicans* como *C. glabrata* (Lachke et al., 2002) e *C. lusitaniae* (Miller et al., 2006), o *switching* fenotípico também envolveu mudanças na morfologia celular.

3.5 INVASÃO

A técnica de “*footprint*” permitiu verificar que os morfotipos que apresentaram colônias de morfologia mais estruturada foram mais invasivos, uma vez que a quantidade de células remanescente foi maior nestes morfotipos do que nos respectivos morfotipos parentais, embora os mesmos também tenham invadido, porém em menor extensão (Figura 5).

Nossos dados corroboram com os relatos de Laffey e Butler (2005), que descreveram um potencial invasivo superior em colônias de fenótipos mais estruturados e mais filamentosos. A técnica de “*footprint*” tem sido utilizada com sucesso no estudo de potencial invasivo de morfotipos de *Saccharomyces cerevisiae* (ŠT’OVÍČEK et al., 2010). A capacidade invasiva de *C. tropicalis* em tecidos e outros substratos também tem sido recentemente descrita (JAYATILAKE et al., 2006, 2008; SILVA et al., 2011a).

No presente estudo, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar tanto o potencial invasivo quanto perfil de tipos celulares envolvidos na invasão pelos morfotipos obtidos. Os dados obtidos revelaram um potencial invasivo por todos os morfotipos avaliados, uma vez que os mesmos demonstraram invadir toda a extensão do ágar, apresentando apenas diferenças quanto aos tipos celulares.

Os morfotipos variantes, flor e rugoso, obtidos do isolado 49.07 apresentaram formas filamentosas durante a invasão (dados não mostrados), diferentemente do observado para o morfotipo parental liso, que apresentou apenas blastoconídios (Figura 6-A). O morfotipo variante cratera, originado do parental 335.07, apresentou diferenciação em células filamentosas mesmo na porção final do ágar (Figura 6-B). Quanto ao isolado 46.10, tanto o morfotipo parental felpudo, quanto o morfotipo variante miceliado apresentaram predomínio de formas filamentosas ao invadirem o ágar. As células filamentosas do morfotipo miceliado parecem crescer emaranhadas ao ágar (Figura 6-C). O morfotipo variante flocoado originado do parental 100.10 apresentou formas filamentosas mesmo em porções

distantes da superfície do ágar (Figura 6-D), já o morfotipo variante crepe apresentou cadeias de blastoconídios e formas filamentosas escassas, contornando as cavidades do ágar no momento da invasão (dados não mostrados). O morfotipo semi-liso (parental 236.10) apresentou maior quantidade de blastoconídios, porém com considerável quantidade de formas filamentosas, formando aglomerados de células por toda extensão do ágar (Figura 6-E), já o morfotipo variante difuso deste isolado, apresentou formas blastoconidiais distribuídas mais espaçadamente no interior do ágar (Figura 6-F).

O emprego da microscopia eletrônica de varredura (MEV) representa uma ferramenta atrativa para o estudo de padrões estruturais de desenvolvimento de colônias de *Candida* spp. Por esta técnica é possível avaliar a arquitetura colonial e dinâmica de crescimento de variantes fenotípicos nestas espécies (GÓMEZ-AGUADO et al., 2011; FURLANETO et al., 2012).

Embora estudos referentes ao potencial de invasão de *Candida* spp. tenham sido descritos pouco se sabe a respeito do potencial invasivo de morfotipos de *C. tropicalis* promovidos por *switching* fenotípico. Em estudo realizado por Brown et al. (1999) foi observado que *C. albicans* produz formas filamentosas quando em contato com ágar, sendo estas formas responsáveis pela invasão deste substrato. Segundo estes autores, a produção de hifas invasivas durante o crescimento em meio laboratorial pode ocorrer pelo mesmo mecanismo envolvido na produção de lesões invasivas durante a candidíase.

Radford et al. (1994), ao avaliarem fenótipos promovidos por *switching* fenotípico em *C. albicans*, revelaram que colônias de morfotipo liso são compostas basicamente por blastoconídios, enquanto morfotipos de morfologia mais estruturada consistem de proporções variadas de formas filamentosas e blastoconídios. Mais recentemente, Jayatilake (2011) revelou que hifas apresentam capacidade invasiva em tecido epitelial humano reconstituído.

Não obstante, nossos dados sugerem inferências concordantes com os autores citados acima, a cerca da participação de formas filamentosas no momento da invasão e do perfil diferenciado de formas celulares peculiares a cada morfotipo.

3.6 SUSCETIBILIDADES DOS MORFOTIPOS AOS ANTIFÚNGICOS

Os níveis de suscetibilidade fúngica dos morfotipos analisados estão apresentados na (Tabela 2). Os resultados demonstram que todos os morfotipos tanto parentais quanto variantes apresentaram suscetibilidade à anfotericina B e fluconazol. Resistência ao itraconazol (CIM>1) foi observada para o morfotipo variante flor, originado do parental 49.07, e para os morfotipos parental liso e morfotipo variante crepe, originados do parental 100.10. O morfotipo variante flor ainda apresentou os maiores valores de CIM para todos os antifúngicos testados. Quanto ao cetoconazol, os morfotipos apresentaram baixos valores de CIM, porém foi indicado como “não categorizado” uma vez que não existem pontos de corte estabelecidos para o mesmo.

Alguns estudos têm evidenciado que o *switching* fenotípico em *C. albicans* e espécies não-*albicans*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae*, está associado a alterações na suscetibilidade à antifúngicos (SOLL et al., 1989; YOON et al., 1999; VARGAS et al., 2000; LACHKE, 2000; FAVEL, et al., 2003; MILLER et al., 2006).

Quanto aos dados relativos à suscetibilidade fúngica dos morfotipos de *C. tropicalis* apresentados na Tabela 2, a maioria dos morfotipos variantes apresentou o mesmo perfil de suscetibilidade dos seus respectivos morfotipos parentais. No entanto, alterações no perfil de suscetibilidade ao itraconazol foram observadas entre morfotipos parental e variantes dos isolados 49.07 e 100.10. Até o presente momento não há relatos da avaliação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos em variantes fenotípicos de *C. tropicalis*.

Em síntese, considerando que o mecanismo de *switching* em leveduras é um evento epigenético, e que *switching* fenotípico pode estar relacionado a alguns fatores de virulência de forma reversível (Soll, 1992), as diferenças observadas quanto à atividade hemolítica, formação de biofilme e a suscetibilidade ao itraconazol observadas para alguns morfotipos podem ser decorrentes de alterações provocadas pela regulação diferenciada de genes relacionados a estas características durante o *switching* fenotípico, ocorrendo de forma morfotipo-dependente. Estas alterações possibilitariam uma vantagem seletiva ao micro-organismo, por permitir melhor adaptação a determinadas condições ambientais.

CONCLUSÕES

- O *switching* fenotípico em *C. tropicalis* ocorre de forma isolado-dependente, devido à ocorrência de diferentes fenótipos variantes nos isolados testados;
- Houve correlação entre a ocorrência de *switching* fenotípico e a produção de atividade hemolítica pelos morfotipos;
- Não houve correlação entre a ocorrência de *switching* fenotípico e a produção de atividade proteolítica;
- *Switching* fenotípico em *C. tropicalis* está associado à capacidade diferenciada de produção de biofilme;
- A capacidade de produção de biofilme, bem como o potencial de invasão pelos morfotipos estão relacionados à filamentação;
- *Switching* fenotípico em *C. tropicalis* está associado a mudanças no perfil de resistência/suscetibilidade ao antifúngico itraconazol.

REFERÊNCIAS

- ANTONY, G.; SARALAYA, V.; BHAT, G. K.; SHIVANANDA, P. G. Phenotypic switching and its influence on expression of virulence by *Candida albicans* causing candidiasis in human immunodeficiency virus- infected patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 241-4, 2007.
- ANTONY, G ; SARALAYA, V; BHAT, K. G.; SHENOY, M. S.; SHIVANANDA, P. G. Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 202-205, 2009.
- BAILLIE, G.; DOUGLAS, J. Role of dimorphism in the development of *Candidaalbicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 671-679, 1999.
- BROWN JR, D. H.; GIUSANI, A. D.; CHEN, X.; KUMAMOTO, C. A. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 651-662, 1999.
- CLSI, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd Ed. NCCLS document M27-A3. NCCLS, Wayne, PA.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, p. 73–79, 2009.

FAVEL, A.; MICHEL-NGUYEN, A.; PEYRON, F., MARTIN, C.; THOMACHOT, L.; DATRY, A.; BOUCHARA, J-P.; CHALLIER, S.; NOEL, T.; CHASTIN, C.; REGLI, P. 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, p. 331–339, 2003.

FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v. 54, pp. e816-e820, 2011.

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

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R.M.B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, v. 54, p. e41-e51, 2010b.

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

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.

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

GOMÉZ-AGUADO, F.; ALOU, L.; CORCUERA, M. T.; SEVILLANO, D.; ALONSO, M. J.; GOMÉZ-LUS, M. L.; PRIETO, J. Envolving architectural patterns in microbial colonies development. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, p. 925-930, 2011.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.

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

JAYATILAKE, J. A. M. S.; SAMARANAYAKE, Y. H.; CHEUNG, L. K.; SMARANAYAKE, L. P. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type. Hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, p. 484-91, 2006.

JAYATILAKE, J. A. M.; SAMARANAYAKE, Y. H. & SAMARANAYAKE, L. P. A comparative study of Candidal invasion in rabbit tongue mucosal explants and reconstituted human oral epithelium. **Mycopathologia**, v. 165, p. 373–380, 2008

JAYATILAKE, J. A. M. S. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, p. 235-250, 2011.

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, Y. H.; YAU, J. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.160, p. 191, 2005.

KRCMERY, V. & BARNES, A. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

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

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

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971-2974, 2001.

MARTINEZ, L. R.; IBOM, D. C.; CASADEVALL, A. B.; FRIES, C. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 166, p. 175, 2008.

MILLER, N. S.; DICK, J. D.; MERZ, W. G. Phenotypic Switching in *Candida lusitanae* on Copper Sulfate Indicator Agar: Association with Amphotericin B Resistance and Filamentation, **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1536-1539, 2006.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital, **Clinical Microbiology Infectious**, v. 17, p. 1538–1545, 2011.

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

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

RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J. & WALTER, J. D. A scanning electron microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 416-423, 1994.

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

SILVA, S. HOOPER, S. J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. W. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, pp. 264-272, 2011a.

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

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

SOLL, D. R.; GALASK, R.; ISLEY, S.; RAO, T. V. G.; STONE, D.; HICKS, J.; SCHMID, J.; MAC, K.; HANNA, C. "Swiching of *Candida albicans* during sucessive episodes of recurrent vaginitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 681-690, 1989.

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

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

VARGAS, K.; MESSER, S. A.; PFALLER, M.; LOCKHART, S. R.; STAPLETON, J. T.; HELLSTEIN, J.; SOLL, D. R. Elevated Phenotypic Switching and Drug Resistance of *Candida albicans* from Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals prior to First Thrush Episode. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3595-3607, 2000.

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

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

Tabela 1- Atividade proteolítica de morfotipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis*.

Isolados de <i>Candida tropicalis</i>	Morfotipos	Proteinase*
49.07	Parental (Liso)	0,41±0,04
	Flor	0,41±0,02
	Rugoso	0,41±0,04
335.07	Parental (Liso)	0,41±0,01
	Cratera	0,41±0,02
	Centro irregular	0,41±0,03
46.10	Parental (Felpudo)	0,41±0,00
	Miceliado	0,41±0,01
100.10	Parental (Liso)	0,81±0,31
	Crepe	1±0
	Flocado	1±0
236.10	Parental (Semi-liso)	1±0
	Difuso	1±0

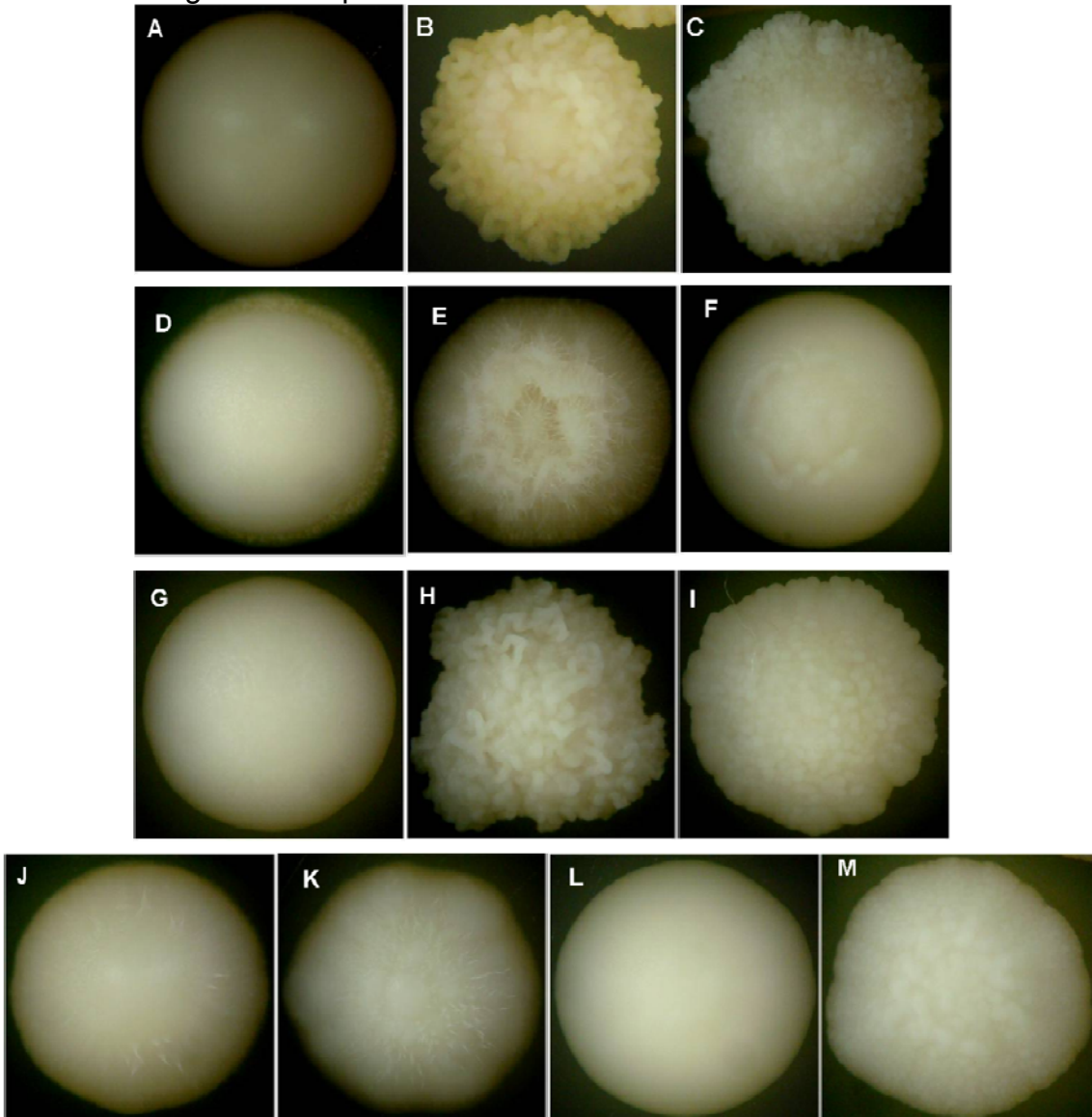
Os dados são expressos em unidades arbitrárias e correspondem a média ±DP de três experimentos independentes. (*) Valores de Pz.

Tabela 2- Perfil de suscetibilidade de morfofipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis* pelo método Etest®.

Isolados	Morfofipos	Antifúngicos MIC(μ g/mL)			
		Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol
49.07	Parental (Liso)	.064(S)	.047(S)	.008(S)	.002(NC)
	Flor	.125(S)	1.0(S)	3(R)	.125(NC)
	Rugoso	.125(S)	.047(S)	.008(S)	.004(NC)
335.07	Parental (Liso)	.032(S)	.38(S)	.064(S)	.012(NC)
	Cratera	.012(S)	.50(S)	.047(S)	.008(NC)
	Centro irregular	.047(S)	.50(S)	.047(S)	.016(NC)
46.10	Parental (Felpudo)	.064(S)	.047(S)	.016(S)	.006(NC)
	Miceliado	.094(S)	.19(S)	.032(S)	.012(NC)
100.10	Parental (Liso)	.016(S)	.75(S)	3(R)	.064(NC)
	Crepe	.047(S)	1.0(S)	2(R)	.125(NC)
	Flocado	.032(S)	1.0(S)	.023(S)	.016(NC)
236.10	Parental (Semi-Liso)	.032(S)	.25(S)	.016(S)	.016(NC)
	Difuso	.047(S)	.19(S)	.016(S)	.008(NC)

Concentração inibitória mínima (MIC). Sensível (S); Sensível dependente da dose (SDD); Resistente (R) e Não categorizado (NC).

Figura 1 - Fotomicrografia (x2) apresentando colônias representativas de morfotipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis* cultivados em YPD ágar a 28°C por 96h.



Isolado 49.07 (A, B e C); isolado 335.07 (D, E e F); isolado 100.10 (G, H e I); isolado 46.10 (J, K) e isolado 236.10 (L e M). Em (A) parental liso; (B) flor; (C) rugoso; (D) parental liso; (E) cratera; (F) centro irregular; (G) parental liso; (H) crepe; (I) flocado; (J) parental felpudo; (K) miceliado; (L) parental semi-liso e (M) difuso.

Figura 2 - Análise comparativa entre a atividade hemolítica dos morfotipos variantes com seus respectivos morfotipos parentais em cada isolado. (a) 49.07; (b) 335.07; (c) 46.10; (d) 100.10 e (e) 236.10. Valores correspondem à média de três experimentos independentes dados em (Pz).

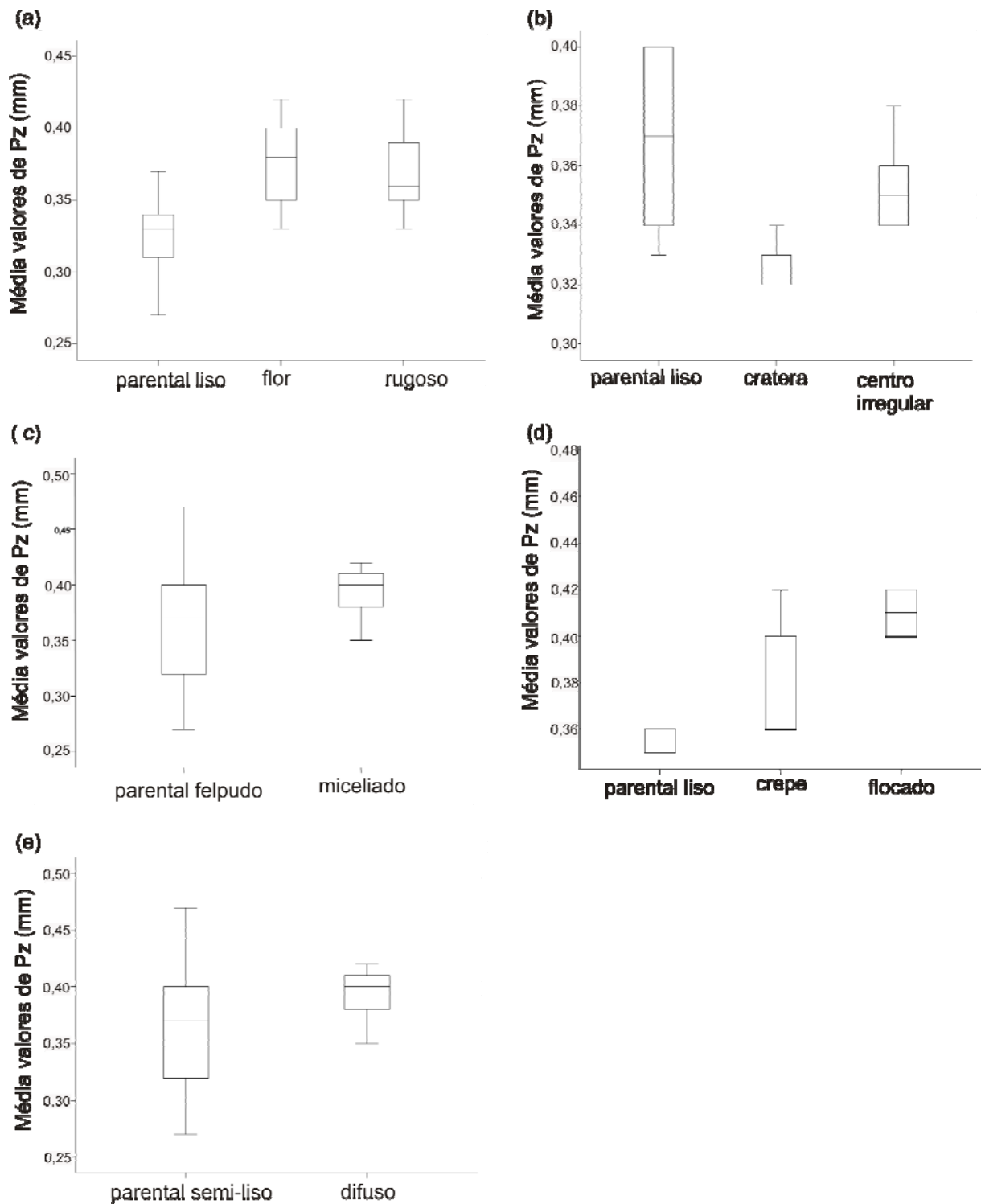


Figura 3 - Formação de biofilme por morfotipos de *Candida tropicalis* (a). Estrutura dos biofilmes formados por células aderentes de morfotipos parentais e variantes dos isolados 49.07; 335.07; 46.10; 100.10 e 236.10 após 48 h (b). A média \pm DP foi determinada por dois ensaios independentes realizados em triplicata. (*) $p < 0,05$.

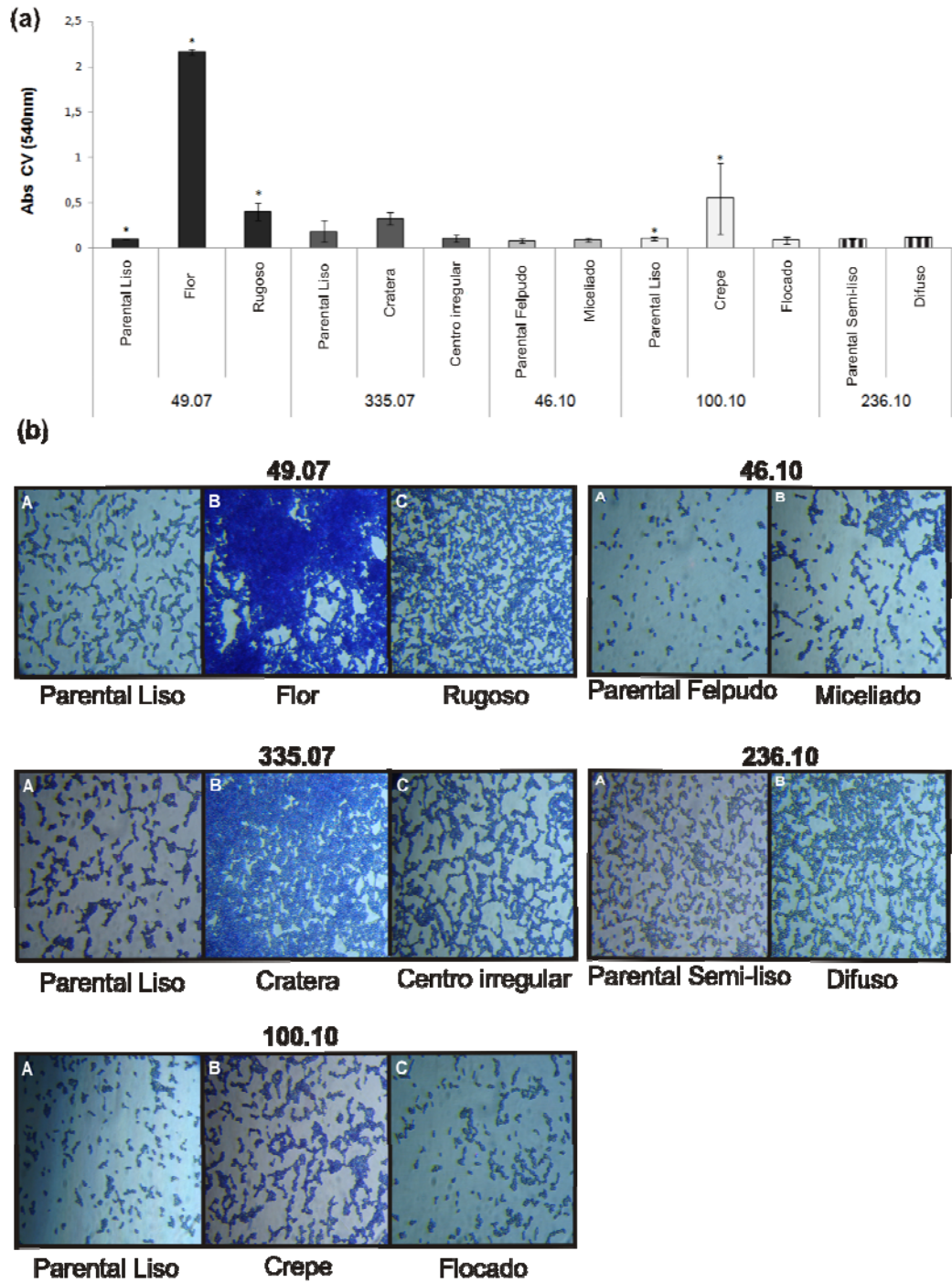


Figura 4 - Porcentagens de formas filamentosas em cada morfotipo. Foram analisadas mil células para cada colônia. Valores correspondem a média de três colônias (3.000 células) analisadas quanto ao número de formas filamentosas (hifas e pseudohifas).

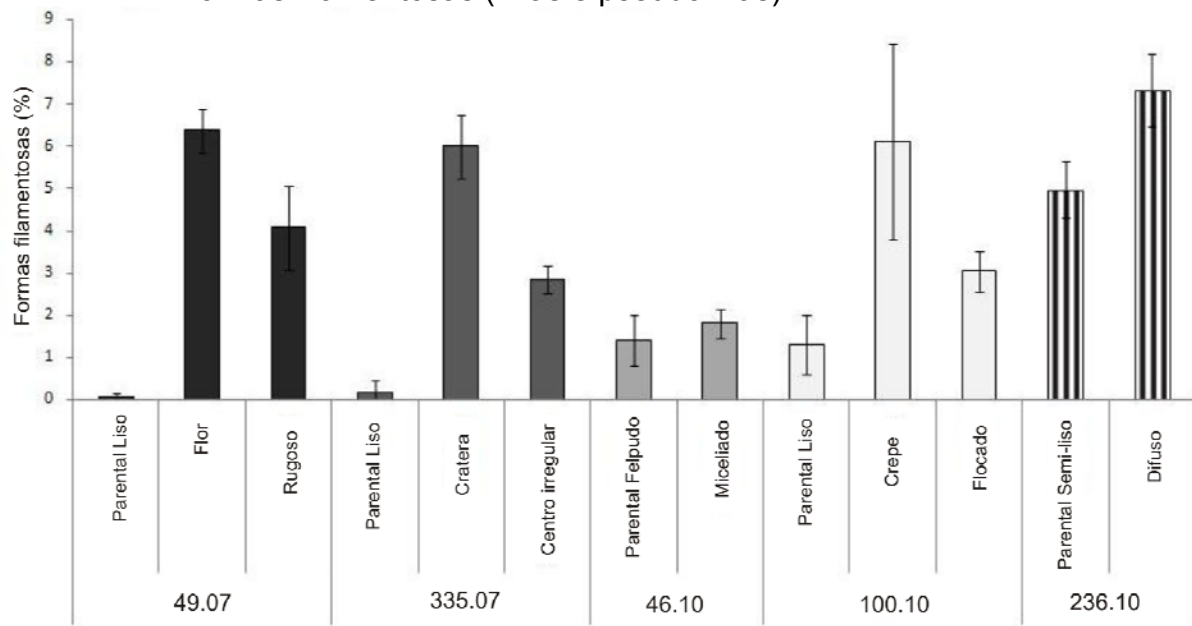
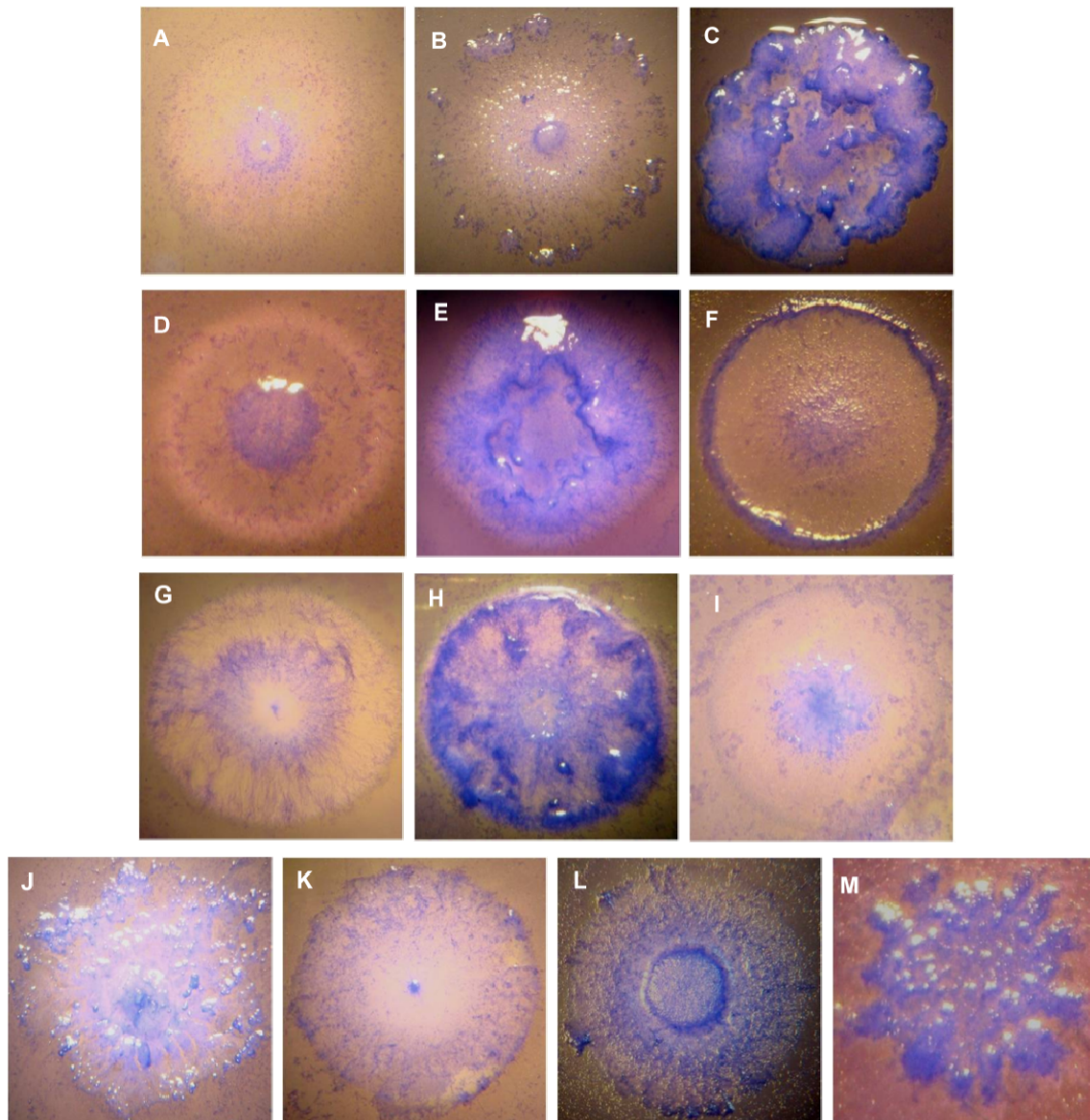
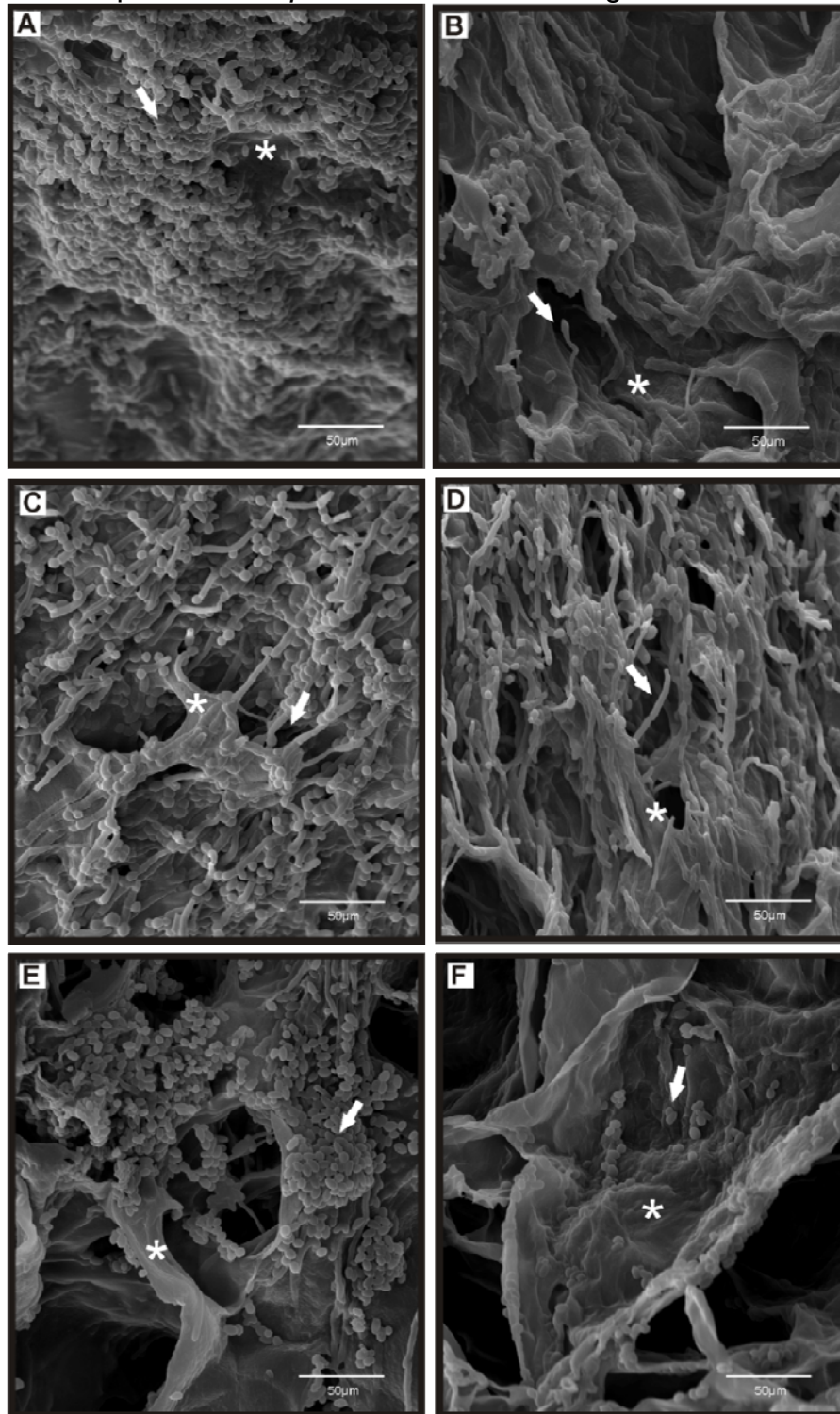


Figura 5 - Fotomicrografia (x2) apresentando a invasão do ágar por morfotipos de isolados clínicos de *Candida tropicalis* cultivados em YPD ágar a 28 °C por 96 h



Células foram fotografadas após remoção da colônia do ágar por lavagem com água destilada estéril. Isolado 49.07 (A, B e C); isolado 335.07 (D, E e F); isolado 100.10 (G, H e I); isolado 46.10 (J, K) e isolado 236.10 (L e M). Em (A) parental liso; (B) flor; (C) rugoso; (D) parental liso; (E) cratera; (F) centro irregular; (G) parental liso; (H) crepe; (I) flocado; (J) parental felpudo; (K) miceliado; (L) parental semi-liso e (M) difuso.

Figura 6 - Eletromicrografia apresentando os tipos e arranjos celulares de morfotipos de *C. tropicalis* ao invadirem o ágar.



(A) isolado 49.07, morfotipo parental liso; (B) isolado 335.07, morfotipo variante cratera; (C) isolado 46.10, morfotipo variante miceliado; (D) isolado 100.10, morfotipo variante flocado; (E) isolado 236.10, morfotipo parental semi-liso; (F) isolado 236.10, morfotipo variante difuso. Ágar (*) e tipos celulares (setas).