



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE TANCLER STIPP-ABE

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida parapsilosis **STRICTO SENSU EM SUPERFÍCIES**
DISTINTAS

Londrina
2017

ALINE TANCLER STIPP-ABE

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida parapsilosis **STRICTO SENSU EM SUPERFÍCIES**
DISTINTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2017

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

Stipp-Abe, Aline Tancler.

Formação de biofilme por isolados clínicos de *Candida parapsilosis* stricto sensu em superfícies distintas / Aline Tancler Stipp-Abe. - Londrina, 2017.
91 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. *Candida* - Tese. 2. Biofilme - Tese. 3. Virulência (Microbiologia) - Tese. 4. Candidíase - Tese. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ALINE TANCLER STIPP-ABE

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOALDOS CLÍNICOS DE *Candida parapsilosis* STRICTO SENSU EM SUPERFÍCIES DISTINTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

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

Dra. Alane Tatiana Pereira Moralez
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 24 de novembro de 2017.

À Deus

À minha amada filha Marina Tancler Stipp Abe

Ao meu esposo Fulvio Abe

Aos meus amados pais Paulo José Marconi Stipp e Ana Maria Tancler Stipp

Ao meu querido irmão Danilo Tancler Stipp

Aos meus avós Nilza T. Tancler e Geraldo Tancler (*in memoriam*)

e Ada M. Stipp (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado ao longo deste trabalho, tornando possível a concretização desse sonho.

À minha amada filha Marina, razão da minha existência, pela compreensão e pelas horas que não pudemos ficar juntas, para a elaboração deste trabalho, mas em momento algum deixei de tê-la em meu coração. Sempre te amarei.

Ao meu esposo Fúlvio, pela paciência e incentivo em meus momentos de desânimo e falta de estímulo.

Aos meus queridos pais Paulo e Ana Maria, por suas várias lições de esperança, sempre repetindo palavras essenciais de amor, incentivo, crença e alegrias, para eu ter confiança e continuar na batalha.

Ao meu irmão Danilo, minha cunhada Rejane e afilhada Amanda; pelo apoio em todos os momentos, sempre me dando apoio e auxiliando no que fosse necessário.

A todos os meus familiares, que sempre me incentivaram a continuar neste caminho Antonio Carlos e Elami Stipp, Mara Stipp, Rogério e Maria José Tancler; ao meu tio Sérgio Henrique Tancler; e aos meus avós Geraldo Tancler (*in memoriam*), Nilza T. Tancler, aos meus primos Livia e Gabriel, sempre estarão em meu coração; agradeço a todos pelo respeito e confiança nos momentos presentes.

À professora e orientadora Prof. Dra. Marcia Cristina Furlaneto pela oportunidade concedida e confiança em mim depositada. Agradeço-a por todos os conselhos que recebi, pelo convívio ao longo desses anos; e pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido. Agradeço-a ainda pela paciência no decorrer da realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

A todos os professores do curso de pós-graduação em Microbiologia, em especial aos professores: Carlos Nosawa, Gerson Nakazato, Jacinta Pelayo, Luciano Panagio, Lucy Lioni,

Renata Kobayashi, Ricardo Almeida, Rosa Elisa Linhares e Sueli Ogatta; muito obrigado pela amizade, conhecimento e formação acadêmica científica.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de defesa: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia e Profa. Dra. Alane Tatiana Pereira Moralez, pelas valiosas contribuições ao presente trabalho.

Ao meu grande amigo Marcus Vinicius de Matos Gomes (*in memoriam*) pelos ensinamentos, pelo exemplo de integridade e profissionalismo. Que Deus o abençoe. Saudades... sempre em nossos corações.

Aos funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) e Departamento de Microbiologia pelo auxílio e atenção.

Aos meus grandes amigos que acompanharam minha jornada ao longo deste período de trabalho: Carlos Eduardo Coral, Bárbara Gionco, Thalita Herek, Renata Perugini, Eliandro Tavares, Hugo Perini, Kátia Rocha e Alane Moralez pelos conselhos, confiança, respeito e companheirismo, além dos momentos de descontração e muitas risadas; pessoas às quais serei eternamente grata.

À Universidade Estadual de Londrina pela estrutura e suporte fornecidos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da PUCPR e da UNOPAR, ao qual tenho muito orgulho e carinho por fazer parte destas Instituições, em especial o meu agradecimento à Paulo Bignardi, Regina Poli, Francis Fregonezi, Marilsa Santini, Nathalia Ferrer, Vania Terra, Maria Helena Matosinho, Valéria Belo, que com muita paciência e carinho me incentivaram nos momentos de desânimo.

À Minha terapeuta Norma, muita gratidão por toda força, equilíbrio, carinho e principalmente por me acalmar diante dos obstáculos... VENCEMOS!!

Aos meus alunos de Medicina da PUC e de Biomedicina da UNOPAR, pela torcida, incentivo e paciência, e também por me escutar por várias vezes a falar sobre meu trabalho e sobre a importância de estudar microbiologia e principalmente biofilme de *Candida*.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho; meu muito obrigada!

VENCERÁS

Não desanimes. Persiste mais um tanto. Não cultives o pessimismo. Centraliza-te no bem a fazer. Esquece as sugestões do medo destrutivo. Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros. Avança, ainda que seja por entre lágrimas. Trabalha constantemente. Edifica sempre. Não constas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração. Não desista da paciência. Não creias em realizações sem esforço. Perdão as ofensas. Recorda que os agressores são doentes. Conserva o hábito da oração para quem se te faz a luz na vida. Resguarda-te em Deus e perseverará no trabalho que Deus te confiou. Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar. Age auxiliando. Serve sem apego. E assim...
Vencerás.

Pelo espírito Emmanuel
Médium: Francisco Candido Xavier
Do livro: "Astronautas do Além".

STIPP-ABE, Aline Tancler. **Formação de biofilme por isolados clínicos de *Candida parapsilosis* stricto sensu em superfícies distintas**. 2017. 91 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

As infecções causadas por *Candida parapsilosis* stricto sensu representam um grave problema de saúde, principalmente quando relacionadas à adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas, como dispositivos médicos. A adesão e produção de biofilme têm sido apontadas como fatores de virulência para o desenvolvimento de candidíases e candidemias, pois tratam-se de mecanismos primários de infecção, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Estudos indicam que a presença de biofilme se constitui um mecanismo de resistência a ação dos antifúngicos dificultando o tratamento dessas infecções. Este estudo avaliou a capacidade de adesão e formação de biofilme, em superfícies distintas, poliestireno e elastômero de silicone, bem como em quatro tipos diferentes de cateteres utilizados na prática médica. Foram utilizadas 41 isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu provenientes de isolados clínicos de sangue (14), sangue via cateter (5), ponta de cateter (12) e secreção traqueal (10). Os ensaios de adesão e formação de biofilme em poliestireno e elastômero de silicone foram analisados pelas técnicas de mensuração de biomassa total (CV) e viabilidade celular (XTT). Nove desses isolados foram escolhidos aleatoriamente, e a viabilidade celular foi analisada de acordo com a adesão e formação de biofilme em quatro diferentes dispositivos médicos, Vialon® BD, Silicone, teflon e poliuretano. Os ensaios de adesão e formação de biofilme nos quatro diferentes dispositivos médicos foram analisadas pela técnica de viabilidade celular. A adesão em elastômero de silicone e poliestireno, foram predominantes nos isolados com alta atividade metabólica. A adesão em poliestireno de isolados de secreção traqueal foi significativamente superior aos isolados de ponta de cateter e de sangue ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Nas duas superfícies analisadas quanto a formação de biofilme, a maioria dos isolados apresentaram elevada produção de biomassa. No teste de viabilidade celular, a superfície de elastômero de silicone demonstrou predominância de isolados com elevada produção de biofilme, enquanto em poliestireno o predomínio foi de isolados com média produção. Isolados de sangue apresentaram maior formação de biofilme em poliestireno ($p < 0,01$). A viabilidade celular na adesão em cateter de poliuretano foi superior em todos os isolados provenientes de sangue, ponta de cateter e sangue via cateter, e significativamente superior para isolados de ponta de cateter ($p < 0,01$). Tanto a adesão como a formação de biofilme por *C. parapsilosis* stricto sensu foram variáveis dependendo dos locais de isolamento, bem como nas diferentes superfícies testadas, indicando assim que não existe um padrão específico de adesão e formação de biofilme. Os resultados dessas análises servirão de base para novos estudos utilizando elastômero de silicone bem como a utilização de dispositivos médicos, para verificar a formação de biofilme, uma vez que é mais confiável por serem materiais utilizados na prática médica, fornecendo assim, subsídios para o desenvolvimento de novos dispositivos médicos que apresente menor adesão, dificultando assim a formação de biofilme, reduzindo as altas taxas de mortalidade por infecções relacionadas à esses dispositivos, como a candidemia.

Palavras-chave: Adesão. Biofilme. *Candida parapsilosis* stricto sensu. Elastômero de silicone. Dispositivos médicos.

STIPP-ABE, Aline Tancler. **Biofilm formation for clinical isolates by *Candida parapsilosis* stricto sensu on different surfaces**. 2017. 91 p. Thesis (Doctor's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Infections caused by *Candida parapsilosis* stricto sensu represent a serious health problem, especially when they are related to adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces, such as medical devices. Adhesion and biofilm production have been identified as virulence factors for the development of candidiasis and candidemia, since they represent primary mechanisms of infection, especially in immunocompromised patients. Studies indicate that the presence of biofilm constitute a mechanism of resistance to the action of antifungal drugs, impairing infections treatment. This study evaluated the ability to adhere and to form biofilm, on different surfaces, polystyrene and silicon elastomer, as well as four different types of catheters used in medical practice. It has been used 41 samples of *C. parapsilosis* stricto sensu, from clinical isolates of blood (14), catheter vial blood (5), catheter tip (12), and tracheal secretion (10). The adhesion and biofilm formation tests on polystyrene and silicon elastomer were analyzed by total biomass (CV) and cell viability (XTT) techniques. Nine samples were randomly chosen, and cell viability was tested according to adhesion and biofilm formation in four different medical devices: Vialon® BD, Silicon, Teflon and Polyurethane. The adhesion and biofilm formation tests in the four different medical devices were analyzed by the cell viability technique. The adhesion ultrastructure in polystyrene, silicon elastomer and in the four catheters were analysed using scanning electron microscopy as well as biofilm formed on catheters. Adhesion in elastomer of silicon and polystyrene were predominantly in isolates with high metabolic activity. Polystyrene adhesion of tracheal secretion isolates was significantly higher than catheter tip and blood samples ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). In both surfaces analysed for biofilm formation, most of the isolates showed high biomass production. In the cell viability test, the silicon elastomer surface showed predominance of isolates with high biofilm production, while in polystyrene the predominance was of medium production isolates. Blood samples showed higher biofilm formation in polystyrene ($p < 0.01$). The cell viability in the adhesion of *C. parapsilosis* cells in polyurethane catheter was higher in all blood, catheter tip and blood vial catheter isolates, and significantly superior in those from catheter tip ($p < 0.01$). Both adhesion and biofilm formation by *C. parapsilosis* stricto sensu cells were variable on different catheter surfaces tested depending on the isolating sites, thus indicating that there is no specific pattern of adhesion and biofilm formation. These results provide the basis for further studies using silicone elastomer and the use of medical devices to verify the biofilm formation as they are widely used in medical practice, thus providing subsidies for the development of new medical devices that reduce the adhesion and consequently the biofilm formation, reducing the high mortality rates from infections related to these devices, such as candidemia.

Key words: Adhesion. Biofilm. *Candida parapsilosis* stricto sensu. Silicone elastomer. Medical devices.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases de desenvolvimento do Biofilme	21
Figura 2 – Principais fatores que interferem na formação de biofilme	25
Figura 3 – Rede regulatória de genes envolvidos nos diferentes estágios de formação de biofilme	34
 Artigo A	
Figura 1 – Percentage of adhered cells in isolates obtained from different sites	52
Figura 2 – Comparison of the means of adhesion through biomass and cell viability the different insulation sites	53
Figura 3 – Topography of elastomer silicone and polystyrene by MEV.....	54
Figura 4 – Scanning of <i>Candida parapsilosis</i> stricto sensu adhesion in silicone	55
Figura 5 – Percentage of biofilm formation of isolates obtained from different sites.....	56
Figura 6 – Comparison of the means of biofilm formation through biomass and cell viability the different insulation sites	57
Figura 7 – Percentage of pseudohyphae in cells recovered from biofilm	58
 Artigo B	
Figura 1 – Comparasion of adhesion by <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu in different biomaterial of catheters	70
Figura 2 – Comparision of adhesion assay by clinically isolated <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu in different sites	71
Figura 3 – Sacanning electron micrographs of topography by catheter devices	72
Figura 4 – Scanning electron micrographs of <i>C. parapsilosis</i> strcito sensu cell adhesion in four different catheter surface	73
Figura 5 – Comparision of biofilm formation by <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu in diferente medical devices.....	74
Figura 6 – Comparison of biofilm formation by <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu of diferente isolation sites	75
Figura 7 – Scanning electron micrographs of biofilm of <i>C. parapsilosis</i> strcito sensu in four different catheter surface	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gene envolvidos nos processos de adesão e maturação do biofilme em <i>C. parapsilosis</i>	28
Artigo A	
Table 1 – <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu samples and their respective isolation sites.....	38
Table 2 – Adhesion and biofilm formation in elastomer and polystyrene of <i>Candida parapsilosis</i> stricto sensu measured	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HU	Hospital Universitário
UEL	Universidade Estadual de Londrina
CV	Cristal violeta
XTT	2,3 bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5 - [(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazoliohydroxide)
PVC	Policloreto de polivinilo
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
LPB	<i>Low biomass producers</i>
MPB	<i>Medial biomass producers</i>
HPB	<i>High biomass producers</i>
LAM	<i>Low metabolic activity</i>
MAM	<i>Medial metabolic activity</i>
HAM	<i>High metabolic activity</i>
VIAL	Sangue via cateter
BD	Becton Dickison
PBS	Tampão fosfato salino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	16
2.2	MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES	19
2.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DISPOSITIVOS MÉDICOS	22
2.4	PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>CANDIDA PARAPSILOSIS STRICTO</i> SENSU PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME	25
2.4.1	Capacidade de Adesão.....	26
2.4.2	Morfogênese	27
2.4.3	Fatores Moleculares da Formação de Biofilme.....	27
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	35
4	ARTIGO A – ADHESION AND BIOFILM PRODUCTION BY CLINICAL ISOLATES OF <i>CANDIDA PARAPSILOSIS STRICTO</i> SENSU ON SURFACES OF POLYSTYRENE AND SILICONE ELASTOMER	36
5	ARTIGO B – ADHESION AND BIOFILM FORMATION BY CLINICAL ISOLATES OF <i>CANDIDA PARAPSILOSIS STRICTO</i> SENSU IN DIFFERENT MEDICAL DEVICES	59
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas, a exemplo de candidíase, representam um problema de saúde pública de grande importância, pois são de difícil diagnóstico e causam altas taxas de morbidade e mortalidade (FRIDKIN *et al.* 1996; RICHARDSON *et al.*, 2008). Estas infecções tornaram-se comuns em unidades de terapias intensiva adultas e pediátricas, e sua incidência crescente tem sido atribuída a vários fatores de risco prevalentes em pacientes críticos com debilidades, malignidade subjacente, transplantes de medula óssea, estadia prolongada em UTI e em hospitais, neutropenia, utilização de antibióticos e corticosteroides, e administração de alimentação parenteral (TUMBARELLO *et al.*, 2012).

O complexo *parapsilosis* foi anteriormente classificada em grupos I, II e III com base em diferenças genéticas observadas. Tavanti e colaboradores (2005), demonstraram que esses grupos apresentavam diferenças fenotípicas distintas suficientes para serem reclassificados como espécies, assim os grupos II e III foram designados como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* respectivamente, e o grupo I como *C. parapsilosis* stricto sensu, sendo a *C. parapsilosis* stricto sensu prevalente em infecções sanguíneas entre as não-*Candida albicans* em várias localidades do Brasil (COLOMBO *et al.* 2017).

Marra e colaboradores (2011) em um estudo epidemiológico descrevem a prevalência de não *Candida albicans* em isolados sanguíneos, sendo 34,3% de *Candida parapsilosis* stricto sensu, entre os isolamentos de leveduras. Para avaliar a epidemiologia de candidemia em 4 hospitais terciários em São Paulo, Colombo e colaboradores (2007) relatam 282 episódios de infecção da corrente sanguínea por *Candida* spp., sendo 25% dos isolados de *Candida parapsilosis*, porcentagem equivalente descrita por Nucci e colaboradores (2013) em um estudo epidemiológico em países da América Latina. Segundo estudo realizado no Hospital Universitário de Londrina (HU/UEL), *C. parapsilosis* foi a segunda espécie mais isolada em hemoculturas e prevalentes em secreção traqueal (COSTA *et al.*, 2014).

Candidemia é frequentemente associada à isolados formadores de biofilme, principalmente em dispositivos médicos, tais como cateter venoso ou cateter urinário (DOUGLAS *et al.*, 2003; KOJIC *et al.*, 2004). Este tipo de infecção é muito grave, pois os biofilmes são estruturas resistentes à ação de antifúngicos, e promovem uma fonte contínua de infecção (MUKHERJEE *et al.*, 2004).

O evento primário na infecção por *Candida* é a adesão ao hospedeiro ou em superfícies abióticas de dispositivos médicos, muitas vezes levando à formação de biofilmes (CHANDRA *et al.*, 2001). Assim, a adesão é um fator de virulência extremamente

importante, e o grau de adesão pode ser dependente de propriedades da superfície de materiais abióticos e do próprio microrganismo, tais como hidrofobicidade e/ou rugosidade da superfície (HENRIQUES *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2009). Segundo Kuhn e colaboradores (2004), a adesão e a formação de biofilme podem ser especialmente importantes para *Candida parapsilosis* stricto sensu, sendo que os dispositivos médicos de permanência parecem ser a via predominante deste tipo de infecção, e isto leva a importantes surtos hospitalares.

Os biofilmes foram estudados ao longo dos tempos e definidos como sendo uma comunidade séssil caracterizada por células que formam micro colônias e que estão aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas numa matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética (COSTERTON *et al.*, 2003).

Um dos principais fatores de virulência do gênero *Candida* compreende a capacidade de adaptação em uma variedade de ambientes, e conseqüentemente de formação de biofilmes (DOUGLAS, 2003). Segundo Estivill *et al.* (2011), o potencial em formar biofilme é espécie dependente, sendo que *C. parapsilosis* apresentaram alta produção de biofilmes em cloreto de polivinila (PVC) e Teflon.

Candida parapsilosis é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis, o que facilita sua propagação nosocomial por meio das mãos de profissionais da área da saúde. Esta característica faz com que *C. parapsilosis* seja cada vez mais relacionada a surtos de infecções hospitalares (CUÉLLAR *et al.*, 2012).

Tendo em vista que diversos tipos de infecções por *C. parapsilosis* stricto sensu podem estar relacionadas com a formação de biofilmes, a análise *in vitro* da aderência pode contribuir para a compreensão do comportamento deste microrganismo em um processo de infecção específico. Uma vez que a sensibilidade de células séssis aos antifúngicos é reduzida em relação às células planctônicas, o tratamento pode ser mais complexo e a presença do biofilme tornam-se uma fonte permanente de infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Espécies do gênero *Candida* são caracterizadas como patógenos oportunistas, fazendo parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis em grande parte da população, e são reconhecidas como um dos principais agentes colonizadores e infecciosos que acometem o ser humano (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; HA *et al.*, 2010; NUCCI *et al.*, 2010). Dentre as espécies patogênicas do gênero, algumas são capazes de causar desde micoses superficiais até, em casos mais graves, infecções disseminadas e sistêmicas, potencialmente fatais exibindo taxas de mortalidade que alcançam frequências de até 80% (DOSTÁL *et al.*, 2003; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). A distribuição epidemiológica de infecções causadas por *Candida* spp. pode estar relacionada com as características hospitalares, posicionamento geográfico e condições particulares de cada paciente (PFALLER *et al.*, 2011; GUINEA, 2014).

Embora *Candida albicans* seja a espécie mais abordada na literatura por apresentar alta frequência de isolamento em infecções fúngicas, o número de espécies não-*Candida albicans* tem aumentado consideravelmente em casos de candidíases invasivas, que por sua vez, apresentam maiores taxas de mortalidade (COLOMBO *et al.*, 2007; CONDE-ROSA *et al.*, 2010; FURLANETO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014). Inseridas no grupo das espécies patogênicas do gênero estão incluídas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* (NAGLIK; CHALACOMBE; HUBE, 2003; PAPON *et al.*, 2013; MERSEGUEL *et al.*, 2015). Filogeneticamente essas espécies estão posicionadas como membros do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, e ordem Saccharomycetales (CHAI *et al.*, 2010) e estão predominantemente agrupadas no clado CTG por traduzir o códon CTG como serina em detrimento ao aminoácido leucina (PAPON *et al.*, 2013).

C. parapsilosis foi descrita inicialmente como *Monilia parapsilosis* pela semelhança com *Monilia psilosis*, atualmente classificada como *C. albicans* (ASHFORD, 1928). A espécie foi inicialmente dividida em três grupos (I, II e III) devido a padrões diferenciados de perfis de eletroforese de isoenzimas, e sequências distintas de DNA ribossomal (rDNA). Posteriormente esses grupos foram reclassificados devido às características genéticas particulares em três espécies: *C. parapsilosis stricto sensu*; *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (LIN *et al.*, 1995; TAVANTI *et al.*, 2005). Embora essas

espécies apresentem alto grau de similaridade, elas podem apresentar perfis de virulência distintos assim como distribuição epidemiológica característica (CANTÓN *et al.*, 2011).

Além de se apresentar naturalmente como agente colonizador de superfícies mucosas, pele e unhas assim como na microbiota normal de indivíduos saudáveis, *C. parapsilosis* pode ser facilmente isolada no solo, água do mar e superfícies vegetais, mostrando a grande capacidade desse organismo de se adaptar aos mais diferentes nichos (SANCHEZ *et al.* 1993; DE BERNARDIS *et al.* 1999; KUHN *et al.* 2004; WEEMS, 2015). A partir da década de 1990 *C. parapsilosis* tem mostrado aumento significativo na incidência de isolamento em casos clínicos em diferentes posições globais, como Europa e Ásia, apresentando-se como o segundo ou terceiro causador mais comum em casos de candidíase, ou candidemia causada por espécies do gênero *Candida* (PFALLER *et al.*, 1999; PFALLER *et al.*, 2000; SANDVEN, 2000; PFALLER *et al.*, 2008).

Dentre as espécies não-*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são prevalentemente isoladas na América latina, enquanto nos Estados Unidos o agente etiológico mais isolado dentro desse grupo é *C. glabrata* (NUCCI *et al.*, 2010). Nacionalmente *C. parapsilosis* se apresenta como a espécie de não-*Candida albicans* mais frequentemente isolada em casos de infecções sanguíneas (DOI *et al.*, 2016) e regionalmente, num estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, 24,1% dos casos de candidemia foram causados por *C. parapsilosis* stricto sensu (COSTA *et al.*, 2014). Esse padrão de distribuição de espécies parece se manter em toda a América do Sul (YAPAR, 2014). Além da alta frequência de isolamento, há relatos de altos índices de isolados dessa espécie que apresentam resistência ao antifúngico fluconazol, amplamente utilizado na clínica para o combate de infecções causadas por *Candida* (COSTA *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos realizados com *C. parapsilosis* apontam que no ambiente hospitalar, isolados da espécie podem ser amplamente encontrados em superfícies físicas, trazendo o caráter oportunista das infecções causadas por essa espécie, além disso, há fatores nosocomiais e iatrogênicos que favorecem o estabelecimento de candidíases invasivas. Essas infecções estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. (JARVIS 1995; GIRMENIA *et al.* 1996; SPELLBERG *et al.*, 2006).

C. parapsilosis também tem sido particularmente associada à infecções em neonatos que apresentam casos graves de desnutrição (CAMPBELL *et al.*, 2000; SILVA *et al.* 2001), sendo também frequentemente observada em pacientes submetidos à tratamentos com associação de cateteres e hiperalimentação intravenosa (HUANG *et al.*, 2004; MARAIS *et al.*

2004; CANO *et al.*, 2005). Além disso, a espécie tem destaque em infecções hematogênicas em unidades de tratamento intensivo, podendo levar a taxas de mortalidade elevadas, entre 50 e 85% (HOFFMAN-SANTOS *et al.*, 2013).

Entretanto a fonte da infecção por esta espécie de levedura nem sempre é aparente, em muitas unidades de cuidados intensivos neonatais, *C. parapsilosis* surgiu como o patógeno predominante, causando infecção invasiva e aumentando significativamente a morbidade e mortalidade de doenças graves (KAO *et al.*, 1999; KRCMERY *et al.* 1999; KUHN *et al.* 2002). Estudos relatam proporções de 50-60% de infecções por *C. parapsilosis* entre neonatos (BENJAMIN *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.* 2006). Mudanças nas práticas de cuidados intensivos neonatais podem estar relacionadas ao surgimento de *C. parapsilosis* como um importante agente patogênico em neonatos com baixo peso (CLERIHEW *et al.*, 2007). O controle dificultado deste patógeno, somado aos métodos ineficazes de assepsia acarretam na persistência prolongada deste no ambiente hospitalar, a qual pode perdurar por vários anos (SARVIKIVI *et al.*, 2005) resultando em elevadas taxas de mortalidade (SAXEN *et al.*, 1995). À medida que os recém-nascidos amadurecem, a incidência de *C. parapsilosis* diminui (PFALLER *et al.*, 2002; TORTORANO *et al.* 2006).

C. parapsilosis também é um colonizador frequente do espaço subungueal de indivíduos saudáveis, facilitando a transmissão cruzada entre pacientes, especialmente entre recém-nascidos, através das mãos de profissionais de saúde, o que por sua vez, desempenham um papel importante na propagação da levedura, contribuindo para a alta taxa de isolamento dessa espécie. (ABI-SAID *et al.*, 1997; WEEMS, 2015). Vários surtos têm sido relatados pela interação direta entre trabalhadores da saúde e recém-nascidos, por meio da utilização ou manipulação de cateteres, bem como inserção de supositórios de glicerina e no uso de pomadas tópicas (BARCHIESI *et al.* 2004; KUHN *et al.* 2004; VAN ASBECK *et al.* 2007).

Além da contaminação por profissionais da saúde, surtos causados por *C. parapsilosis* foram relatados pela contaminação de soluções de hiperalimentação, dispositivos intravasculares de monitoramento de pressão, soluções de irrigação oftalmológica e diversas soluções contendo glicose (CLARK *et al.*, 2004; WEEMS, 2015).

O advento de novas terapias e procedimentos médicos, elevado número de procedimentos cirúrgicos invasivos, uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro e a hospitalização prolongada, estão diretamente relacionados ao aumento da incidência de infecções sanguíneas vinculadas à *Candida* (EGGIMANN *et al.*, 2003; SOFAIR *et al.*, 2006). O aumento crescente na epidemiologia para infecções por *C. parapsilosis* pode estar

especialmente relacionado ao aumento que ocorreu nas últimas décadas na incidência de infecções na corrente sanguínea associadas ao uso de dispositivos intravasculares (SAN MIGUEL *et al.*, 2005).

Com o uso cada vez mais frequente de antifúngicos azóis, houve uma mudança epidemiológica dos casos de candidíase hematogênica, favorecendo cada vez mais espécies de não-*C.albicans* (ABI-SAID *et al.*, 1997; KAO *et al.* 1999). O aumento na incidência de *C. parapsilosis* correlaciona-se com aumento do uso de caspofungina e voriconazol (FORREST 2008). Além disso, também há um tendência de redução no isolamento de *C. albicans* com um aumento concomitante de *C. parapsilosis* entre pacientes adultos com câncer, indicando que, mesmo entre pacientes mais velhos a incidência de *C. parapsilosis* pode estar em ascensão (GIRMENIA *et al.* 1996; NUCCI *et al.* 2010).

Para obter sucesso na colonização e consequente infecção, *C. parapsilosis*, assim como todos os grupos de microrganismos patogênicos, precisa manifestar uma série de fatores de virulência que proporcionem o sucesso na interação com o hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012).

Inseridos nos fatores de virulência reconhecidos para *C. parapsilosis* estão: capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro; secreção de enzimas hidrolíticas que levam a dano tecidual; capacidade de morfogênese, que embora não ocorra na forma de hifas verdadeiras pode se manifestar como pseudo-hifas, que proporcionam vantagem adaptativa para a espécie (MAYER *et al.*, 2013), além da capacidade de aderência à tecidos do hospedeiro e substratos abióticos, culminando em posterior potencial de formação de biofilmes em dispositivos médicos e/ou na superfície epitelial do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012).

Assume-se que uma das principais contribuições para a virulência das espécies de *Candida* é a sua versatilidade para adaptar-se a uma variedade de diferentes habitats, assim como seu potencial de formação de comunidades microbianas ligadas às mais diferentes superfícies, evento esse conhecido como biofilme (SILVA *et al.*, 2011).

2.2 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Os biofilmes microbianos são comumente definidos como comunidades sésseis de microrganismos estabelecidos em uma estrutura tridimensional e embebidos em uma matriz extracelular polimérica composta principalmente de proteínas, polissacarídeos,

material genético extracelular e moléculas responsáveis pela comunicação entre as células (COSTERTON, 1999; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

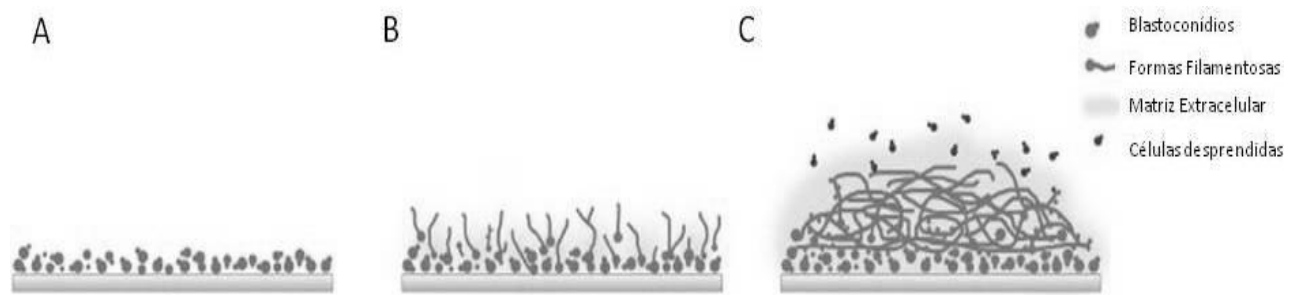
Durante o processo de colonização e posterior estabelecimento de infecção, o primeiro evento manifestado por espécies do gênero *Candida* é a capacidade de aderir às diferentes superfícies do hospedeiro. Esse processo permite a persistência desses microrganismos dentro do hospedeiro e proporciona um ambiente adequado para o estabelecimento dos demais fatores de virulência que culminam no sucesso da infecção (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, esses organismos são capazes de aderir à superfícies abióticas, importante agravante no meio clínico, uma vez que a adesão e posterior formação de biofilme em dispositivos médicos se torna um grande obstáculo no tratamento de infecções (SILVA *et al.*, 2011; BRILHANTE *et al.*, 2014). Diversos são os fatores que interferem na capacidade de adesão, como o perfil de proteínas expressas na parede celular (CHAFFIN, 2008) e propriedades físico-químicas da superfície celular (ANIL *et al.*, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2002).

A superfície celular é o sitio de interações físico-químicas com as células do hospedeiro ou outros tipos de superfícies, como as de dispositivos médicos, o que culmina no processo de adesão (CANNON; CHAFFIN, 1999). Proteínas da superfície celular de *Candida* que estão envolvidas na capacidade de aderência são descritas como adesinas (DE LAS PENAS *et al.*, 2003). Para *C. parapsilosis* são descritas cinco tipos de proteínas codificadas por genes da família ALS (*Agglutinin-Like Sequence*) e seis codificadas por PGA30 (predicted glycosylphosphatidylinositol-anchored protein 30) (BUTLER *et al.*, 2009). Além dessas proteínas, sugere-se que a hidrofobicidade da superfície celular também seja um fator interferente na capacidade de adesão (PANAGODA *et al.*, 2001).

A inicial adesão de células aos tecidos do hospedeiro ou à dispositivos médicos é seguida por uma fase de proliferação celular (Figura 1). Com o aumento da densidade de células presentes há o estabelecimento do biofilme maduro (RAMAGE *et al.*, 2006). A capacidade de produção de biofilme leva ao estabelecimento de comunidades celulares intimamente ligadas entre si e a um substrato biótico ou abiótico. Para *C. parapsilosis*, essas células podem apresentar caráter polimórfico, ou seja, se apresentarem na forma leveduriforme e filamentosa (pseudo-hifas). A comunidade celular é envolta por uma matriz extracelular polimérica que permite a sinalização celular (*quorum sensing*), troca de metabólitos e circulação de nutrientes. Quando o biofilme está estabelecido e se torna maduro, ocorre o desprendimento células que podem infectar outros sítios e potencialmente disseminar a infecção. (TREVINO-RANGEL, 2015).

O desenvolvimento de biofilmes por espécies de *Candida* envolve alterações finas na expressão gênica, exigindo uma complexa e bem coordenada regulação espacial e temporal para realizar o processo com alta eficiência (SILVA *et al.*, 2009). Este modo de crescimento é um potente fator de virulência para todas as espécies de *Candida*. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* apresentam grande capacidade de formação de biofilmes, a qual tem sido relacionada à elevações nas taxas de morbidade e mortalidade em comparação com isolados incapazes de formar biofilmes (DESAI *et al.*, 2014). A formação de biofilme é um fenômeno sequencial que envolve a aderência, a maturação e desprendimento (Figura 1) (NOBILE *et al.*, 2011).

Figura 1 – Fases de desenvolvimento do Biofilme



Fonte: NOBILE *et al.*, (2011)

Notas: Fases de desenvolvimento do biofilme: Adesão inicial (A); Fase de maturação e diferenciação celular (B); Biofilme maduro – desprendimento e dispersão celular (C). Adaptado de SANDAI et al (2016).

Fixação e colonização de células da levedura à superfícies bióticas ou abióticas é o primeiro passo do desenvolvimento do biofilme. A adesão inicial das células de *Candida* é seguida pela divisão celular. Essa proliferação leva à formação de uma camada basal de microcolônias de ancoragem (FINKEL; MITCHEL, 2011; NOBILE *et al.*, 2011) com subsequente maturação do biofilme. As infecções mucosas podem ser associadas com biofilmes na medida em que o patógeno adere a uma superfície e produz uma matriz extracelular (FANNING *et al.*, 2012)

A maturação do biofilme é, geralmente, caracterizada pela presença de formas filamentosas, e pela produção de matriz extracelular (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; FINKEL; MITCHEL, 2011). O papel da matriz é proteger as células de *Candida* de células de defesa do hospedeiro e atuar como uma barreira física às drogas e substâncias tóxicas, impedindo que essas alcancem todas as células da levedura. Além disso, a matriz permite a circulação de nutrientes, permitindo que todas as células do biofilme sejam nutridas adequadamente (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; CHANDRA *et al.*, 2001).

Ao final do processo de maturação do biofilme, a estrutura complexa formada pode ser modificada em decorrência de um processo denominado de desprendimento ou dispersão celular, o qual resulta na liberação de células do biofilme permitindo a colonização de novos sítios e o estabelecimento de novas comunidades (DONLAN *et al.*, 2002). Em *C. albicans*, a estrutura do biofilme normalmente consiste em duas camadas: uma camada basal de bastoconídios e uma cobertura espessa e rígida de matriz extracelular em meio à formas hifais (pseudo-hifas) (DONLAN *et al.*, 2002).

Em comparação com *C. albicans*, os biofilmes de *C. parapsilosis* são mais delgados, consistindo na fase celular de blastoconídios agregados com pseudohifas (SILVA *et al.*, 2012). Os carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas são os principais constituintes da matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; ZARNOWSKI *et al.*, 2014). No caso de *C. parapsilosis* há relatos de que a matriz extracelular contém altas quantidades de carboidratos, no entanto a fração proteica é menor em comparação com a de outras espécies (SILVA *et al.*, 2009).

Biofilmes são prontamente formados por células de *C. parapsilosis* quando expostas á altas concentrações de glicose e lipídios, sendo este fator associado à maior prevalência deste organismo em infecções sanguíneas de pacientes que recebem nutrição parenteral (NOSEK *et al.*, 2009). A incidência elevada desta espécie na colonização de dispositivos médicos plásticos (cateteres e linhas intravasculares), somada a capacidade de formação de biofilme desta espécie é de extrema relevância clínica, uma que a expressão deste fator de virulência potencializa a capacidade de colonização da levedura (TROFA *et al.*, 2008; WEEMS, 2015). O conhecimento de vias e mecanismos de formação de biofilme se torna de grande relevância pra *C. parapsilosis* uma vez que todo o complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* stricto sensu, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*) são capazes de formar biofilmes.

2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DISPOSITIVOS MÉDICOS

As altas taxas de morbidade e mortalidade nosocomial devido às infecções fúngicas invasivas são principalmente decorrentes de espécies de *Candida* (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012; ZAGO *et al.*, 2015) com a formação de biofilmes desempenhando um papel determinante na virulência (NOBILE *et al.*, 2006; NETT *et al.*, 2014).

Espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes em células animais, bem como em muitos biomateriais implantados no hospedeiro (CHANDRA *et al.*, 2008;

BORGHI *et al.*, 2011). As espécies patogênicas são comumente isoladas de implantes médicos tais como: cateter venoso central, peritoneal, vascular e urinário, prótese ortopédica e valvar, catéteres de nutrição parenteral, lentes de contato e dispositivos dentários (LI *et al.*, 2010; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012a; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012b; TAMMER *et al.*, 2014). Estudos demonstram que espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes em uma variedade de superfícies de dispositivos médicos, como polimetilmetacrilato, silicone, poliuretano, cloreto de polivinilo, polipropileno e poliestireno, entre outros (CHANDRA *et al.*, 2001; KUHN *et al.*, 2002; NETT *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2011)

Embora *C. albicans* ainda seja a espécie mais estudada para esses casos, já foi relatado que *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são capazes de formar biofilmes em dispositivos médicos com diferentes propriedades físico-químicas (WONG, 2006). Isolados dessas espécies capazes de formar biofilmes podem levar a índices de 50% de morte e são muito mais agressivos quando comparados àqueles incapazes de formar biofilme (KUMAMOTO, 2002; SILVA *et al.*, 2011).

Propriedades físico-químicas dos dispositivos representam um papel central na adesão do patógeno (RINASTITI *et al.*, 2010). Consequentemente, foi descrito que espécies de *Candida* preferencialmente aderem aos biomateriais de alta rugosidade e porosidade (FRADE; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012b). Agentes patogênicos como *Candida*, aderem com maior vigor à superfícies de PVC quando comparadas às de poliuretano, silicone, teflon e poliestireno, muitas dessas, utilizadas como padrão na avaliação do potencial de formação de biofilme desses indivíduos (ESTIVILL *et al.*, 2011; NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017).

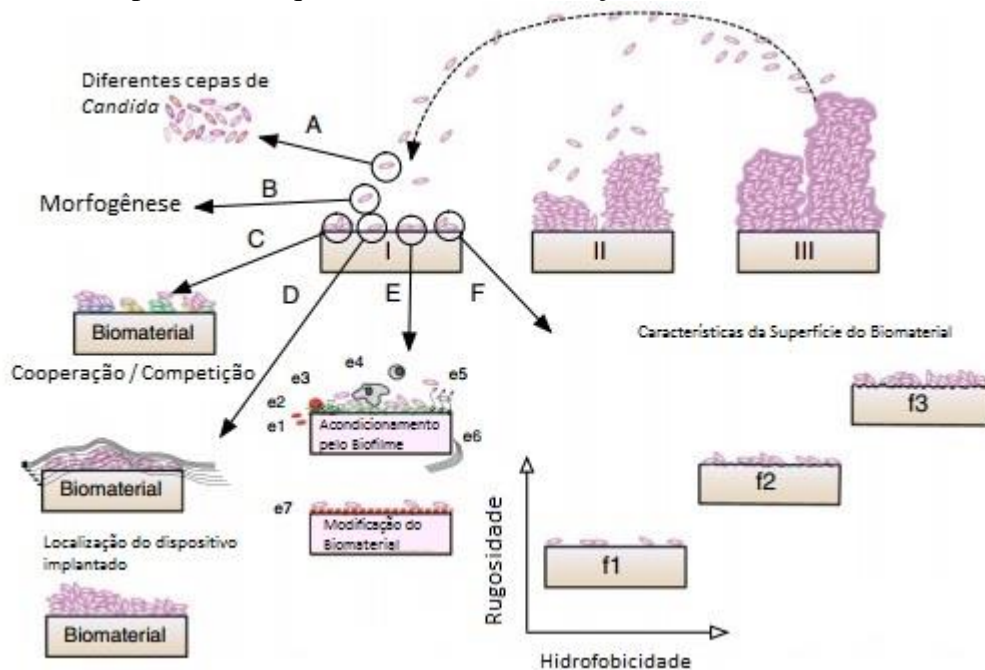
A maior aderência em superfícies de PVC pode ser explicada pelo fato dessas superfícies apresentarem maior número de rugosidades em comparação às compostas de teflon e poliestireno (FRADE e ARTHINGTON-SKAGGS, 2011). Poliuretano e silicone apresentam texturas mais suaves, assim como alta hidrofobicidade. A combinação de composição química, superfície e topografia tornam os componentes de PVC ideais para a adesão de microrganismos em poros e cavidades, favorecendo posteriormente a total cobertura da superfície por biofilmes (NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017).

Dada a relevância do componente do biomaterial utilizado na clínica, é de extrema importância o desenvolvimento de componentes que evitem ou inibam a capacidade de adesão de *C. parapsilosis*, evitando que o dispositivo médico sirva de ponto de cultivo e desprendimento constante de células para o corpo do ser humano (NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017).

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos dispositivos médicos utilizados também é importante na compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre o material e a parede celular de *Candida* e outros patógenos (NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017). Os biomateriais podem ou não liberar substâncias tóxicas para o meio em resposta à estímulos biológicos. Por esta razão, o controle fino da superfície é crucial no desenho desses dispositivos. Além disso, propriedades de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, carga elétrica, receptores e rugosidade da superfície, entre outros, devem ser considerados na escolha do aparato clínico. (RATNER *et al.*, 1987). Embora haja uma correlação entre a superfície do material e o favorecimento de adesão e formação de biofilmes, essa combinação é multifatorial e normalmente a superfície exibe algum grau de mobilidade, de modo que átomos e moléculas próximas a ele possam se reorganizar em resposta ao meio externo (RATNER *et al.*, 1987; NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017).

Fatores que determinam a formação de biofilmes como acondicionamento de células do hospedeiro, características da superfície, morfogênese da *Candida*, a cepa de *Candida*, a cooperação e concorrência e a localização do implante, também desempenham um papel importante na formação do biofilme (Figura 2) (SHIN *et al.*, 2002; KOJIC *et al.*, 2004; NETT *et al.*, 2006; RAMAGE *et al.*, 2009).

Figura 2 – Principais fatores que interferem na formação de biofilme



Fonte: SHIN *et al.*, 2002; KOJIC *et al.*, 2004; NETT *et al.*, 2006; RAMAGE *et al.*, 2009.

Notas: Principais fatores que interferem na formação de biofilme por *Candida* em biomateriais. I, II e III representam as fases da formação de biofilme. (A) Diferentes cepas de *Candida*; (B) Morfogênese de células de *Candida*; (C) Comunidade microbiana pode oferecer concorrência ou cooperação no desenvolvimento do biofilme de *Candida*; (D) Localização do dispositivo médico permite a presença de tensão de cisalhamento; (E) Biofilme condicionam células do hospedeiro, como plaquetas e coágulos de sangue (e1 e e3), havendo ligação de proteínas à superfície de biomateriais que guiam interações celulares (e2), células envolvidas à resposta imune do hospedeiro pelo dispositivo, como macrófagos (e4), íons ou fragmentos do biomaterial (e5), encapsulamento do biomaterial com tecido fibroso (e6); modificação de biomaterial pode controlar a formação de biofilme (e7); (F) Características da área de contato, como hidrofobicidade e a rugosidade, têm efeito direto na adesão da *Candida* (f1 a f3). Adaptado de CUELLAR *et al.* (2012)

2.4 PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade (TAMURA *et al.*, 2007). Existem diferenças na patogenicidade entre isolados de *Candida* spp, assim, vários fatores de virulência tem sido propostos e descritos (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007)

Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismos e variam de hospedeiro para hospedeiro ou até mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (TAMURA *et al.*, 2007)

Candida parapsilosis é um importante agente oportunista para seres humanos e dispõem de uma variedade de fatores associados à sua capacidade de causar infecções, sendo um microrganismo versátil, podendo sobreviver como comensal em vários sítios anatômicos, cada um com suas condições inerentes (CALDERONE, FONZI, 2001; GACSER, A., *et al.*, 2007; WEEMS, 2015).

Dentre os fatores de virulência observados entre as espécies de *Candida* spp estão: habilidade de produzir enzimas hidrolíticas, propriedade de multiplicação a altas temperaturas, hidrofobicidade de superfície celular, variabilidade genotípica, “switching” fenotípico, aderência e formação de biofilmes (TAMURA *et al.*, 2007; MORALEZ, *et al.*, 2014).

A capacidade de adesão e formação de biofilmes de *C. parapsilosis* é importante uma vez que esta espécie coloniza dispositivos médicos que permanecem no organismo durante um longo período de tempo, sendo deste modo uma das vias predominantes de infecção (KUHN, *et al.*, 2004).

2.4.1 Capacidade de Adesão

A capacidade de adesão de *Candida parapsilosis* às células, tecidos e dispositivos médicos implantados nos hospedeiros e a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro são considerados aspectos importantes das interações da célula com o ambiente que a circunda. A adesão das células ao hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo inicial para a infecção (FRADE; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011).

As interações físicas destas leveduras com as células do hospedeiro são mediadas na superfície celular e os constituintes da parede celular que estão implicados nas ligações são denominados de adesinas. Existe uma grande variedade deste tipo de estruturas, justificando assim, a capacidade da célula colonizar um variado número de superfícies (SKERL *et al.*, 1984; CHAFFIN *et al.*, 1998). Adesinas são proteínas importantes no processo de infecção, pois são elas que fazem a ligação da *Candida* às células ou à superfície a ser infectada (STURTEVANT, *et al.*, 1997; CALDERONE, *et al.*, 2001).

Relativamente à *C. parapsilosis*, existem poucos estudos desenvolvidos sobre o papel das adesinas na adesão, todavia um conjunto de adesinas diretamente envolvidas na adesão de *C. parapsilosis* ao epitélio humana já foi identificado (BUTLER *et al.*, 2009; GACSER, 2016).

2.4.2 Morfogênese

Acredita-se que a transição de levedura à hifa seja importante no estabelecimento da infecção, uma vez que mutantes incapazes de formar hifa são atenuados em virulência. A morfogênese em espécies de *Candida* pode ser mediada por vários fatores ambientais, os parâmetros que induzem modificações morfológicas *in vitro* incluem: temperatura de crescimento acima de 35°C, pH acima de 6,5, escassez de carbono ou nitrogênio, baixas concentrações de oxigênio e alguns compostos químicos, aminoácidos e álcool (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2001). Aminoácidos estimulam morfogênese de células de levedura a pseudo-hifas em *C. parapsilosis*, e isso pode explicar a alta incidência de infecções por *C. parapsilosis* em recém-nascidos ligados à cateteres (KIM *et al.*, 2006). É importante enfatizar que é sempre necessária a combinação de mais de um desses fatores para a indução de filamentação (GOW *et al.*, 2002).

2.4.3 Fatores Moleculares da Formação de Biofilmes

A formação de biofilmes está diretamente relacionada com as condições ambientais em que o microrganismo está inserido, tornando a comparação de alterações genéticas regulatórias entre espécies de *Candida* um difícil fator a ser estudado. No entanto se conhece grande parte da rede regulatória de genes envolvidos na formação de biofilmes em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (ARAÚJO *et al.*, 2017). Os genes envolvidos no controle da aderência e formação de biofilmes em *C. parapsilosis* podem ser encontrados na tabela 1.

A aderência de células de *Candida* à superfícies mucosas ou materiais sintéticos é um passo inicial levando à proliferação e conseqüentemente à formação e potencial infecção do biofilme (SILVA *et al.*, 2012). O mecanismo de adesão é baseado na interação entre a parede celular do microrganismo e da superfície celular do hospedeiro. Por isso, a adesão é mediada por células hospedeiras, células fúngicas e condições ambientais (WANG *et al.*, 2012). A modulação do processo de adesão pode ser conseguida por adesinas microbianas, receptores de células hospedeiras, ou por manipulações físicas e químicas (LIMA-NETO *et al.*, 2011). A presença de proteínas específicas da parede celular, designadas normalmente como adesinas, é um gatilho na modulação do processo de adesão (SILVA *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Genes envolvidos nos processos de adesão e maturação do biofilme em *C. parapsilosis*

Fase de desenvolvimento	Gene	Descrição
Adesão	HWP1	Adesão celular; Envolvido no passo de fixação das células no substrato e consequente formação de biofilme
	ALS1-5	Possíveis adesinas envolvidas no processo de adesão
Maturação	BCR1	Fator de transcrição necessário para formação de biofilme
	EFG1	Fator de transcrição necessário para formação de biofilme e morfogênese
	NDT80	Fator de transcrição envolvido na formação de biofilme
	RBT1	Necessário para formação de biofilme, regulado por BCR1
	CZF1	Fator de transcrição da formação de biofilme
	CZF3	Fator de transcrição da formação de biofilme
	UME6	Fator de transcrição da formação de biofilme
	CPH2	Fator de transcrição da formação de biofilme
	ACE2	Fator de transcrição da formação de biofilme
	FKS1	Processo de maturação do biofilme em presença de glicose

Fonte: Adaptado de Araújo *et al.*(2017)

Em *C. albicans*, a adesão é mediada por proteínas da família *Als* (MAYER *et al.*, 2013). Vários são os genes que codificam as adesinas da família *Als*. A expressão desses genes é feita de maneira diferencial e temporal em diversos materiais durante formação de biofilmes (GREEN *et al.*, 2004; YEATER *et al.*, 2007). Cinco ortólogos dos genes *ALS* encontrados em *C. albicans* que podem estar envolvidos na formação de biofilmes, já foram identificados em *C. parapsilosis* (ROSSIGNOL *et al.*, 2009).

Esse grupo de proteínas para *C. albicans* consiste em oito membros, nomeadamente *Als1-7* e *9*, e todas elas têm uma estrutura similar que contém uma sequência de sinal secretório N-terminal (MAYER *et al.*, 2013). Especificamente, as proteínas *Als1* e *Als3* estão envolvidas na ligação da superfície do biofilme; no entanto, sua expressão difere dependendo da morfologia da célula de *C. albicans* (NOBILE *et al.*, 2011). No caso de *ALS1*, a expressão é detectável nas formas blastoconidiais e hifais (LI *et al.*, 2013) enquanto *ALS3* é expresso apenas quando a levedura está em sua forma filamentosa (GREEN *et al.*, 2004). Dos oito genes que codificam essas proteínas *ALS*; *ALS1*, *ALS3* e *ALS5* estão envolvidos na adesão de *C. albicans* para uma variedade de substratos bióticos (HENRIQUES *et al.*, 2006).

Além das Als, outros componentes proteicos estão presentes na parede celular, no entanto eles não são covalentemente vinculados a esta estrutura (NOMBELA *et al.*, 2006). Uma dessas proteínas é a Enolase 1, que forma precursores complexos de alto peso molecular. Em *C. albicans* também foi observado que a Enolase 1 interage com o componente glucano da parede celular o que facilita sua secreção para o meio (ANGIOLELLA *et al.*, 1996; JONG *et al.*, 2003). Essa proteína participa no processo de adesão de *C. parapsilosis* à dispositivos médicos de diferentes composições. Esse comportamento pode ser subjacente ao mesmo mecanismo relatado para *C. albicans*, onde foi demonstrado a presença de precursores de proteínas de kinina e de kininogênio de alto peso molecular que desencadeiam a cascata formadora de kinina na superfície celular.

Eap1 é uma proteína de parede celular ligada a GPI (glicosilfosfatidilinositol-dependente) que está envolvida na adesão célula-célula em *C. albicans* (LI *et al.*, 2010). Esta proteína medeia a ligação à diferentes superfícies e sua síntese é regulada pelo fator de transcrição EFG1 (LI *et al.*, 2010).

A manoproteína da parede celular HWP1 promove a ligação de células de *Candida* com a superfície do hospedeiro (HENRIQUES *et al.*, 2006); essa foi a primeira proteína de superfície celular descrita como envolvida na formação de biofilmes *in vivo* em *C. albicans* (WAN HARUN *et al.*, 2013). Orsi *et al.* (2014) demonstraram que o gene que codifica Hwp1 está envolvido na formação de tubos germinativos e formas filamentosas, promovendo assim o contato físico entre as células epiteliais do hospedeiro e células fúngicas. Com isso tem-se que HWP1 é um importante efetor de patogenicidade de *C. albicans* (STAAB *et al.*, 1999). Esse gene também é expresso em *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, mas ainda não foi detectado em *C. glabrata*. O fato de HWP1 ser expresso nessas três espécies durante o processo de adesão e formação de biofilmes indica seu envolvimento na produção de adesinas covalentemente ligadas ao glucano da parede celular (WAN HARUN *et al.*, 2013).

A proteína de superfície celular PGA10 e a proteína PBR1 segregada, também são descritas como importantes para a adesão total dos biofilmes de *C. albicans* (SAHNI *et al.*, 2009). Pga10, também conhecido como RBT51, é um membro de proteínas comuns em várias membranas extracelulares fúngicas e tem um papel em adesão em *C. albicans* (PÉREZ *et al.*, 2006). Pérez *et al.* (2006) demonstraram que mutantes para Dpga10 apresentam biofilme menos consistente, sendo facilmente desprendido de substratos plásticos. Além disso, Sahni *et al.* (2009) evidenciaram adesão menor de *C. albicans* às células do sangue quando o gene PBR1 foi excluído.

Em *C. parapsilosis*, a adesão às superfícies epiteliais e acrílicas também está associada à característica hidrofóbica da superfície celular. Além disso, *C. parapsilosis* possui maior habilidade que *C. albicans* em aderir a células epiteliais bucais (PANAGODA *et al.*, 2001). Butler *et al.* (2009) identificaram cinco membros de ALS e seis membros de proteínas da parede celular PGA30 em *C. parapsilosis*. Da mesma forma que para *C. albicans*, os mecanismos de adesão das espécies não-*C. albicans* indicam que a parede celular provavelmente desempenha um papel crucial na colonização e na subsequente formação de biofilmes (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Proteínas encontradas na parede celular e que desempenham papéis específicos no citoplasma são conhecidas como proteínas *moonlighting*. FBA1, uma enzima glicolítica detectada em biofilmes de *C. albicans* (CHAFFIN, 2008; MARTÍNEZ-GOMARIZ *et al.*, 2009), favorece a adesão de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* em superfícies de dispositivos feitos de PVC. Além disso, Nuñez-Beltran *et al.* (2017) mostraram que antígenos recombinantes desta proteína de *C. albicans* reagem com soros de pacientes com candidemia infectados com esta e outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* (LI *et al.*, 2013). PGK, assim como FBA1, também é encontrada em biofilmes formados por *C. albicans* (MARTÍNEZ-GOMARIZ *et al.*, 2009). Esta proteína também está relacionada com o processo de adesão de *C. parapsilosis* em materiais de silicone (NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017).

Proteínas *moonlighting* são observadas inicialmente no processo de adesão em dispositivos médicos em várias espécies de *Candida*, isso pode ser explicado pelo fato de que as propriedades da superfície são determinantes para a adsorção de proteínas. Este evento ocorre alguns segundos depois do contato dos dispositivos com o meio biológico (VROMAN *et al.*, 1977) e antes que as células atinjam o domínio do substrato (BAIER, 1978). Em geral, as proteínas tem maior afinidade a ambientes aquosos, no entanto, há uma tendência ao acúmulo dessas moléculas na interfase quando misturadas a soluções contendo outras fases. Em uma interfase sólida, as proteínas interagem com a superfície através de forças eletrostáticas, polares e hidrofóbicas. Assim, quando proteínas da parede celular como Enolase1, FBA1 e PGK são segregados para o meio, facilitam a adesão de *Candida* ao dispositivo, permitindo que outras proteínas de parede como as adesinas (ALS, EPA, HWP1, entre outros), se liguem covalentemente ao biomaterial estabelecendo uma forte ligação com o patógeno (NUÑES-BELTRAN *et al.*, 2017)

Sabe-se que as lipases estão diretamente envolvidas na capacidade de formação de biofilme de *C. parapsilosis*, uma vez que mutantes que não expressão essas

moléculas apresentam menor potencial de formação de biofilme, culminando na redução da virulência (GACSER *et al.*, 2007). Além disso, BCR (biofilm and cell wall regulator) também foi considerado necessário para a formação adequada do biofilme em *C. parapsilosis* (GACSER *et al.*, 2007).

Após o processo inicial de adesão, o próximo passo na formação do biofilme é a divisão celular e consequente proliferação. A formação de biofilmes em espécies de *Candida* é regulada por vários fatores de transcrição que desempenham um papel fundamental em várias vias e têm um potencial importante na regulação de outros genes envolvidos na formação de biofilmes (NOBILE *et al.*, 2006). Nobile *et al.* (2011) investigaram a rede de transcrição e identificaram um conjunto de seis desses fatores (BCR1, EFG1, TEC1, NDT80, ROB1 e BRG1) em *C. albicans* que desempenham um papel importante na regulação da formação de biofilmes. Visto que, quando qualquer um desses reguladores é excluído, os biofilmes de *C. albicans* não apresentam desenvolvimento adequado (NOBILE *et al.*, 2011).

Para espécies não-*C. albicans* pouco se sabe sobre a influência desses fatores de transcrição na formação de biofilme. BCR1 é uma proteína essencial para a formação de biofilme em *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Além disso, o gene que codifica esta proteína está ligado à expressão de várias proteínas de parede celular como Als1, Als3 e Hwp1 em *C. albicans* (NOBILE e MITCHELL, 2005; HENRIQUES *et al.*, 2006; NOBILE *et al.*, 2006). Em *C. parapsilosis*, o ortólogo de BCR1 é essencial para a formação de biofilmes (HOLLAND *et al.*, 2014), e quando este gene é excluído, o biofilme formado por *C. parapsilosis* é mais delgado e composto por poucas camadas de células, mostrando que o BCR1 também é necessário para a formação de biofilmes *in vivo* (DING *et al.*, 2011).

EFG1 é um fator de transcrição necessário para a formação de biofilmes que regula a dinâmica da superfície celular e a formação de formas filamentosas (CONNOLLY *et al.*, 2013). Holland *et al.* (2014) demonstraram redução semelhante no biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* quando EFG1 é eliminado. Além disso, mutantes que não expressam EFG1 são incapazes de manifestar formas filamentosas mesmo sob condições de indução de filamentação (LIU, 2001). Outro fator de transcrição descrito (NDT80) que interfere no desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* também é observado em *C. parapsilosis* (NOBILE *et al.*, 2011; HOLLAND *et al.*, 2014). NDT80 é um fator chave em resposta a diferentes condições ambientais e está envolvido na morfogênese e virulência em *C. albicans*. Em *C. parapsilosis*, a exclusão de NDT80 resulta em um defeito de crescimento significativo na formação de biofilmes (HOLLAND *et al.*, 2014). Além desses o desenvolvimento de

biofilme em *C. parapsilosis* é regulado por CZF1, GZF3, UME6, CPH2 e ACE2 (HOLLAND *et al.*, 2014).

A produção de matriz extracelular é outra característica importante na maturação do biofilme (FINKEL e MITCHELL, 2011). A composição da matriz varia de acordo com a espécie, linhagens e condições ambientais, contudo, esta é majoritariamente composta por carboidratos e proteínas (AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006). Um dos carboidratos presentes na matriz de *C. albicans* é β -1,3 glucano (NETT *et al.*, 2006). No entanto, estudos recentes demonstraram que o β -1,6 glucano é também um componente matriz importante, e que é altamente dependente do meio ambiente condições de cultivo (ZARNOWSKI *et al.*, 2014).

O gene responsável pela glucan sintase é FKS1, mais comumente designado GSC1, e tem sido implicado na resistência ao biofilme de *C. albicans* a fluconazol (NETT *et al.*, 2006). A susceptibilidade ao fluconazol é o resultado da interrupção do FKS1 que reduz o deposição de β -1,3-glucano na matriz do biofilme (NETT *et al.*, 2010). Em *C. parapsilosis*, o gene FKS1 está envolvido na maturação de biofilmes na presença de glicose (TAFF *et al.*, 2012). Pereira *et al.* (2015) demonstraram que a regulação positiva da FKS1 é induzida por altos níveis de glicose, levando a um aumento na síntese de β -1,3-glucano. Este glucano é acumulado na matriz, formando um biofilme denso e estruturado.

Em *C. albicans*, RLM1 e ZAP1 são dois outros reguladores envolvidos na produção de matrizes em biofilmes. O fator de transcrição ZAP1 é um regulador negativo da produção da matriz de biofilme e mutantes deficitárias desse fator, produzem um biofilme com altos níveis de β -1,3-glucano tanto *in vitro* como *in vivo* (NOBILE *et al.*, 2009). Alguns genes alvo de ZAP1 são CSH1, IFD6, GCA1, GCA2 e ADH5, que modulam os níveis de β - 1,3-glucano na matriz de biofilme (NOBILE *et al.*, 2009). No caso de CSH1 e IFD6, quando ZAP1 ativa a expressão desses genes, a produção de β -1,3-glucano diminui e, portanto, esses genes são considerados como reguladores negativos da produção da matriz (NOBILE *et al.*, 2009). No entanto, GCA1, GCA2 e ADH5 são reguladores positivos, uma vez que há um aumento de β -1,3-glucano quando estes genes são ativados pelo gene ZAP1 (NOBILE *et al.*, 2009). Outro regulador da produção da matriz é RLM1, um regulador positivo, cuja exclusão promove redução nos níveis de matriz (NETT *et al.*, 2011).

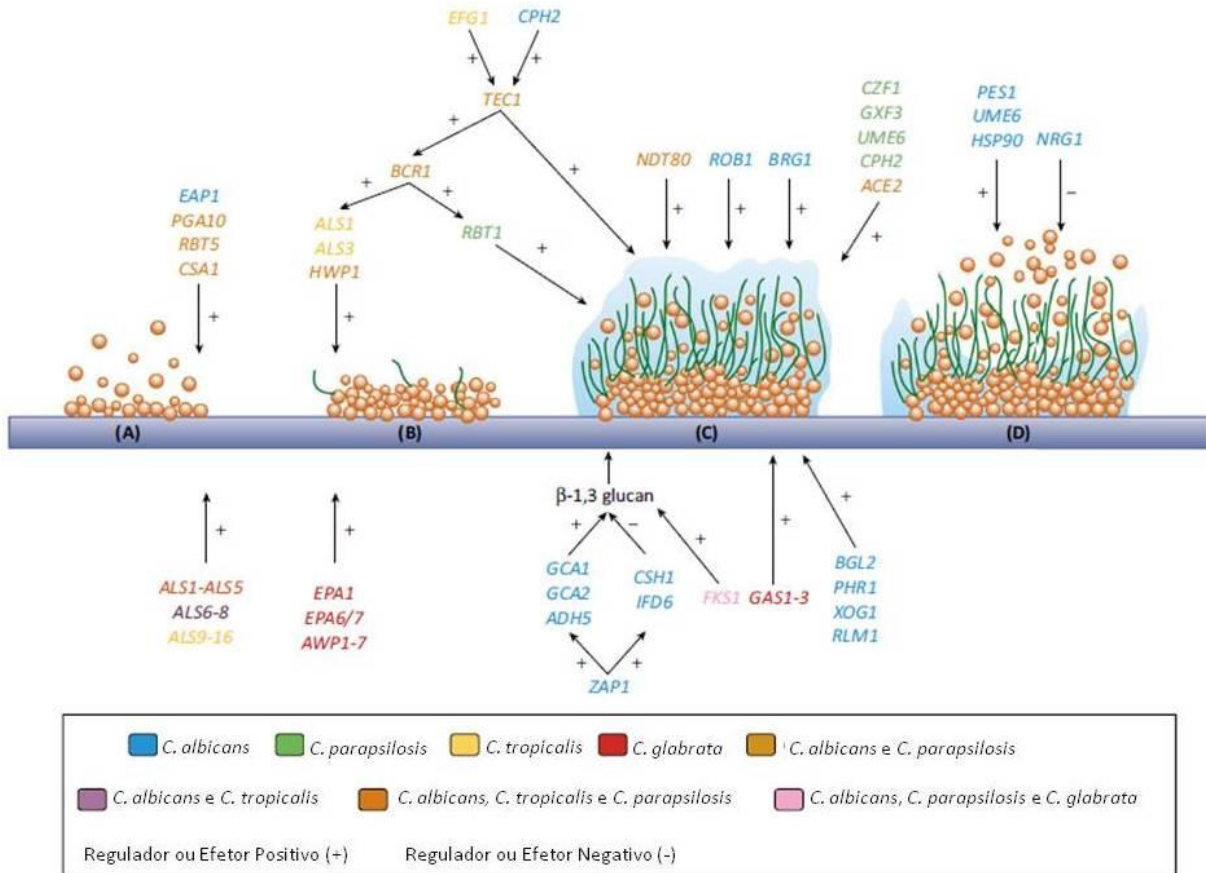
O último passo da formação de biofilme é caracterizado pela dispersão de células de levedura ou partes do biofilme em sua forma madura, isso permite que o organismo atinja novos sítios e inicie uma nova adesão e colonização, completando o ciclo de vida do biofilme (NOBILE *et al.*, 2011). A dispersão do biofilme ocorre em resposta a mudanças

ambientais, como diminuição ou falta de nutrientes ou outras modificações na composição do meio de crescimento (UPPULURI *et al.*, 2010). Além disso, a dispersão de células de biofilme pode levar a um desenvolvimento de infecções em órgãos distantes do sítio de infecção inicial, devido à capacidade de invadir e se disseminar na corrente sanguínea (UPPULURI *et al.*, 2010). Na última década, os primeiros eventos associados à formação de biofilme de *Candida* receberam atenção considerável. No entanto, pouco se conhece sobre a dispersão de biofilme de *Candida* ou os mecanismos e genes que o desencadeiam (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Estudos recentes sobre biofilmes de *C. albicans* relataram que a maioria das células dispersas são células blastoconidiais, sendo três genes reguladores responsáveis por esta etapa, nomeadamente PES1, UME6 e NRG1 (FINKEL; MITCHELL, 2011). Uppuluri *et al.* (2010) demonstraram que as principais células de levedura dispersas a partir do biofilme são liberadas a partir das camadas de hifas superiores. Além disso, a superexpressão de PES1 resulta em um aumento do crescimento da levedura quando as células são cultivadas em meio sem doxiciclina (DOX) (SHEN *et al.*, 2008). Em contraste, quando NRG1 é superexpresso, na ausência de DOX, o biofilme apresenta apenas uma monocamada de células de leveduras e pseudo-hifas (UPPULURI *et al.*, 2010) apontando que NRG1 é um regulador negativo de filamentação (BRAUN *et al.*, 2001; MURAD *et al.*, 2001).

UME6 é um regulador de transcrição da transição de levedura para forma filamentosa em *C. albicans*, sendo necessário para a extensão das hifas (BANERJEE *et al.*, 2008). Quando UME6 é excluído, há uma pequena redução no biofilme de *C. albicans*, o que significa que esse gene tem um menor papel no desenvolvimento do biofilme (HOLLAND *et al.*, 2014). Uma sumarização dos fatores moleculares envolvidos no processo de formação de biofilme pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Rede regulatória de genes envolvidos nos diferentes estágios de formação de biofilme



Fonte: Adaptado de ARAÚJO et al (2017).

Notas: Rede regulatória de genes envolvidos nos diferentes estágios de formação de biofilme em *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*. Inicial adesão (A); Formação da camada basal (B); Biofilme maduro composto de células com diversas morfologias e matriz extracelular polimérica (C); Desprendimento e dispersão celular a partir do biofilme maduro (D).

Apesar de todas as espécies de *Candida* apresentarem genes reguladores similares em cada estágio de formação de biofilme, são poucas as informações sobre as espécies não-*C. albicans*, o que dificulta a comparação entre elas. No entanto, é possível enfatizar que os genes ALS estão envolvidos no processo de adesão tanto em *C. albicans* quanto em *C. parapsilosis*. Além de que, alguns fatores de transcrição descritos como envolvidos na formação de biofilmes de *C. albicans* (BCR1, EFG1 e HWP1) são igualmente relacionados a formação de biofilme em *C. parapsilosis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de adesão e produção de biofilme de isolados clínicos de *Candida parapsilosis* stricto sensu provenientes de isolados clínicos do Hospital Universitário de Londrina em biomateriais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a adesão e formação de biofilme por isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu provenientes de sangue, sangue via cateter, ponta de cateter e secreção traqueal, em placas de poliestireno e elastômero de silicone de isolados;
- b) Analisar a adesão e formação de biofilme por *Candida parapsilosis* stricto sensu provenientes de sangue, sangue via cateter e ponta de cateter, em cateteres de Vialon®, Silicone, Teflon e Poliuretano.

4 ARTIGO A

ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU EM SUPERFÍCIES DE POLIESTIRENO E ELASTÔMERO DE SILICONE

ADHESION AND BIOFILM PRODUCTION BY CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU ON SURFACES OF POLYSTYRENE AND SILICONE ELASTOMER

RESUMO:

Infecções por *Candida parapsilosis* stricto sensu estão atualmente associadas à habilidade de formação de biofilmes, sendo a segunda espécie mais comumente isolada em infecções sanguíneas. A aderência à materiais abióticos é um fator de virulência com importante papel na patogênese das infecções por espécies de *Candida*. Além disso, é a primeira etapa do desenvolvimento de biofilmes e que tem importante repercussão clínica devido à sua maior resistência aos antifúngicos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme por isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu em superfícies de silicone e poliestireno. Os isolados foram obtidos a partir de quatro locais de infecção diferentes, sangue, sangue via cateter, ponta de cateter e secreção traqueal, e foram analisados quanto à adesão e formação de biofilme por quantificação de biomassa total (CV) e a atividade metabólica (XTT). Tanto a adesão como a formação de biofilme pelas células de *C. parapsilosis* stricto sensu foram variáveis dependendo dos locais de isolamento, bem como nas diferentes superfícies testadas, indicando assim que não existe um padrão específico de adesão e formação de biofilme. Os resultados dessas análises sugerem uma base para novos estudos utilizando elastômero de silicone para verificar a formação de biofilme, uma vez que é mais confiável por ser um material utilizado em vários dispositivos na prática médica.

Palavras-chave: Adesão, Biofilme, *Candida parapsilosis* stricto sensu, elastômero de silicone.

ABSTRACT:

Infections by *Candida parapsilosis* stricto sensu are currently associated to the ability of biofilm formation, being the second most commonly isolated species in blood infections. Adhesion to abiotic materials is a virulence factor with role in the pathogenesis of *Candida* infections. Besides, it is a first stage of the biofilms development that has important clinical repercussions due to their increased resistance to antifungals. The aims of this study was to evaluate the ability of adhesion and biofilm formation by clinical isolates of *C. parapsilosis* stricto sensu on silicone and polystyrene surfaces. The isolates were obtained from four different infection sites, and using the test for quantification of biomass (CV) and to measure the metabolic activity (XTT), adhesion and biofilm formation were analyzed. Both adhesion and biofilm formation by *Candida parapsilosis* stricto sensu cells were variable depending on the isolation sites as well as on the different surfaces tested, thus indicating that there is no specific pattern of adhesion and biofilm formation. The results of these analyzes may provide

a basis for further studies using the silicone elastomer to verify the formation of biofilm, since it is more reliable for being a material used in various devices in medical practice.

Key words: *Candida parapsilosis* stricto sensu, Biofilm, Adhesion, Silicon elastomer.

1 INTRODUCTION

Over the last decades *Candida parapsilosis* has become the second most isolated pathogen in blood cultures, overcoming *Candida albicans* in some hospitals¹⁻⁴. According to Costa *et al.* (2014)², in a study conducted at the University Hospital of State of Londrina (HU / UEL), *C. parapsilosis* was the second most isolated species in blood cultures and prevalent in tracheal secretion.

Candida parapsilosis was previously divided into groups I, II and III based on observed genetic differences. Tavanti *et al.*⁵ (2005), have show that these groups presented sufficient phenotypic differences, so groups II and III were designated *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* respectively, and group I as *C. parapsilosis* stricto sensu, the most prevalent in blood infections among non-*Candida albicans* in several Brazilian locations⁴.

Some infections may thrive due to the ability of *Candida parapsilosis* stricto sensu to adhere to medical devices, and also because of its propensity to colonize the skin of healthy individuals, which mainly facilitate bloodstream infections associated with parenteral access and the presence of intravascular devices⁶⁻⁸.

Biofilms are complex fungal communities usually associated to the abiotic surface embedded by an extracellular matrix. Biofilm formation is an important virulence factor, since it confers significant antifungal tolerance, and protects the yeast cell from the host's immune system, whereby the biofilms themselves are reservoirs for persistent infections⁹⁻¹³.

Biofilm formation involves a sequence of events: the first is *Candida* species is its adhesion to the host or on abiotic surfaces of medical devices, often leading to biofilm formation^{14,15}. Thus, adhesion is an extremely important virulence factor in the infection process, and the degree of adhesion may be dependent on yeast cell or even surface properties of abiotic materials such as hydrophobicity and / or surface roughness^{16,17}.

C. parapsilosis biofilms form after the adherence of free floating cells suspension to a surface, this process takes 1-2 hours^{18,19}. *C. parapsilosis* stricto sensu biofilms presents a simple and not very thick architecture, and are observed as monolayers and aggregates of yeasts, besides presenting differentiated morphologies in pseudohyphas^{20,21}.

Considering that several types of *C. parapsilosis* stricto sensu infections may be related to the formation of biofilms, there are few studies that focus on the ability of these microorganisms to adhere to different surfaces. Thus, this study aims to evaluate the adhesion and biofilm formation ability of clinical isolates of *Candida parapsilosis* stricto sensu from different anatomical sites, using silicone elastomer, commonly present in medical devices, and polystyrene, which is normally used in studies of microbial biofilm formation, including *Candida parapsilosis* stricto sensu

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 ISOLATES OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU

Forty one clinical isolates (table 1) of *Candida parapsilosis* stricto sensu, isolated from blood, catheter blood, catheter tip and tracheal secretion were used in the present study. The isolates were obtained from clinical isolates in the University Hospital of the Londrina, Paraná state, Southern Brazil.

Table 1 - *C. parapsilosis* stricto sensu samples and their respective isolation sites

Isolation sites	<i>n</i>	Samples
Blood	14	82.12
		163.12
		188.12
		225.12
		228.12
		232.12
		252.12
		255.12
		309.12
		322.12
		07.13
		96.13
		200.13
		219.13
Catheter blood	5	53.12
		498.12
		83.13

		203.13
		220.13
		27.10
		118.06
		76.07
		85.07
		198.07
		08.10
Catheter tip	12	168.10
		96.12
		460.12
		13.13
		223.13
		241.13
		05.12
		15.12
		97.12
		124.12
		140.12
Tracheal secretion	10	462.12
		53.13
		104.13
		303.13
		644.13

PCR identification was carried out in order to identify all clinical isolates assayed as belonging to the genus *Candida*. PCR was using species-specific forward primers (ITS1 and ITS2) corresponding to intergenic spacer regions and ITS4 as universal reverse primer located at the 26S rDNA. Identity of species belong to *C. parapsilosis* stricto sensu was obtained by primers for URA3 gene (orotidine-50-phosphate decarboxylase) (F: 5'- AGA CTT GGG TAT TAC GTT GT-3' e R: 5'- CAG GAG TCA TGA TTA CCC-3')⁵.

2.2 ADHESION AND BIOFILM FORMATION

A) Silicone elastomer

Adhesion and biofilm formation on silicone surface were evaluated as described by Estivill *et al.* (2011)²⁰ with modifications. The silicone elastomer is presented as

silicone sheets, consisting of homogeneous, translucent and a smooth surface silicone, thickness of 0.1 cm, measuring 10 cm x 10 cm.

The silicone sheet was cut into 0,5cm² fragments and sterilized by immersion in 0,5% hypochlorite during 3 minutes, then washed in 100ml of deionized water during 10 minutes and dried by UV light for 15 minutes each side. These fragments were plated in 96-well plate containing 200 µl of the standard suspension 10⁷UFC/mL of RPMI cells supplemented with 2% glucose and maintained 90 minutes at 37 °C at 1,60g to allow cell adhesion to the material. Concomitantly, another plate was maintained 72 hours under the same culture conditions, been performed as duplicates assays. After each incubation period, the fragments were washed three times with 1 ml sterile PBS to remove not adhered cells²¹.

B) Polystyrene

96-well polystyrene plate were used by adding 200 µL of standardized suspension cells 10⁷ UFC/mL in RPMI medium supplemented with 2% glucose, and maintained for 90 minutes at 37°C at 1,60g. to allow cell adhesion in to material. Concomitantly, another plate was maintained for 72 hours under the same culture conditions, been performed as duplicates assays, according to Nweze *et al.* (2012)²².

2.3 EVALUATION OF METABOLIC ACTIVITY OF BIOFILM (XTT)

The biofilm cells metabolic activity was evaluated using the colorimetric assay resulting from reduction of the 2,3 bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5 - [(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolohydroxide) (XTT) (Sigma-Aldrich, Madrid Spain) by mitochondrial dehydrogenase in orange formazan compound, this coloration obtained is directly proportional to mitochondrial activity and cell viability.

The XTT was dissolved in PBS at a final concentration of 1mg/mL, subsequently filtered in 0.22µm membrane and stored in a freezer. The XTT was thawed and mixed to a 0.4mM menadione solution, at a volume ratio of 20: 1.

A) Silicone elastomer

After incubation period, the fragments were transferred to a plate containing 158µL of PBS, 40µL of XTT and 2µL of menadione solution. After a 3 hour dark incubation at 37°C, 100 µL solution was transferred to a microtiter plate and the solution color was

measured at 490 nm using a microplate reader as described by Estivill *et al.* (2011)²⁰, with modifications.

B) Polystyrene

After incubation period, the biofilm was washed three times with 1x PBS, and 100µL of the XTT solution was added and incubated for 3 hours at 37°C. An aliquot of 80 µL solution was transferred to a microtiter plate and the solution color was measured at 490 nm using a microplate reader as described by Pierce *et al.* (2008)²³, with modifications.

2.4 DETERMINATION OF TOTAL BIOFILM BIOMASS (CV)

A) Elastomer

After the incubation period, fragments were removed from the plates and washed with PBS buffer to remove the non-adherent cells. The measurement of the total biomass of the formed biofilm, it was stained with violet crystal as described by SILVA *et al.* (2009)¹¹. Aliquots of 200 µl of acetic acid (33%) solution was transferred to a microtiter plate and the solution color was measured at 600nm using a microplate reader as described by Silva *et al.* (2009)¹¹, with modifications and solution absorbance was analysed by ELISA.

B) Polystyrene

After the incubation period, the wells of the microplate were washed with PBS buffer for removal of the non-adherent cells. For the measurement of the total biomass of the formed biofilm was stained with violet crystal as described by Silva *et al.* (2009)¹¹. For this, the cells were washed with PBS and fixed with 200µL of methanol for 15 minutes. The plate was then subjected to drying at room temperature. The cells were stained with 200µl of 1% violet crystal solution for 5 minutes and the wells washed with PBS buffer. For the dye release and subsequent reading, 200 µl of acetic acid (33%) solution was transferred to a microtiter plate and the solution color was measured at 600nm using a microplate reader as described by Silva *et al.* (2009)¹¹, with modifications.

2.5 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

The 5mm fragments of silicone elastomer and polystyrene were placed in 24-well plates and 1000 µL of standard yeast suspension was added in RPMI medium

supplemented with 2% glucose (1×10^7 cells / mL). Plates were incubated for 90 minutes at 37 ° C at 120 rpm. After incubation the fragments were washed gently three times in buffer; The adhered cells were fixed in 3% glutaraldehyde for 18 hours. After fixation, the samples were dehydrated by serial washing of 15 minutes each containing 70%, 80%, 90% and 100% alcohol solutions. The samples were dried in a critical point dryer (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), and finally coated with gold (SputterCoater SDC 050 - BALTEC) and observed in a scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

2.6 ASSESSMENT OF PERCENTAGE OF FILAMENTOUS FORMS

For this analysis, blood isolates (82.12; 252.12; 07.13), tracheal secretion isolates (140.12; 498.12) and catheter tip isolates (27.06; 08.10; 460.12) were randomly selected.

To evaluate the cell differentiation potential of the isolates, cells were recovered from biofilms formed on polystyrene surfaces and on elastomeric surfaces. Cells were removed from both surfaces with 1 ml of phosphate buffer solution and tween 80 [0.05%] under sonication for 1 minute and then the suspension was vortexed for 30 seconds.

In order to estimate the number of differentiated cells in pseudohyphas, we counted 100 cells from each isolate in a hemocytometric chamber. The number of different cell types was converted into percent and the number of cells defined as the average of three experiments performed for each isolate.

2.7 ANALYSYS OF ADHESION PROFILE AND BIOFILM FORMATION

The geometric mean (\pm SD) of adhesion and biofilm production was calculated for each isolate. For each process, the absorbances obtained from isolates of each isolation site were divided into tertiles according to adhesion and biofilm production. This division provided cut-off points for low, moderate and high biomass producers (LPB, MPB and HPB), and low, moderate and high metabolic activity of adhered cells and biofilm (LAM, MAM and HAM). For the evaluation of adhesion and biofilm formation by the isolates, cut-off points were established relative to the absorbance values obtained in the respective assays. For this, the values obtained were divided into tertiles as described by Sherry *et al.* (2014)²⁴.

2.8 STATISTICAL ANALYSES

Statistical analyses were conducted using the Prism 6 for Windows, version 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.). Normal distribution was tested using D'Agostino Pearson omnibus and Shapiro-Wilk tests. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for parameters with normal distribution and median and interquartile range (IQ3–IQ1) for data with non-normal distribution. Mann–Whitney U test was used for comparisons. A two-sided $p < 0.05$ was considered significant.

3 RESULTS

Biomass production and metabolic activity of the cells in each material were measured by the XTT and CV procedures, respectively, shown in Table 2. Adhesion and biofilm production by *C. parapsilosis* stricto sensu isolates were variable according to the specific sites as well as on the different surfaces analyzed, indicating the absence of a specific adhesion and biofilm formation pattern for *Candida parapsilosis* stricto sensu in polystyrene and silicone elastomer.

3.1 ISOLATES CLASSIFICATION ACCORDING TO ADHESION ABILITY IN SURFACES BY CUT-OFF POINTS

The absorbance values relating to metabolic activity and total biomass allowed the classification in: (1) [LPB < 0.394 ; MPB $0.394 - 1.183$; HPB > 1.183] and (LAM < 0.364 ; MAM $0.364 - 1.093$; HAM > 1.093) for polystyrene surface, and (2) [(LPB < 0.39 ; MPB $0.39 - 1.17$; HPB > 1.17) and (LAM < 0.18 ; MAM $0.18 - 0.54$; HAM > 0.54) for silicone elastomer surface.

According to total biomass classification (Fig. 1A and B), the analyzed isolates had greater adhesion in silicone elastomer than in polystyrene, but the blood isolates from catheter vial, 60% had HBF in polystyrene and in MBF elastomer. Most of the blood isolates were HBF (64%) or LBM (22%) on the elastomer surface; on the other hand, in polystyrene, the same isolates showed the same frequency of HBF and MBF (43%). Among the catheter-tip isolates, predominance of MBF (58%) was observed on the elastomer surface, whereas on the polystyrene surface there was mainly HBF isolates (58%).

On the polystyrene surface (Fig. 2A), tracheal secretion isolates showed significantly higher adhesion to catheter-tip isolates ($p < 0.01$) as well as blood ($p < 0.05$). On the surface of silicone elastomer (Fig. 2C), the isolates showed no significant adhesion.

The adhesion ability on both silicone elastomer and polystyrene (Fig. 1C and D), revealed mainly HAM (64 and 63%), based on metabolic activity. The HAM was also significant in silicon elastomer with blood isolates (42%) and catheter tip (67%), whereas the other isolates had predominance of MAM in the same surface.

In the polystyrene surface, cell viability demonstrated that tracheal secretion isolates obtained significantly superior adhesion than catheter ($p < 0.05$) and blood ($p < 0.05$) isolates, and blood isolates from catheter vial was superior than catheter tip ($p < 0.05$) and blood ($p < 0.05$). In the silicone elastomer, catheter tip and blood stream isolates showed greater adhesion ($p < 0.05$) than in polystyrene.

As observed at the ultrastructural level using scanning electron microscope (SEM), the topography of the silicone elastomer (Fig. 3A) reveals a rough surface and presence of small depressions, different from those observed for the polystyrene surface (Fig. 3B), which revealed a uniform aspect. These differences may explain in part the adhesion profiles obtained.

Differences in cell adhesion quantification in silicone elastomer were demonstrated (Figure 4), represented of blood isolates. Figure 4A demonstrates an isolate with LPB and LAM, and Figure 4B shows an isolate with HPB and HAM. The electromicrophotography demonstrates adhered yeast cells on the surface of silicone elastomer forming monolayers.

3.2 ISOLATES CLASSIFICATION REGARDING BIOFILM FORMATION IN SURFACES BY DIFFERENT CUT-OFF POINTS

Biofilm formation percentage in polystyrene was calculated according to the different cut-off points state for total biomass (LPB < 0.545 ; MPB $0.545 - 1.636$; HPB > 1.636); and metabolic activity (LAM < 0.353 ; MAM $0.353 - 1.06$; HAM > 1.06). In silicon elastomer, the cutoff points were (LPB < 0.76 , MPB $0.76 - 2.29$, HPB > 2.29) relative to total biomass, and (LAM < 0.24 , MAM $0.24 - 0.73$; HAM > 0.73) according to metabolic activity.

In both polystyrene and silicone elastomer (Fig 5 A and B), there was predominance of HBF to biofilm formation quantified by total biomass. In the polystyrene surface (Fig. 6A and C), blood isolates from catheter vial showed significantly higher biofilm

formation than catheter-tip isolates ($p < 0.05$). In case of silicone elastomer (Fig. 6B and D), only the blood isolates showed a higher significant biofilm formation in catheter-tip isolates ($p < 0.01$)

Regarding metabolic activity, biofilm formation in silicone elastomer (Fig. 6D) revealed predominantly HAM isolates (60%), and MAM (46%) in polystyrene surface (Fig 6 C).

Biofilm formation according to cell viability on polystyrene surface (Fig 6C) was significantly superior for tracheal secretion isolates ($p < 0.05$) and catheter tip ($p < 0.05$). In case of silicone elastomer (Fig. 6D), only isolates of tracheal secretion ($p < 0.01$) showed a significantly higher biofilm formation.

3.3 EVALUATION OF CELLULAR DIFFERENTIATION IN RECOVERED CELLS FROM BIOFILM OF POLYSTYRENE AND SILICONE ELASTOMER SURFACES

In this experiment, 8 isolates obtained from different sites were used: 3 samples of blood, 2 samples of catheter tip, 2 samples of tracheal secretion and 1 isolate of blood from catheter vial.

As shown in Figure 7, there was a difference between the percentage of cell differentiation in biofilms formed in polystyrene and in silicon elastomer. In silicon, less than 10% of pseudohyphae were observed among cells that constitute the biofilm, whereas in polystyrene, up to 45% of pseudohyphae were observed.

4 DISCUSSION

In *Candida* species, such as *Candida parapsilosis* stricto sensu, the increased potential for adhesion and biofilm formation is of note, thus causing serious infections due to the use of medical devices such as catheters. Patients infected by strong biofilm-forming isolates have a worse prognosis²⁵.

In vitro, the gold method for the study of microbial biofilm comprises the use of 96-well plates made of polystyrene. In this study, in addition to polystyrene plates, it was used silicone elastomer sheets, which are present in many medical devices, such as long-term devices, including central and urinary catheters. All the isolates analyzed were able to adhere to the silicone, which agrees with results obtained in several previous studies^{21,26,27}.

However, it is important to note, that blood isolates had a higher degree of heterogeneity, both in adhesion and in biofilm formation, in comparison to other sites, also varying in the two analyzed materials, as seen in previous studies²¹. The results may reflect physiological differences among the isolates, suggesting the pathogenic potential of each isolates.

Microstructure analysis (SEM) provided useful information about the adhered cells into this surface, as well as adhesion pattern. A localized pattern could be observed, with an involvement of cell clusters adhered to specific regions of the silicone elastomer, as concave regions of the surface. It is also observed the presence of blastoconidia of *C. parapsilosis* stricto sensu, as well as some differentiated cells in pseudohyphae, the same observation found by Tumbarello *et al* (2014)²⁵, which demonstrated abundant number of blastoconidia and some pseudohyphae on polystyrene surface.

Cell adhesion process to the abiotic surface appears to be isolated-dependent, since a higher percentage of APB in blood isolates (36%) was observed in total biomass data, even when the tertiles were calculated according to each isolation site, as shown in Figure 1A. Silva *et al.* (2010)²¹ describe that adhesion on the elastomer surface is isolated-dependent, since different adhesion levels were obtained comparing the different sites analyzed.

The predominance of total biomass producers during cell adhesion in both surfaces was verified, but the absence of lower producers was only found on elastomer surfaces in blood isolates from catheter vial, catheter tip and tracheal secretion. In contrast to the metabolic activity analysis, where an absence of LAM was shown only in blood isolates from catheter vial, total biomass was predominant in silicone elastomer surface, blood, blood from catheter vial and tracheal secretion on polystyrene surface.

Interesting, more than 40% of the isolates presented high values of metabolic activity (viable cells) on polystyrene surface, whereas less than 10% high biomass production was seen on the same surface, analyzing the adhesion of *Candida parapsilosis* stricto sensu cells, demonstrating a high amount of adhered cells in metabolic activity in polystyrene surface.

The analysis between the two surfaces showed a significant difference in the quantification of biomass and metabolic activity, thus indicating the absence of a specific according to the isolation site (Figure 1)

Cell differentiation on the surfaces tested identified a pattern of pseudohyphae, which can occur during the germinating. A failure occurs in the separation from

the mother cell during elongation, which produces prolonged filaments and maintains the constrictions at the septum junctions, with a quite variable length. The pseudohyphae filaments may consist of elongated cells that are similar to hyphae, however, there are differences between the mode of growth of hyphae and pseudohyphae. It should be noted that there are no reports in the literature regarding the percentage of pseudohyphae of *C. parapsilosis* stricto sensu on the surfaces tested, in particular the silicon elastomer.

It should be noticed that there are no reports within the literature regarding the percentage of pseudohyphae of *C. parapsilosis* stricto sensu on the tested surfaces, especially the silicone elastomer one, due to its wide use mainly in long-stay devices such as central intravenous catheter and urinary catheter.

Although few studies have been conducted described the biofilm of *C. parapsilosis* stricto sensu, the literature demonstrates that biofilm of this yeast is a dense network of blastoconidia with irregular cell and pseudohyphatic clusters, as reported in previous studies^{28,29}. They were associated with the higher amount of biomass in specific isolates as well a higher metabolic activity, mainly on the surface of silicone elastomer, showing the high affinity of *Candida parapsilosis* stricto sensu cells by the surface of silicone elastomer.

According to Tumbarello *et al.* (2014)²⁵, *C. parapsilosis* was characterized as a moderate biofilm formation yeast, by metabolic activity and biomass. In this study, most of the isolates were obtained and described as high biofilm producers in the two analyzed surfaces.

C. parapsilosis stricto sensu is an opportunistic pathological agent, with medical importance due its high incidence. In vitro studies have made great progress in elucidating factors that favor its pathogenesis, and adhesion and biofilm formation have been well described. There are several studies that clearly detail the importance of *C. parapsilosis* in several sites of infection such as candidemia and urinary tract infection in immunocompromised patients.

Once silicon elastomer is a biomaterial used in various devices in medical practice, studies of adhesion and biofilm production by candida species could be of importance, according to the methodologies employed. Since both procedures have been used in several literatures demonstrating the complementarity of these methodologies, they may be able to identify different parameters, thus supporting the use of combined methodologies for the study of adhesion and biofilm production of *C. parapsilosis* stricto sensu.

Moreover, the metabolic activity of biofilm in our study did not correlate with biofilm biomass for all strains tested. As pointed out earlier, differences between metabolic activity and biomass results have important implications for biofilm studies (Kunh *et al.*, 2003), and demonstrated that metabolic measurements based on XTT activity are insufficient to qualify biofilms and should be combined with biomass and microscopic analyses for comparisons across different strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by PROPPG/Uel-Brazil. A.T.S-A was fellowship holder of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Brazil.

REFERENCES

1. NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis.**, v. 51, p.561-570, 2010.
2. COSTA, V.G. *et al.* Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v.178, p.243-250, 2014.
3. KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. **N Eng J Med.**, v. 373, p.1445-56, 2015
4. COLOMBO, A. L.; MATTA, D.A.; SOUZA, A. C. R. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal of Fungi.**, v.3, p.24-38, 2017.
5. TAVANTI, A. *et al.* *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **J of Clin Microbiol.**, v.43, p. 284-292, 2005.
6. NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Curr Opin Microbiol.**, v.4, p.340-345, 2006.
7. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev.**, v.20, p.133-163, 2007.
8. VAZ, C. *et al.* Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. **Diagn Microbiol Infect Dis.**,v.71, p.159-162, 2011.
9. JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerg Infect Dis.**, v.10, p.14-19, 2004.
10. NETT, J. E.; ANDES, D. Review of Techniques for diagnosis of catheter-related *Candida* biofilm infections. **Current Fungal Infect Rep.**, v.2, p.237-243, 2008.

11. SILVA, S. *et al.* Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol.**, v.47, p.681-689, 2009.
12. SILVA, S. *et al.* Adherence and biofilm formation of non- *Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol.**, v.19, p.241-247, 2011.
13. TREVIÑ-RANGEL, R. J. *et al.* Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. **Rev Iberoamericana de Micol.**, v.32, p.1130-1406, 2015.
14. CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 5385-5394, 2001.
15. NOBILE, C. J. *et al.* A recently evolved transcriptional net-work controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell.**, v.148, p. 126-138, 2011.
16. HENRIQUES, M. *et al.* Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. **Biotechnol letters.**, v.24, p.1111-1115, 2002.
17. SOUSA, C.; HENRIQUES, M.; TEIXEIRA, P. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. **Inter J Biomater.**, v.1. p.1-10, 2009.
18. SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T.W. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro. **Arch Oral Biol.**, v. 26, n.10, p.815–820, 1981.
19. SAMARANAYAKE, L. P. *et. al.* Oral disease in the elderly in long-term hospital care. **Oral Diseases.**, v. 1, p.147-151, 1995.
20. LAFFEY, S.F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiol.**, v.151, p.1073-1081, 2005.
21. ESTIVILL, D. *et al.* Biofilm formation by Five species of *Candida* on three clinical materials. **J of Microbiol Methods.**, v.86, p.238-242, 2011.
22. SILVA, S. *et al.* Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **J of Medical Microbiol.**, v.59, p.747-754, 2010.
23. NWEZE, E. *et al.* Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.149-153, 2012.
24. PIERCE, C.G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocol.**, v.3, p.1494-1500, 2008.

25. SHERRY, L. *et al.* Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. **BMC Microbiol.**, v.14, p.182-196, 2014.
26. TUMBARELLO, M. *et al.* Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One** **7.**, v.7, p.1-9, 2012.
27. BUSSCHER, H. J.; GEERTSEMA DOORNBUSCH, G. I.; VAN DER MEI, H. C. Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. **J Biomed Mater Res.**, v.34, p.201-209, 1997.
28. TAMURA, N. K.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathol.**, v.156, p.269-272, 2003.
29. KUHN, D. M. *et al.* Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**, v.70, p. 878-888, 2002.
30. BIZERRA, C. F. *et al.* Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.**, v.8, p.442-450, 2008.

Table 2. Adhesion and biofilm formation in elastomer and polystyrene of *Candida parapsilosis* stricto sensu measured by metabolic activity and biomass expressed as geometric mean \pm SD and range, at cell adhesion (90 min) and biofilm (72 hours)

Elastomer						
Site	<i>n</i>	Biomass Total (GM\pmSD / Range)		Metabolic Activity (GM\pmSD / Range)		
		90 min	72 hour	90 min	72 hour	
Blood	14	0,821 \pm 0,219 / 0,518 - 1,288	1,177 \pm 0,806 / 0,449 - 3,084	0,480 \pm 0,153 / 0,150 - 0,689	0,321 \pm 0,246 / 0,068 - 0,778	
Catheter blood	5	0,638 \pm 0,246 / 0,411 - 1,044	1,326 \pm 1,091 / 0,491 - 2,914	0,471 \pm 0,272 / 0,256 - 0,877	0,633 \pm 0,650 / 0,132 - 1,495	
Catheter tip	12	0,821 \pm 0,219 / 0,518 - 1,288	1,177 \pm 0,807 / 0,449 - 3,084	0,480 \pm 0,153 / 0,150 - 0,689	0,321 \pm 0,246 / 0,068 - 0,778	
Tracheal secretion	10	0,947 \pm 0,323 / 0,566 - 1,69	1,444 \pm 1,312 / 0,505 - 4,302	0,624 \pm 0,114 / 0,454 - 0,780	0,854 \pm 0,387 / 0,291 - 1,459	
All	41	0,788 \pm 0,296 / 0,337 – 1,695	1,534 \pm 1,070 / 0,449 – 4,302	0,360 \pm 0,248 / 0,046 – 0,935	0,492 \pm 0,406 / 0,068 – 1,495	
Polystyrene						
Site	<i>n</i>	Biomass Total (GM\pmSD / Range)		Metabolic Activity (GM\pmSD / Range)		
		90 min	72 hour	90 min	72 hour	
Blood	14	0,305 \pm 0,368 / 0,119 – 1,386	1,120 \pm 0,781 / 0,322 – 2,972	0,705 \pm 0,068 / 0,543 – 0,770	0,572 \pm 0,151 / 0,328 – 0,849	
Catheter blood	5	0,658 \pm 0,305 / 0,303 – 1,034	1,420 \pm 0,173 / 1,228 – 1,666	0,779 \pm 0,052 / 0,717 – 0,833	0,623 \pm 0,075 / 0,546 – 0,717	
Catheter tip	12	0,408 \pm 0,243 / 0,174 - 0,844	0,914 \pm 0,287 / 0,636 – 1,744	0,646 \pm 0,140 / 0,311 – 0,766	0,418 \pm 0,261 / 0,119 – 0,806	
Tracheal secretion	10	0,808 \pm 0,393 / 0,354 – 1,492	0,959 \pm 0,427 / 0,453 – 1,603	0,707 \pm 0,133 / 0,412 – 0,811	0,752 \pm 0,107 / 0,458 – 0,833	
All	41	0,789 \pm 0,406 / 0,119 – 1,492	1,091 \pm 0,415 / 0,322 – 2,972	0,729 \pm 0,118 / 0,311 – 0,833	0,707 \pm 0,118 / 0,119 – 0,849	

Figure 1. Percentage of adhered cells in isolates obtained from different sites classified according to biomass and metabolic activity on polystyrene (A) and (C) and on silicone elastomer (B) and (D).

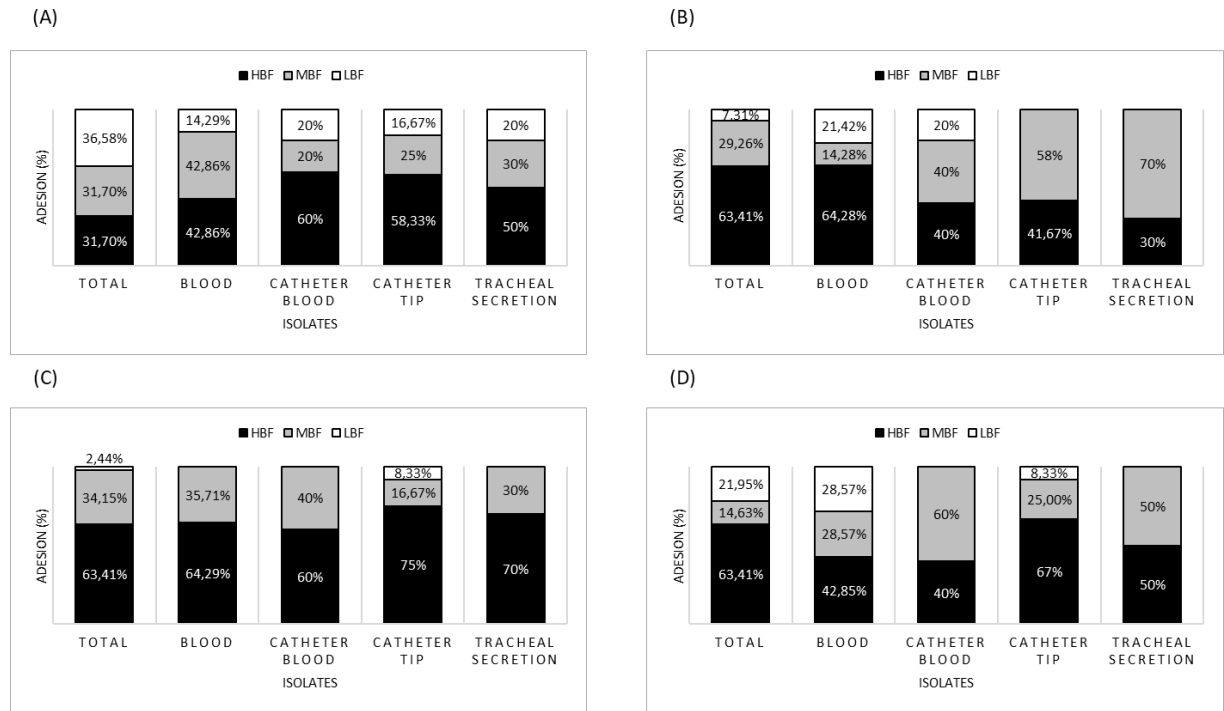


Figure 2. Comparison of the means of adhesion through biomass (A) and (B) and cell viability (C) and (D) between different insulation sites, polystyrene (A) and (C) and silicone elastomer (B) and (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

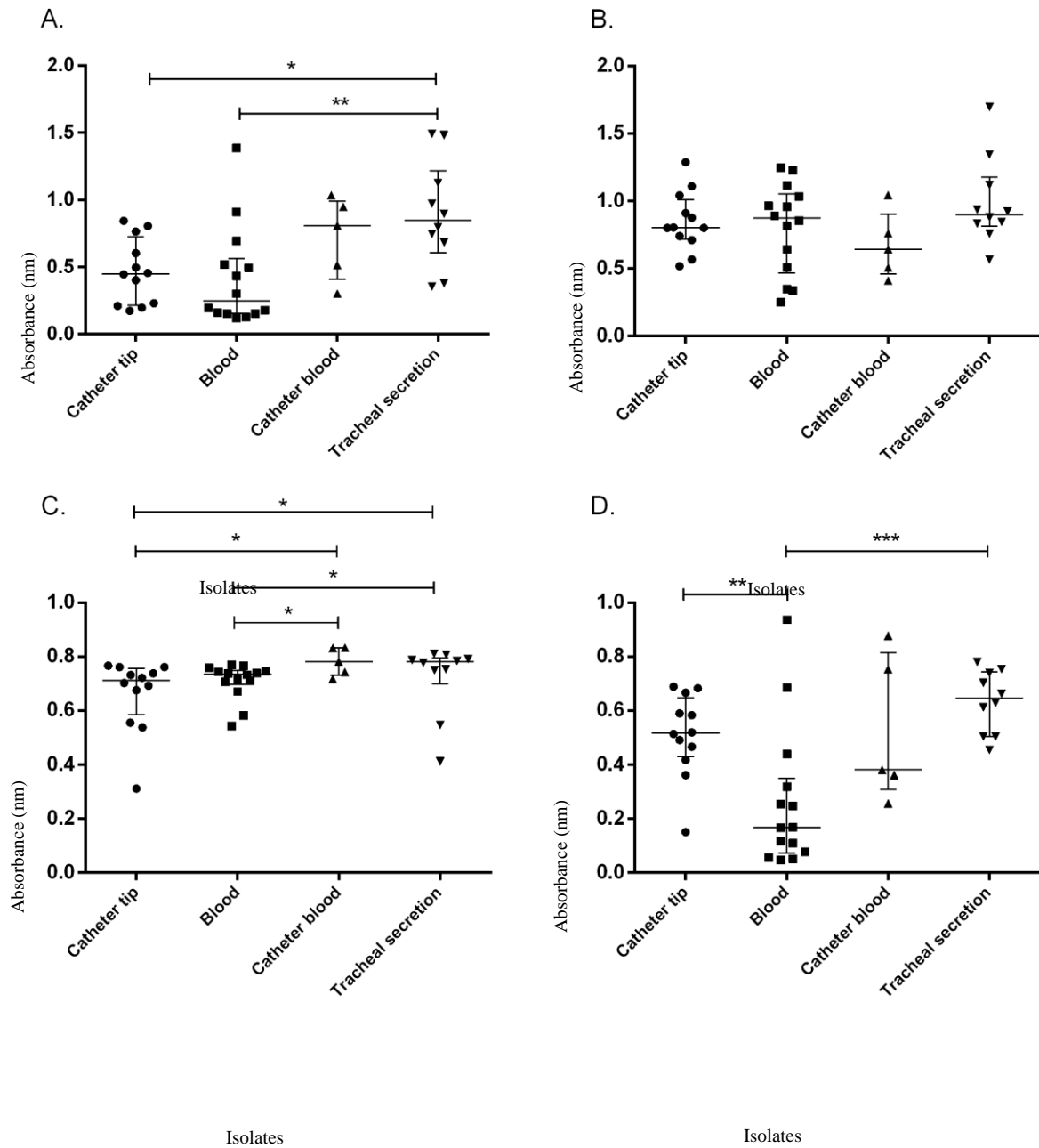


Figure 3 – Topography of the elastomer silicone (A) and polystyrene (B) analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM)

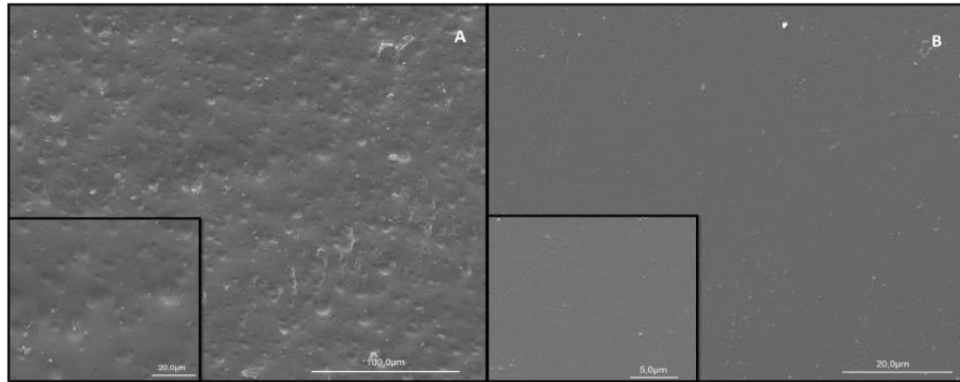


Figure 4. Electron micrograph of scanning of *Candida parapsilosis* stricto sensu adhesion in silicone elastomer from low blood isolate producing biomass and metabolic activity (A) and high biomass producer and metabolic activity (B).

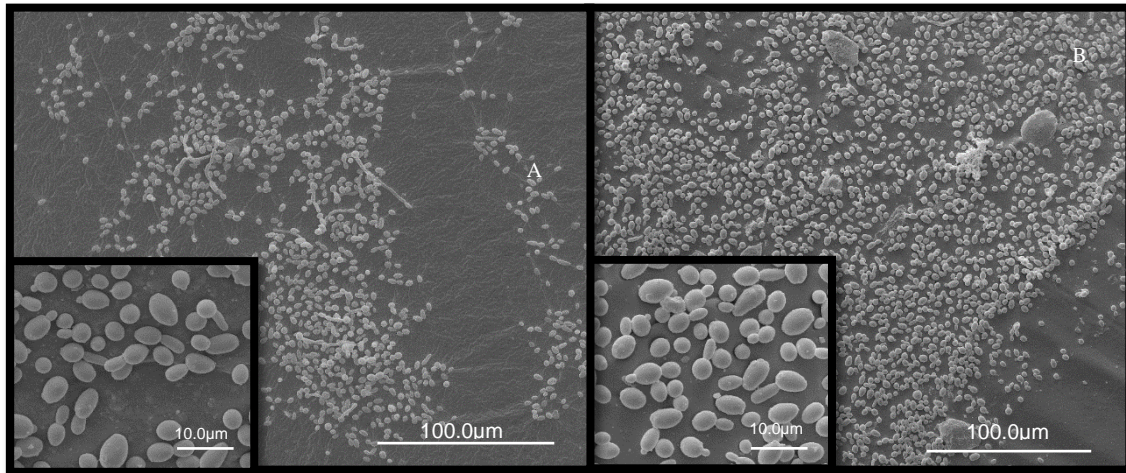


Figure 5. Percentage of Biofilm formation of isolates from sites classified according to biomass and metabolic activity of the biofilm on polystyrene (A) and (C) and silicone elastomer (B) and (D).

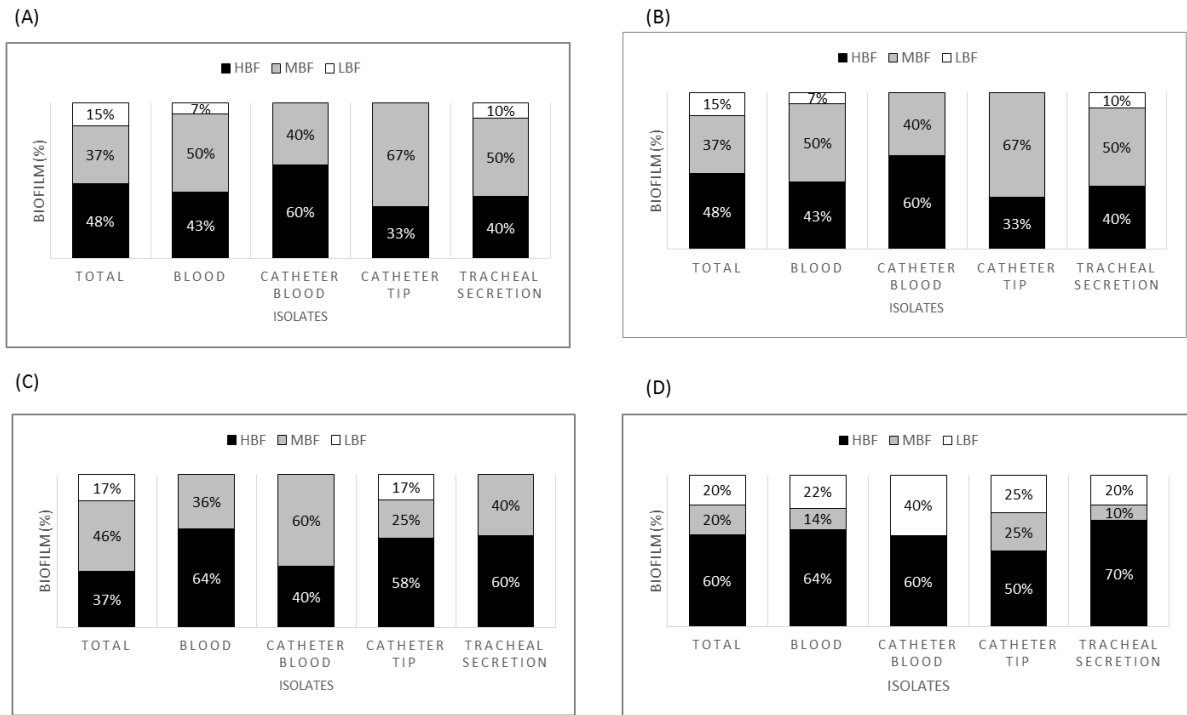


Figure 6. Comparison of the means of biofilm formation through biomass (A) and (B) and metabolic activity (C) and (D) between different insulation sites, polystyrene (A) and (C) and silicone elastomer (B) and (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

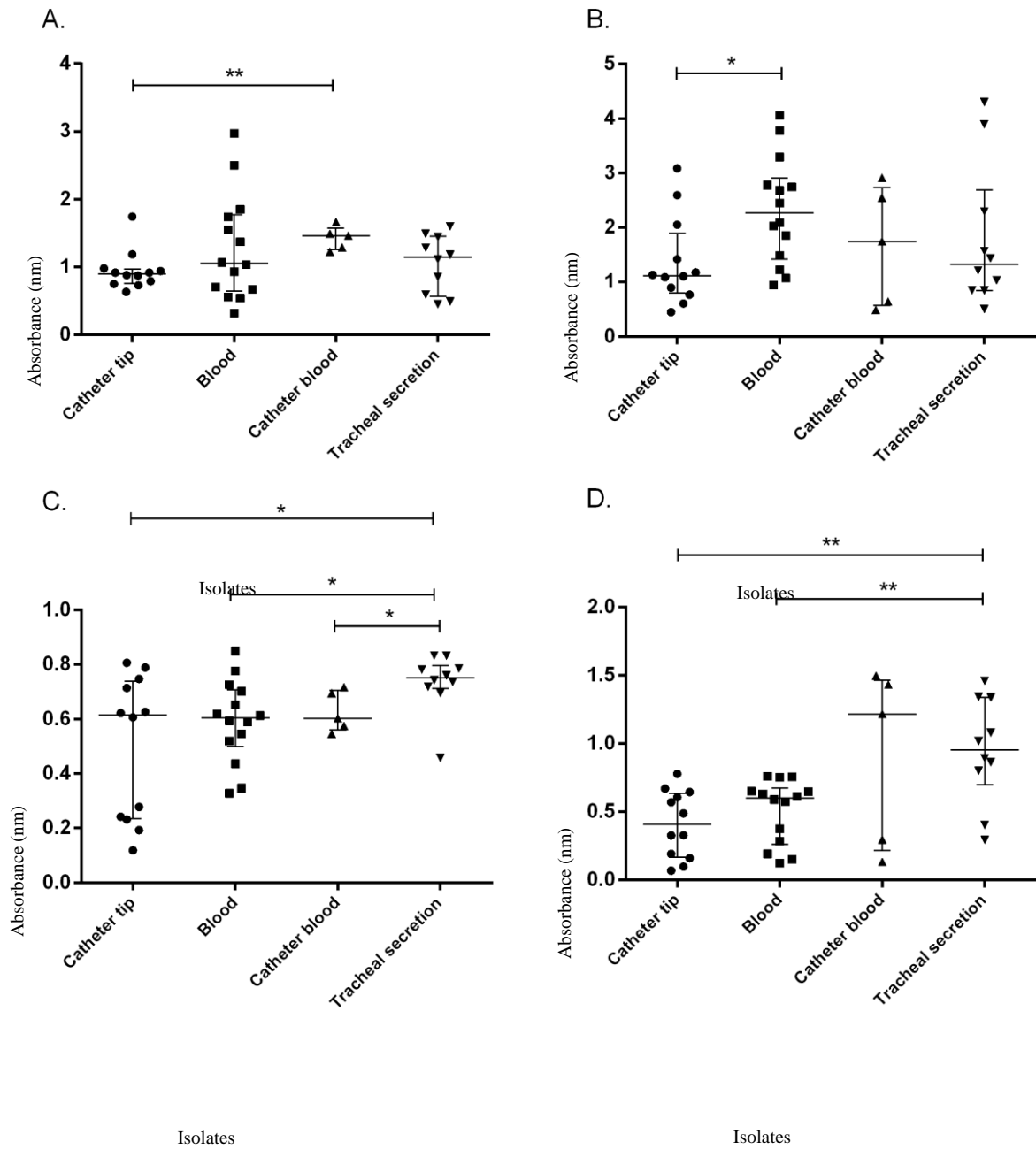
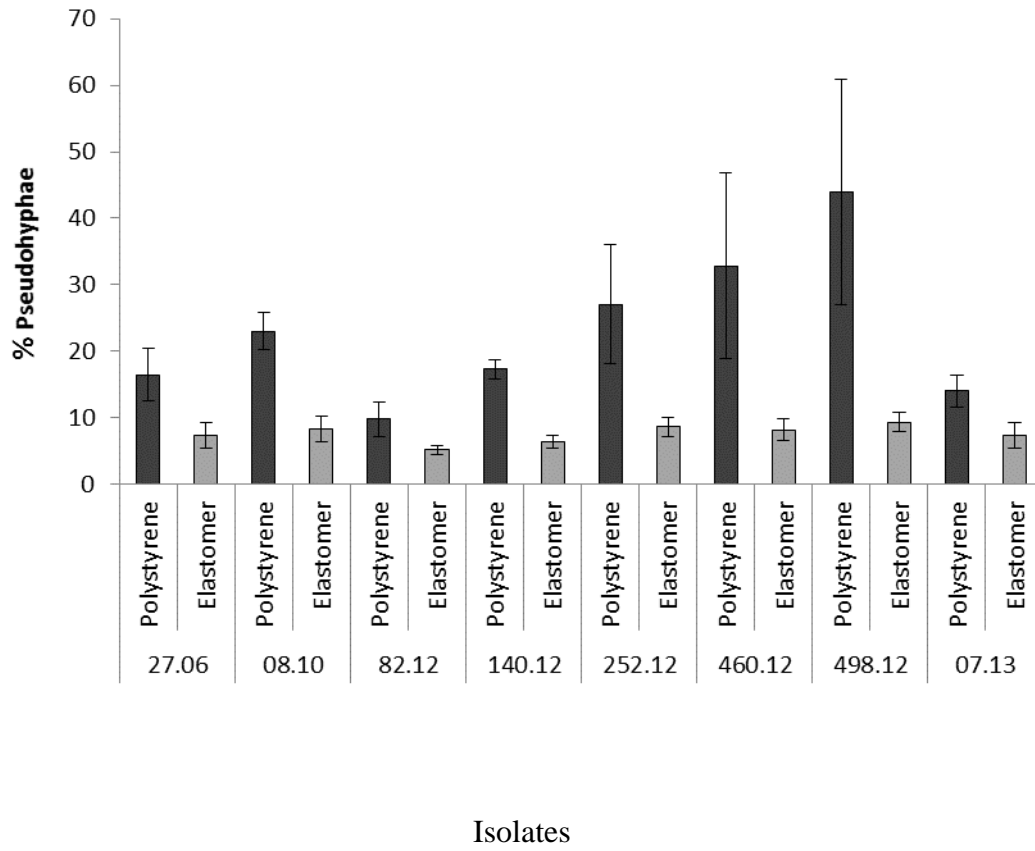


Figure 7. Percentage of pseudohyphae in cells recovered from biofilm formed on polystyrene surface and silicone elastomer



5 ARTIGO B

O artigo B “ADHESION AND BIOFILM PRODUCTION BY CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU IN DIFFERENT MEDICAL DEVICES” está em construção.

ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU EM DIFERENTES DISPOSITIVOS MÉDICOS

ADHESION AND BIOFILM PRODUCTION BY CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU IN DIFFERENT MEDICAL DEVICES

RESUMO:

Candida parapsilosis é capaz de aderir e formar biofilme em praticamente qualquer biomaterial implantado em um hospedeiro. As infecções relacionadas a dispositivos intravasculares são frequentemente associadas a biofilmes. Biofilmes são considerados a principal causa de mortalidade em imunocomprometidos e pacientes hospitalizados pois causam infecções recorrentes e invasivas, de difícil erradicação. Isto é devido ao fato de que as células do biofilme apresentam alta resistência ao tratamento com antifúngicos e mecanismos de defesa do hospedeiro, e exibem excelente capacidade de aderir a dispositivos médicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu em aderir e formar biofilme em quatro diferentes dispositivos médicos utilizados na prática clínica. A adesão e formação de biofilmes dos isolados foram analisados utilizando a técnica de viabilidade celular (XTT) nos cateteres de Vialon®, silicone, teflon e poliuretano. Isolados de sangue via cateter demonstraram um alto potencial de adesão em cateteres de poliuretano em comparação com cateter de Vialon® e teflon ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). A viabilidade celular em biofilmes foi igualmente quantificada nos diferentes cateteres, não obtendo diferença significativa ($p > 0,05$). Na análise ultraestrutural (SEM) da adesão foi observada monocamadas em Vialon® e silicone, e multicamadas em teflon e poliuretano, bem como a presença de pseudohifas nos quatro cateteres analisados. O resultado dessas análises fornecem base para futuros estudos permitindo assim o desenvolvimento de novos dispositivos médicos que impeçam a adesão e a formação de biofilmes e reduzam as taxas de mortalidade das candidemias.

Palavras-chave: Adesão, Biofilme, *Candida parapsilosis* stricto sensu, dispositivos médicos, cateteres.

ABSTRACT:

Candida parapsilosis can adhere and form biofilm in virtually any biomaterial implanted in a host. Infections related to intravascular medical devices are often associated with biofilms. Biofilms are considered the leading cause of mortality in immunocompromised and

hospitalized patients as they cause recurrent and invasive infections, which are difficult to eradicate. This is because biofilm cells are highly resistant to antifungal and host defense mechanisms, and exhibit excellent ability to adhere to medical devices. The objective of this study was to evaluate the ability of isolates of *C. parapsilosis* stricto sensu to adhere and form biofilm in four different medical devices used in clinical practice. The adhesion and biofilm formation of the isolates were analyzed using the cell viability technique (XTT) in Vialon®, Silicon, Teflon and Polyurethane catheters. Blood isolates via catheter demonstrated a high potential for adhesion in Polyurethane catheters compared to Vialon® and Teflon catheters ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). The cellular viability in biofilms was also quantified in the different catheters, but without significant difference ($p > 0.05$). In the ultrastructural analysis (SEM) of the adhesion, it was observed monolayers in Vialon® and Silicon, and multilayer in Teflon and Polyurethane, as well as the presence of pseudohyphae in the four catheters analyzed. These results provide the basis for future studies, allowing the development of new medical devices that may hinder adhesion and formation of biofilms, and most importantly, could reduce mortality rates of candidemias.

Key words: *Candida parapsilosis* stricto sensu, Biofilm, Adhesion, Medical Devices, Catheters.

1 INTRODUCTION

Nosocomial infections represent an important question for public health and hospital care. It is estimated that 1.7 million patients present hospital acquired infections and almost 100,000 deaths are registered each year (VARGAS-BLANCO, LYNN *et al.*, 2017). One of its most common causes is the commensal fungi *Candida*, which is responsible for associated bloodstream infections, or candidemia (KAWAI *et al.*, 2017).

The ability of *Candida* to colonize medical devices, such as central lines, venous and tracheal catheters, can potentially leads to severe infection. This contamination may favor to the development of a microbial consortia on device surface, implanted in an extracellular matrix, which is called biofilm (GUO *et al.*, 2017; PIERCE *et al.*, 2017). Moreover, biofilm formation could contribute to long-term persistent infections due to the possibility of evolving to a reservoir of multicellular structures, when interactions between yeast and bacteria build up into mixed biofilms (SEGHIR *et al.*, 2017).

The first step for *Candida* to form a biofilm on medical devices is adhesion, which is determined by cell wall proteins of the pathogen and physicochemical nature of the biomaterial (NUNEZ-BELTRAN, *et al.*, 2017). And in fact, many *Candida* species infections could involve the formation of biofilms on implanted devices, consisted of matrix-enclosed microcolonies of yeasts and hyphae, arranged in a bilayer structure (DOUGLAS, 2003).

The ability to survive to the host immune system, the reduced number of antifungal drugs (SPAMPINATO and LEONARDI, 2013), in addition to the resistance of

organisms associated to biofilms to standard antibiotics, disinfectants or germicides (WEBB, *et al.*, 2003; HOIBY, *et al.*, 2010), increase the potential of these pathogens to cause high morbidity and mortality in catheterized patients. Furthermore, clinically important antifungal agents are much less active against *C. albicans* biofilms, but also, biofilms of non-*C. albicans* species, such as *C. parapsilosis*, are also drug resistant (HAWSER and DOUGLAS, 1995).

Candida parapsilosis is notorious for its capacity to form biofilms on the catheters and other implants devices, for nosocomial spread by hand carriage, and for persistence in the hospital environment. This species is of special concern in critically ill neonates, causing more than on quarter of all invasive fungal infections in low birth weight infants (CLERIHEW, *et al.*, 2007; TROFA, *et al.*, 2008; VAN ASBECK, *et al.*, 2009)

In this context, it is reasonable that *in vitro* analysis of *C. parapsilosis* adherence and biofilm formation could contribute to the understanding of species behavior in a specific infectious process. Thus, the objective of this study was to evaluate and quantify adhesion and biofilm formation in nine clinical isolates of *Candida parapsilosis* sensu stricto in four different biomaterials of medical devices.

2 METHODS

2.1 BIOMATERIALS

Four different types of synthetic materials used in several medical devices were used: Vialon® BD (Catheter 1), Silicon (Catheter 2), Teflon(Catheter 3) and Polyurethane (Catheter 4). 5-mm sections of materials were sterilized by immersion in 0.5% hypochlorite suspension for 3 minutes, washed in 100mL with deionized water for 10 minutes, and dried in UV light for 15 minutes.

2.2 ORGANISMS

Candida parapsilosis sensu stricto strains were isolated from blood (3), catheter blood (3) and intravenous device (3), and maintained as a stock culture from the Fungal Genetics Laboratory, the University of Londrina-Brazil on yeast extract-peptone-D-glucose (YPD) agar at -20°C in glycerol.

2.3 ADHESION AND BIOFILM FORMATION

Three biomaterial fragments were immersed in 1mL RPMI 1640 broth medium supplemented with 2% glucose standardized cell standardized suspension onto each of a 24 well plate, and incubated with shaking at 120 rpm for 90 minutes at 37°C in a shaker. Concomitantly, another plate was maintained for 48 hours in the same conditions. Each experiment was tested in triplicate. After incubation, each biomaterial was washed three times in 1mL sterile PBS to eliminate non-adherent cells (SILVA *et al.*, 2010).

2.4 ADHESION AND BIOFILM QUANTIFICATION

To measure quantity and metabolic activity of biofilm obtained according to the abovementioned procedure, the XTT reduction assay was performed as previously reported (Estivill, Arias *et al.* 2011). Briefly, 100ul of XTT (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 0.5 mg/ml/menadione PBS solution was added to each well containing each biomaterial preformed biofilms. The plates were covered with aluminum foil and incubated at 37°C for 3 h. After incubation and centrifugation at 13,200 rpm for 10 minutes, 100ul of the supernatant solution was removed and placed into a new 96-well plate that was spectrophotometrically read at 492 nm (Bio-Tek L 808). Blank samples were prepared by filling 1 well with 100ul of XTT/menadione solution (ESTIVILL, 2011; NEWEZE, 2012).

2.5 ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS

Pre-formed biofilms of *Candida parapsilosis sensu stricto* cells from strains 53.12 SC, 118.06 PC and 82.12 SG were fixed after filling the wells with a solution of PBS at a 0.1M.L^{-1} concentration adjusted to $\text{pH} = 7$ containing glutaraldehyde at 3% and 1% osmium tetroxide in 0.1M.L^{-1} PBS solution. After incubation, samples were dehydrated by means of serial washings with solutions containing 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, and 100% of ethanol in distilled water; samples were further dried with CO_2 in a critical point dryer (Critical Point Dryer SDC 030 – BALTEC). Finally, materials with biofilm were coated with gold using SDC 050 Sputter Coater (BALTEC). Biofilm structure was visualized with a scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

2.6 DATA ANALYSIS

The mean (\pm SD) biofilm production was calculated for each strain and biomaterial. Data normal distribution were calculated using D'Agostino & Pearson and Shapiro-Wilk normality tests. Pairwise comparisons between groups were performed using unpaired Student *t* test to calculate differences in biofilm production by each strain and biomaterial.

3 RESULTS

3.1 EVALUATION OF ADHESION OF CANDIDA PARAPSILOSIS STRICTO SENSU IN DIFFERENT CATHETERS

As shown in Figure 1, *C. parapsilosis* stricto sensu adhesion properties were independent of the biomaterial catheter in strains obtained from blood and blood catheter vial, whereas *C. parapsilosis* obtained from catheter tip manifested significantly better adhesion properties in polyurethane device, compared to Vialon® BD ($p= 0.015$) and Teflon ($p= 0.008$), but not from Silicon ($p= 0.16$).

Significantly higher *C. parapsilosis* adhesion from isolates of blood catheter vial was observed on Vialon ($p= 0.04$) and Teflon catheters ($p= 0.04$) than on blood and catheter tip isolates, as shown in Figure 2. However, there were not significant adhesion differences when tested isolates were compared in silicon or in polyurethane devices.

3.2 ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF ADHERED CELLS IN DISTINCT MEDICAL DEVICES BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

The topography of the catheters analyzed with SEM revealed a rough surface in Vialon® BD catheters (Fig. 3A), silicon (Fig. 3B) and polyurethane (Fig. 3C), differently from that observed for the Teflon catheter which presents a smooth surface.

Differences in cell adhesion quantification in the different medical devices were demonstrated by SEM (Figure 4), from *C.parapsilosis* blood isolates. Figure 4A represents the Vialon®-BD catheter with few adhered cells when compared to teflon catheter (Fig. 4C) and polyurethane (Fig. 4D). The electromicrophotography demonstrates yeast cells

adhered to the surface of: the Vialon® catheter (Fig. 4A) and in silicon (Fig. 4B), forming monolayers, but forming multilayers in teflon catheters (Fig. 4C), in polyurethane (Fig. 4D), with few pseudohyphae.

3.3 BIOFILM FORMATION BY CANDIDA PARAPSILOSIS IN DIFFERENT CATHETERS

After 48 h, *Candida parapsilosis* stricto sensu formed biofilms in all different biomaterials catheters (Fig. 5). There were no differences regarding biofilm formation between different catheters ($p>0.05$).

When biofilm formation was compared between different origins of *C. parapsilosis* isolates, no significant differences were detected (Fig. 6, $p>0.05$).

3.4 ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF BIOFILM FORMATION IN DISTINCT MEDICAL DEVICES BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

After 48hs, the matured biofilms comprised a dense network of yeasts and pseudohyphae. Extracellular polymeric material (indicated by the arrows in Figure 7) was visible on the surfaces of some of these morphological forms at scanning electron microscopy.

4 DISCUSSION

Biofilm formation on medical devices by *Candida* species is a major cause of the hospital morbidity and mortality (TUMBARELLO *et al.*, 2012). Furthermore, non-*albicans* *Candida* species have been isolated in increasing numbers in patients, and they are able at forming biofilms (TAN, *et al.* 2016). Multiple development stages are normally involved in biofilm formation. Adhesion is the initial stage in pathogen colonization, microbial biofilm formation and subsequent device infection (CHANDRA *et al.*, 2001; DOUGLAS, 2003)

It is known that most candidemias are preceded by colonization of the patient by the same yeast responsible for the infection, however *Candida* spp hematogenous infections can be acquired exogenously through hands of healthcare professionals, especially in patients with vascular catheters (HOTA, B., 2004).

After adhesion, *Candida* biofilm develops until yeasts, pseudohyphae and hyphae are entirely encased in the extracellular polymeric substances (TAMURA *et al.*, 2003; SENEVIRATNE, *et al.* 2008).

During this biofilm development, biofilm may be confronted with necessary adaptations due to changes in different growth conditions, which are crucial for the survival of the microbial communities. However, very little is known about the environmental cues that affect the initial cell-surface and cell-cell interaction (TAN, *et al.* 2016). Therefore, the influence of medical devices surface biomaterials during biofilm development were also evaluated.

The results showed that different medical device surfaces could influence *Candida parapsilosis* sensu stricto cells adhesion. Similar results also have been obtained on *C. albicans* in silicone catheter, where high cell adhesion *in vitro* were detectable (KOJIC, DAROUICHE, 2003). Studies indicated that *C. albicans* and *C. parapsilosis* are also equally potent in their ability to adhere *in vitro* to human buccal epithelial cells and silicone elastomer (PANAGODA, *et al.*, 2001; KUHN, *et al.*, 2002).

In fact, non-*Candida albicans* showed adhesion and hydrophobic properties significantly superior to *C. albicans*. The hydrophobic interactions are involved in the *Candida* adhesion process to the surfaces of host cells (DOYLE *et al.*, 1990). Luo *et al.* (2002) observed an intimate relationship between the adherence of *Candida* species on surfaces and the surface hydrophobicity of these yeasts.

Probably, the surface roughness of medical devices explains the significant difference in adhesion analyses but not in biofilm formation, as the cells adhere rapidly to rough surfaces.

In this work, cell adhesion analysis through SEM in Vialon®, Silicon and Polyurethane surfaces revealed a rough surface, which differed from that of Teflon, which showed a smooth cover. These observations have provided important information on different cell morphology, adhesion and structure of *C. parapsilosis* biofilm, as well as, the analysis of the topography of different catheters analyzed.

Similarly, after 48hs incubation, *Candida parapsilosis* biofilm developed better as well as extracellular material increased. Furthermore, different medical device biomaterials also affect biofilm structure. SEM revealed the presence of a dense network of yeast, pseudohyphae, and extracellular material, which is similar to the results found by Hawser *et al.* (2004), with isolates in a silicone catheter.

Moreover, the metabolic activity of biofilm in our study did not correlate with biofilm biomass for all strains tested. As pointed out earlier, differences between metabolic activity and biomass results have important implications for biofilm studies (Kunh *et al.*, 2003), and demonstrated that metabolic measurements based on XTT activity are insufficient to qualify biofilms and should be combined with biomass and microscopic analyses for comparisons across different strains.

Regarding the use of catheters, scientific advances have been made in the field of polymers and pharmacology to find new solutions to increase durability and fomenting its use. So far it is not possible to determine which biomaterial could significantly reduce the incidence associated with the presence of catheters with systemic infections. In developed European countries, polyurethane catheters are mostly used for short duration procedures, and tunneled silicon catheters for long term hospital admission (Mermel, 2001).

In fact, catheter-associated infections cause high mortality in hospitalized patients. The ability to adhere and form biofilms in medical devices is a potent virulence factor that can make *Candida parapsilosis* infect patients using such device. Bloodstream infection associated with central venous catheter insertion and maintenance is the most critical complication, extending hospitalization and increasing hospital costs.

Furthermore, one of the most important features of *Candida* species biofilms is their resistance to current antifungals. Studies on resistance mechanisms indicate that those drugs have impaired diffusion into biofilms (KUNHN *et al.*, 2002; ESTIVILL *et al.*, 2011; CUELLAR *et al.*, 2012). Indeed, biofilms formed by *C. parapsilosis* display a matrix-antifungal sequestration mechanism of drug resistance (MITCHELL *et al.*, 2013).

By understanding which *Candida* species mechanisms of adherence and biofilm formation are dominant under specific biomaterials, we can hopefully improve the current therapies available and, also, identify novel approaches for treating these resistant infections. New drugs and combinations with medical devices designed to target biofilm-specific mechanisms of resistance may be able to overcome the limitations of current therapeutics and to reduce the mortality rates of candidemias.

REFERENCES

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5385-5394, 2001.

CLERIHEW, L. *et al.* *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v.92, p. 127-129, 2007.

CUÉLLAR, M. C.; VEGA, A. G.; NOVELO, B., M.; LOPEZ, E. R.; RUIZ, E. B.; QINTANAR, M. A. E.; VILLAGOMEZ, J. C. C. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 31, 2513-2527, 2012.

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

DOYLE, R.J.; ROSENBERG M. Microbial cell surface hydrophobicity. **American Society for Microbiology**, v.8, p.881-890, 1990.

ESTIVILL, D. *et al.* Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **J Microbiol Methods**, v.86, p.238-242, 2011.

GUO, D. *et al.* Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 33, p. 1567-1581, 2017.

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

HOIBY, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, p.322-332, 2010.

KAWAI, A.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO H. Time-Lapse Tracking of *Candida tropicalis* Biofilm Formation and the Antifungal Efficacy of Liposomal Amphotericin B. **Jpn J Infect Dis**, v.70, p.559-564, 2017.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to silicone catheters in vitro and vivo. **Clin. Microbiol Infect**, v.9, n.7, p. 684-690, 2003.

KUHN, D. M. *et al.*, Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun.**, v.70, p. 878-888, 2002.

LUO, G., SAMARANAYAKE L.P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.110, p. 601-610, 2002.

MERMEL, L. A. I. *et al.* Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infections Diseases.**, v. 32, p. 1249-1272, 2001.

MITCHELL, K. F. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-albicans *Candida* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.57, n.4, p. 1918-20, 2013.

- NWEZE, E. *et al.* Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.149-153, 2012.
- NUNEZ-BELTRAN, A.; LOPEZ-ROMERO, E.; CUELLAR-CRUZ, M. Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. **Microb Pathog.**, v.107, p.293-303, 2017.
- PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v.44, p. 29-35, 2001.
- PIERCE, C. G. *et al.* The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **J Fungi (Basel)**, v.3, n.1, p.14, 2017.
- SEGHIR, A. *et al.* Infectious risk related to the formation of multi-species biofilms (*Candida* - bacteria) on peripheral vascular catheters. **J Mycol Med.**, v.27, p.20-27, 2017.
- SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 216, 2016.
- SILVA, S. *et al.* Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **Journal of Medical Microbiology.**, v.59, p.747-54, 2010.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int.**, v.2013, 204237, 2013,
- TAMURA, N.K.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Evaluation of adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathologia**, v.156, p.269-272, 2003.
- TAN, Y. I. *et al.* Influence of culture conditions for clinically isolates non-*albicans* *Candida* biofilm formation. **Journal Microbiol Methods**, v.130, p.123-128, 2016.
- TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v.21, p.606-25, 2008.
- TUMBARELLO, M. *et al.* Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One.**, v.7, e33705, 2012.
- VAN ASBECK, E.C.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Crit Rev Microbiol**, v.35, n.4, p. 283-309, 2009.
- VARGAS-BLANCO, D. I. *et al.* A pre-therapeutic coating for medical devices that prevents the attachment of *Candida albicans*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v.16, n.1, p.41, 2017.

WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Curr Opin Microbiol.**, v.6, p.578-585, 2003.

Figure 1 - Adhesion assay in different biomaterial catheters: Catheter 1 - Vialon®, Catheter 2 – Silicon, Catheter 3 – Teflon and Catheter 4 – Polyurethane from Blood, Blood from catheter tip and Blood from catheter vial. The results shown represent the means and standard error of mean (error bars) of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

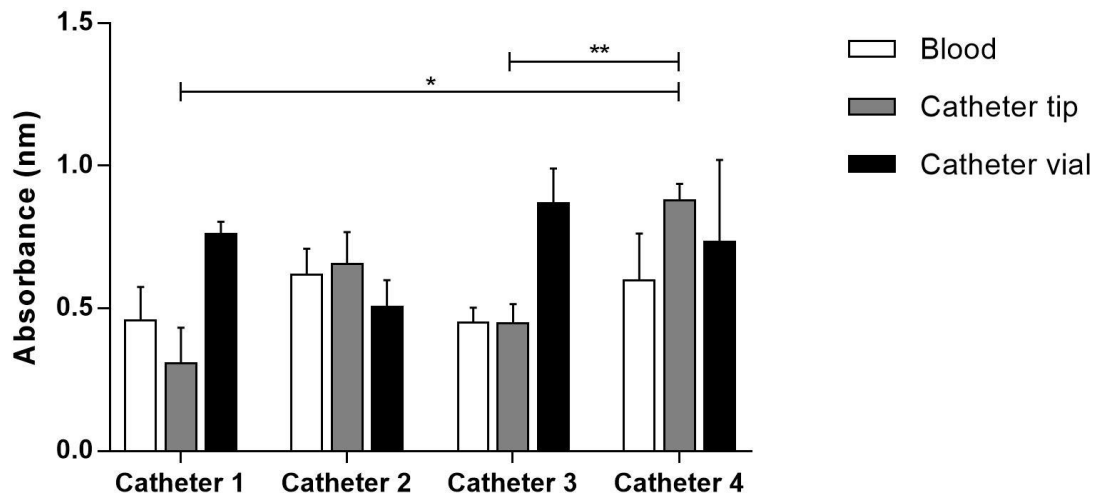


Figure 2 - Adhesion assay by clinically isolated *Candida parapsilosis* stricto sensu in different sites. Catheter 1 - Vialon®, Catheter 2 – Silicon, Catheter 3 – Teflon and Catheter 4 – Polyurethane. The results shown represent the means and standard error of mean (error bars) of three independent experiments. * $p < 0.05$.

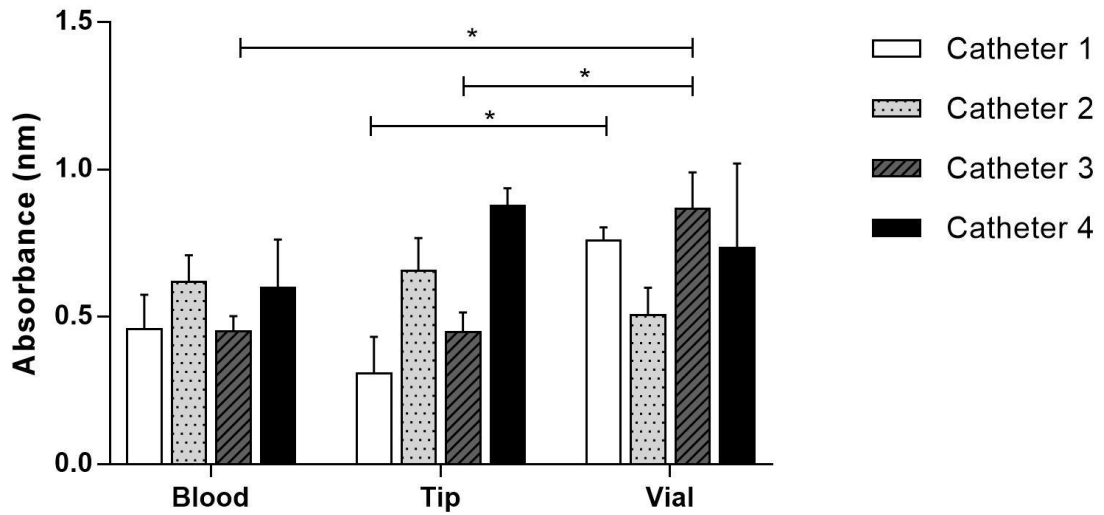


Figure 3 - Scanning electron micrographs of topography by catheter devices. (A) Vialon ® (B) Silicon. (C) Teflon. (D) Polyurethane. Scale bars: 100 μm and 10 μm .

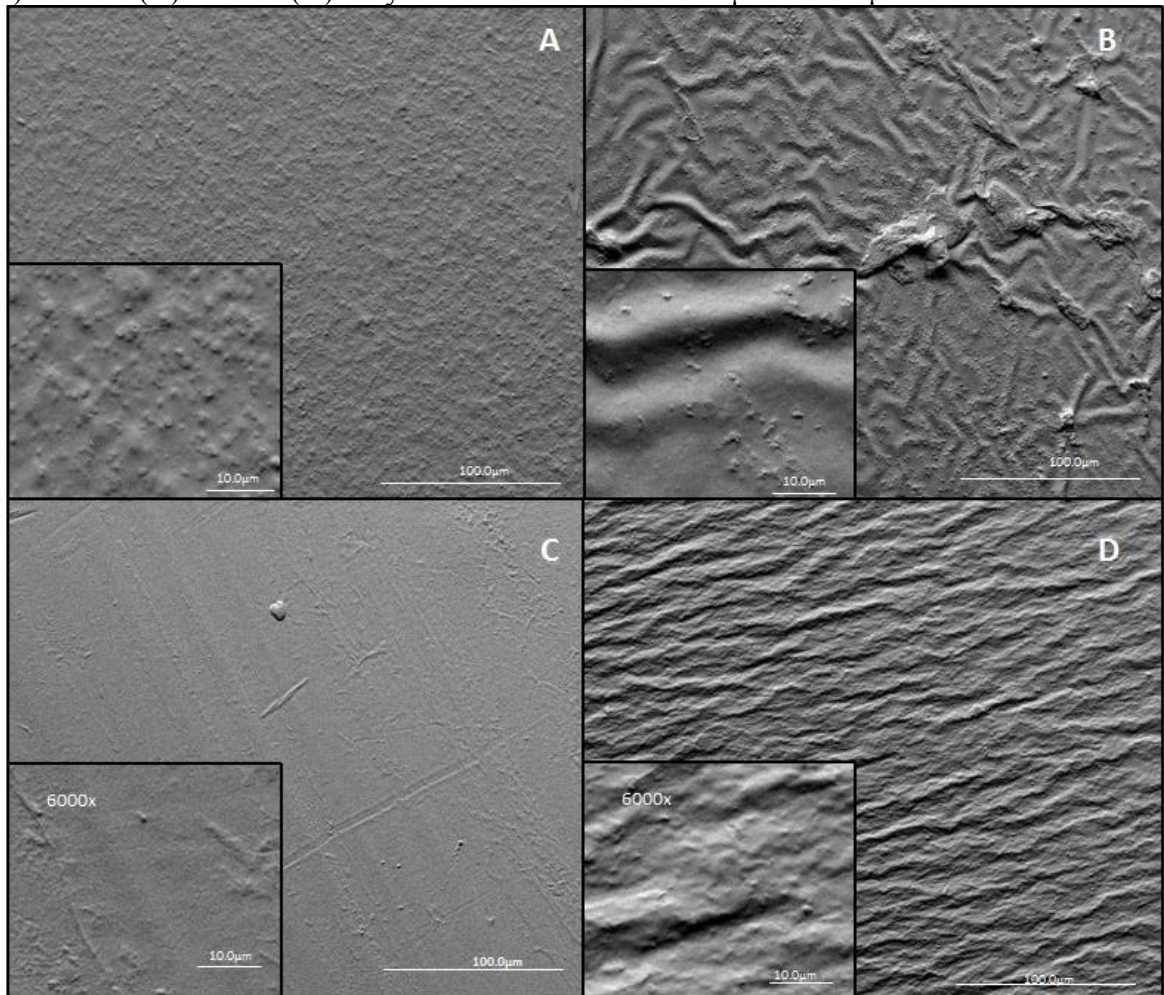


Figure 4 - Scanning electron micrographs of *Candida parapsilosis* stricto sensu cell adhesion in catheter surface: (A) Vialon® BD; (B) Silicon; (C) Teflon; (D) Polyurethane. Scale bars: 100 μ m and 10 μ m.

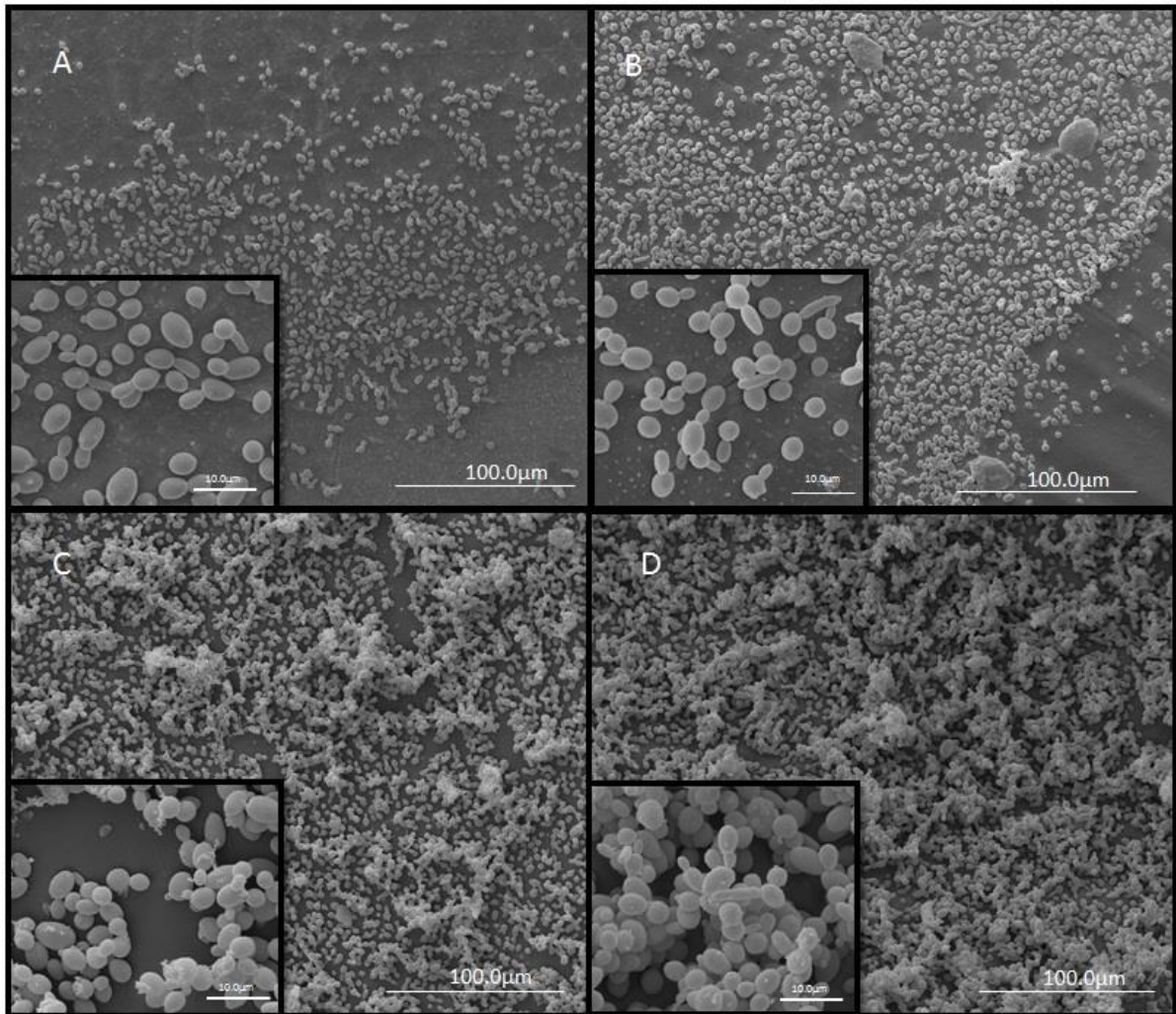


Figure 5 - Biofilm formation by clinically isolated *Candida parapsilosis* stricto sensu in different biomaterial catheters: Catheter 1 - Vialon®, Catheter 2 - Silicon, Catheter 3 – Teflon and Catheter 4 – Polyurethane, from Blood, blood from catheter tip and blood from catheter vial. The results shown represent the means and standard error of mean (error bars) of three independent experiments.

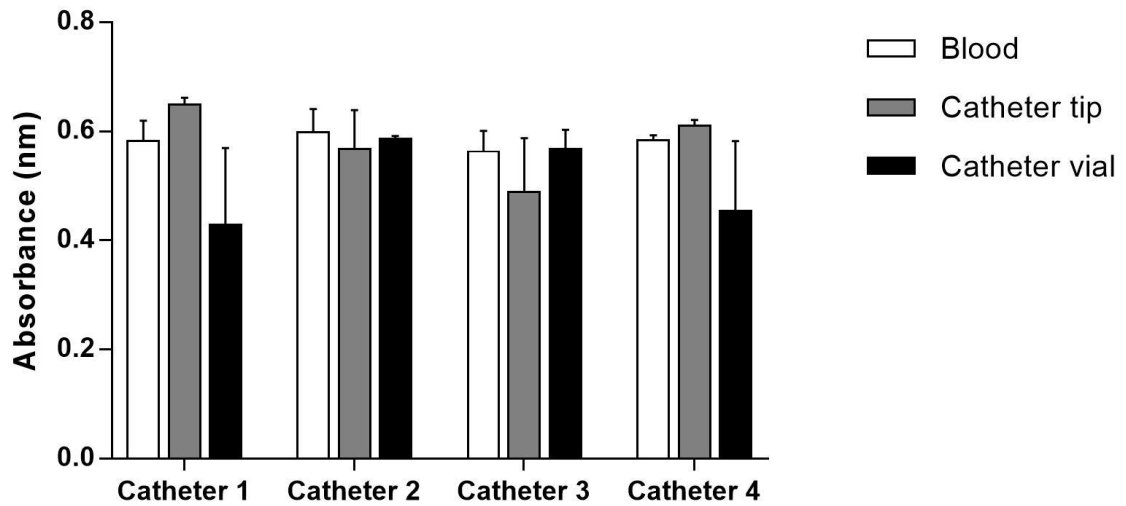


Figure 6 - Biofilm formation by clinically isolated *Candida parapsilosis* stricto sensu in different sites. Catheter 1 - Vialon®, Catheter 2 – Silicon, Catheter 3 – Teflon and Catheter 4 – Polyurethane. The results shown represent the means and standard error of mean (error bars) of three independent experiments.

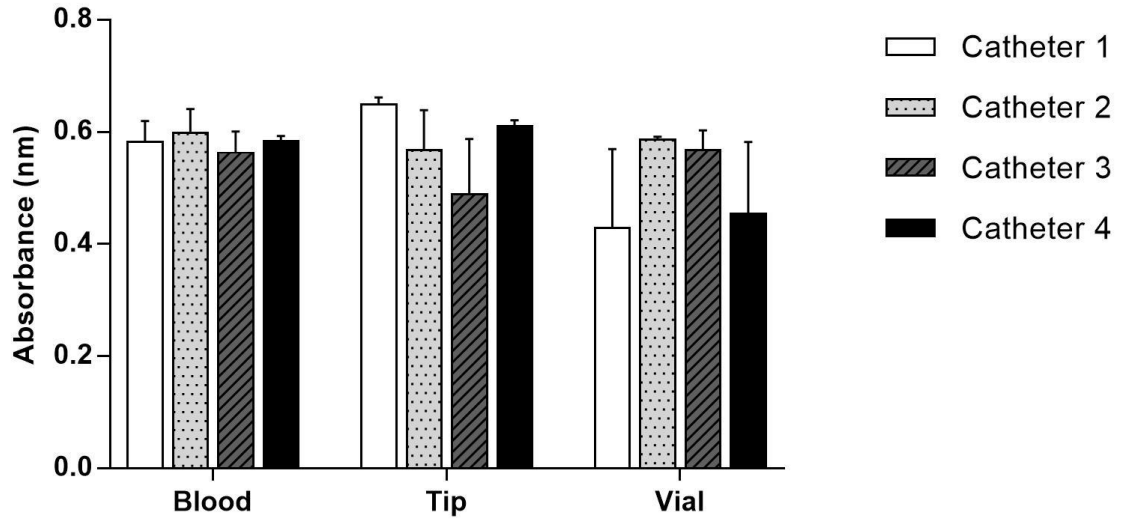
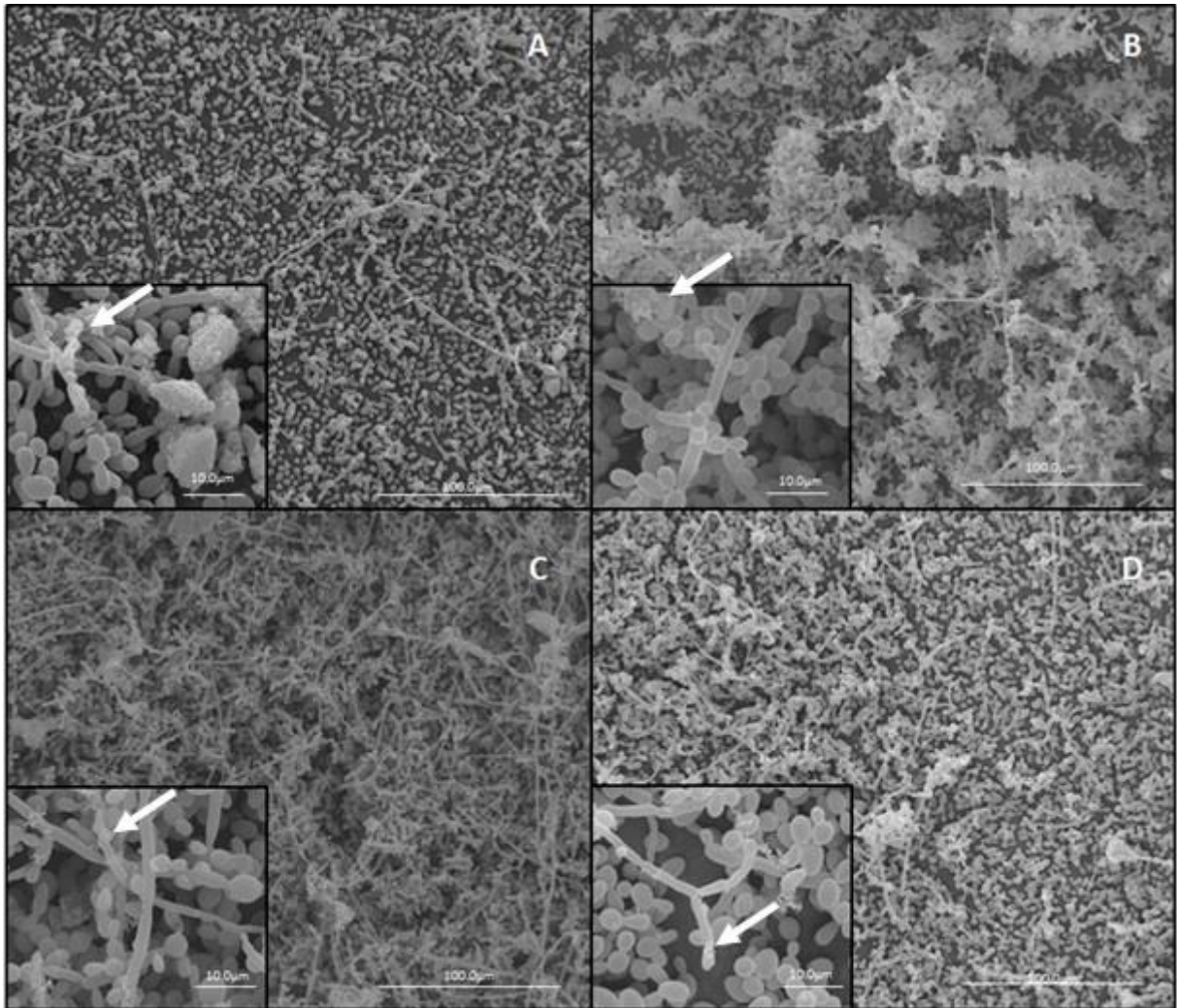


Figure 7 - Scanning electron micrographs of *Candida parapsilosis* stricto sensu cell in biofilm formation on 12 hours in catheter surfaces: (A) Vialon® BD; (B) Silicon; (C) Teflon; (D) Polyurethane. Scale bars: 100 μm and 10 μm .



6 CONCLUSÕES

- a) Todos os isolados apresentaram eficiência quanto à adesão e a formação de biofilme nas diferentes superfícies testadas, bem como nos diferentes dispositivos médicos testados;
- b) Os isolados apresentaram elevado potencial de aderência em superfície de elastômero de silicone, sendo os isolados de sangue e sangue via cateter predominantemente altos produtores de biomassa e atividade celular.
- c) As maiores taxas de aderência e formação de biofilme dos isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu estão relacionados à rugosidade superficial do elastômero de silicone;
- d) Observa-se uma diversidade no padrão de aderência e diferenciação celular, entre os isolados provenientes dos sítios de isolamento estudados.
- e) Análise ultraestrutural de células aderidas de *Candida parapsilosis* stricto sensu em cateter de Vialon® e silicone apresentou monocamadas de balstoconídios com poucas células em morfogênese, mesma característica foi observada em elastômero de silicone.
- f) Dados homogêneos foram obtidos na formação de biofilme nos quatro tipos de dispositivo médico;
- g) A análise da adesão e de formação de biofilme pelos isolados estudados foram variáveis de acordo com os sítios específicos de isolamento, bem como nas diferentes superfícies testadas, indicando assim, a inexistência de um padrão específico para *Candida parapsilosis* stricto sensu.

REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D. et. al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1122-1128, 1997.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**. v. 55, p. 999–1008, 2006.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ANGIOLELLA, L.*et al.* Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. **Journal of Infectious Diseases**. v. 173, p.684-690, 1996.
- ANIL, S.; ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. **Oral Diseases**, v. 7, p. 119–122, 2001.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.
- ASHFORD, B. K. Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and their Relation to Tropical Sprue. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 6, pp. 507 - 538, 1928.
- BAIER, R. E. Key events in blood interactions at non-physiologic interfaces da personal primer. **Artificial organs**, v. 2, n. 4, p. 422-426, 1978.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L.J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.
- BANERJEE, M. et. al. UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 4, p. 1354-1365, 2008.
- BARCHIESI, F. et. al. Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 49, n. 4, p. 269-271, 2004.
- BENJAMIN, D. K. *et al.* When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. **Pediatrics**, v. 106, n. 4, p. 712-718, 2000.
- BIZERRA, C. F. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.**, v.8, p.442-450, 2008

- BORGHI, E. *et al.* Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 689-690, 2011.
- BUSSCHER, H. J.; GEERTSEMA DOORNBUSCH, G. I.; VAN DER MEI, H. C. Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. **J Biomed Mater Res.**, v.34, p.201-209, 1997.
- BRAUN, B. R.; KADOSH, D.; JOHNSON, A. D. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4753-4761, 2001.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1568-1572, 2014.
- BUTLER, G. *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p. 657-662, 2009.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-335, 2001.
- CAMPBELL, J. R.; ZACCARIA, E.; BAKER, C. J. Systemic candidiasis in extremely low birth weight infants receiving topical petrolatum ointment for skin care: a case-control study. **Pediatrics**, v. 105, n. 5, p. 1041-1045, 2000.
- CANNON, R.D.; CHAFFIN W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10, n. 3, p. 359-383, 1999.
- CANO, M. V. *et al.* Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2005.
- CANTÓN, E. *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, pp. 5590 - 5596, 2011.
- CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.
- CHAI, L. Y.; DENNING, David W.; WARN, Peter. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.
- CHANDRA, J *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.
- CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K; GHANNOUM, M. A. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms, **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1909-1924, 2008.

CLARK, T. A. *et al.* Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.

CLERIHEW, L. *et al.* *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 92, n. 2, p. 127-129, 2007.

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.

COLOMBO, A. L.; MATTA, D.A.; SOUZA, A.C.R. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal of Fungi**, v. 3, p. 24-38, 2017.

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.

CONNOLLY, L. A. *et al.* The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 36-53, 2013.

COSTA, V. G. *et al.* Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary - care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 243-250, 2014.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 3, p. 217-221, 1999.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 2003.

CUÉLLAR, M. C. *et al.* The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 10, p. 2513-2527, 2012.

CUELLAR-CRUZ, M. *et al.* *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 755-771, 2012.

DE BERNARDIS, F. *et al.* Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p. 201-208, 1999.

DE LAS PENAS, A. *et al.* Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. **Genes & Development**, v. 17, n. 18, p. 2245-2258, 2003.

DESAI, J.V. *et al.* Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 10, p. a019729, 2014.

DING, C. *et al.* Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e28151, 2011.

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS One**, v. 11, n. 1, 2016.

DONLAN, R.M. *et al.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, 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.

DOUGLAS L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v. 1, p. 30–36, 2003.

DOYLE, R.J.; ROSENBERG M. Microbial cell surface hydrophobicity. **American Society for Microbiology**, v.1, p.434-436, 1990.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ESTIVILL, D. *et al.* Biofilm formation by Five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Method**, v. 86, p. 238-242, 2011.

FANNING, S. *et al.* Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator Bcr1 in vitro and in vivo. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 7, p. 896-904, 2012.

FINKEL, J.S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FORREST, G. N.; WEEKES, E.; JOHNSON, J. K. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. **Journal of Infection**, v. 56, n. 2, p. 126-129, 2008.

FRADE, J. P.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. **Mycoses**, v. 54, n. 4, 2011.

FRIDKIN, S. K; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v 9: 449– 511, 1996.

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.

GACSER, A. *et al.* Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics na Biology**, 44, 1336-1341, 2007.

GACSER, A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence. **Virulence**. 7, 65-67, 2016.

GIRMENIA, C. *et al.* Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 506-514, 1996.

GOW, N. A.; BROWN, A. J.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 366-371, 2002.

GREEN, C.B. *et al.* RTPCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology**. 150, 267-275, 2004.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. s6, pp. 5 - 10, 2014.

GUO, D. *et al.* Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 33, p. 1567-1581, 2017.

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.

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

HENRIQUES, M. *et al.* Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 13, p. 1111-1115, 2002.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedical Science**, v. 63, n. 1, p. 5-11, 2006.

HOFFMANN-SANTOS, H. D. *et al.* Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 409-415, 2013.

HOIBY, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, p.322-332, 2010.

HOLLAND, L. M. *et al.* Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, 2014.

HOYER, L. L. *et al.* *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 39-54, 1995.

HUANG, Y. C. *et al.* Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, n. 3, p. 200-203, 2004.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerg Infect Dis.**, v.10, p.14-19, 2004.

JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1526-1530, 1995.

JONG, A.Y. *et al.* Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 615-622, 2003.

KAWAI, A.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO H. Time-Lapse Tracking of *Candida tropicalis* Biofilm Formation and the Antifungal Efficacy of Liposomal Amphotericin B. **Jpn J Infect Dis**, v.70, p.559-564, 2017.

KAO, A. S. *et al.* The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1164-1170, 1999.

KIM, S. K.; EL BISSATI, K.; MAMOUN, C. B. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 152, n. 10, p. 2885-2894, 2006.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to silicone catheters in vitro and vivo. **Clin. Microbiol Infect**, v.9, n.7, p. 684-690, 2003.

KRCMERY, V. J. Candidemia in cancer patients: risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. **Acta Chemoth** 5: 133–145. 1999.

KUHN, D. M. *et al.* Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 878-888, 2002.

KUHN, D. M. *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

KUHN, D. M. *et al.* *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 6, p. 1074, 2004.

- KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. **N Eng J Med.**, v. 373, p.1445-56, 2015
- KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 608-611, 2002.
- LAFHEY, S.F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiol.**, v.151, p.1073-1081, 2005.
- LI, L. *et al.* In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces, **Molecular Oral microbiology**, v. 25, n. 6, p. 384-390, 2010.
- LI, F.Q. *et al.* Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 253, 2013.
- LIMA-NETO, R. G. *et al.* Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23-29, 2011.
- LIN, D. *et al.* Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, pp. 1815-1821, 1995.
- LIU, H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 728-735, 2001.
- LUO, G., SAMARANAYAKE L.P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.110, p. 601-610, 2002.
- MARAIS, E. *et al.* *Candida parapsilosis* detected in TPN using the BacT/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 4, p. 291-296, 2004.
- MARRA, A. R. *et al.* and the Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.
- MARTÍNEZ-GOMARIZ, M. *et al.* Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2230-2252, 2009.
- MAYER, F.L. *et al.* *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MERSEGUEL, K.B. *et al.* Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 57, 2015.

MERMEL, L. A. I. *et al.* Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infections Diseases.**, v. 32, p. 1249-1272, 2001.

MITCHELL, K. F. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-albicans *Candida* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.57, n.4, p. 1918-20, 2013.

MORALEZ, A. T. P. *et al.* Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 52, 106-114, 2014.

MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4, p. 301-309, 2004.

MURAD, A. M. A. *et al.* NRG1 represses yeast–hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4742-4752, 2001.

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.

NAVARRO-GARCÍA, F. *et al.* Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 245-268, 2001.

NETT, J. E.; ANDES, D. Review of Techniques for diagnosis of catheter-related *Candida* biofilm infections. **Current Fungal Infec Rep.**, v.2, p.237-243, 2008.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340-345, 2006.

NETT, J. E. *et al.* Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3505-3508, 2010.

NETT, J. E. *et al.* Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1660-1669, 2011.

NETT, J. E. *et al.*, Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p. 4931-4940, 2014.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1382-1391, 2006.

NOBILE, C.J. *et al.* Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation, **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 10, p. 1604-1610, 2006.

NOBILE, C. J. *et al.* Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biology**, v. 7, n. 6, 2009.

NOBILE, C. J. *et al.* A recently evolved transcriptional net-work controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell.**, v.148, p. 126-138, 2011.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2006.

NOSEK, J. *et al.* Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 497-509, 2009.

NWEZE, E. *et al.* Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.149-153, 2012.

NUCCI, M. *et al.* EPIDEMIOLOGY of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. **PloS One** **8**, e59373, 2013.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, p. 561-570, 2010.

NÚÑEZ-BELTRÁN, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 293-303, 2017.

PANAGODA, G.J.; ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v. 44, p. 29–35, 2001.

PAPON, N. *et al.* Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PEREIRA, L. *et al.* Influence of glucose concentration on the structure and quantity of biofilms formed by *Candida parapsilosis*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 5, 2015.

PÉREZ, A. *et al.* Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 1074-1084, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev.**, v.20, p.133-163, 2007.

PFALLER, M. A. *et al.* International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 35, n. 1, p. 19-25, 1999.

PFALLER, M. A. *et al.* Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 747-751, 2000.

PFALLER, M. A. *et al.* Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.

PFALLER, M. A. *et al.* In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 150-156, 2008.

PFALLER, M. A. *et al.* *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

PFALLER, M. A. *et al.* Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010–2012). **The Journal of Antibiotics**. V. 68, 2015.

PIERCE, C.G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocol.**, v.3, p.1494-1500, 2008
 PIERCE, C. G. *et al.* The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **J Fungi (Basel)**, v.3, n.1, p.14, 2017.

RAMAGE, G.; MARTINEZ, J.P.; LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RAMAGE, G. *et al.* Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

RATNER, B. D.; JOHNSTON, A. B.; LENK, T. J. Biomaterial surfaces, **Journal of Biomedical Materials**, v.21, p. 59-89, 1987.

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

RINASTITI, M., OZCAN, M., SISWOMIHARDJO, W., BUSSCHER, H.J., VAN DER MEI, H.C., Effect of biofilm on composites, **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1476-1481, 2010.

RODRIGUEZ, D. *et al.* Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 3, p. 224-229, 2006.

ROSSIGNOL, T. *et al.* Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, p. 550-559, 2009.

SAMARANAYAKE, L. P. *et al.* Oral disease in the elderly in long-term hospital care. **Oral Diseases.**, v. 1, p.147-151, 1995.

SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T.W. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro. **Arch Oral Biol.**, v. 26, n.10, p.815–820, 1981.

SAHNI, N. *et al.* Genes selectively up-regulated by pheromone in white cells are involved in biofilm formation in *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000601, 2009.

- SAN MIGUEL, L. G. *et al.* Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 548-552, 2005.
- SANCHEZ, V. *et al.* Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study. **The American journal of medicine**, v. 94, n. 6, p. 577-582, 1993.
- SANDAI, D. *et al.* Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. **Jundishapur Journal of Microbiology**. 9, 11, 2016.
- SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, n. 3, p. 73-81, 2000.
- SARVIKIVI, E. *et al.* Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2729-2735, 2005.
- SAXEN, H. *et al.* Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 14, n. 9, p. 776-781, 1995.
- SEGHIR, A. *et al.* Infectious risk related to the formation of multi-species biofilms (*Candida* - bacteria) on peripheral vascular catheters. **J Mycol Med.**, v.27, p.20-27, 2017.
- SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 216, 2016.
- SHEN, J. *et al.* The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20918-20923, 2008.
- SHERRY, L. *et al.* Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. **BMC Microbiol.**, v.14, p.182-196, 2014.
- 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, n. 4, p. 1244-1248, 2002.
- SILVA, C. L. P. D.; DOS SANTOS, R. M.; COLOMBO, A. L. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 32-36, 2001.
- SILVA, S. *et al.* Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans*, *Candida* species, **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.
- SILVA, S. *et al.* Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681-689, 2009.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, 36, 288-305, 2012.

SILVA, S. *et al.* Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **J of Medical Microbiol.**, v.59, p.747-754, 2010.

SINGH, R.; SHIVAPRAKASH, M.R.; CHAKRABARTI, A. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. **Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 2611-2618, 2011.

SKERL, K.G.; CALDERONE, R. A. In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 221-227, 1984.

SOFAIR, A. N. *et al.* Epidemiology of community-onset candidemia in Connecticut and Maryland. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 1, p. 32-39, 2006.

SOUSA, C.; HENRIQUES, M.; TEIXEIRA, P. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. **International Journal Biomaterials**, 2009.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int.**, v.2013, e204237, 2013.

SPELLBERG, B. J. *et al.* Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 2, p. 256-260, 2006.

SPORI, D. M. Structural Influences on Self-cleaning Surfaces. **ETH Zurich**, Zurich, 2010.

STAAB, J. F. *et al.* Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1535-1538, 1999.

STURTEVANT, J. ;CALDERONE, R. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 14, 90-97, 1997

TAFF, H. T. *et al.* A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2012.

TAMMER I. *et al.* Induction of *Candida albicans* biofilm formation on silver-coated vascular grafts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1282-1285, 2014.

TAMURA, N. K. *et al.* Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAMURA, N. K.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathol.**, v.156, p.269-272, 2003.

- TAN, Y. I. *et al.* Influence of culture conditions for clinically isolates non-*albicans* *Candida* biofilm formation. **Journal Microbiol Methods**, v.130, p.123-128, 2016.
- TAVANTI, A. *et al.* *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, pp. 284 -292, 2005.
- TORTORANO, A. M. *et al.* Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006.
- TREVIÑO-RANGEL, R. D. J.*et al.* Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 3, p. 180-184, 2015.
- TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.
- TUMBARELLO, M. *et al.* Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e33705, 2012.
- UPPULURI, P. *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000828, 2010.
- VAN ASBECK, E. C. *et al.* *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, n. 6, p. 287-293, 2007.
- VAN ASBECK, E.C.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Crit Rev Microbiol**, v.35, n.4, p. 283-309, 2009.
- VARGAS-BLANCO, D. I. *et al.* A pre-therapeutic coating for medical devices that prevents the attachment of *Candida albicans*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v.16, n.1, p.41, 2017.
- VAZ, C. *et al.* Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. **Diagn Microbiol Infect Dis.**,v.71, p.159-162, 2011.
- VROMAN, L. *et al.* Reactions of formed elements of blood with plasma-proteins at interfaces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 283, n. 1, p. 65-76, 1977.
- WAN HARUN, W. H. A. *et al.* Effect of Piper betle and Brucea javanica on the differential expression of hyphal wall protein (HWP1) in non-*Candida albicans* *Candida* (NCAC) species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- WANG, Y. C. *et al.* Prediction of phenotype-associated genes via a cellular network approach: a *Candida albicans* infection case study. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35339, 2012.

WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Curr Opin Microbiol.**, v.6, p.578-585, 2003.

WEEMS JR., J.J. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 756-766, 1992.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. **Cytokine**. 2015.

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

YEATER, K. M.*et al.* Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2373-2385, 2007.

ZAGO, C.E. *et al.* Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*, **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 245-25, 2015.

ZARNOWSKI, R. *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**, v. 5, n. 4, e01333-14, 2014.

ZHAO, X. *et al.* ALS51, a newly discovered gene in the *Candida albicans* ALS family, created by intergenic recombination: analysis of the gene and protein, and implications for evolution of microbial gene families. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 245-257, 2011.