



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CÁSSIA MILENA DE SOUZA

**PERFIL DE ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICA E ABIÓTICA  
POR ISOLADOS CLÍNICOS E MORFOTIPOS DERIVADOS  
DE *SWITCHING* FENOTÍPICO DE *CANDIDA TROPICALIS***

CÁSSIA MILENA DE SOUZA

**PERFIL DE ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICA E ABIÓTICA  
POR ISOLADOS CLÍNICOS E MORFOTIPOS DERIVADOS  
DE *SWITCHING* FENOTÍPICO DE *CANDIDA TROPICALIS***

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

Orientação: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto.

Londrina  
2019

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

de Souza, Cássia Milena.

PERFIL DE ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICA E ABIÓTICA POR ISOLADOS CLÍNICOS E MORFOTIPOS DERIVADOS DE SWITCHING FENOTÍPICO DE CANDIDA TROPICALIS. / Cássia Milena de Souza. - Londrina, 2019.  
70 f. : il.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Switching fenotípico - Tese. 2. Candida tropicalis - Tese. 3. Adesão superfície abiótica - Tese. 4. Adesão em células epiteliais - Tese. I. Furlaneto, Marcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CÁSSIA MILENA DE SOUZA

**PERFIL DE ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICA E ABIÓTICA POR  
ISOLADOS CLÍNICOS E MORFOTIPOS DERIVADOS DE *SWITCHING*  
FENOTÍPICO DE *CANDIDA TROPICALIS***

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de Fevereiro de 2019.

*Dedico este trabalho...*

Em primeiro lugar a Deus, que me protejeu e deu forças durante minha caminhada.

À minha família, minha irmã Hellen e aos meus pais, Ivan e Elza, pelo carinho, apoio e compreensão, e principalmente pelo empenho em minha educação e formação, pois mesmo com a baixa escolaridade e os calos da vida dura do campo tinham a convicção que a educação era o único caminho para um futuro melhor, não medindo esforços para tornar isso possível. Vocês me inspiram a ser melhor, sendo para mim exemplos de humildade, honestidade e fé

À minha avó Maria (*in memoriam*), pelos valores passados os quais moldaram meu caráter e me fizeram chegar até aqui.

Ao meu namorado Cleberson Castilho, pelo carinho e companheirismo.

À minha orientadora Professora Doutora Marcia Cristina Furlaneto, por tornar possível a realização deste trabalho, por todas as orientações e apontamentos.

À minha primeira orientadora, Professora Doutora Emanuele Júlio Galvão de França, por me apresentar ao universo da microbiologia.

Aos amigos do laboratório; Alane, Eloiza, Giovanna, Hugo, Kátia, Lennara, Mateus, Murilo, Marcia, Renan e a toda equipe Genoma pelo apoio na realização deste trabalho, pelos palpites, ideias e pela convivência harmoniosa e companheirismo. Vocês tornaram meus dias mais doces e felizes. Obrigada pela hombridade diária.

Aos meus amigos Thais, Elisângela, Meline, Ana Carolina, Jéssica, Caroline, Camila, Gazal, Raul e Wilson.

Aos colegas de turma do mestrado pelo convívio harmonioso, companheirismo e comprometimento durante as disciplinas.

Aos meus amigos da graduação, que contribuíram com a minha formação acadêmica e pessoal.

E à todos de contribuíram direta ou indiretamente com a realização do trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela oportunidade e confiança depositada durante o desenvolvimento do trabalho. Pela paciência, conselhos, orientações e incentivo na pesquisa. Principalmente por ser uma profissional exemplar, apaixonada pela ciência, transmitindo conhecimento com brilho no olhar e nos motivando a buscar sempre mais.

À profa. Dra. Emanuele Júlio Galvão de França que me apresentou a microbiologia, acreditou em mim e guiou meus primeiros passos na vida científica, sendo exemplo de profissional e ser humano. Agradeço pela disponibilidade ao aceitar compor a banca de Qualificação.

À profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia pela agradável convivência no laboratório, por ser exemplo de profissionalismo e de amor pela Microbiologia. Agradeço pela disponibilidade em compor a banca de projeto, qualificação e defesa.

À profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla pela disponibilidade em compor a banca de defesa.

Ao prof. Dr. Ricardo Couto de Almeida e prof. Dr. Luciano Panagio, bem como a todo o Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina por realizar e disponibilizar o cultivo das linhagens celulares, possibilitando a realização deste trabalho.

Aos técnicos Osvaldo, Tiago e Osvaldo por toda a ajuda, tanto na manutenção do laboratório, quanto na realização de algumas técnicas.

A aluna Carla Caloni do Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina pela disponibilização de células neste estudo. Agradeço também pelo convívio harmonioso, solicitude e comprometimento com a ciência.

Agradeço a Central de Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL (CMLP), em especial ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise-LMEM, e ao Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas-LAMM e, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/CT-INFRA) 01/2011 convênio nº01.13.0049.00.

À Universidade Estadual de Londrina, pela formação, suporte e

espaço físico proporcionados.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia desta Universidade, pelo incentivo e oportunidade.

Ao órgão de fomento, CAPES pela concessão da bolsa e auxílio à pesquisa.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem,  
enquanto você não tem condições melhores,  
para fazer melhor ainda!”- Mario Sergio Cortella

SOUZA, Cássia Milena de. **Perfil de adesão à superfícies biótica e abiótica por isolados clínicos e morfotipos derivados de *switching* fenotípico de *Candida tropicalis***. 2019. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

*Candida tropicalis* é um dos agentes etiológicos mais frequente em infecções fúngicas humanas. O evento de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* está associado a alterações no padrão de virulência, no entanto, não existem dados acerca do papel de *switching* na habilidade de adesão de *C. tropicalis*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a adesão de isolados clínicos de *C. tropicalis* à superfícies de poliestireno, células HeLa e Vero, e avaliar o efeito do estado de *switching* na adesão de *C. tropicalis* a estas superfícies. Para tal, foram empregados três sistemas de *switching* que compreendem isolados clínicos (49.07, 100.10 e 335.07), linhagens variantes ( Morotipos Crepe e Rugosa do sistema 49.07; Morfotipos Crepe e Flocada do sistema 100.10 e o Morfotipo variante de Centro irregular do sistema 335.07) e revertentes derivados de *switching* (Morfotipos Revertente de Crepe e Revertente de Rugosa do sistema 49.07; Morfotipos Revertente de Crepe e Flocada do sistema 100.10 e o Morfotipo Revertente de Centro irregular do sistema 335.07). Os isolados diferiram quanto a capacidade de adesão às superfícies testadas, no entanto foi observada maior adesão ao poliestireno, seguido por HeLa e Vero. Os isolados 100.10 e 335.07 exibiram maior número de leveduras aderidas por HeLa em relação a células Vero. No entanto, foi observada correlação perfeita ( $r^2 = 1$ ,  $p < 0,0001$ ) entre células HeLa e Vero quanto o número de células de *C. tropicalis* por célula epitelial. O *switching* alterou o perfil de adesão de *C. tropicalis* à superfícies bióticas e abiótica, uma vez que as linhagens variantes e revertentes apresentaram variações no perfil de adesão às superfícies testadas. Em poliestireno, foi evidenciado um aumento na capacidade de adesão em decorrência deste evento epigenético, particularmente pelos morfotipos variantes, o que pode estar associado a maior capacidade de morfogênese. Por outro lado, a maioria (80%) dos morfotipos revertentes exibiram redução na capacidade de adesão comparativamente ao observado para seus respectivos variantes. O estado de *switching* também alterou o perfil de adesão de morfotipos de *C. tropicalis* a linhagens celulares HeLa (70%) e Vero (60%) sendo verificado um aumento de adesão em relação as linhagens parentais. Os morfotipos revertentes (60%) foram mais aderentes a ambas linhagens celulares, comparativamente aos parentais. Além disso, 80% dos revertentes apresentaram número superior de leveduras aderidas por célula HeLa, em relação aos seus respectivos variantes. O mesmo padrão de adesão foi observado em células Vero. A maioria dos morfotipos (92,3%) apresentou maior afinidade a linhagem HeLa, no entanto o padrão de adesão dos morfotipos entre ambos os modelos de infecção *in vitro* foi perfeitamente correlato (Correlação de Pearson:  $r^2 = 1$ ,  $p < 0,0001$ ). Concluímos que o estado de *switching* altera a capacidade de adesão de *C. tropicalis*, sendo que a maioria dos morfotipos de *switching* apresentou aumento na capacidade adesão tanto em superfície abiótica (poliestireno) quanto em células epiteliais. A adesão acentuada dos morfotipos variantes em poliestireno, bem como dos revertentes à células epiteliais sugerem que o *switching* possa estar relacionado a ampliação da plasticidade do patógeno durante esta etapa inicial de colonização e infecção.

### Palavras-chave:

*Switching* fenotípico. *Candida tropicalis*. Adesão superfície abiótica. Adesão em células epiteliais.

SOUZA, Cássia Milena de. **Adhesion profile to biotic and abiotic surfaces by clinical isolates and *Candida tropicalis* morphotypes derived from phenotypic switching**. 2019. 70p. Dissertation (Master degree in Microbiology) – State University of Londrina, 2019.

## ABSTRACT

*Candida tropicalis* is one of the most frequent etiologic agents in human fungal infections. The phenotypic switching event is associated with changes in the virulence attributes in *C. tropicalis*, however, there is not data around the switching role in the *C. tropicalis* adhesion ability. The present study aim to evaluate the adhesion of clinical isolates of *C. tropicalis* to polystyrene, HeLa and Vero cells, and assess the effect of switching status in *C. tropicalis* adhesion on these surfaces. To that end, three switching systems were used, comprising clinical isolates (49.07, 100.10 and 335.07), variant lineages (Crepe and Rough morphotypes of the 49.07 and 100.10 system and the irregular center variant of the 335.07 system) and the Revertent lineages (Reverent Crepe and Rough Morphotypes to the 49.07 and 100.10 system and Reverent Morphotype of Irregular Center of 335.07 system). The isolates differed in their ability to adhere on surfaces, however, greater adhesion to polystyrene was observed, followed by HeLa and Vero cells. Isolates 100.10 and 335.07 exhibited higher number of yeasts adhered by HeLa to Vero cells. However, a perfect correlation was obtained for the number of *C. tropicalis* cells per epithelial cell between HeLa cell and Vero cell (Pearson correlation,  $r^2$  1,  $p$  0.0001). Switching changed the *C. tropicalis* adhesion profile to the biotic and abiotic surfaces, since the variant and revertant strains showed variations in the adhesion profile to both surfaces tested. In polystyrene, an increase in adhesion was observed due to this epigenetic event, particularly by the variant strains, which may be associated with a greater capability of morphogenesis. On the other hand, the majority (80%) of the revertant strains exhibited reduction of adhesion capability in comparison to that observed for their respective variants counterparts. The switching event also altered the adhesion profile of *C. tropicalis* morphotypes to HeLa (70%) and Vero (60%) cell lines, with an increase in adhesion capability compared to the parental strains. The revertant morphotypes (60%) were more adherent to both epithelial cell lines compared to their parental strains. In addition, 80% of the revertant strains exhibited higher number of adhered yeasts per HeLa cell, in relation to their respective variant strains. The same adhesion profile was observed for Vero cells. Almost all morphotypes (92.3%) had higher affinity for HeLa, however the adhesion pattern of the morphotypes was perfectly correlated (Pearson's correlation:  $r^2$  1,  $p$  <0.0001) between both models of in vitro infection. We conclude that the phenotypic switching changes the adhesion capability of *C. tropicalis* where the majority of the switching morphotypes showed increased capacity of adhesion to abiotic surface (polystyrene) as well as to epithelial cells. The pronounced adhesion of the variant morphotypes to polystyrene, and of the revertant to epithelial cells suggests that switching may be related to the increase of pathogen plasticity during this initial stage of yeast colonization and infection.

**Keywords:** Phenotypic switching. *Candida tropicalis*. Adhesion in abiotic surface. Adhesion in epithelial cells.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1 -</b>	Adesinas em <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	22
-------------------	---	----

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1 -</b>	Sistemas de <i>switching</i> de <i>C. tropicalis</i> (49.07; 100.10; 335.07): complexidade, padrão morfológico e filamentação .....	48
-------------------	---	----

<b>Tabela 2 -</b>	Porcentagem de células epiteliais (HeLa e Vero) com leveduras aderidas-morfotipos de três sistemas de <i>switching</i> de <i>C. tropicalis</i> . Parental (isolado clínico), variantes de <i>switching</i> (Crepe, Rugosa, Flocada, Centro irregular), e seus respectivos revertentes (RC, RR, RF, RCI). Teste t-pareado (**p<0.01, *p<0.05). Os asteriscos representam a diferença significativa entre a linhagem Parental e os morfotipos de <i>switching</i> de cada sistema. As cores indicam as diferenças no percentual de levedura por célula epitelial, sendo classificadas como Baixa adesão (BA) 53,4 – 72,5 em Amarelo; Adesão Moderada (AM) 72,6 – 97,0 em Laranja; Alta adesão (AA) 97,1 – 99,8 em Vermelho .....	65
-------------------	--	----

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 -** Estrutura da parede celular padrão de *Candida* spp. A- Organização dos componentes da parede celular de *Candida* spp. B- Aranjo da adesina fúngica.....20

### ARTIGO 1

- Fig. 1 -** Comparison of adherence of *C. tropicalis* isolates (49.07, 100.10 and 335.07). The ability of *C. tropicalis* to adhere to polystyrene and epithelial cell lines (HeLa and Vero) was assessed. Absorbance values of crystal violet solutions (Abs CV) obtained from 2 h adhesion to polystyrene surface, and to HeLa and Vero cells. The data are means of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks represent a significant difference (Test-*t* paired, \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01).....46
- Fig. 2 -** Percentage of HeLa and Vero cells lines with adhered *C. tropicalis* yeasts (A). One hundred epithelial cells were accounted in three fields per coverslips. Asterisks represent a significant difference (Test-*t* paired, *p* < 0.05). Mean of *C. tropicalis* yeast adhered per HeLa and Vero cells (B). All tests were repeated in triplicate in three separate assays, with 100 epithelial cells accounted for three fields per coverslips. Asterisks represent a significant difference (Test-*t* paired, *p* < 0.05). Representative photomicrographs of *C. tropicalis* adhered to HeLa and Vero epithelial cells lines cells using methylene blue staining (C). White arrow heads indicate the occurrence of filamentous growth. Photomicroscope observation (400X magnification), scale bar (10 μm).....47

## ARTIGO 2

- Figura 1 -** Perfil de adesão de morfotipos de três sistemas de *switching* de *C. tropicalis* (49.07; 100.10 e 335.07) em poliestireno por 60 minutos. Parental (isolado clínico), variantes de *switching* (Crepe, Rugosa, Flocada, Centro irregular), e seus respectivos revertentes (RC, RR, RF, RCI). As diferenças significativas foram determinadas por meio do Teste t-pareado (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ) \*diferença significativa.....65
- Figura 2 -** Adesão de morfotipos de *switching* de *C. tropicalis* do sistema 49.07 á superfície abiótica de poliestireno por microscopia de luz transmitida. Os tons quentes indicam o perfil de filamentação dos morfotipos, sendo Vermelho (+++), alta filamentação; Laranja (++) , média filamentação; Amarela (+), baixa filamentação. O tons frios indicam o perfil de adesão dos morfotipos, Azul escuro (+++), alta adesão; Azul (++) , adesão intermediária; Azul claro (+), baixa adesão.....66
- Figura 3 -** Adesão de morfotipos de três sistemas de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) de *C. tropicalis* á linhagens de células epiteliais HeLa e Vero, quantificação por biomassa total em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. (A): Adesão dos morfotipos em células HeLa. (B): Adesão dos morfotipos em células Vero. Teste t-pareado ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ), \*diferença significativa.....67
- Figura 4 -** Efeito do *switching* no padrão de distribuição de *C. tropicalis* em células epiteliais. A- Média de leveduras de três sistema de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) aderidas em HeLa. B- Média de leveduras de três sistema de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) aderidas em Vero. Teste t-pareado ( $p < 0,05$ ), \* diferença significativa. C- Perfil de adesão dos morfotipos do sistema de *switching* 49.07 de *C. tropicalis* nas linhagens de células HeLa e Vero. A seta azul: presença de formas filamentosas.

Cabeça de seta amarela: perfil de distribuição dos morfotipos. Asterisco vermelho: perda da monocamada. Observação em fotomicroscópio (400X de aumento), barra de escala (10  $\mu\text{m}$ ).....69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	15
3.1.1	<i>Candida Tropicalis</i> .....	17
3.2	ADESÃO DE <i>CANDIDA</i> SPP. A DIFERENTES SUBSTRATOS. ....	18
3.3	<i>SWITCHING</i> FENOTÍPICO .....	25
	REFERÊNCIAS .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>Artigo 2 -</b>	<i>Switching</i> fenotípico em <i>Candida tropicalis</i> : papel na adesão à superfícies bióticas e abiótica. ....	28
<b>ARTIGO 1</b>	.....	29
	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>30</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>31</b>
	<i>Candida tropicalis</i> strains .....	31
	Adhesion assay to polystyrene.....	31
	Culture of epithelial cells .....	31
	Adhesion to epithelial cells .....	32
	Microscope observation .....	32
	Statistical analysis .....	33
	<b>RESULTS</b> .....	<b>33</b>
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>34</b>

<b>References</b> .....	35
<b>ARTIGO 2 SWITCHING FENOTÍPICO EM <i>Candida tropicalis</i>: PAPEL NA ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICAS E ABIÓTICA</b> .....	48
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
MATERIAL BIOLÓGICO .....	50
PREPARO DOS INÓCULOS .....	50
ADESÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS.....	52
DETERMINAÇÃO DA ADESÃO POR BIOMASSA TOTAL.....	53
QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS ADERIDAS POR OBSERVAÇÃO DIRETA EM MICROSCÓPICO ÓPTICO.....	53
MICROSCOPIA DE LUZ .....	54
ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	54
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
PAPEL DO SWITCHING FENOTÍPICO NA CAPACIDADE DE ADESÃO DE <i>C. tropicalis</i> EM POLIESTIRENO.....	54
PAPEL DO SWITCHING FENOTÍPICO NA CAPACIDADE DE ADESÃO DE <i>C. tropicalis</i> A CÉLULAS EPITELIAIS (HeLa e Vero). .....	57
<b>CONCLUSÕES</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida tropicalis* desponta entre as espécies fúngicas não-*Candida albicans*, apresentando incidência crescente em diversas casuísticas, principalmente em regiões tropicais (ZUZA-ALVES et al., 2017). No Brasil, 15 a 30% dos casos de candidemia são atribuídos a *C. tropicalis*, sendo a segunda espécie mais recorrente entre as não-*Candida albicans* (COSTA et al., 2014; DOI et al., 2016). A elevada plasticidade fenotípica e a ampla variedade de fatores de virulência expressos por *C. tropicalis*, contribuem com este cenário, possibilitando a colonização de diversos nichos no hospedeiro (YU et al., 2017).

A colonização do hospedeiro está intrinsecamente relacionada a capacidade de adesão da levedura (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; YU et al., 2017). A adesão é caracterizada por ser o primeiro estágio do processo infeccioso, além de também compreender a primeira etapa da formação de biofilme (NEGRI et al., 2011; ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016). A habilidade de aderir-se em diferentes superfícies, como dispositivos médicos e a tecidos do hospedeiro é mediada pela complexa parede celular de *Candida* spp., composta por uma série de proteínas (adesinas) que exibem perfis distintos de afinidade às diferentes superfícies, desta forma é possível afirmar que a adesão é um fator chave para a patogenicidade de *Candida* spp. (YU et al., 2016; MONNIOT et al., 2013).

O *switching* fenotípico, também reconhecido como um fator de virulência, é um processo micro-evolutivo de caráter epigenético, atuando a nível transcricional, em frequências superiores às de mutações somáticas. O *switching* fenotípico apresenta padrão elevado de reversibilidade, resultando em alterações na macromorfologia e micromorfologia das colônias, bem como nos padrões de filamentação e de virulência da levedura, ampliando assim as respostas do patógeno (SLUTSKY et al., 1987; EGGER et al., 2004; JAIN et al., 2008; SOLL, 2009; MORALES et al., 2016).

Considerando a importância da adesão na colonização e infecção do hospedeiro, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de adesão de três isolados clínicos de *C. tropicalis* a superfície abiótica de poliestireno e a superfícies bióticas (HeLa e Vero), bem como investigar correlações na adesão entre estas superfícies. Somado a isto, objetivou-se avaliar se “estado de *switching*” altera a capacidade de adesão de *C. tropicalis*.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de adesão à superfícies biótica e abiótica por isolados clínicos e o papel do *switching* fenotípico na capacidade de adesão de *Candida tropicalis*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de adesão de isolados clínicos de *C. tropicalis* á superfícies abiótica (poliestireno) e bióticas (células epiteliais HeLa e Vero).
- Avaliar o papel do *switching* na capacidade de adesão de morfotipos (linhagem parental, e linhagens derivadas de *switching* fenotípico-variantes e revertentes) dos sistemas de *switching* 49.07, 100.10 e 335.07 de *C. tropicalis* em superfície de poliestireno.
- Avaliar o papel do *switching* no perfil de adesão de morfotipos dos sistemas de *switching* 49.07, 100.10 e 335.07 de *C. tropicalis* em células epiteliais (HeLa e Vero).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero fúngico *Candida* é composto por aproximadamente 150 espécies, destas apenas 20 são descritas como patógenos humanos (HA et al., 2010; PRIEST et al., 2015). Tais leveduras compõe a microbiota normal humana de grande parte da população, colonizando majoritariamente superfícies mucosas e cutâneas. Entretanto, destacam-se como patógenos oportunistas de ampla relevância clínica, causando infecções que variam desde superficiais a sistêmicas, predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (BASSETTI et al., 2006; BOUZA e MUNOZ, 2008; NUCCI et al., 2010; DOI et al., 2016).

Entre as espécies de *Candida* de importância clínica, destacam-se *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. dublinensis* (HA et al., 2010). A incidência destas espécies possui caráter endêmico, variando entre as regiões do globo (COLOMBO et al., 2006; GUINEA., 2014; DOI et al., 2016).

*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são responsáveis por cerca de 95% das infecções fúngicas, sendo as demais espécies patogênicas do gênero relatadas como de incidência rara (BASSETTI et al., 2006; DIMOPOULOS et al., 2007; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Estudos epidemiológicos apontam *C. albicans* como o agente etiológico mais frequentemente estudado em casos de micoses superficiais e sistêmicas, tal como candidemia. Contudo, espécies não-*Candida albicans* têm emergido nos últimos anos, com incidência equivalente ou superior à de *C. albicans* (COLOMBO et al., 2006; CONDE-ROSA et al., 2010; COSTA et al., 2014).

Em estudo multicêntrico desenvolvido por Marra e colaboradores (2011) no Brasil, foi observado que 6% dos casos de infecções sanguíneas adquiridas no ambiente hospitalar tinham como agente etiológico espécies do gênero *Candida*, sendo 65,7% destas atribuídas a espécies não-*Candida albicans*, das quais *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram as espécies com maior ocorrência nos hospitais avaliados. Considerando este contexto, *C. tropicalis*

compreende uma das espécies mais frequentes em casos de candidemia, infecções do trato urinário e micoses superficiais, sobretudo em regiões de clima tropical (COLOMBO et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; COSTA et al., 2014).

Em trabalho desenvolvido por Doi e colaboradores (2016) em 16 hospitais de cuidados terciários do Brasil, distribuídos pelo território nacional, foram analisados 2563 casos de infecções nosocomiais, entre os quais *Candida* spp. foi relatada como o 7º agente mais prevalente. As espécies não-*Candida albicans* destacaram-se neste contexto, apresentando incidência elevada (67,7%), sendo *C. tropicalis* a segunda espécie mais recorrente (15,3%).

Cabe ressaltar que tais infecções, tem resultado em hospitalizações prolongadas e em elevações dos índices de mortalidade em torno de 50%, tal problemática deve-se a baixa na susceptibilidade aos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica e a expressão de diversos fatores de virulência, culminando em infecções invasivas, persistentes e de controle dificultado (MARRA et al., 2011; MAYER; WILSON; HUBE., 2013; DOI et al., 2016; YU et al., 2016; NÚÑEZ-BELTRÁN; LÓPEZ-ROMERO; CUÉLLAR-CRUZ., 2017).

*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* estão filogeneticamente agrupadas no clado CTG, codificando uma serina ao invés de uma leucina. Estudos sugerem que microrganismos desse clado expressam um padrão proeminentemente de virulência, o qual ocorre possivelmente devido a associação desse códon com a expressão diferenciada de algumas famílias de genes, principalmente de genes associados à dinâmica da parede celular (MIRANDA et al., 2013; TURNER e BUTLER, 2014; PRIEST et al., 2015).

Em *C. albicans* a alta incorporação de leucina no códon CUG, aumenta a aderência a superfícies do hospedeiro, em decorrência de alterações na hidrofobicidade de parede. Além disso, a alteração na tradução do CUG modifica a exposição da  $\beta$ 1,3 – glucana da superfície celular, reduzindo a fagocitose da levedura por macrófagos. Ou seja, a variação na tradução do CUG proporciona efeitos importantes nas interações de *Candida* com o hospedeiro (MIRANDA et al., 2013).

### 3.1.1 *Candida Tropicalis*

*C. tropicalis* é membro da divisão Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Sacaromycetales. Possui genótipo diploide, com cerca de 5 a 6 pares de cromossomos homólogos (CHAI et al., 2010). É polimórfica, ou seja, ocorre nas formas de levedura, pseudo-hifa e hifa, propriedade compartilhada apenas com *C. albicans* e *C. dubliniensis* (ZUZA-ALVES et al., 2017).

Caracterizada como patógeno oportunista, *C. tropicalis* destaca-se em termos de virulência e importância clínica em relação as demais espécies não-*Candida albicans* por apresentar elevada ubiquidade metabólica, possibilitando a colonização de diferentes sítios anatômicos, como pele, trato gastrointestinal, geniturinário e respiratório (PIZZO et al., 2001; ZAUGG et al., 2001; FALAGAS et al., 2010; NEGRI et al., 2010, 2011; WACHTLER et al., 2011; MORALEZ et al., 2014, 2016; COSTA-ORLANDI et al., 2017). A espécie também exibe um perfil elevado de adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas, como cateteres e superfícies bióticas, células epiteliais e endoteliais (ZUZA-ALVES et al., 2017). Sendo assim, fatores como tempo de internação prolongado, nutrição parenteral, terapia antimicrobiana de amplo espectro e utilização de dispositivos médicos invasivos, são agentes predisponentes no desenvolvimento de candidemia causada por *C. tropicalis* (DOI et al., 2016).

*C. tropicalis* destaca-se ainda no cenário global entre as espécies não-*Candida albicans*, como o segundo agente etiológico mais frequentemente associado a infecções superficiais e sistêmicas, visto que cerca de 14 a 30% das infecções sanguíneas causadas por *Candida* spp. são atribuídas a *C. tropicalis* (SIPSAS et al., 2009; COSTA et al., 2014; GUINEA et al., 2014; DOI et al., 2016). Em estudo desenvolvido por Costa e colaboradores (2014) no Hospital Universitário de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil, 30,5% dos casos de candidemia adquiridas no ambiente hospitalar eram causadas por *C. tropicalis*, frequência superior às demais espécies do gênero, indicando uma alteração no contexto epidemiológico da espécie.

A incidência acentuada de infecções por este patógeno chama atenção visto a redução na suscetibilidade aos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica, tal qual os azóis, bem como a fármacos de última linha, como as equinocandinas, promovendo elevações na morbidade e mortalidade dos pacientes

(SÓCZO et al., 2007; ESCHENAUER et al., 2014; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016).

Somado a isto *C. tropicalis* expressa uma série de fatores de virulência, que estão envolvidos tanto na colonização do hospedeiro, como no estabelecimento da infecção, tal qual a capacidade adesão, formação de biofilme, morfogênese, secreção de enzimas líticas (proteínases, fosfolipases e hemolisinas) e o evento de *switching* fenotípico. A habilidade da levedura de expressar estes fatores está diretamente relacionada com o processo infeccioso no hospedeiro humano (ZUZA-ALVES et al., 2017).

### 3.2 Adesão de *Candida* Spp. a Diferentes Substratos.

A adesão consiste em um processo complexo de interação entre a parede celular do fungo com a superfície do hospedeiro, sendo a primeira etapa do processo infeccioso (ZUZU-ALVES et al., 2017). A parede celular de espécies do gênero *Candida* é uma estrutura fundamental para a manutenção da viabilidade celular (NETEA et al., 2008), sendo composta por cerca de 80 a 90% de resíduos de manose ligados por N-glicosilação, O-glicosilação e glicosilfosfatidilinositol (GPI). É dividida em uma camada interna de polissacarídeos de quitina e  $\beta$ -1,3-glucano, responsável pelo formado e rigidez da parede, e uma camada externa de mananas associadas covalentemente a proteínas, conforme ilustrado na Figura 1-A (GOZALBO et al., 2004; NETEA et al., 2008; GOW et al., 2012).

Determinados componentes da parede celular são reconhecidos pelo sistema imunológico como padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) (revisado por ZHU e FILLER., 2010). Contudo, a composição da parede celular varia entre as espécies e linhagens de uma mesma espécie, tais variações interferem nas propriedades antigênicas da parede, dificultando a resposta imunológica do hospedeiro (NETEA et al., 2008; GOW et al., 2012).

Vários fatores podem levar a variações na parede celular dos fungos, tais como, polimorfismo, *switching* e respostas a flutuações ambientais. Em *C. albicans*, a expressão de proteínas de parede passa por alterações durante a transição de levedura para hifa. Neste estágio, há a expressão acentuada de genes responsáveis por proteínas específicas das hifas, sendo exemplos os genes *Hwp1* (hyphal wall protein 1), *Hyr1* (hyphally upregulated protein) e *ALS3* (agglutinin-like sequence). As proteínas de parede, também são alteradas, apresentando menor

número de ligações fosfodiéster e  $\beta$ -1,2 manooligosacarídeo na forma de hifa. Além disso, a estrutura de componentes básicos de parede, tal como mananas, glucana e polissacarídeos sofrem variações (NETEA et al., 2008; revisado por ZHU e FILLER., 2010; GOW et al., 2012).

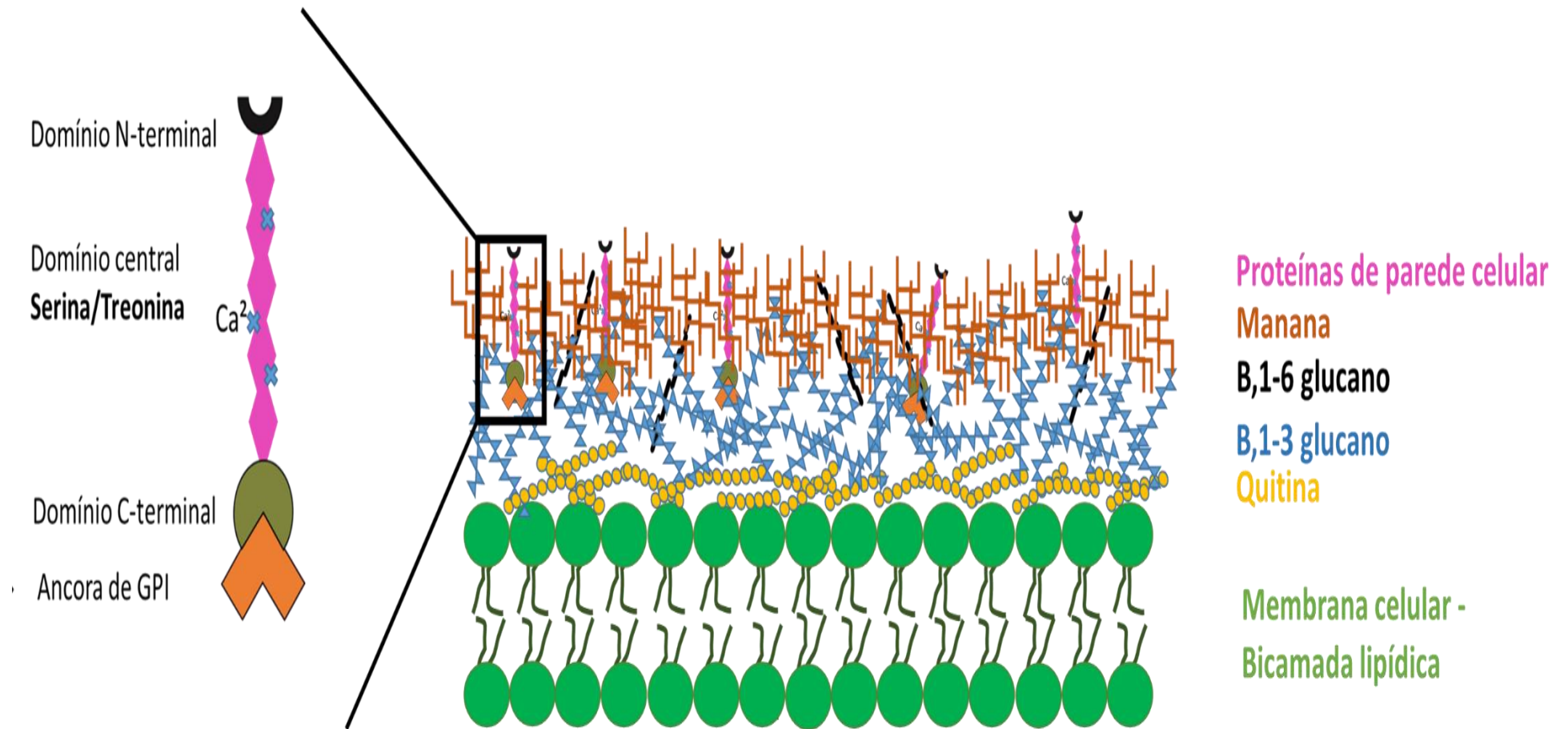
Alterações protéicas na parede, além de dificultar o reconhecimento do sistema imune podem vir a interferir na capacidade do microrganismo de aderir e invadir tecidos do hospedeiro (GOW et al., 2012). Fator que chama atenção, visto que a capacidade de adesão de *Candida* spp. ao hospedeiro representa um importante atributo de virulência, aumentando o potencial de invasão e disseminação das infecções (NEGRI et al., 2010).

A adesão ocorre em duas etapas, a primeira descrita como reversível é mediada por forças físicas como de van der Waals, ligações covalentes, interações estéricas e eletrostáticas (MARIĆ; VRANEŠ., 2007). A hidrofobicidade da superfície celular é crucial para a adesão, visto que a adesão da levedura em uma superfície hidrofóbica, não-polar, reduz as forças repulsivas envolvidas na interação, ampliando as forças de atração, fazendo com que a adesão avance para um estágio irreversível, mediado também por diversas proteínas de parede (GARRETT; BHAKOO; ZHANG., 2008).

Conforme mencionado, a parede celular de *Candida* spp. é composta por uma série de proteínas, as quais são altamente glicosiladas e possuem vários grupamentos fosfato, que conferem carga negativa a parede celular, fato diretamente relacionado com as interações eletrostáticas da parede (TRONCHIN et al., 2008). Dentre estas proteínas estão as proteínas de caráter hidrofóbico, que medeiam as interações com uma ampla variedade de superfícies abióticas, como: poliestireno, poliuretano e silicone, materiais convencionalmente utilizados na fabricação de cateteres. Essas proteínas interagem também com proteínas da superfície da célula hospedeira, como laminina, fibrogênio e fibronectina (TRONCHIN et al., 2008; ZUZA-ALVES et al., 2017).

A adesão de *Candida* spp. em células epiteliais humanas, consiste em um processo complexo e multifacetado, envolvendo a superação das forças repulsivas de parede, uma vez que tanto a superfície celular de *Candida* quanto a das células epiteliais são carregadas negativamente. As adesinas atuam interagindo com os componentes da matriz extracelular (CME), tais como fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina, entactina e tenascin, ligando-se também á proteínas séricas

e componentes imóveis de parede, como integrinas e caderinas (revisado por WILLIANS et al., 2013).



**Figura 1.** Estrutura da parede celular padrão de *Candida* spp. A- Organização dos componentes da parede celular de *Candida* spp. B- Aranjo da adesina fúngica. **Fonte:** o próprio autor

A interação destas estruturas pode sofrer interferência de outros fatores relacionados ao hospedeiro. Destacamos aqui a ação protetiva de proteínas do soro, conforme relatado em estudo desenvolvido por Ding e colaboradores (2014), no qual foi evidenciado uma baixa expressão gênica de genes relacionados à adesinas, tais como, *ALS1*, *ALS3* e *BCR1*.

Espécies de *Candida* expressam múltiplas estruturas de parede que medeiam a adesão, denominadas adesinas (VERSTREPEN et al., 2006). A estrutura comum das adesinas consiste em três domínios: (1) um domínio N-terminal, que possui uma região de ligação de carboidrato ou peptídeo que projeta-se da superfície celular fornecendo maior afinidade às superfícies; (2) o domínio central, caracterizado pela presença de múltiplas repetições de serina e treonina, resultando em adesinas de comprimentos diferentes, sendo as regiões com repetições mais longas responsáveis por conferir maior adesão, uma vez que possibilitam uma maior exposição da região N-terminal, além disso, essa porção sofre também variações em decorrência de eventos de recombinação entre alelos de adesinas; (3) e o domínio C-terminal, o qual permanece ancorado ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), ligando a adesina a parede celular, conforme ilustrado na Figura 1 (VERSTREPEN et al., 2004, 2005, 2006; GROOT et al., 2013).

As adesinas passam por extensas modificações pós-transcricionais, sendo um peptídeo sinal do domínio N-terminal removido e outro peptídeo sinal da porção C-terminal substituído por uma ancora de GPI no reticulo endoplasmático. Ocorrem também as reações de N-glicosilação e O-glicosilação na porção central das adesinas. No complexo de Golgi ocorre o processamento adicional da âncora de GPI e das cadeias laterais. É proposto que as pequenas ligações nas cadeias laterais conferem as adesinas uma estrutura longa e semi-rígida estabilizada por íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (JENTOFT., 1990). Na membrana plasmática, a âncora de GPI é clivada e a adesina liga-se covalentemente ao  $\beta$ -1,6 glucano por meio de resíduos de GPI conforme ilustrado na Figura 1 (TIEDE et al., 1999; VERSTREPEN et al., 2004, 2005, 2006; GROOT et al., 2013).

Assim como *C. albicans*, *C. tropicalis* apresenta uma serie de proteínas de parede celular que atuam como adesinas. Em razão da proximidade filogenética que estas compartilham, muitas das adesinas expressas em ambas espécies assemelham-se em estrutura e função (YU et al., 2016).

Em *C. tropicalis* são conhecidos 16 genes da família ALS, as quais apresentam afinidade a diferentes superfícies (BUTTLER et al., 2009). As glicoproteínas 2 e 3 da família ALS estão relacionadas tanto com a adesão em células epiteliais, quanto com o dano celular. No entanto, a expressão ALS 1-2 ocorre de forma proeminentemente em poliestireno comparado com a adesão em células epiteliais (YU et al., 2016). Indicando papel relevante dessas proteínas no potencial de adesão de *C. tropicalis* á superfícies abióticas e bióticas e a relação para com o dano celular (Tabela 1).

Outra família de proteínas relacionada com a adesão são as proteases aspárticas secretadas (Sap1-4 - secreted aspartyl proteases), as quais são importantes também no dano celular (BUTLER et al., 2009). Yu e colaboradores (2016) evidenciaram a expressão elevada do gene *SAP3* na adesão de *C. tropicalis* em poliestireno e em células epiteliais, enquanto a expressão de *Sap1* foi superior em células epiteliais e *SAP4* superior em poliestireno (Tabela 1). A expressão dessas adesinas pode ser mediada por uma série de eventos, tais como o *switching* fenotípico, podendo resultar na expressão diferenciada desse fator de virulência em *C. tropicalis* (GROOT et al., 2013).

**Tabela 1.** Adesinas em *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Proteína	Estrutura	Substrato	Referências
<i>Candida albicans</i>			
Als 1	1260 aa; com sequências de formação de amilóide	Células epiteliais, células orais, células endoteliais, fibronectina, laminina, vidro e plástico.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Zhao et al.,2004; Hoyer et al., 1995; GenBank acesso n. P46590
Als 2	2530 aa	Células endoteliais, superfícies abióticas como plástico e vidro.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Jones et al., 2004; Hoyer, L. L.; Payne, T. L.; Hecht, J. E.,1998. GenBank acesso n. P0CU38
Als 3	1155 aa; com sequências de formação	Células epiteliais, células orais, células endoteliais,	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Zhao et al.,2004; GenBank acesso n.

	de amilóide	fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, plástico e vidro. Atua como receptor de ferritina.	AAO72959
Als 4	2100 aa	Células endoteliais, superfícies abióticas	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Jones et al., 2004; Hoyer, L. L.; Payne, T. L.; Hecht, J. E., 1998; GenBank acesso n. A0A1D8PQB9
Als 5	1419 aa	Células epiteliais, células endoteliais, superfícies abióticas e proteínas da matriz extracelular.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Gaur, N. K.; Klotz, S. A., 1997; GenBank acesso n. O13368
Als 6	1366 aa	Células endoteliais, superfícies abióticas, como vidro e plástico.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Zhao et al., 2007; GenBank acesso n. AAO72081
Als 7	1568 aa	Células epiteliais, células endoteliais, fibrinectina, laminina, superfícies abióticas, como vidro e plástico.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; van het Hoog et al., 2007; Sheppard et al., 2004; GenBank acesso n. Q5A312
Als 9	1890 aa	Células endoteliais, laminina, fibronectina, superfícies abióticas, como vidro e plástico	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Sheppard et al., 2004; Zhao et al., 2003; GenBank acesso n. A0A1D8PQ86
Hwp 1	634 aa	Células epiteliais; Células BEC; biofilme <i>in vivo</i> , fibronectina, poliestireno.	Groot et al., 2013; Zhu e Filler et al., 2010; Staab; Ferrer.; Sundstrom., 1996; GenBank acesso n. AAC96368
Eap 1	653 aa	Células epiteliais; poliestireno; formação de biofilme; <i>mating</i> sexual e filamentação.	van het Hoog et al., 2007; Jones et al., 2004; GenBank acesso n. G1UBC2
Iff 4	1526 aa	Células epiteliais e superfícies plásticas.	van het Hoog et al., 2007; Jones et al., 2004; GenBank acesso n. Q5AAL9
Hyr 1	919 aa	Medeia a resistência a neutrófilos; Bcr1	Luo et al., 2010; van het Hoog et al., 2007; Jones et al., 2004; GenBank

		dependente; hifa específica.	acesso n. Q5AL03.2
<i>Candida tropicalis</i>			
Als 1	353 aa p	Poliestireno	Yu et al., 2016; Butler et al., 2009; GenBank acesso n. AAG35604
Als 2	-----	Poliestireno e células epiteliais	Yu et al., 2016; Butler et al., 2009
Als 3	-----	Poliestireno e células epiteliais	Yu et al., 2016; Butler et al., 2009
Als 4-16	-----		Butler et al., 2009
Sap 1	394 aa	Células epiteliais e poliestireno	Yu et al., 2016; GenBank acesso n. MF925001.1
Sap 2	406 aa p	Poliestireno e células epiteliais	Wu et al., 2012; GenBank acesso n. MF925069.1
Sap 3	369 aa p	Poliestireno e células epiteliais	Yu et al., 2016; GenBank acesso n. MF925136.1
Sap 4	394 aa	Poliestireno	Yu et al., 2016; Wu et al., 2012; GenBank acesso n. MF925205.1
Hwp 1	301 aa p	Vitronectina, fibronectina, laminina	Kozik et al., 2015; Butler et al., 2009; GenBank acesso n. ACC68135
Hyr 1	171 aa	-----	Butler et al., 2009; GenBank acesso n. XP_002549698

aa / aminoácido

P / proteína parcialmente descrita

----- / Não determinado

Em *C. albicans* o fator de transcrição Efg1, crucial para a ativação dos genes hifa-específicos, é responsável por induzir a expressão de adesinas e invasinas. Uma ampla variedade de adesinas tem sido descrita para *C. albicans*, conforme consta na Tabela 1: ALS, Hwp1, Eap1 (enhanced adherence to polystyrene), Iff4 (IPF family F) e Hyr1, apresentam afinidade distinta às diferentes superfícies bióticas e abióticas (GROOT et al., 2013; ZHU e FILLER et al., 2010; NOBILE e MITCHELL., 2005; LI e PALECEK., 2003; VERSTREPEN et al., 2006).

Genes da família ALS, estão envolvidos na adesão e invasão de células hospedeiras (LIU e FILLER, 2011). Oito tipos de ALS são descritos para *C. albicans*, ALS1-7 e ALS9, estas exibem perfil de adesão distinto á diferentes superfícies sendo que, ALS1, ALS3 e ALS5 medeiam a adesão à diversos sítios do hospedeiro, incluindo células epiteliais, orais e diversas superfícies abióticas. ALS3 por sua vez atua também como um receptor de ferritina, mediando assim a aquisição de ferro. ALS2 e ALS4 medeiam a adesão em células endoteliais e à superfícies abióticas, contribuindo com a formação de biofilme e patogenicidade. ALS6 e ALS7 promovem adesão apenas a superfícies abióticas, como vidro e plástico. ALS9 promove a adesão em células endoteliais e a uma gama limitada de substratos, não mediando a adesão em células epiteliais (Tabela 1) (GROOT et al., 2013; ZHU e FILLER et al., 2010).

Hwp1 é uma proteína GPI, expressa na parede celular de hifas e pseudo-hifas de *C. albicans*, seu domínio N-terminal atua como substrato de ligação à transglutaminas associadas covalentemente a proteínas na membrana de células epiteliais. Sendo assim, a expressão de *Hwp1* é considerada primordial para a formação de biofilme *in vivo* (GROOT et al., 2013; ZHU e FILLER et al., 2010). Segundo Nobile e Mitchell (2005), Hwp1 também pode ligar-se á ALS1 e ALS3, promovendo ligação entre hifas de *C. albicans*, a qual é importante para a formação de biofilme e o *mating* sexual (Tabela 1).

Conforme já discutido, a morfogênese resulta em alterações na parede celular. Estudos apontam que o fator transcricional Bcr1 (biofilm and cell wall regulator), diretamente relacionado ao potencial de filamentação em *C. albicans* e *C. tropicalis*, é responsável pela indução da transcrição de *Hyr1*, estando também envolvido na formação de biofilme (LIU e FILLER, 2011; LUO et al 2011; LIN et al 2009). *Hyr1* além de mediar a adesão, pode atuar promovendo resistência a ação de neutrófilos, sendo importante no desenvolvimento de infecções persistentes (Tabela 1) (GROOT et al., 2013).

### 3.3 SWITCHING FENOTÍPICO

*Switching* fenotípico consiste em um evento epigenético, espontâneo, caracterizado pela alteração na morfologia das colônias com frequência

superior a de mutação e com padrão elevado de reversibilidade (SLUTSKY et al., 1987; EGGER et al., 2004; JAIN et al., 2008; SOLL, 2009).

Tal alteração fenotípica é considerada uma microevolução pontual, permitindo rápida adaptação as constantes flutuações ambientais (temperatura, pH, pressão osmótica), bem como a diferentes microambientes do hospedeiro, sendo um importante fator de virulência para espécies de *Candida* (SLUTSKY et al., 1987; SOLL, 1992; STRAUB et al., 2001; JAIN et al., 2008).

O evento de *switching* modula a expressão de diversas famílias gênicas, as quais resultam em alterações não apenas na morfologia das colônias, bem como na expressão diferenciada de propriedades antigênicas, polimorfismo, formação de biofilme a superfícies bióticas e abióticas (LOHSE; JOHNSON, 2009; LOHSE et al., 2010).

Os sistemas de *switching* têm sido caracterizados desde a década de 80, sendo os estudos iniciais desenvolvidos de forma mais extensiva com *C. albicans* (SLUTSKY et al., 1985; SLUTSKY et al., 1987; SOLL, 1992). Tal apresenta um repertório amplo de sistemas de *switching* com diversos morfotipos, sendo o sistema White-opaque o mais estudado (YOON et al., 1999).

Vários fatores de transcrição estão relacionados ao *switching*, sendo Efg1 (Enhanced filamentous growth protein 1) de extrema relevância às células *White* e a interconversibilidade do sistema *White-Opaque*, uma vez que é responsável pela repressão do principal regulador da fase *Opaque* (Wor1). Além disso, Efg1 é caracterizado por ser um dos seis fatores de transcrição relacionados com a capacidade de formação de biofilme em *C. albicans*, estando também envolvido na capacidade de formação de hifas frente a condições ambientais adversas (ZORDAN et al., 2007; PIERCE; KUMAMOTO, 2012; HERNDAY et al., 2013; PANDE et al., 2013; HIRAKAWA et al., 2014).

O padrão de virulência expresso por *C. albicans* também é alterado em decorrência do evento de *switching*, uma vez que as células *White* são mais virulentas em relação às células *opaque*, sendo este um agravante para o contexto clínico (STRAUB et al., 2001; JAIN et al., 2008).

O evento de *switching* fenotípico foi descrito também para outras espécies de *Candida*, sendo essas *C. tropicalis* (SOLL et al., 1988; FRANÇA et al., 2011; PORMAN et al., 2011; MORALEZ et al., 2014, 2016), *C. parapsilosis* (LOTT et

al., 1993; LAFFEY e BUTLER, 2005), *Candida lusitanae* (YOON et al., 1999) e *C. glabrata* (LACHKE et al., 2000; SRIKANTHA et al., 2008).

Soll e colaboradores (1988) descreveram pela primeira vez o evento de *switching* fenotípico para *C. tropicalis*. No entanto, os morfotipos observados a partir dos isolados sanguíneos de *C. tropicalis* diferiram daqueles descritos para *C. albicans*, apresentando morfologia estruturada, com maior número de formas filamentosas. Porman e colaboradores (2011) denominaram de *White-Opaque* um dos sistemas de *switching* de *C. tropicalis*, em decorrência das semelhanças morfológicas com o sistema *White-opaque* de *C. albicans*. Porém estes diferem sobretudo no padrão transcricional de genes envolvidos (SOLL, 2009; PORMAN et al., 2011).

Em trabalho desenvolvido por França e colaboradores (2011), com o sistema de *switching* 49.07 de *C. tropicalis*, foram realizadas análises ultraestruturais das colônias dos morfotipos, nas quais detectou-se a presença de matriz extracelular durante seu desenvolvimento, sobretudo nos morfotipos variantes mais estruturados, sugerindo uma possível relação entre a presença de material extracelular e a complexidade dos morfotipos de *C. tropicalis*. Além disso, os morfotipos exibiram perfis distintos de formação de biofilme, indicando alteração neste fator de virulência em decorrência do evento de *switching*.

Moralez e colaboradores (2014), desenvolveram estudos com diferentes sistemas *switching* (49.07; 335.07; 100.10; 46.10; 23610), os quais provém de isolados clínicos de *C. tropicalis*, apresentando colônias com morfologia complexa, mais estruturada, denominadas variantes morfológicas de *switching*. Tais variantes apresentam alta frequência de reversibilidade, retomando a morfologia de colônia observada originalmente no isolado clínico (Parental).

Tais morfotipos mostraram diferenças no perfil de filamentação dos morfotipos de *C. tropicalis*, sendo esse superior nas colônias dos morfotipos variantes em contraste com o parental. A capacidade de formar biofilme foi observada em todos os morfotipos avaliados. Entretanto, foram observadas variações entre estes, conforme evidenciado nos morfotipos crepe e rugoso do sistema 49.07 e no morfotipo crepe do sistema 100.10, os quais foram maiores formadores de biofilme que seus parentais. O fator hemolítico e a concentração inibitória mínima (MIC) ao itraconazol também sofreram variações entre os morfotipos variantes, quando comparado ao parental.

Posteriormente, Moralez e colaboradores (2016) evidenciaram diferenças significativas no dano celular de células epiteliais por morfotipos de *switching*. Neste contexto, o morfotipo Crepe do sistema de *switching* 49.07 sobressaiu-se, promovendo dano celular superior ao expresso por seu parental. Tal estudo foi o primeiro a avaliar os morfotipos após o fenômeno de reversibilidade, evidenciando uma citotoxicidade superior pelo morfotipo revertente de crepe frente ao parental, sugerindo que embora haja semelhança morfológica entre estes, o padrão transcricional expresso difere possivelmente em decorrência da condição fisiológica do morfotipo e a características de virulência não relacionadas com o fenótipo.

Perini e colaboradores (2018), observaram redução nos níveis de fagocitose por hemocitos de *Galleria mellonella* infectados pelo morfotipo Crepe do sistema 49.07, em relação a linhagem parental. Além disso, o evento de *switching* foi relacionado ao aumento da expressão do fator *EFG1*, vinculado a diferenciação celular, bem como a elevações na concentração inibitória mínima (CIM) ao fluconazol. Tais dados mostram que o evento de *switching* altera os fatores de virulência dos morfotipos de *C. tropicalis*.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D; HENRIQUES, M; SILVA, S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2016.
- BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 21, 2006.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 87–91, 2008.
- BRUDER-NASCIMENTO et al., Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research**, v. 3, n.1, p. 1-5, 2010.
- BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p.657–662, 2009.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.
- CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282–298, 2010.
- CHEN, Y. C. et al. Candidaemia with uncommon *Candida* species: Predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 14–16, 2009.
- CONDE-ROSA, A. et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 29, n. 1, p. 26–29, 2010.
- 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.
- COSTA-ORLANDI, C. et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 1-24, 2017.
- DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: A prospective comparative study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 377–384, 2007.
- DING, X. et al. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. **BMC Microbiology**, v.14, n.80, p. 1-9, 2014.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p.

e0146909, 2016.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 456-463, 2004.

ESCHENAUER, G. A. et al. Real-world experience with echinocandin MICs against *Candida* species: A multi-center study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 02163-13, 2014.

FRANÇA, E. J. G. et al. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. **Micron**, v. 42, n. 7, p. 726–732, 2011.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954–e966, 2010.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5289-5294, 1997.

GOZALBO, D. et al. *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**. V.4, n. 2, 2004.

GOW, N. A. R. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2012.

GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481, 2013.

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

HA, J. F. et al. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181–195, 2010.

HERNDAY, A. D. et al. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. v.90, 2013.

HIRAKAWA, M. P. et al. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. **Genome Research**. v.25, 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.
- HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; HECHT, J. E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and Localization of Als Proteins to the Fungal Cell Surface. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5334-5343, 1998.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. C. Phenotypic Switching in Fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, n. 3, p. 180–188, 2008.
- JENTOFT, N. Why are proteins O-mannosylated? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 291-294, 1990.
- JONES, T. et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7329-7334, 2004.
- KOZIK, A. et al. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 197, 2015.
- LACHKE, S. A. et al. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. **Infection and Immunity**. 2000.
- LAFFEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1073–1081, 2005.
- LI, F.; PALECEK, S. P. *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 6, p. 1266–73, 2003.
- LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. **Eukaryotic Cell**. 2011.
- LIN, L. et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **Plos Pathogens**, v.5 n. 12, p. e1000703, 2009.
- LOHSE, M. B.; JOHNSON, A. D. White-opaque switching in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 650–654, 2009.
- LOHSE, M. B. et al. Distinct class of DNA-binding domains is exemplified by a master regulator of phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14105–14110, 2010.
- LOTT, T. J. et al. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v. 23, p. 463-467, 1993.

LUO, G. et al. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 11, p. 1718-1728, 2010.

LUO, G. et al. Active and passive immunization with rHyr1p-N protects mice against hematogenously disseminated candidiasis. **PloS One**, v. 6, n.10, p. e25909, 2011.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. Scope and frequency of fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. isolates. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 733-739, 2016.

MARIĆ, S.; VRANEŠ, J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. **Periodicum Bilogorum**, v. 109, p. 115-121, 2007.

MARRA, R. A. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 05, p. 1866-1871, 2011.

MAYER, F. L; WILSON, D; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12, n. 1, p. 204, 2008.

MIRANDA, et al. *Candida albicans* CUG mistranslation is a mechanism to create cell surface variation. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00285-13, 2013.

MONNIOT, C et al. Rbt1 protein domains analysis in *Candida albicans* brings insights into hyphal surface modifications and Rbt1 potential role during adhesion and biofilm formation. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82395, 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. n.1, p. 106–114, 2014.

MORALEZ, A. T.-P. et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379–86, 2016.

NEGRI, M. et al. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. **British Journal of Biomedical Science**, v. 67, n. 3, p. 120–5, 2010.

NEGRI, M. et al. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 9, p. 1270–1275, 2011.

NETEA, M. G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67–78, 2008.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of Cell-Surface Genes and Biofilm Formation by the *C. albicans* Transcription Factor Bcr1p. **Current Biology**, v.15, p.1150–1155, 2005.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 5, 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.

PANDE, K.; CHEN, C.; NOBLE, S. M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. **Nature Genetics**. v.45, 2013.

PERINI, H.; SOUZA, C. M.; SANTOS, M. M.; FURLANETO-MAIA, L.; ALMEIDA, R. S.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching alters virulence and fluconazole susceptibility profile in *Candida tropicalis* clinical isolate. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, vol.23, n.2, pp.07-11, 2018.

PIERCE, J. V.; KUMAMOTO, C. A. Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. **mBIO**. v.3, 2012.

PIZZO, G. et al. Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Clinical Oral Investigations**, v. 5, n. 3, p. 172–176, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M. A. et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 842–849, 2008.

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

PRIEST, S. J.; LORENZ, M. C. Characterization of virulence-related phenotypes in *Candida* species of the CUG clade. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 9, p. 931–940, 2015.

SIPSAS, V. N. et al. Candidemia in Patients With Hematologic Malignancies in the Era of New Antifungal Agents (2001-2007). **Cancer**, v. 115, n. 2, p. 4745-4752, 2009.

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

SLUTSKY, B. et al. "White-opaque transition": A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 189–197, 1987.

SOCZO, G. et al. In vitro study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4474-4476, 2007.

SOLL, D. R. et al. Multiple *Candida* Strains in the Course of a Single Systemic Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n.8, p. 1448-1459, 1988.

SOLL, D. R.; MORROW, B.; SRIKANTHA, T. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 2, p. 61–65, 1992.

SOLL, D. R. Why does *Candida albicans* switch? **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 973–989, 2009.

SHEPPARD, D. C. et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, 2004.

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

STAAB, J. F.; FERRER, C. A.; SUNDSTROM, P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 11, p. 6298-6305, 1996.

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

TIEDE, A. et al. Biosynthesis of Glycosylphosphatidylinositols in Mammals and Unicellular Microbes. **Biological Chemistry**, v. 380, n. 5, p. 503-524, 1999.

TRONCHIN, G et al. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Sabouraudia**, v. 46, n. 8, p. 749-772, 2008.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives Medicine**, v. 4, p. 1-17, 2014.

VAN HET HOOG, M. et al. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. **Genome biology**, v. 8, n. 4, p. R52, 2007.

VERSTREPEN, K. J.; REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 533–540, 2004.

VERSTREPEN, K. J. et al. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nature Genetics**, v. 37, n. 9, p. 986–990, 2005.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5–15, 2006.

WACHTLER, B. et al., From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. e17046, 2011.

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, p. 22434, 2013.

WU, Y. et al. Analysis of the clonality of *Candida tropicalis* strains from a general hospital in Beijing using multilocus sequence typing. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e47767, 2012.

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

YU, S. et al. Distinct Expression Levels of ALS , LIP , and SAP Genes in *Candida tropicalis* with Diverse Virulent Activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–10, 2016.

YU, S B et al. The activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 459-469, 2017.

ZAUGG, C. et al. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis* Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 405–412, 2001.

ZHAO, X. et al. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2947-2960, 2003.

ZHAO, X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2415-2428, 2004.

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273–282, 2010.

ZORDAM, R. E.; GALGOCZY, D. J.; JOHNSON, A. D. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, 2007.

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

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente trabalho serão apresentados na forma de artigos.

**Artigo 1** - Comparative analysis of adhesion of *Candida tropicalis* to polystyrene and epithelial cells and the extent of adherent yeast cells to distinct epithelial cell lines.

**Artigo 2** - *Switching* fenotípico em *Candida tropicalis*: papel na adesão à superfícies bióticas e abiótica.

## ARTIGO 1

**COMPARATIVE ANALYSIS OF ADHESION OF *Candida tropicalis* TO POLYSTYRENE AND EPITHELIAL CELLS AND THE EXTENT OF ADHERENT YEAST CELLS TO DISTINCT EPITHELIAL CELL LINES****Abstract**

**Purpose.** *Candida tropicalis* is an emergent species associated with human infections. This study aimed to compare the adhesion capability of *C. tropicalis* to polystyrene and epithelial cells as well as to determine the extent of adherent yeast cells on distinct epithelial cells lines.

**Methodology.** The ability of *C. tropicalis* clinical isolates (49.07, 335.07, 100.10) to adhere to polystyrene surface and to epithelial cells (HeLa and Vero cells) was carried out for 2 h at 37°C and determined by crystal violet staining. Correlation between adhesion to polystyrene and to cell lines was assessed by Pearson's correlation coefficient. The percentage of epithelial cells with adhered yeast and number of adherent yeasts per epithelial cell were counted microscopically.

**Results.** *C. tropicalis* adhered significantly more to polystyrene than to HeLa and Vero cells. Besides, high correlation values ( $r^2$  0.9999222) were obtained between adhesion to these surfaces for isolates 100.10 and 335.07. The percentage of HeLa cells with adhered yeast cells as well as the number of adherent yeasts per HeLa cell were higher in comparison to that observed for Vero cells ( $p < 0.05$ ). However, a perfect correlation was obtained for the number of *C. tropicalis* cells per epithelial cell between HeLa cell and Vero cell (Pearson correlation,  $r^2$  1,  $p$  0.0001).

**Conclusions.** *C. tropicalis* adhesiveness to polystyrene was higher than that observed for epithelial cells. The extent of adherent *C. tropicalis* cells on epithelial cells was cell type specific, although a perfect correlation for the number of yeast cells per epithelial cell between HeLa and Vero cell was observed.

**Keywords:** *Candida tropicalis*, adhesion, HeLa cell, Vero cell.

## INTRODUCTION

*Candida* species are the main causative agents of fungal infections, particularly in patients with impairment in the immune system, causing high morbidity and mortality [1]. Although *Candida albicans* remains the most frequently isolated species, the prevalence of non-*albicans* *Candida* species is on the rise. Currently, *Candida tropicalis* consist of one of the most clinically relevant *Candida* species mainly in tropical climates [2-5]. In fact, the increase in isolation of *C. tropicalis* associated with both superficial (mucosal and cutaneous) and systemic infections in several casuistics emphasizes its emergent character [6].

The pathogenicity of *Candida* species is related to several virulence traits, including their ability to adhere to host epithelial cells, which is a prerequisite for colonization and infection [7-9]. For instance, studies have described that *C. tropicalis* displayed higher ability of adherence to human buccal epithelial cells compared to other *Candida* species [10,11]. A study by [9] revealed that the ability of *C. tropicalis* to adhere to human urinary bladder epithelial cell line occurred in a strain-dependent manner. Further, adherence to abiotic surfaces is an important factor in the clinical environment, since it is the first step for the formation of biofilm on medical devices, conferring significant tolerance to antifungal therapy [12,13]. Recently, it has been showed that *C. tropicalis* exhibited the highest adherence capability to polystyrene surface compared to others pathogenic *Candida* species [14].

Adhesion process is complex and includes different factors, such as the microorganism involved, the composition of adhesion surfaces and environmental factors [15], and it is driven by biointeractions between fungal cells and host surfaces [16]. Considerable knowledge is available regarding *C. albicans* adhesion nevertheless limited studies have been performed on *C. tropicalis*. In the present study, we aimed to compare the adhesion profile of clinical isolates of *C. tropicalis* to polystyrene surface and epithelial cells (HeLa and Vero), and to evaluate whether there is a correlation between the extent of adherent yeast cells to distinct epithelial cell lines.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Candida tropicalis* strains**

Clinical isolates of *C. tropicalis* recovered from tracheal secretion (49.07, 335.07) and from blood (100.10) were obtained as a stock culture from the Fungal Genetics Laboratory, The State University of Londrina-Brazil [17]. These isolates were stored as frozen stocks with 15% (w/v) glycerol at -80°C and cultured on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) agar plates (1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone, 2% w/v dextrose and 2% w/v agar) at 30°C.

### **Adhesion assay to polystyrene**

*C. tropicalis* adhesion assay was performed as reported previously [18], with modifications. For each isolate, 1 mL of standardized cell suspensions in RPMI 1640 medium (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA), containing  $1 \times 10^7$  cells/mL, were placed into wells of 24-well polystyrene culture plates and incubated at 37°C without agitation for 2 h. After, the medium was aspirated, and non-adherent cells were removed by washing twice with sterile PBS buffer.

Yeast cells were quantified using the crystal violet (CV) staining method. Adhered cells were fixed with 1 mL of methanol for 15 min, and 1 mL of CV (1% v/v) was added to each well and incubated for 5 min. The wells were washed with PBS buffer twice. 1 mL of acetic acid (33 % v/v) was added to dissolve the color. The solution absorbance was read in triplicate in a microtiter plate reader (Bio-Tek EL 808) at 540 nm. The experiments were performed in triplicate and repeated three times.

### **Culture of epithelial cells**

HeLa cells (ATCC, CCL2TM; Manassas, VA, USA), originating from human uterine cervix tumor, and Vero cells line (ATCC CCL81), originating from fibroblastic monkey kidney- *Cercopithecus aethiops*, were acquired from the American Type Culture Collection, and was maintained in culture in the Mycology and Alternative Methods to the Use of Animals Laboratory, State University of Londrina. The cells were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO, USA) containing 10 % fetal bovine serum (FBS; GIBCO, USA) and 1 % penicillin/streptomycin (P/S; GIBCO, USA) in cell culture flasks. After, cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/mL with fresh DMEM without antimicrobial

agents and added to each well of a 24 well culture plates, and incubated with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C until achieving 80 % confluence (HeLa per 24 hours and Vero per 18 hours).

### **Adhesion to epithelial cells**

*C. tropicalis* adhesion to epithelial cells was conducted as reported previously [8], with modifications. Yeast cells were suspended in DMEM medium and 1 mL of standardized cell suspensions, containing  $1 \times 10^7$  cells/mL, was added to each well of the 24 well culture plates and co-culture with cells line in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 2 h. After, wells were washed with PBS buffer to remove unattached yeast. Yeast cells were quantified using the crystal violet (CV) staining method and light microscope observation. Crystal violet (1 mL, 1%) was added to each well containing the epithelial cells with adherent yeasts for 5 min and the wells were washed twice with PBS buffer. To remove color from the epithelial cells, 1 mL of ethanol:acetone (1:1) was added to the wells and removed immediately. Acetic acid (33%, 3 mL) was added to each well and absorbance was read at 540 nm. Wells containing epithelial cells without yeasts were used as controls. All procedures were repeated in triplicate in three separate experiments.

### **Microscope observation**

The percentage of HeLa and Vero cells with adhered yeasts and number of adhered yeast per cell line were performed as described elsewhere [19], with modifications. Briefly, the cells lines ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were adhered to 13-mm round coverslips (Perfecta, Brazil) where they remained for 24 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After achieving 80 % confluence the epithelial cells were co-cultivated with *Candida* cells ( $1 \times 10^7$  cells/mL) for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After this period, the co-cultured cells were washed with PBS buffer and fixed with 4 % of paraformaldehyde in PBS buffer for 30 min. After washing with PBS buffer, cells were stained with 1 % methylene blue for 5 min, following washing with PBS buffer and analyzed by light microscopy (E100, Nikon-LED). All tests were repeated in triplicate in three separate experiments, 300 epithelial cells were accounted per coverslips.

## Statistical analysis

The results were analysed using Graphpad prism 7 program. Anova-Tukey Test was used to compare adhesion capability. The Pearson correlation was used to verify the correlation of adhesion between different surfaces. A  $p$  value  $<0.05$  was taken to be statistically significant. In all cases, the assays were performed in triplicate on three separate occasions.

## RESULTS

Our data showed that *C. tropicalis* isolates were able to adhere to polystyrene surface and to both epithelial cells lines (HeLa and Vero) (Fig. 1). However, significant differences of isolates adhesion ability were observed among these surfaces ( $p<0.05$ ), where the highest adherence was observed on polystyrene, followed by HeLa and Vero cells.

*C. tropicalis* isolate 49.07 showed lower ability to adhere to polystyrene ( $p<0.01$ ) and Vero cells ( $p<0.05$ ) compared to others isolates. On the other hand, isolates 100.10 and 335.07 exhibited the same extent of adherence to both abiotic and biotic surfaces (Fig. 1). Of note, for these isolates high correlation values (Pearson correlation,  $r^2$  0.9999222,  $p$  0.007941) were obtained for the adhesion capability between biotic (HeLa and Vero cells) and polystyrene surface.

We also assessed the percentage of epithelial cells exhibiting adhered yeast cells and the number of adhered yeast cell per epithelial cell (Fig. 2). As shown in Fig. 2A, high percentage of epithelial cells exhibiting adhered *C. tropicalis* cells was observed. However, for isolates 100.10 and 335.07, a significantly higher percentage of HeLa cells with adhered yeast cells was observed compared to that observed for Vero cells ( $p<0.05$ ), suggesting greater affinity of these isolates for the human epithelial cell line (Fig. 2A). Besides, for these isolates, the number of yeast cells per HeLa cell was higher than the number of yeast cells adhered to Vero cells ( $p<0.05$ ) (Fig. 2B). Interesting, for all isolates a perfect correlation was obtained for the number of *C. tropicalis* cells per epithelial cell between HeLa cell and Vero cell (Pearson correlation,  $r^2$  1,  $p$  0.0001).

Microscopic analysis of *C. tropicalis* adhesion to epithelial cells revealed distinct patterns of yeast distribution on HeLa and Vero cells monolayers (Fig. 2C). *C. tropicalis* occurred as clumps of yeast cells homogeneously distributed on the surface of HeLa cells. Concerning Vero cells a diffuse yeast distribution pattern was

observed (Fig. 2C). Isolate 335.07 exhibited initial differentiation into filamentous forms after co-cultivation with both epithelial cell lines.

## DISCUSSION

One important phenomenon to be considered with respect to pathogenesis is the capacity of fungal cells to adhere to different surfaces. Despite the clinical relevance of *C. tropicalis* relatively little is known about its pathogenic mechanisms. Thus, a better understanding of adhesion ability of this species would provide an insight into its pathogenesis. In this study, we aimed to analyse whether clinical strains of *C. tropicalis* adhere to different substrates, polystyrene and epithelial cells, to variable extents, and determine whether the extent of adherent yeast cells on epithelial cells is cell type specific.

Adhesiveness of *C. tropicalis* to polystyrene surface was higher than that observed to epithelial cells. Similarly, *C. albicans* also showed higher adhesion to polystyrene compared to human colorectal carcinoma cell line (Caco-2) and to epidermoid vulvovaginal (A431) cells [7]. Also, in the present study, a comparison of adhesion capability to polystyrene and continuous cells lines revealed high correlation ( $r^2$  0.9999222,  $p$  0.007941). This is an interesting trait, because the majority of studies regarding *Candida* spp. adhesion are based on *in vitro* assays using polystyrene surfaces [13,14]. This correlation may help to infer the capability of *C. tropicalis* adherence to biotic surfaces on the basis of the data obtained using the standard polystyrene assay.

This study showed for the first time the capability of *C. tropicalis* to adhere to Vero cells. Overall, the percentage of epithelial cells with adhered yeast cells and the number of yeast cells per Vero cell were lower than that observed for HeLa cells (Fig. 2A,B). The differences in number of adhered yeast per epithelial cell can be explained, in part, by aggregative pattern of adhesion evidenced in HeLa, since in Vero cells the *C. tropicalis* isolates exhibited a diffuse distribution pattern (Fig. 2C). Besides, differences in the adhesion capacity may be related to the affinity of the *Candida* cell wall components to the epithelial cell receptors [20]. The ability of *C. tropicalis* to adhere to epithelial cells, in particular human epithelia cell, deserve attention, because adhesion may be the first stage for biofilm formation, an important virulence factor, associated with candidemia cases and high mortality rates [10].

In fact, *Candida* spp. expresses multiple cell wall components that mediate adhesion, like adhesins, to epithelial cells [21]. The ability to adhere to biotic surfaces may also be related to the capacity of morphogenesis [21], as observed for isolate 335.07 on the surface of both cell lines. The filamentation capacity is associated with the expression of the cell wall proteins, that together with the adhesins, bind covalently to epithelial cells, favoring adhesion [21].

Another factor related with the adhesion event to biotic and non-biotic surfaces is the diversity of physical interaction that mediates this characteristic. In abiotic materials, the adhesion is better in surfaces that favor the formation of hydrophobic and electrostatic bonds between cell wall proteins [22]. The hydrophobicity is also a factor associated with the cell wall composition, which can facilitate adhesion to the substrates. Concerning *C. tropicalis*, Okawa et al. (2008) [23] described that the strain most adhesive to HeLa cells showed the highest hydrophobicity activity.

The process of adhesion is mediated by several factors that culminate with the success of the yeasts in the occupation of several body sites. We showed a perfect correlation between adhesion capacity (total biomass data) and mean of adhered yeast to Vero cells ( $r^2 1$ ,  $p 0.00002$ ).

In conclusion, our results indicate that although higher adhesion of *C. tropicalis* occurred on plastic surface (polystyrene) compared to epithelial cells, high correlation of adhesion ability between these surfaces was found. A perfect correlation was observed for the number of *C. tropicalis* cells per epithelial cell between HeLa and Vero cell, although *C. tropicalis* was more adherent to the former cell type.

### **Acknowledgements**

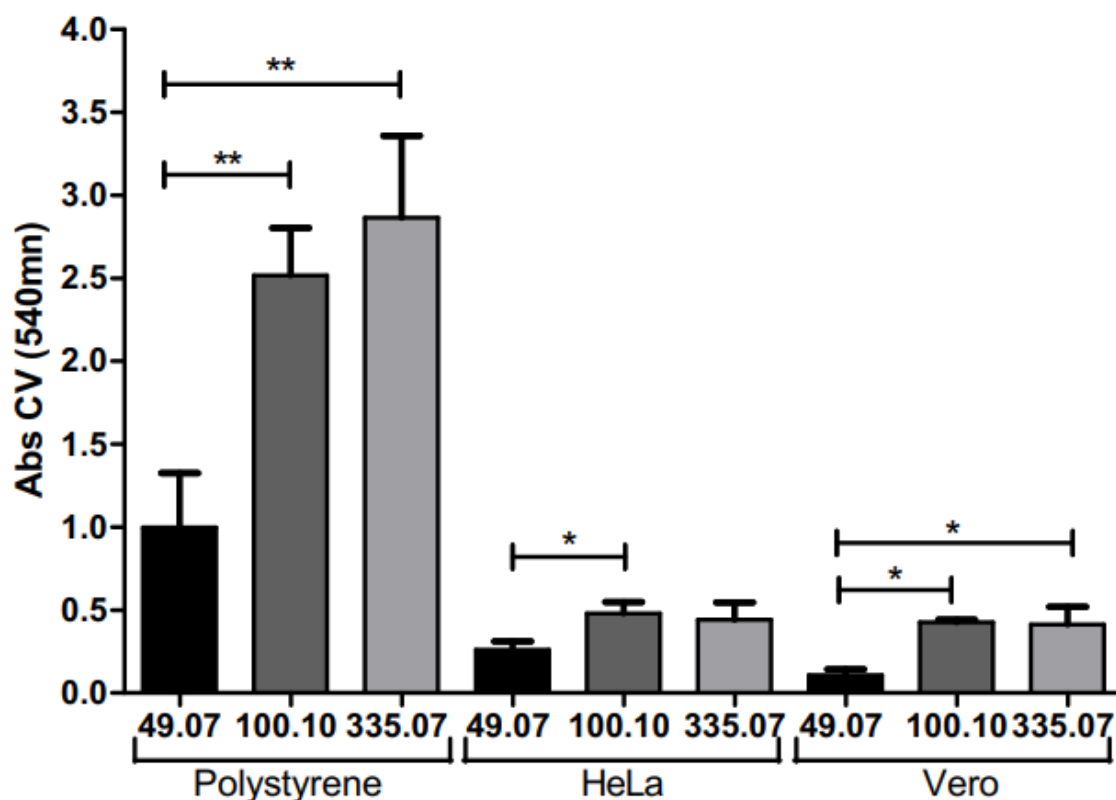
We thank Dr Luciano Panagio and Dr Ricardo Almeida-Department of Microbiology, Paraná State University of Londrina, Brazil, for kindly providing the epithelial cell lines used in this study. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. MC Furlaneto is grateful to CNPq for the PQ fellowship.

### **References**

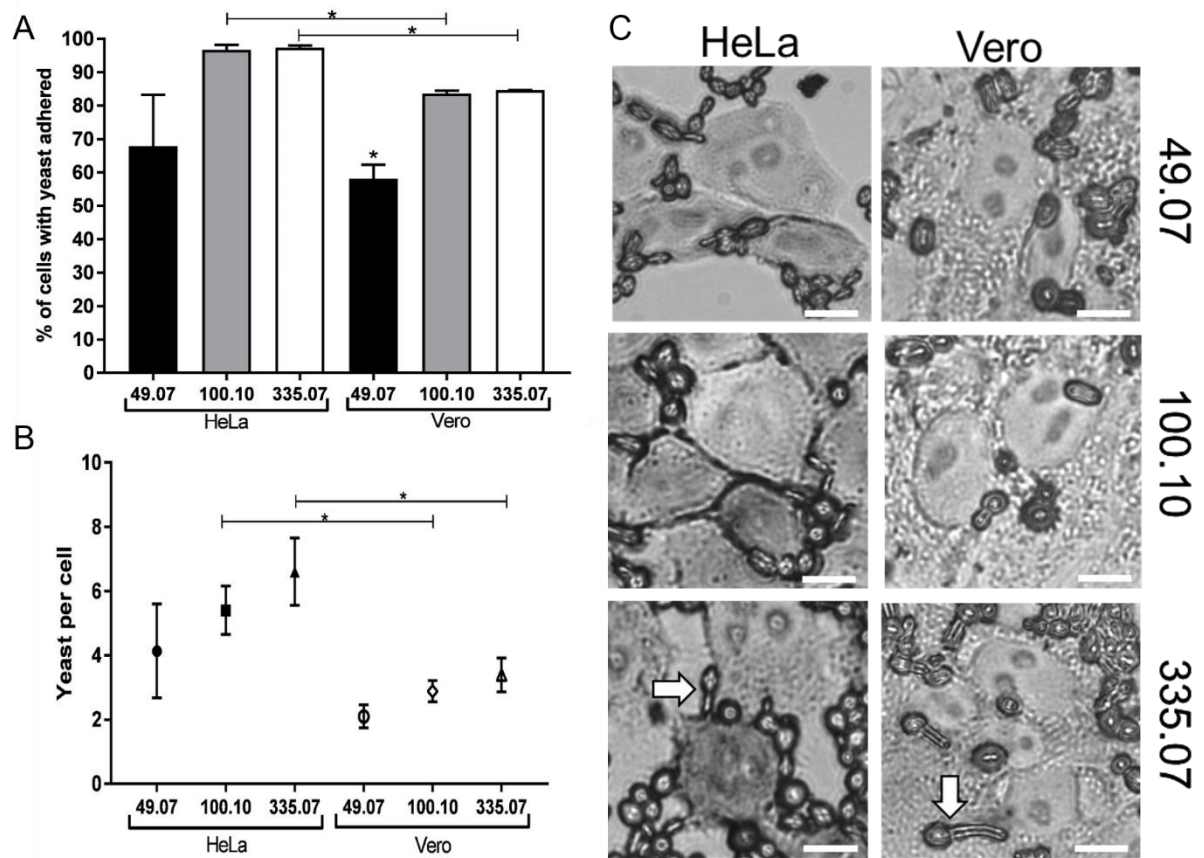
- [1] Santos GCO, Vasconcelos CC, Lopes AJO, Cartágenes MSS, et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol* 2018;9:1351.

- [2] Da Costa VG, Quesada RMB, Abe ATS, et al. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia* 2014;178(3-4):243-50.
- [3] Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *Plos One* 2016;11:e0146909.
- [4] da Matta DA, Souza ACR, Colombo AL. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. *J Fungi* 2017;3:24.
- [5] Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, et al. A multi-centric study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *Plos One* 2017;12(4):e0175172.
- [6] Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Front Microbiol* 2017;8:1927.
- [7] Sohn K, Senyürek I, Fertey J, et al. An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. *FEMS Yeast Res* 2006;6(7):1085-93.
- [8] Negri M, Gonçalves V, Silva S, et al. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. *Brit J Biomed Sci* 2010;67(3):120-5.
- [9] Yu SB, Li WG, Liu XS, et al. The Activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its Multilocus Sequence Typing. *Mycopathologia* 2017;182(5-6):459-69.
- [10] Biasoli MS, Tosello ME, Luque AG, Magaro HM. Adherence, colonization and dissemination of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species. *Med Mycol* 2010;48, 291-297.
- [11] Chaves GM, Diniz MG, da Silva-Rocha WP, et al. Species distribution and virulence factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients in Brazil. *Mycopathologia* 2013;175:255-63.
- [12] Silva S, Negri M, Henriques M, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;36(2):288-305.
- [13] Brilhante RSN, Rodrigues TDJS, Castelo DDSCM, et al. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. *J Med Microbiol* 2014;63(11):1568-72.
- [14] Kumari A, Mankotia S, Chaubey B, Luthra M, Singh R. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. *J Med Microbiol* 2018;67:889-92.

- [15] Silva-Dias A, Miranda IM, Rocha R, et al. A novel flow cytometric protocol for assessment of yeast cell adhesion. *Cytom Part A* 2012;81(3):265-70.
- [16] Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ* 2001;65(8):785-7.
- [17] Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RMB, et al. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44(5):595-9.
- [18] Silva S, Henriques M, Martins A, et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 2009;47(7):681-9.
- [19] Sanfelice, RA, da Silva SS, Bosqui LR, et al. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta tropica* 2017;167:208-15.
- [20] Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 2010;12(3):273-82.
- [21] Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009;459(7247):657.
- [22] Cuellar-Cruz M, Vega-Gonzalez A, Mendoza-Novelo B, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(10):2513-27.
- [23] Okawa Y, Miyauchi M, Kobayashi H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biol Pharm Bull* 2008;31(8):1507-10.



**Fig. 1.** Comparison of adherence of *C. tropicalis* isolates (49.07, 100.10 and 335.07). The ability of *C. tropicalis* to adhere to polystyrene and epithelial cell lines (HeLa and Vero) was assessed. Absorbance values of crystal violet solutions (Abs CV) obtained from 2 h adhesion to polystyrene surface, and to HeLa and Vero cells. The data are means of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks represent a significant difference (Anova-Tukey Test, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).



**Fig. 2.** Percentage of HeLa and Vero cells lines with adhered *C. tropicalis* yeasts (A). One hundred epithelial cells were accounted in three fields per coverslips. Asterisks represent a significant difference (Anova-Tukey Test,  $p < 0.05$ ). Mean of *C. tropicalis* yeast adhered per HeLa and Vero cells (B). All tests were repeated in triplicate in three separate assays, with 100 epithelial cells accounted for three fields per coverslips. Asterisks represent a significant difference (Anova-Tukey Test,  $p < 0.05$ ). Representative photomicrographs of *C. tropicalis* adhered to HeLa and Vero epithelial cells lines cells using methylene blue staining (C). White arrow heads indicate the occurrence of filamentous growth. Photomicroscope observation (400X magnification), scale bar (10  $\mu\text{m}$ ).

## ARTIGO 2

**SWITCHING FENOTÍPICO EM *Candida tropicalis*: PAPEL NA  
ADESÃO À SUPERFÍCIES BIÓTICAS E ABIÓTICA****RESUMO**

*Candida tropicalis* compreende um patógeno de importância clínica de crescente. O evento de *switching* fenotípico em *C. tropicalis* está associado a alterações no padrão de virulência, no entanto, não existem dados acerca do papel de *switching* na habilidade de adesão de *C. tropicalis*. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estado de *switching* na adesão de *C. tropicalis* às superfícies de poliestireno, células HeLa e Vero. Para tal, foram empregados três sistemas de *switching* que compreendem isolados clínicos (49.07, 100.10 e 335.07) e linhagens variantes e revertentes derivados de *switching*. Os morfotipos de *switching* (linhagens variantes e revertentes) apresentaram variações no perfil de adesão nas superfícies testadas. Em poliestireno, foi evidenciado um aumento na capacidade de adesão em decorrência deste evento epigenético, particularmente pelos morfotipos variantes, o que pode estar associado a maior capacidade de morfogênese. Por outro lado, a maioria (80%) dos morfotipos revertentes exibiram redução na capacidade de adesão comparativamente ao observado para seus respectivos variantes. O estado de *switching* também alterou o perfil de adesão de morfotipos de *C. tropicalis* a linhagens celulares HeLa (70%) e Vero (60%) sendo verificado um aumento de adesão em relação as linhagens parentais. Os morfotipos revertentes (60%) foram mais aderentes a ambas linhagens celulares, comparativamente aos parentais. Além disso, 80% dos revertentes apresentaram número superior de leveduras aderidas por célula HeLa, em relação aos seus respectivos variantes. O mesmo padrão de adesão foi observado em células Vero. A maioria dos morfotipos (92,3%) apresentou maior afinidade a linhagem HeLa, no entanto o padrão de adesão dos morfotipos entre ambos os modelos de infecção *in vitro* foi perfeitamente correlato (Correlação de Pearson:  $r^2 = 1$ ,  $p < 0,0001$ ). Em suma, concluímos que o estado de *switching* altera a capacidade de adesão de *C. tropicalis*, visto que a maioria dos morfotipos de *switching* apresentou aumento na capacidade adesão tanto em superfície abiótica (poliestireno) quanto em células epiteliais. A adesão acentuada dos morfotipos variantes em poliestireno, bem como dos revertentes às células epiteliais sugerem que o *switching* possa estar relacionado a ampliação da plasticidade do patógeno durante esta etapa inicial de colonização e infecção.

## INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* compõe a microbiota normal de indivíduos saudáveis, contudo destacam-se como patógenos oportunistas de ampla relevância clínica (BASSETTI et al., 2006; BOUZA e MUNOZ, 2008; NUCCI et al., 2010; DOI et al., 2016). Flutuações na condição fisiológica do hospedeiro oportunizam aos microrganismos sobrepujar as barreiras imunológicas, passando do estado comensal para patogênico (NAGLIK.; CHALLACOMBE.; HUBE., 2003). Dentre as espécies patogênicas, *C. tropicalis* compreende o segundo agente etiológico mais frequente em casos de candidemia, com incidência prevalente nas regiões tropicais do globo (COLOMBO et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; COSTA et al., 2014; da MATTA et al., 2017).

*C. tropicalis* expressa uma série de fatores de virulência, dentre os quais a capacidade de adesão a diferentes superfícies e o evento de *switching* fenotípico (HENRIQUES; AZEREDO; OLIVEIRA., 2006; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT., 2006; JAYATILAKE et al., 2008, 2011; FRANÇA et al., 2011; MORALEZ et al., 2014, 2016; YU et al., 2016; NÚÑEZ-BELTRÁN; LÓPEZ-ROMERO; CUÉLLAR-CRUZ., 2017). *Switching* fenotípico caracteriza-se por ser um evento epigenético, que promove alteração espontânea na morfologia das colônias, em frequências superiores às de mutações somáticas e com padrão elevado de reversibilidade (SLUTSKY et al., 1987; EGGER et al., 2004; JAIN et al., 2008; SOLL, 2009). O estado de *switching* resulta tanto em alterações na estrutura macroscópica de colônia quanto em alterações ao nível celular, promovendo padrões de filamentação distintos entre os morfotipos parentais (linhagens originais) e variantes morfológicas, derivados de *switching* (MORALEZ et al., 2014, 2016). As alterações fenotípicas proporcionadas pelo *switching* ocorrem a nível transcricional, podendo gerar modificações nos perfis de virulência da levedura (SOLL, 1992; JAIN et al., 2008; MORALEZ et al., 2016).

A adesão compreende a primeira etapa do processo infeccioso, sendo um importante atributo de virulência, relacionado a colonização de dispositivos médicos e a tecidos do hospedeiro (ZUZA-ALVES et al., 2017). A composição da parede celular possui papel central neste processo, mediando as interações com diversas superfícies (TRONCHIN et al., 2008). Entretanto, vários fatores podem promover alterações na parede celular dos fungos, tais como, polimorfismo, *switching* e

respostas a flutuações ambientais, entre outros, aumentando a plasticidade do patógeno (ZUZA-ALVES et al., 2017).

Dado a relevância do *switching* fenotípico na modulação dos fatores de virulência, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se o “estado de *switching*” está associado a alterações na capacidade de adesão de isolados clínicos de *C. tropicalis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho foram utilizadas linhagens de três sistemas de *switching* fenotípico de *C. tropicalis*: 49.07; 100.10; 335.07, constituídos por morfotipos distintos (isolados clínicos, variantes e revertentes) (Tabela 1). Tais morfotipos compõem a coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, onde estão armazenados a -20°C em meio YPD caldo (1% extrato de leveduras, 2% peptona, 2% glicose), acrescido de 20% de glicerol.

Para avaliar a capacidade de adesão dos morfotipos em células epiteliais foram utilizadas duas linhagens de células contínuas: HeLa, proveniente de carcinoma de colo uterino humano (ATCC, CCL2TM; Manassas, VA, USA), e Vero, proveniente de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (ATCC CCL81). Essas foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, sob coordenação dos Professores Dr. Luciano Aparecido Panagio e Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida.

### PREPARO DOS INÓCULOS

Os morfotipos foram cultivados em meio YPD caldo (1% extrato de leveduras, 2 % peptona bacteriológica, 2 % glicose anidra) por 24 horas, sob agitação a 180 rpm, a 28 °C. Posteriormente, a densidade celular foi ajustada a  $6 \times 10^3$  células/mL, seguida pelo plaqueamento em meio YPD solidificado (YPD acrescido de 2 % ágar), e incubadas por 96 horas, a 28 °C.

**Tabela 1.** Sistemas de *switching* de *C. tropicalis* (49.07; 100.10; 335.07): complexidade, padrão morfológico e filimentação.

Morfotipos	Designação do morfotipo	Padrão de colônia/ Complexidade*	Morfologia padrão	Perfil de filimentação **	
Isolado 49.07	Parental	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	1	
	Variantes	Crepe	Estruturada/++	Superfície estruturada e irregular, borda irregular.	3
		Rugoso	Estruturada/+++	Superfície estruturada e irregular, borda regular.	3
		Revertentes	Revertente de Crepe	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.
	Revertente de Rugoso		Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	1
Isolado 100.10	Parental	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	2	
	Variantes	Crepe	Estruturada/+++	Superfície estruturada e irregular, borda irregular.	3
		Flocado	Estruturada/++	Superfície estruturada e irregular, borda regular.	3
		Revertentes	Revertente de Crepe	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.
	Revertente de Flocado		Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	2
Isolado 335.07	Parental	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	ND	
	Variantes	Centro irregular	Estruturada/++	Superfície estruturada e irregular, borda regular.	ND
	Revertentes	Revertente de Centro Irregular	Liso/+	Superfície lisa e uniforme, borda regular.	ND

Dados baseados em Moralez et al. (2014).

\*Complexidade: (+) pouco complexo; (++) parcialmente complexo; (+++) alta complexidade.

\*\*Perfil de filimentação relativo a porcentagem de formas filamentosas (hifas e pseudohifas) nos morfotipos dos sistemas de *switching*: (1) formas filamentosas >0 ≤3%; (2) formas filamentosas > 3,1%≤5,0%; (3) formas filamentosas >5,1%.

ND: não determinado.

## ADESÃO DOS MORFOTIPOS DE *Candida tropicalis* EM POLIESTIRENO

Os morfotipos de *C. tropicalis* foram cultivados conforme descrito no tópico anterior e a densidade celular do inóculo foi ajustada a  $5 \times 10^7$  células/mL em meio RPMI 1640. Para os ensaios de adesão em superfície de poliestireno, 200  $\mu$ l da suspensão celular ( $1 \times 10^7$  células/mL) foram adicionados aos poços de placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato e mantidos por 60 minutos a 37 °C.

As células aderidas foram quantificadas pelo método semi-quantitativo de quantificação da biomassa total por cristal violeta conforme descrito por Henriques; Azeredo e Oliveira (2006), com modificações. Para tal, posteriormente à incubação, o sobrenadante foi gentilmente removido e os poços lavados três vezes com PBS.

Em seguida as leveduras aderidas foram fixadas, por meio da adição de 200  $\mu$ l de metanol por 15 minutos. Após a retirada do metanol e secagem dos poços à temperatura ambiente, as células aderidas foram coradas com 200  $\mu$ l de Cristal violeta (1%) por 5 minutos. Na sequência os poços foram lavados 3 vezes com PBS para remoção do excesso de corante.

O corante retido nas células foi solubilizado por meio da adição de 200  $\mu$ l de ácido acético a 33%. 100  $\mu$ l da solução foram então transferidos para outra placa de microtitulação, a partir da qual foi mensurada a absorbância da solução em espectrofotômetro (Bio-Tek L 808) com comprimento de onda de 540 nm.

## ADESÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS.

As células epiteliais (HeLa e Vero) foram cultivadas em meio D-MEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina, até a obtenção de 80% de confluência da monocamada em garrafas de cultivo celular. Na sequência, 1 mL da suspensão celular em meio D-MEM sem adição de soro fetal bovino e antibióticos, foi transferido para a placa de cultivo celular de 24 poços, seguido por incubação por 24 horas para a linhagem HeLa e de 18 horas para linhagem Vero, a 37 °C sob 5 % de CO<sub>2</sub>, até a obtenção de 80% de confluência da monocamada (NEGRI et al., 2011).

Suspensões celulares dos morfotipos foram ajustadas a densidade de  $1 \times 10^7$  células/mL em meio D-MEM. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi adicionado a cada poço da placa de 24 poços previamente coberta com uma monocamada confluenta de células. O co-cultivo foi realizado por 2 horas a 37 °C sob 5 % de CO<sub>2</sub>.

Por fim, os poços foram lavados uma vez com PBS para remover as leveduras não aderidas.

#### DETERMINAÇÃO DA ADESÃO POR BIOMASSA TOTAL.

A adesão dos morfotipos às células epiteliais foi quantificada por meio do método de quantificação da biomassa total por Cristal violeta, de acordo com NEGRI e colaboradores (2010). Para tal, foi adicionado em cada poço 1 mL de Cristal violeta a 1 % por 5 minutos, após os poços foram lavados 3 vezes com PBS a fim de remover o excesso de corante não fixado. Para a remoção do corante das células epiteliais, foi adicionado 1 mL de etanol: acetona (1:1), o qual foi imediatamente removido, afim de que apenas as células de *C. tropicalis* aderidas permanecessem coradas. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de ácido acético (33%) para o desprendimento do corante retido nas leveduras aderidas. 200 µl da solução foram transferidos para uma placa de microtitulação de 96 poços, seguida de leitura espectrofotométrica da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 540 nm. Poços contendo células epiteliais sem leveduras foram utilizadas como controle negativo (YU et al., 2017).

#### QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS ADERIDAS POR OBSERVAÇÃO DIRETA EM MICROSCÓPIO ÓPTICO.

Para avaliar a capacidade de adesão dos morfotipos de *C. tropicalis* em células epiteliais, foram adicionadas às placas de 24 poços, lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, com polaridade previamente ajustada com ácido acético. Posteriormente à obtenção de uma monocamada com 80 % de confluência de células epiteliais (HeLa e Vero), foi realizado o co-cultivo conforme descrito previamente.

Após 2 horas de co-cultivo, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com 4 % de paraformaldeído por 30 minutos em temperatura ambiente e lavados com PBS. As células foram coradas com 1 % de azul de metileno por 5 minutos e montadas em lamínas de vidro para a observação em microscópio óptico (400X).

A adesão foi determinada por meio da análise de dois parâmetros: (1) Porcentagem de células epiteliais com leveduras aderidas; (2) Média de leveduras aderidas por célula epitelial. Para tal, foram avaliados três campos por lamínula,

sendo contabilizadas 100 células por campo. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três repetições independentes.

Para documentação do perfil de adesão e distribuição dos morfotipos estes foram observadas em fotomicroscópio (Axion Imager – Carl Zeiss; Software Axion Vision).

## MICROSCOPIA DE LUZ

Os morfotipos de *C. tropicalis* ( $1 \times 10^7$  células/ mL) foram cultivadas por 60 minutos em cupons de poliestireno de 1 cm, em placas de 24 poços. Na sequência os poços foram lavados três vezes com PBS, e os cupons montados em lâminas de vidro. Os campos foram escolhidos aleatoriamente e documentados com auxílio do software Las X, em microscópio SP8, Leica Microsystems, Mannheim, Germany.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise de adesão a superfícies bióticas e abióticas dos morfotipos de *C. tropicalis* foi empregada o teste t-pareado. Foi considerado como significância estatística  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0.001$ . A correlação dos dados foi verificada por meio do cálculo do Coeficiente de correlação de Pearson.

Os resultados de porcentagem de levedura aderidas por célula epitelial foram classificados em Baixa adesão (BA) 53,4 – 72,5; Adesão Moderada (AM) 72,6 – 97,0 e Alta adesão (AA) 97,1 – 99,8. Para isso, as médias das porcentagens de adesão por morfotipo foram divididas em quartis de acordo com a capacidade de adesão, gerando os pontos de corte “*cut-offs*” citados acima, conforme descrito por Marcos-Zambrano e colaboradores (2014), utilizando o software RStudio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PAPEL DO SWITCHING FENOTÍPICO NA CAPACIDADE DE ADESÃO DE *C. tropicalis* EM POLIESTIRENO

A adesão aos dispositivos médicos é caracterizada como a primeira etapa do processo infeccioso, tornando-se um dos fatores predisponentes mais relevante para o desenvolvimento de infecções por *Candida* spp. (NEGRI et al., 2011; SILVA et al., 2011; DOI et al., 2016; NÚÑEZ-BELTRÁN; LÓPEZ-ROMERO; CUÉLLAR-CRUZ.,

2017). *C. tropicalis* é capaz de aderir em diversas superfícies plásticas, como silicone e poliestireno (YU et al., 2016; NEGRI et al., 2010). O *switching* fenotípico por sua vez, é capaz de alterar padrões de determinantes de virulência em *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011; MORALES et al., 2014), promovendo a ocorrência de linhagens mais virulentas dentro de populações isogênicas (MORALES et al., 2016).

O presente estudo constatou variações no perfil de adesão dos morfotipos de três sistemas de *switching* de *C. tropicalis* na superfície de poliestireno (Figura 1). Do total de 10 linhagens de *switching* (variantes e revertentes) avaliadas, 60% apresentou perfil distinto de adesão em relação aos seus respectivos parentais (Morfotipos Crepe, Rugosa, Revertente de Crepe e Revertente de Rugosa do Sistema 49.07; Morfotipo Crepe do Sistema 100.10; e, Revertente de Centro irregular do Sistema 335.07). Destes, 83% exibiram potencial de adesão superior ao observado para a linhagem parental, indicando que o estado de *switching* amplia a capacidade de colonização da levedura (Figura 1).

Os morfotipos variantes (Crepe e Rugosa) do sistema 49.07 e o variante Crepe do sistema 100.10 exibiram adesão superior comparativamente ao observado para seus respectivos parentais. Este fenótipo proeminente de adesão parece estar associado a maior complexidade de morfogênese destes morfotipos, quando aderidos em poliestireno, como demonstrado na Figura 2. Visto que, a linhagem parental, menos aderente, exibiu células aderidas na forma de blastoconídios, e as linhagens revertentes dividiram-se entre blastoconídios e pseudohifas, enquanto as linhagens variantes apresentaram formas filamentosas em abundância (Figura 2). Interessantemente, Morales e colaboradores (2014) descreveram um padrão elevado de formação e estruturação do biofilme para estes mesmos morfotipos. Sendo assim é possível sugerir que a expressão diferencial de fenótipos de virulência iniciada na adesão em resposta a alterações promovidas pelo *switching*, seja conservada em etapas subsequentes da formação de biofilme em superfície abiótica.

Das linhagens revertentes, 80% foram significativamente menos aderentes que seus respectivos variantes (Figura 1). Estes morfotipos apresentaram perfil de adesão e filamentação intermediário em poliestireno, destacando que as modificações na capacidade de morfogênese promovidas pelo *switching* fenotípico, podem estar relacionadas à perfis distintos de adesão (Figura 2).

Estudos com variantes morfológicas de *switching* de *Candida parapsilosis* mostraram maior potencial de formação de biofilme em morfotipos mais complexos, composto majoritariamente por pseudo-hifas, enquanto aqueles compostos predominantemente por blastoconídios foram menores formadores (LAFHEY e BUTLER, 2005). Não obstante, o *switching* modificou também o padrão de distribuição de *C. tropicalis* em poliestireno, uma vez que, os revertentes apresentaram um perfil de distribuição celular homogêneo em monocamada, semelhante a linhagem parental, enquanto os variantes organizaram-se em estruturas complexas, com presença de camadas e número elevado de formas filamentosas, conforme esquematizado na Figura 2.

Yu e colaboradores (2016) evidenciaram correlação entre a capacidade de filamentação de isolados de *C. tropicalis* e a formação de biofilme em poliestireno. Além disso, em trabalho posterior, foi evidenciada também correlação positiva entre a adesão com a formação de biofilme em poliestireno (YU et al., 2017). A presença de formas filamentosas, por sua vez, está associada a expressão de subconjuntos de genes que codificam fatores de virulência, os quais estão relacionados tanto com a filamentação, quanto com a adesão, tal como a as adesinas Hwp1 (*Hyphal wall protein*) e ALS (*Agglutinin-like sequences*). Tais fatores atuam intermediando o processo de adesão a diversas superfícies abióticas, fato que pode justificar o potencial elevado de adesão observado nos morfotipos com mais formas filamentosas (GROOT et al., 2013; MAYER; WILSON; HUBE., 2013).

Embora a maioria dos morfotipos revertentes tenha apresentado capacidade reduzida de adesão comparativamente aos seus respectivos variantes, estes morfotipos apresentaram heterogeneidade no perfil de adesão quando comparados a linhagem parental. Para linhagens do sistema 49.07 foi observado um padrão intermediário na capacidade de adesão pelos revertentes, sendo definido como: Parental < RR < RC < Crepe < Rugosa (Figura 1), enquanto os revertentes do sistema 100.10 não diferiram do parental. O revertente de centro irregular do sistema 335.07 apresentou adesão diminuída em relação a linhagem parental, caracterizando o perfil de adesão expresso pelos revertentes como sistema de *switching*-dependente no que concerne a adesão em poliestireno.

Estes resultados sugerem que o estado de *switching* altera o potencial de adesão de *C. tropicalis* a superfície de poliestireno, proporcionando assim uma maior pluralidade nas interações para com esta superfície.

## PAPEL DO SWITCHING FENOTÍPICO NA CAPACIDADE DE ADESÃO DE *C. tropicalis* A CÉLULAS EPITELIAIS (HeLa e Vero).

O presente estudo evidenciou que embora todos os morfotipos de *switching* avaliados tenham apresentado capacidade de adesão à ambas linhagens epiteliais, HeLa e Vero, houve variação entre os morfotipos quanto a habilidade de infecção destas linhagens *in vitro* (Figura 3), indicando que estado de *switching* altera o perfil de adesão de *C. tropicalis* em células epiteliais.

Conforme mostrado na Figura 3A, 70% dos morfotipos de *switching* (variantes e revertentes) avaliados diferiram em relação as suas respectivas linhagens parentais quanto a adesão em células HeLa. Destes morfotipos, 50% apresentou aumento na capacidade de adesão. Corroborando com estes dados foi evidenciado que 40% desses morfotipos apresentaram porcentagem superior de leveduras aderidas por célula epitelial em relação ao observado para o morfotipo parental (Tabela 2).

O aumento na capacidade de adesão, que compreende um estágio inicial no processo de infecção, em decorrência do evento *switching* em *C. tropicalis* merece destaque, uma vez que pode favorecer o estabelecimento da infecção, sendo um fator de risco para o hospedeiro. Lima-Neto e colaboradores (2011) relatam que os mecanismos de adesão de *Candida* spp. á tecidos humanos são variados, uma vez que o reconhecimento da levedura pelo sistema imunológico é complexo e envolve uma série de componentes, sendo a parede celular o mais relevante.

*C. albicans* e *C. tropicalis* são agrupadas no clado CUG, reconhecido pela incorporação incorreta de leucina no lugar da serina. O aumento na incorporação de leucina, eleva a hidrofobicidade da parede fúngica e a variabilidade proteica, ampliando as possibilidades de interações, resultando em perfis distintos de adesão (MIRANDA et al., 2013). Somado a isso, este “erro” desencadeia atributos de virulência em *C. albicans*, como morfogênese, adesão e *switching* fenotípico, além de mascarar a  $\beta$ -glucana da parede celular da levedura, retardando o reconhecimento pelo sistema imune (BERMAN e SUBDERY et al., 2002; MIRANDA et al., 2013).

Os revertentes morfológicos apresentaram perfil de adesão proeminentemente, frente aos seus respectivos variantes, em ambos modelos de infecção *in vitro* analisados. 80% destes exibiram capacidade de adesão superior a observada nos variantes, tanto para a quantificação por biomassa total, quanto em relação à média de

leveduras aderidas por célula epitelial (Figura 3 A-B; Figura 4 B). Além disso, 60% dos revertentes apresentaram maior eficiência na colonização de ambas linhagens celulares (Hela e Vero) em relação aos seus variantes (Tabela 2). Sendo assim é possível sugerir que o evento de *switching* fenotípico promove o surgimento de linhagens mais aderentes em *C. tropicalis*, no entanto a presença de formas filamentosas não está diretamente relacionada com a infecção destes modelos *in vitro*.

Revertentes morfológicos destacaram-se também frente as linhagens parentais quanto a capacidade de adesão em células epiteliais, visto que 60% desses morfotipos apresentaram adesão superior em ambos tipos celulares avaliados (Figura 3). Sendo assim, é possível que a retomada do fenótipo parental pelos revertentes altere a composição da parede celular destes de forma distinta a que ocorre nas formas filamentosas nos morfotipos variantes, diferindo também da organização de parede originalmente observada nos parentais. Para *C. albicans* já foi relatado afinidade distinta das adesinas a determinados componentes da matriz extracelular do hospedeiro, sendo as alterações na composição da parede fúngica diretamente relacionadas com a capacidade de estabelecimento da levedura (LI e PALECEK., 2003).

Ademais, 12 (92,3%) dos 13 morfotipos e isolados avaliados apresentaram porcentagem de adesão superior em células HeLa em relação a Vero, ou seja, possuem maior afinidade a este tipo celular (Tabela 2). No entanto, todos os morfotipos apresentaram correlação perfeita para ambos modelos de infecção (Correlação de *Pearson*:  $r = 1$ ,  $p < 0,0001$ ), possibilitando assim a utilização dessa linhagem celular como modelo no estudo de infecção de *C. tropicalis*, visto que grande parte dos estudos para a avaliação da infecção, patogenicidade de candidíases vaginais e alterações morfológicas, utilizam-se de HeLa como modelo experimental *in vitro* (LAN et al., 2016).

Não foram constatadas variações significativas no perfil de adesão dos morfotipos do sistema de *switching* 335.07. Contudo, no que diz respeito aos sistemas de *switching* 49.07 e 100.10, foram detectadas variações no ranqueamento de adesão dos morfotipos, conforme evidenciado na Tabela 2. Uma vez que os revertentes dos sistemas 49.07 e 100.10 apresentaram adesão superior a observada nas linhagens parentais e variantes em células HeLa, sendo o mesmo padrão observado no sistema 49.07 em Vero. Esses dados apontam que embora ocorra o

restabelecimento morfológico da colônia, indivíduos advindos de *switching* fenotípico, apresentam características distintas daquelas apresentadas pelo parental, aumentando assim a variabilidade de resposta dentro da população fúngica. Em particular, o morfotipo crepe do sistema 49.07, destacou-se frente ao seu parental apresentando alta porcentagem de adesão em células HeLa. Sendo assim, fica evidente o efeito modulador do *switching* na capacidade de adesão de *C. tropicalis*.

O padrão de distribuição dos morfotipos às células epiteliais apresentou alterações associadas ao *switching*. Visto que os parentais apresentaram um padrão de distribuição mais localizado com presença de zonas agregativas em células HeLa, enquanto em células Vero foi observado um padrão difuso de distribuição. Os variantes, por sua vez exibiram um perfil pseudo-hifal, com baixo número de leveduras e presença de formas filamentosas. Além disso, capacidade de morfogênese observada durante a adesão dos morfotipos, variantes e revertentes, em células Vero, sugere que a interação com este tipo celular favoreça a morfogênese (Figura 4 C).

Os morfotipos revertentes, no entanto, organizaram-se majoritariamente como agregativos. No entanto, cabe destacar que parte da monocamada de células HeLa e Vero sofreu alterações durante o ensaio de adesão, principalmente pelas linhagens revertentes, apresentando perda na confluência (dados não apresentados), indicando dano às células epiteliais (Figura 4 C). Moralez e colaboradores (2016), descreveram dano celular significativo à linhagem de células FaDu infectada pelo morfotipo Revertente de Crepe.

Os dados de porcentagem de células com leveduras aderidas e a média de leveduras por célula não apresentaram correlação, o que pode ser justificado pelo perfil distinto de distribuição das leveduras de cada morfotipo (Figura 4 C).

A capacidade de adesão dos morfotipos á diferentes substratos indica uma ampliação na capacidade de colonização do hospedeiro em decorrência do evento de *switching*, sendo um agravante para o contexto clínico, visto que a presença de diferentes morfologias celulares, levedura, pseudo-hifa e hifa, está relacionada com a infecção em diferentes órgãos e tecidos, bem como a corrente sanguínea (MONNIOT et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

- BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 21, 2006.
- BERMAN, J; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918, 2002.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 87–91, 2008.
- BRUDER-NASCIMENTO et al., Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research**, v. 3, n.1, p. 1-5, 2010.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.
- 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.
- da MATTA DA, SOUZA ACR, COLOMBO AL. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of Fungi**, v. 3, p. 34, 2017.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.
- EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 456-463, 2004.
- FRANÇA, E. J. G. et al. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. **Micron**, v. 42, n. 7, p. 726–732, 2011.
- GOTTLIEB, S. et al. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells effect of polyoxin D. **Mycopathologia**, v. 115, n. 3, p. 197-205, 1991.
- GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481, 2013.
- HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* Species Adhesion to Oral Epithelium: Factors Involved and Experimental Methodology Used. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 217–226, 2006.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. C. Phenotypic Switching in Fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, n. 3, p. 180–188, 2008.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. A comparative study of candidal invasion in rabbit tongue mucosal explants and reconstituted human oral epithelium. **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 373–380, 2008.

JAYATILAKE, J. A. M. S. A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p. 235–250, 2011.

JIN, Y. et al. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 160, n. 3, p. 191-200, 2005.

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

LAN, Y-B. et al. Time course of global gene expression alterations in *Candida albicans* during infection of HeLa cells. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 120, 2016.

LI, F.; PALECEK, S. P. *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 6, p. 1266–73, 2003.

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.

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

MAYER, F. L; WILSON, D; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MIRANDA, et al. *Candida albicans* CUG mistranslation is a mechanism to create cell surface variation. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00285-13, 2013.

MONNIOT, C. et al. Rbt1 protein domains analysis in *Candida albicans* brings insights into hyphal surface modifications and Rbt1 potential role during adhesion and biofilm formation. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82395, 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. n.1, p. 106–114, 2014.

MORALEZ, A. T.-P. et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379–86, 2016.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 67, n. 3, p. 400–28, table of contents, 2003.

NEGRI, M. et al. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. **British Journal of Biomedical Science**, v. 67, n. 3, p. 120–5, 2010.

NEGRI, M. et al. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 9, p. 1270–1275, 2011.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 5, 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.

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

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2011.

SLUTSKY, B. et al. “White-opaque transition”: A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 189–197, 1987.

SOLL, D. R.; MORROW, B.; SRIKANTHA, T. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 2, p. 61–65, 1992.

SOLL, D. R. Why does *Candida albicans* switch? **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 973–989, 2009.

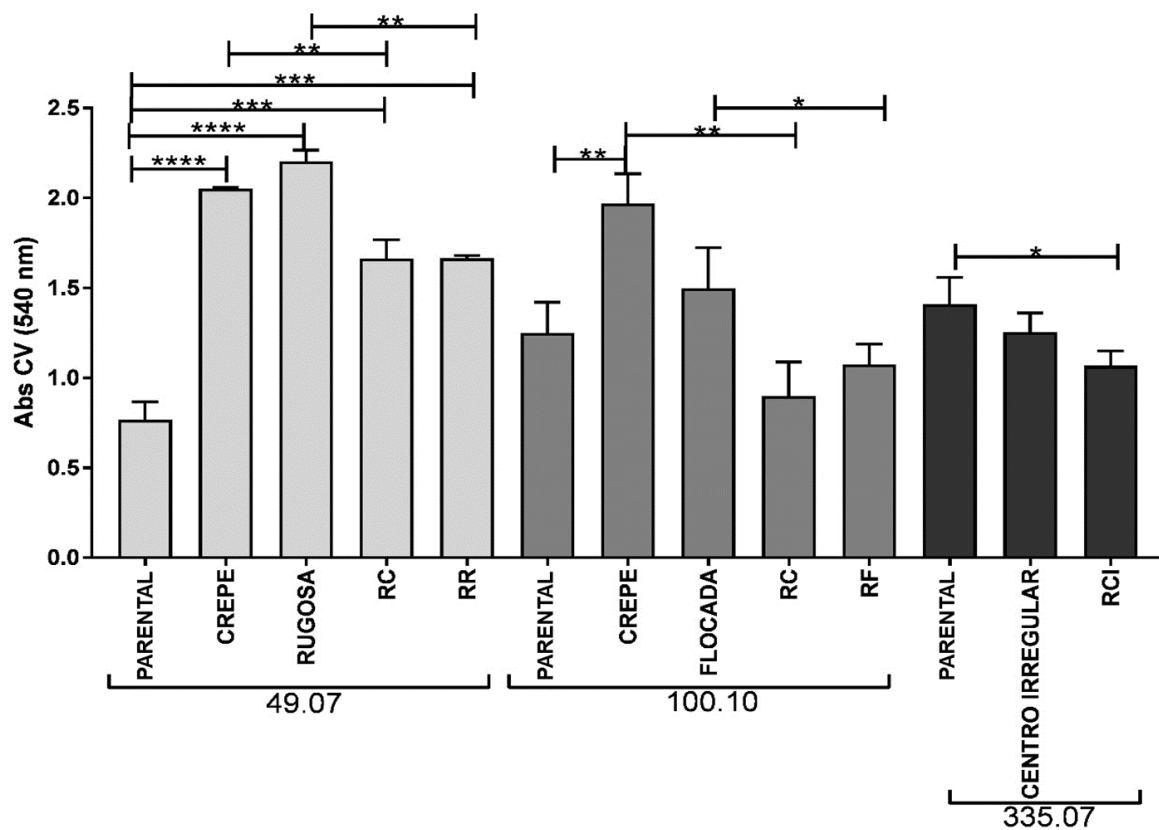
TRONCHIN, G et al. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Sabouraudia**, v. 46, n. 8, p. 749-772, 2008.

YU, S. et al. Distinct Expression Levels of ALS , LIP , and SAP Genes in *Candida tropicalis* with Diverse Virulent Activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–10, 2016.

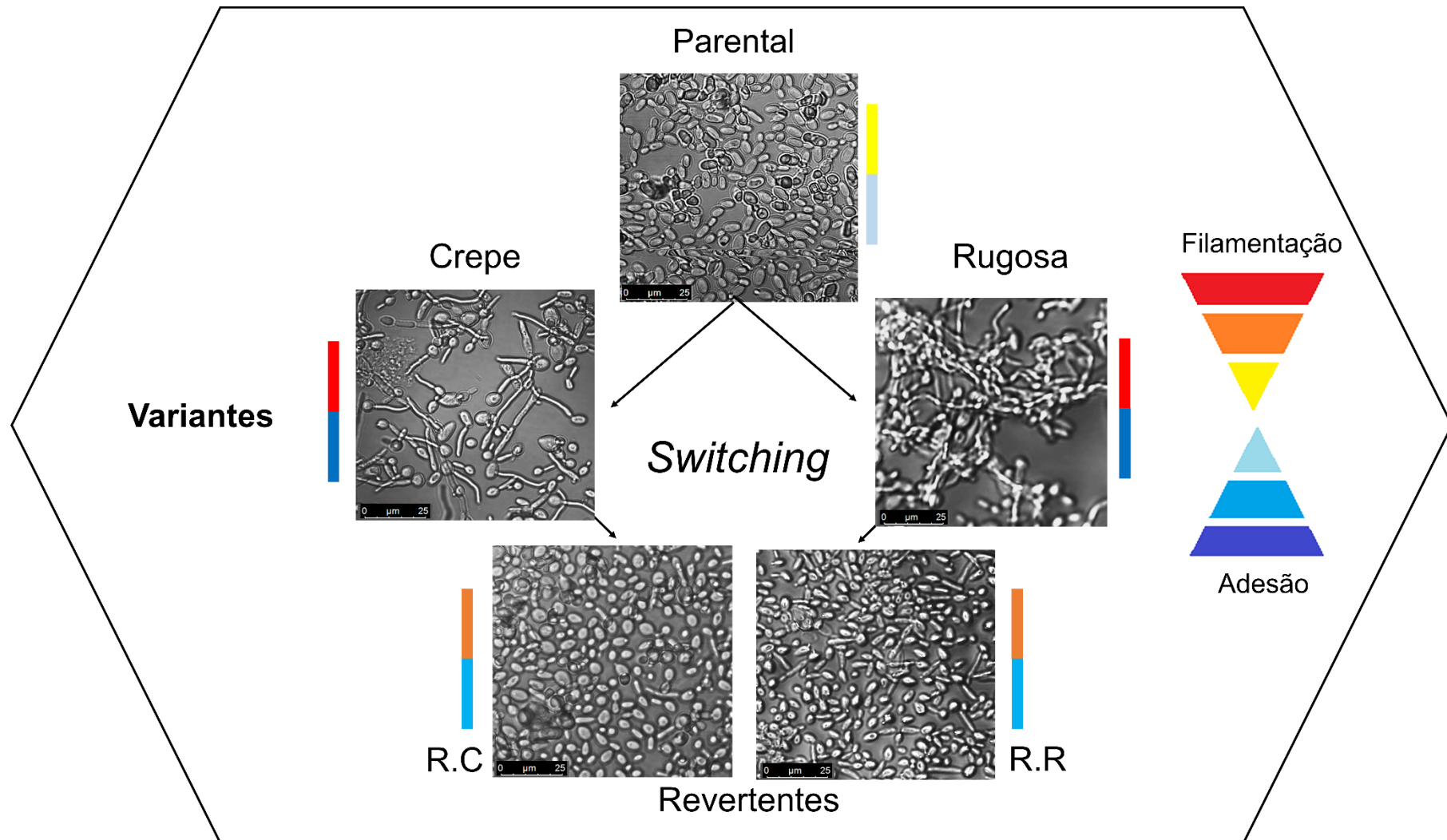
YU, S. B. et al. The activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 459-469, 2017.

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.

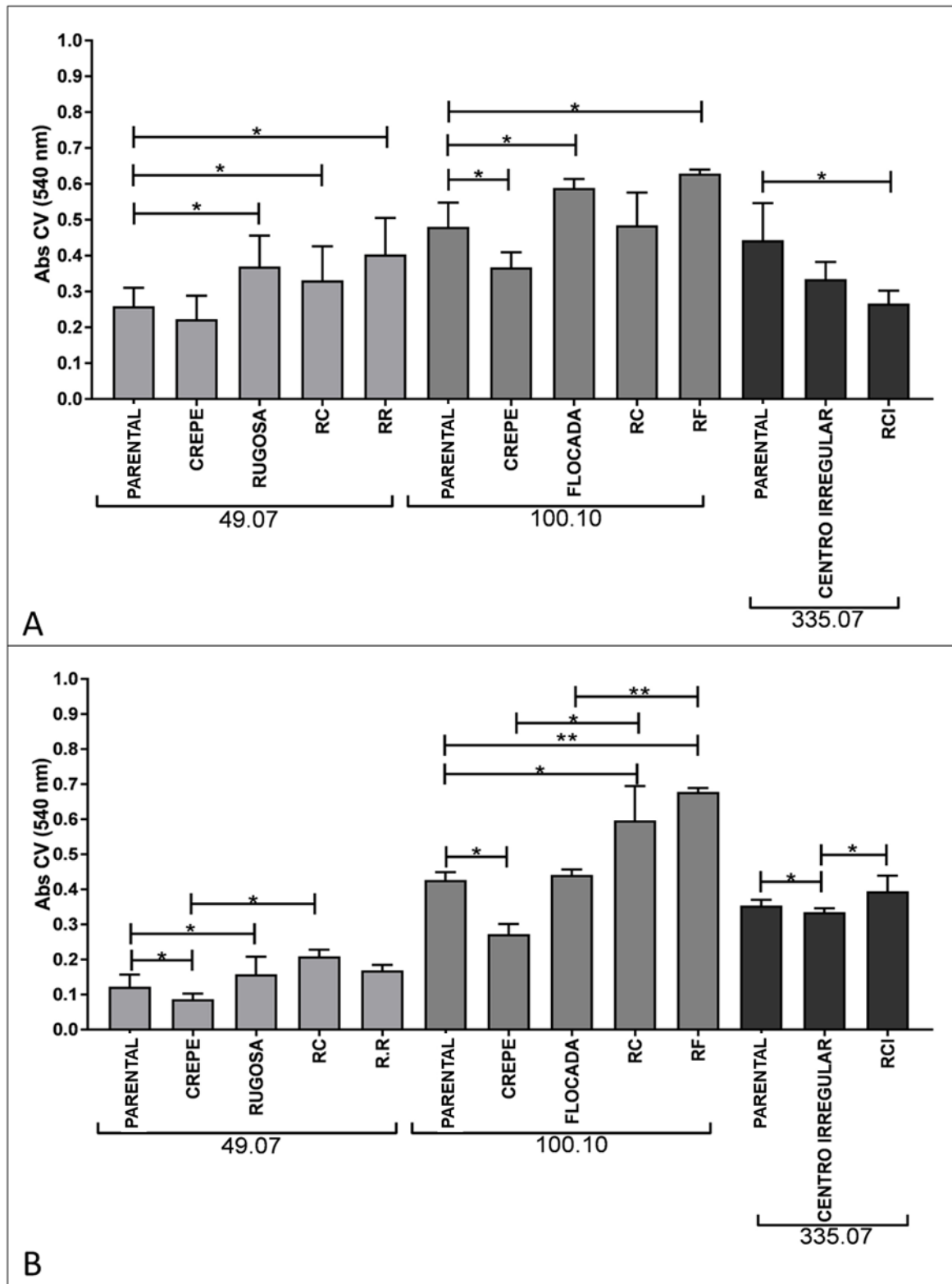
ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1927, 2017.



**Figura 1.** Perfil de adesão de morfotipos de três sistemas de *switching* de *C. tropicalis* (49.07; 100.10 e 335.07) em poliestireno por 60 minutos. Parental (isolado clínico), variantes de *switching* (Crepe, Rugosa, Flocada, Centro irregular), e seus respectivos revertentes (RC, RR, RF, RCI). As diferenças significativas foram determinadas por meio do Teste t-pareado (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ) \*diferença significativa.



**Figura 2:** Adesão de morfotipos de *switching* de *C. tropicalis* do sistema 49.07 à superfície abiótica de poliestireno por microscopia de luz transmitida. Os tons quentes indicam o perfil de filamentação dos morfotipos, sendo Vermelho (+++), alta filamentação; Laranja (++) , filamentação intermediária; Amarela (+), baixa filamentação. O tons frios indicam o perfil de adesão dos morfotipos, Azul escuro (+++), alta adesão; Azul (++) , adesão intermediária; Azul claro (+), baixa adesão.

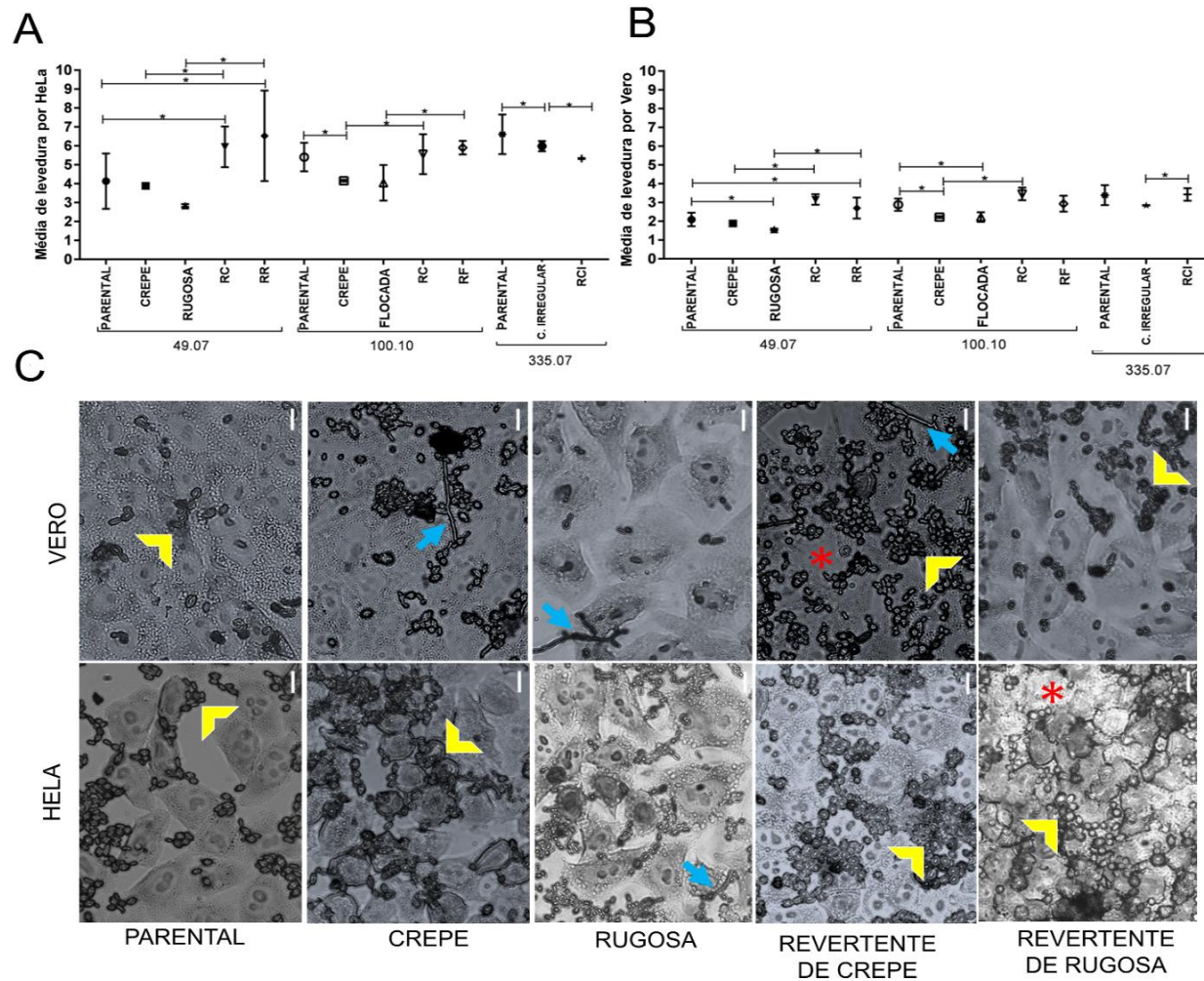


**Figura 3.** Adesão de morfotipos de três sistemas de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) de *C. tropicalis* á linhagens de células epiteliais HeLa e Vero, quantificação por biomassa total em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. (A): Adesão dos morfotipos em células HeLa. (B): Adesão dos morfotipos em células Vero. Teste t-pareado ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ), \* diferença significativa.

**Tabela 2.** Porcentagem de células epiteliais (HeLa e Vero) com leveduras aderidas-morfotipos de três sistemas de *switching* de *C. tropicalis*. Parental (isolado clínico), variantes de *switching* (Crepe, Rugosa, Flocada, Centro irregular), e seus respectivos revertentes (RC, RR, RF, RCI). Teste t-pareado (\*\*p<0.01, \*p<0.05). Os asteriscos representam a diferença significativa entre a linhagem Parental e os morfotipos de *switching* de cada sistema. As cores indicam as diferenças no percentual de levedura por célula epitelial, sendo classificadas como Baixa adesão (BA) 53,4 – 72,5 em Amarelo; Adesão Moderada (AM) 72,6 – 97,0 em Laranja; Alta adesão (AA) 97,1 – 99,8 em Vermelho.

Porcentagem de células epiteliais com leveduras aderidas			
Isolados	Morfotipos	% em células HeLa	% em células Vero
49.07	Parental	67,8 ± 15,3	58,1 ± 4,1
	Crepe	97,7 ± 3,1 *	55,9 ± 1,6
	Rugosa	72,5 ± 9,5	53,4 ± 2,5
	RC	98,0 ± 2,7 *	88,0 ± 2,4 *
	RR	96,8 ± 4,5 *	86,1 ± 6,3 *
100.10	Parental	96,6 ± 1,5	83,6 ± 0,9
	Crepe	89,2 ± 5,0 *	72,1 ± 1,4 *
	Flocada	93,6 ± 3,0	61,1 ± 4,6 *
	RC	97,8 ± 2,1	93,5 ± 0,3 **
335.07	RF	99,8 ± 0,20 *	87,4 ± 4,0
	Parental	97,3 ± 0,6	84,6 ± 0,08
	C. irregular	97,9 ± 0,07	80,6 ± 4,2
	RCI	97,0 ± 0,2	82,3 ± 4,3

% Porcentagem



**Figura 4.** Efeito do *switching* no padrão de distribuição de *C. tropicalis* em células epiteliais. A- Média de leveduras de três sistema de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) aderidas em HeLa. B- Média de leveduras de três sistema de *switching* (49.07; 100.10; 335.07) aderidas em Vero. Teste t-pareado ( $p < 0,05$ ), \* diferença significativa. C- Perfil de adesão dos morfotipos do sistema de *switching* 49.07 de *C. tropicalis* nas linhagens de células HeLa e Vero. A seta azul: presença de formas filamentosas. Cabeça de seta amarela: perfil de distribuição dos morfotipos. Asterisco vermelho: perda da monocamada. Observação em fotomicroscópio (400X de aumento), barra de escala (10  $\mu$ m).

## CONCLUSÕES

O evento de *switching* fenotípico promoveu aumento na capacidade de adesão de *C. tropicalis* a superfície abiótica de poliestireno, o que pode estar associado a maior capacidade de diferenciação em formas filamentosas nesta superfície.

O *switching* promoveu também maior adesão de *C. tropicalis* á células epiteliais, HeLa e Vero, evidenciando um perfil proeminente de adesão pelos revertentes. Tais resultados evidenciam o favorecimento distinto de cada morfologia a diferentes superfícies, reforçando o *switching* como um evento micro-evolutivo.

Foi observada alta correlação de adesão entre as células epiteliais (Vero e HeLa) e poliestireno, bem como uma correlação perfeita quanto a capacidade de adesão entre os dois modelos de infecção (Correlação de *Pearson*:  $r^2$  1,  $p < 0,0001$ ), indicando que a linhagem Vero pode ser empregada no estudo de infecção *in vitro* por *C. tropicalis*.