



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E FATOR HEMOLÍTICO E  
*SWITCHING* FENOTÍPICO EM *CANDIDA* SPP.**

---

Londrina  
2010

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E FATOR HEMOLÍTICO E  
*SWITCHING* FENOTÍPICO EM *CANDIDA* SPP.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientação: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina  
2010

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

F814p França, Emanuele Julio Galvão de.  
Produção de proteases e fator hemolítico e *switching* fenotípico em *Candida* spp /  
Emanuele Julio Galvão de França. – Londrina, 2010.  
82 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. *Candida* – Teses. 2. Leveduras (Fungos) – Teses. 3. Enzimas proteolíticas – Teses. 4.  
Hemólise e hemolisinas – Teses. 5. Biofilme – Teses. 6. Microbiologia médica – Teses. I.  
Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579:582.28

EMANUELE JULIO GALVÃO DE FRANÇA

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E FATOR HEMOLÍTICO E *SWITCHING*  
FENOTÍPICO EM *CANDIDA SPP.***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto  
UEL – Londrina PR

---

Profa. Dra. Márcia de Souza |Carvalho  
Fiocruz – Rio de Janeiro - RJ

---

Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia  
UFPR – Curitiba - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

*DEDICO:*

*Aos meus pais, pelo amor, segurança e confiança transmitidas em todos os momentos, e por tomarem meus sonhos como seus.*

*À minha irmã, minha companheira e conselheira, pelo respeito, carinho e amor. Por ser minha eterna melhor amiga.*

## **AGRADECIMENTOS**

Meus mais sinceros agradecimentos

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, por quem guardo enorme admiração e carinho, agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela dedicação e ética neste e nos demais trabalhos sob sua orientação, pelo incentivo constante e por sempre tentar transmitir seus conhecimentos com generosidade e paciência.

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pela solicitude, envolvimento e grande colaboração na realização deste trabalho, por disponibilizar equipamentos e recursos de seu laboratório e pela atenção, paciência e carinho em todos os momentos.

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia pelas sugestões e colaboração na realização deste trabalho.

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

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia.

Aos queridos amigos do laboratório: Ana Flávia Specian, Daniel Favero, Helena Peggau, Henrique Scremin, Marcelo Tempesta, Rosana Serpa e Viviane Costa, pela generosidade com que transmitem suas experiências, pelo auxílio prático, pela convivência e momentos de reflexão e acima de tudo pela amizade, que me fortaleceu durante estes anos.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos: Daniel, Daniele, Juliana, Julie, Kalil, Karen, Lara, Marla, Roberta, Thiago e Vânia pelos esclarecimentos, auxílio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao Osvaldo pela grande ajuda com a realização das microscopias, pela atenção, envolvimento e simpatia.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana pelo auxílio com a utilização dos equipamentos, sempre com presteza e atenção.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina.

A todos meus amigos, pessoas mais que especiais na minha vida.

À minha família pelo amor incondicional, presença e confiança que me fortalecem todos os minutos.

À Deus, por Sua força e por me presentear com tantas pessoas maravilhosas no meu caminho...

*Muito obrigada!*

FRANÇA, Emanuele Julio Galvão de. **Produção de proteases e fator hemolítico e switching fenotípico em candida spp.** 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em humanos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as atividades hemolítica e proteolítica de isolados clínicos de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* obtidos de sítios anatômicos distintos e determinar as freqüências de *switching* fenotípico em isolado de *C. tropicalis*. Análises da atividade hemolítica de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* obtidos dos mesmos sítios anatômicos revelaram que isolados de *C. tropicalis* coletados de sangue apresentaram atividade estatisticamente superior aos de *C. parapsilosis*. Quando foi comparada a atividade hemolítica de isolados destas duas espécies, provenientes de sítios anatômicos distintos, foi verificado que isolados de *C. parapsilosis* coletados de secreção traqueal apresentaram atividade estatisticamente superior aos de sangue. Para *C. tropicalis* não foi verificada correlação entre atividade hemolítica e sítio de isolamento. Análises da atividade proteolítica de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* obtidos dos mesmos sítios anatômicos revelaram que isolados de *C. parapsilosis* coletados de secreção traqueal apresentaram atividade superior aos de *C. tropicalis*. Quando foi comparada a atividade proteolítica de isolados obtidos de sítios anatômicos distintos, foi verificado que os de *C. parapsilosis* provenientes de secreção traqueal apresentaram atividade superior aos de sangue e lesões superficiais. Já entre isolados de *C. tropicalis*, aqueles coletados de lesões superficiais apresentaram atividade superior aos de secreção traqueal. Nossos dados mostraram o potencial de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, coletados de sítios anatômicos distintos, em produzir fator hemolítico e proteases de maneira distinta. Neste trabalho também foi descrito um novo sistema de *switching* em *C. tropicalis*. Foram identificados quatro morfotipos, denominados “liso”, “côncavo”, “anel” e “rugoso”. As freqüências de *switching* entre os fenótipos variaram de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$ . Colônias dos fenótipos “anel” e “rugoso” são estruturalmente mais complexas que as dos demais morfotipos e apresentam cavidades nas quais é verificada presença de matriz. O variante “anel” foi avaliado quanto à formação da estrutura da colônia em função do tempo, sendo verificada correlação entre aumento na quantidade de matriz e desenvolvimento da colônia. A avaliação da capacidade de produção de biofilme pelos morfotipos revelou menor produção para o fenótipo parental “liso” em relação aos variantes. Também foi verificado que o biofilme formado pelo fenótipo parental liso é composto predominantemente por células blastoconidiais, enquanto o produzido pelos variantes possui ampla proporção de hifas e pseudo-hifas. A presença de matriz foi verificada apenas no biofilme formado pelos variantes “anel” e “rugoso”.

**Palavras-chave:** *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis*. Atividade hemolítica. Atividade proteolítica. Biofilme. *Switching* fenotípico.

FRANÇA, Emanuele Julio Galvão de. **Production of protease and haemolytic factor and phenotypic switching in *Candida* spp.** 2010. 82 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

Yeast species belonging to the genus *Candida* are responsible for the majority of fungal infections in humans. The aim of the present study was to determine haemolytic and protease activities of clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* obtained from anatomically distinct sites, and to determine the frequency of phenotypic switching in *C. tropicalis*. Analysis of haemolytic activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. tropicalis* isolates from blood had statistically higher activity than *C. parapsilosis*. When compared haemolytic activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity than blood isolates. For *C. tropicalis* isolates no correlation was observed between hemolytic activity and site of isolation. Analysis of proteinase activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had statistically higher activity than *C. tropicalis* isolates. When compared proteinase activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity than blood and superficial lesions isolates. Furthermore, *C. tropicalis* isolates from superficial lesions had higher activity than tracheal secretion isolates. Our results show the potential of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates, obtained from distinct anatomic sites, to produce haemolytic factor and proteinases at a distinct manner. In the present study it was also described a new system of switching for *C. tropicalis*. A total of four morphotypes was identified and denoted “smooth”, “bowl-shaped”, “ring” and “rough”. Colonies phenotypes “ring” and “rough” are structurally more complex than that observed for the other phenotypes. They present cavities with the presence of extracellular matrix. The colony structure development of the “ring” variant was evaluated. For this variant there was a correlation between the matrix content and colony development. Analyses of the biofilm production by the morphotypes revealed that the parental morphotype (“smooth”) produces less biofilm than others variants. For the former the biofilm comprised mostly yeast-like cells while for the variants a large proportion of hyphae and pseudohyphae were observed. Biofilm matrix was observed only for “ring” and “rough” variants.

**Keywords:** *Candida tropicalis*. *Candida parapsilosis*. Haemolytic activity. Proteolytic activity. Biofilm. Phenotype switching.

## LISTA DE TABELAS

### Parte I

- Tabela 1** – Distribution of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates according to their anatomic sites of isolation .....47
- Tabela 2** – Comparison of haemolytic and proteinase production of the *Candida* isolates ..... 50

### Parte II

- Tabela 1** – Intensidade de formação de biofilme por morfotipos de *Candida tropicalis* em diferentes tempos de incubação .....73

## LISTA DE FIGURAS

### Parte I

- Figura 1** – Photograph showing the haemolysis on erythrocytes enriched medium (A) and on blood enriched medium (B) induced by *Candida parapsilosis*.....50
- Figura 2** – Haemolytic activity of *Candida parapsilosis* (Cp) and *Candida tropicalis* (Ct) isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions (nail and skin).....51
- Figura 3** – Haemolytic activity of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions(nail and skin).....51
- Figura 4** – Secreted acid proteinase activity of *Candida parapsilosis* showing a clearance zone around the colony on *Candida*-BSA agar medium .....52
- Figura 5** – Proteinase activity of *Candida parapsilosis* (Cp) and *Candida tropicalis* (Ct) isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions (nail and skin).....52
- Figura 6** – Proteinase activity of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates obtained from blood, tracheal secretion lesions and superficial lesions (nail and skin).....53

### Parte II

- Figura 1** – *Switching* fenotípico em *Candida tropicalis*. Colônias representativas dos quatro fenótipos observados no isolado 49.07. A frequência de variação entre cada fenótipo está indicada .....67
- Figura 2** – Curva de crescimento dos morfotipos de *Candida tropicalis*. (A) “liso”, (B) “côncavo”, (C) “anel”, (D) “rugoso” .....69
- Figura 3** – Eletromicrografia de varredura de morfotipos de *C. tropicalis*. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 100x.....70

<b>Figura 4</b> – Eletromicrografia de varredura de morfotipos de <i>Candida tropicalis</i> . (A) e (B) superfície de “liso” e “côncavo”, respectivamente; (C) e (D) presença de matriz na cavidade de “anel” e “rugoso”, respectivamente Aumento 2000x .....	71
<b>Figura 5</b> – Eletromicrografia de varredura de colônia do variante “anel” em diferentes etapas de formação. (A) 40 horas; (B) 48 horas; (C) 55 horas e (D) 64 horas de cultivo.....	72
<b>Figura 6</b> – Formação de biofilme por morfotipos de <i>C. tropicalis</i> . (A) “liso”, (B) “côncavo”, (C) “anel”, (D) “rugoso”. A produção de biofilme do fenótipo “liso” foi inferior à dos variantes.....	74
<b>Figura 7</b> – Eletromicrografia de varredura do biofilme de morfotipos de <i>C. tropicalis</i> formado em fragmentos de cateter urinário em diferentes tempos de incubação. (1) 30 min; (2) 6 horas; (3) 12 horas e (4) 24 horas. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 900x .....	76
<b>Figura 8</b> – Eletromicrografia de varredura do biofilme de morfotipos de <i>C. tropicalis</i> formado em fragmentos de cateter urinário, em diferentes tempos de incubação. (1) 30 min; (2) 6 horas; (3) 12 horas e (4) 24 horas. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 4000x .....	77
<b>Figura 9</b> – Eletromicrografia de varredura do biofilme formado pelos variantes (1) “anel” e (2) “rugoso”, após 24 horas de incubação. Notar presença de matriz. Aumento 10000x.....	78

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	15
3.2	EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	16
3.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
3.3.1	Fator Hemolítico .....	19
3.3.2	Proteases Aspárticas Secretadas.....	22
3.3.3	<i>Switching</i> Fenotípico.....	23
3.3.4	Biofilme .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>PARTE I – HAEMOLYTIC AND PROTEINASE ACTIVITIES IN CLINICAL ISOLATES OF <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> AND <i>CANDIDA TROPICALIS</i> WITH REFERENCE TO THE ISOLATION ANATOMIC SITE</b> .....	44
	<b>PARTE II – SWITCHING FENOTÍPICO EM <i>CANDIDA TROPICALIS</i></b> .....	60
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos relacionados a infecções em humanos, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos. Estas infecções estão associadas a altas taxas de mortalidade e longos períodos de internação, acentuando a importância clínica relacionada a estes microrganismos.

Diversos estudos apontam uma mudança significativa na epidemiologia das infecções provocadas por *Candida* spp nas últimas décadas, demonstrando uma maior diversificação de espécies. Embora ainda seja relatada a prevalência de *Candida albicans* nos casos de infecções por leveduras deste gênero, a proporção de diagnósticos de infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* tem aumentado. Dentre as espécies não-*albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* estão entre as mais frequentemente isoladas.

*C. parapsilosis* é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis e possui ampla capacidade de formação de biofilme. Tais características fazem com que esta espécie seja frequentemente relacionada a surtos hospitalares.

As infecções provocadas por *C. tropicalis* geralmente tem origem endógena, a partir da microbiota do paciente. Estas infecções são comuns principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles acometidos por câncer e doenças hematológicas.

O gênero *Candida* apresenta uma diversidade de determinantes de virulência, que auxiliam na colonização e no estabelecimento de infecções. *C. albicans* tem sido a espécie modelo em estudos relativos à caracterização de determinantes de virulência no gênero, no entanto existem diferenças significativas quanto à expressão destes fatores entre as demais espécies, bem como quanto à sua expressão em função do tipo e local da infecção.

Dentre os principais determinantes de virulência estão as enzimas hidrolíticas extracelulares, como as aspartil proteases (Saps), fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção. Segundo Kantarcioglu e Yucel (2002) Saps são importantes determinantes de virulência em *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, assim como em *C. albicans*.

O fator hemolítico também foi reconhecido como um possível determinante de virulência no gênero *Candida* e está relacionado à capacidade do patógeno em adquirir íons ferro a partir da hemoglobina, já que este íon não se encontra em sua forma livre em hospedeiros humanos. Até o momento, são poucos os dados relativos à atividade hemolítica em *Candida não-albicans*.

O *switching* fenotípico, relatado em algumas espécies do gênero *Candida*, é capaz de promover modificações morfológicas e fisiológicas nesses microrganismos, podendo auxiliar na capacidade de adaptação ao meio. Em *C. albicans*, este mecanismo foi descrito pela primeira vez há mais de 20 anos, e atualmente a maioria dos estudos concentra-se no sistema *white-opaque* desta espécie.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Analisar as atividades hemolítica e proteolítica de isolados clínicos de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* obtidos de sítios anatômicos distintos, estabelecendo uma possível correlação entre as atividades e o sítio de isolamento destas leveduras;
- Determinar as frequências de *switching* fenotípico no isolado 49.07 de *C. tropicalis* e analisar a organização microestrutural das diferentes colônias (morfortipos) do isolado, assim como verificar o potencial de produção de biofilme dos diferentes morfortipos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GÊNERO *CANDIDA*

Leveduras do gênero *Candida*, encontradas na forma comensal em aproximadamente 50% da população, são os principais patógenos fúngicos relacionados a infecções em humanos, provocando altos índices de morbidade e mortalidade (revisado por NAGLIK *et al.*, 2003 e MAVOR, *et al.*, 2005). Espécies de *Candida* possuem ampla capacidade de responder a mudanças ambientais e no hospedeiro, assim, vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção por estes microrganismos (revisado por HAYNES, 2001).

A frequência das infecções por *Candida* spp. vem aumentando mundialmente devido aos múltiplos fatores predisponentes, que facilitam a conversão da forma comensal à existência parasitária. Dentre estes fatores, destacam-se imunossupressão, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, prematuridade e alterações nas barreiras físicas naturais do hospedeiro, como as provocadas por cirurgias, queimaduras e inserção de cateteres. Os tratos gastrointestinal e urogenital, assim como a pele, são as principais portas de entrada para *Candida* spp. (PITTET, *et al.*, 1995; BLUMBERG, *et al.*, 2001; FRIDKIN, 2005; BARBERINO *et al.*, 2006; DIMOPOULOS, *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2009).

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

Candídiase oral, uma das infecções fúngicas mais comuns em humanos, é um problema significativo em indivíduos imunocomprometidos, principalmente os portadores de HIV (PATTON, 2003; WINGETER *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2009). Outra infecção mucosa freqüente é candidíase vulvovaginal, a qual afeta mulheres imunossuprimidas e imunocompetentes, sendo que

aproximadamente 75% das mulheres saudáveis apresentam pelo menos um episódio desta infecção durante a idade fértil (RICHTER, *et al.*, 2005). O trato respiratório também é comumente colonizado por *Candida* spp., principalmente em pacientes que recebem tratamento antimicrobiano, ventilação mecânica e em imunocomprometidos (WILLIAMS *et al.*, 1976; DELISLEA *et al.*, 2008). O gênero *Candida* é ainda amplamente associado à onicomicoses (VEER *et al.*, 2007) e infecções cutâneas (DEL ROSSO *et al.*, 1998).

Entre as infecções invasivas provocadas por espécies do gênero *Candida*, destacam-se os casos de candidemia, a quarta causa mais comum de infecções na corrente sanguínea em hospitais terciários. Estas infecções apresentam altos índices de incidência em quase todas as regiões demográficas, e implicações relevantes quanto aos custos, dificuldades de tratamento e, principalmente, quanto às taxas de mortalidade, próximas a 50% em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (WENZEL, 1995; EDMOND *et al.*, 1999; OLAECHEA *et al.*, 2004; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; SHORR *et al.*, 2009). O desenvolvimento de candidemia está relacionado não somente aos fatores predisponentes que acometem cada paciente, mas também aos procedimentos e materiais médicos utilizados na rotina hospitalar, que são responsáveis por pelo menos a metade dos casos nosocomiais destas infecções (DIEKEMA *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2003; ALMIRANTE *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; MORREL *et al.*, 2005; BASSETTI *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; BASSETTI *et al.*, 2007; NUCCI; COLOMBO, 2007; CHOW *et al.*, 2008a).

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO *CANDIDA*

Embora *Candida albicans* ainda seja a espécie mais amplamente diagnosticada entre isolados clínicos do gênero, nas últimas décadas tem havido um aumento significativo na incidência de outras espécies. Em alguns casos, observa-se igualdade nos índices de isolamento ou até prevalência de espécies não-*albicans* sobre *C. albicans* (COLOMBO, 2000; COLOMBO *et al.*, 2006; CHOW *et al.*, 2008b; DIMOPOLUS *et al.*, 2008). As razões para a emergência das espécies não-*albicans* não são completamente entendidas, mas sabe-se que algumas condições podem

aumentar o risco de desenvolvimento de candidemia por estas espécies. Por exemplo, fungemia por *Candida parapsilosis* tem sido associada a cateteres vasculares, nutrição parenteral e prematuridade, enquanto câncer e neutropenia estão associados à candidemia por *Candida tropicalis*. Por outro lado, fungemia por *Candida glabrata* e *Candida krusei* está associada à exposição prévia aos antifúngicos da classe dos azoles (WINGARD, 1995; GIRMENIA *et al.*, 1996; MARR *et al.*, 1999; TRICK *et al.*, 2002; CLARK *et al.*, 2004).

A epidemiologia das infecções por *Candida* spp. varia conforme a região demográfica (ABI-SAID *et al.*, 1997; TRICK *et al.*, 2002; EGGIMANN *et al.*, 2003; PFALLER *et al.*, 2004). Estudos recentes demonstram um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata* principalmente nos EUA (TRICK *et al.*, 2002; HAJJEH *et al.*, 2004; PFALLER *et al.*, 2006; HACHEM *et al.*, 2008). Já no Brasil, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido as espécies não-*albicans* mais frequentemente isoladas (COLOMBO *et al.*, 2006; HINRICHSEN *et al.*, 2008; BRUDER-NASCIMENTO *et al.*, 2010) e segundo um estudo conduzido por Pfaller e colaboradores (2005), os índices de isolamento destas espécies em todo o mundo aumentaram 3,1% e 2,9%, respectivamente, no período de 1997 a 2003.

*C. parapsilosis* é reconhecida pela capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos intravasculares e por sua persistência no ambiente hospitalar. Além disso, esta espécie é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis, o que facilita sua propagação nosocomial por meio das mãos de profissionais da área da saúde. Estas características fazem com que *C. parapsilosis* seja cada vez mais relacionada a surtos hospitalares, originando infecções principalmente em neonatos prematuros (DE BERNARDIS *et al.*, 1999a; SHIN *et al.*, 2002; KUHN *et al.*, 2004; ALMIRANTE, *et al.*, 2005; BONASSOLI *et al.*, 2005; VAN ASBECK *et al.*, 2007; PFALLER *et al.*, 2008).

Os isolados de *C. parapsilosis* eram divididos em três grupos genotípicos, denominados grupos I, II e III (LEHMANN *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 1995; ROY; MEYER, 1998). No entanto, recentemente, duas novas espécies, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, foram propostas para substituir as designações *C. parapsilosis* grupo II e III, respectivamente. A denominação *C. parapsilosis* foi mantida para os isolados do grupo I (TAVANTI *et al.*, 2005). A incidência de *C. metapsilosis* é extremamente rara em isolados clínicos, no entanto, segundo Tavanti

e colaboradores (2007), *C. orthopsilosis* é capaz de colonizar e causar infecções em diferentes regiões anatômicas.

Diferentemente de *C. parapsilosis*, que é disseminada predominantemente por via exógena, a maioria das infecções causadas por *C. tropicalis* são originadas endógenamente, a partir da microbiota do hospedeiro (revisado por RICHARDSON; LASS-FLORL, 2008). Assim, *C. tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista em pacientes acometidos por câncer, doenças hematológicas e quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos ou danos nas mucosas (NUCCI e COLOMBO, 2007). Outro fator que contribui para a importância clínica desta espécie é sua virulência. Segundo De Repentigny e colaboradores (1992), em modelos animais portadores de doenças hematológicas, esta espécie parece ser mais virulenta que *C. albicans*.

### 3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos que propiciam sucesso na colonização e infecção do hospedeiro. Assim, a maioria dos patógenos, incluindo *Candida* spp., expressa uma série de fatores de virulência e apresenta estratégias específicas que os auxiliam na habilidade de colonizar tecidos hospedeiros, sobrepujar suas defesas e causar infecções (revisado por NAGLIK *et al.*, 2003).

No gênero *Candida*, os fatores de virulência são determinados geneticamente e seletivamente expressos de acordo com o tipo, estágio e sítio anatômico da infecção, com a resposta natural do organismo e com os fatores de predisposição do hospedeiro. O estado fisiológico e as interações com células do sistema imune do hospedeiro também podem afetar significativamente a sobrevivência e virulência destes microrganismos em diferentes sítios anatômicos (revisado por CUTLER, 1991, ODDS, 1994 e SWEET, 1997).

Dentre os principais determinantes de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida*, tem-se a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares (proteases e fosfolipases), a capacidade de variação da morfologia celular (formação de hifas, pseudo-hifas e variação fenotípica), e a expressão de

fatores de adesão, como moléculas reconhecedoras de superfícies (GHANNOUN, 2000; GOKCE *et al.*, 2007; NAGLIK *et al.*, 2008). Adicionalmente, o *switching* fenotípico proporciona variações na morfologia da colônia, composição antigênica e afinidade a tecidos. Assim, este mecanismo possibilita maior flexibilidade e conseqüentemente maior adaptação da levedura às condições hostis do hospedeiro (revisado por CALDERONE; FONZI, 2001). O fator hemolítico também tem sido reconhecido como um possível atributo de patogenicidade nas espécies de *Candida* (MANNS, *et al.*, 1994; WATANABE *et al.*, 1997, 1999; LACHKE, 2000; LUO *et al.*, 2001, 2004; FURLANETO-MAIA *et al.*, 2008).

A maioria das pesquisas referentes aos determinantes de virulência no gênero *Candida* é realizada utilizando-se *C. albicans* como modelo. Entretanto, vários estudos constataam diferenças significativas quanto à presença de genes relacionados a esses determinantes entre as demais espécies, bem como, quanto à expressão dos mesmos, a qual é dependente da interação fungo-hospedeiro e de necessidades nutricionais e fisiológicas do fungo no curso da infecção (MONOD *et al.*, 1994; GILFILLAN *et al.*, 1998; FIDEL *et al.*, 1999; STAIB *et al.*, 2000; BRIELAND *et al.*, 2001; ZAUGG *et al.*, 2001; KANTARCIOGLU e YÜCEL 2002; FOTEDAR e AL-HEDAITHY, 2003; TAVANTI *et al.*, 2004; DAGDEVIREN *et al.*, 2005; OKSUZ *et al.*, 2007).

### 3.3.1 Fator Hemolítico

O ferro elementar é um co-fator essencial para uma ampla variedade de funções metabólicas, como transporte de oxigênio, respiração, regulação da expressão gênica e síntese de DNA, sendo assim requerido para a sobrevivência de todos os organismos. No entanto, a reatividade deste elemento com peróxido de hidrogênio resulta em formação de radicais hidroxila altamente tóxicos, os quais podem reagir com açúcares, aminoácidos, fosfolipídeos, bases nitrogenadas e ácidos orgânicos presentes nas células. Estas propriedades requerem que os organismos possuam um sistema altamente regulado de captação e armazenamento do ferro (BYERS e ARCENEUX, 1998; revisado por MOYE-ROWLEY, 2003).

A habilidade de microrganismos patogênicos de adquirir este elemento é de fundamental importância para a sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecções em seus hospedeiros. Desta forma, a disponibilidade de ferro tem um papel crítico na relação patógeno-hospedeiro, bem como na virulência de bactérias e fungos (revisado por PAYNE, 1993; HOWARD, 1999).

Os seres humanos possuem um sistema altamente regulado para homeostase do ferro, garantindo a disponibilidade deste elemento nas funções vitais e eliminando sua toxicidade (revisado por DUNN *et al.*, 2007). Assim, a maioria do ferro está localizada intracelularmente, na forma de ferritina, proteínas Fe-S e em compostos contendo o grupo heme. A pouca quantidade de ferro extracelular encontra-se associada a proteínas de transporte como transferrina (soro) e lactoferrina (secreções corporais). Esta retenção de ferro por proteínas do hospedeiro atua como um obstáculo a infecções por muitos microrganismos, já que mantém a concentração de ferro livre nos fluidos corporais em níveis extremamente baixos, insuficientes para o crescimento microbiano. Esta estratégia de defesa é denominada “imunidade nutricional” (revisado por WEINBERG, 1999a e RATLEDGE; DOVER, 2000). No entanto, microrganismos patogênicos apresentam estratégias complexas para aquisição deste elemento e em muitos destes organismos, a disponibilidade de ferro serve como um sinal para induzir a expressão de determinantes de virulência (revisado por HOWARD, 1999; WEIBERG, 1999b; TIMM *et al.*, 2003).

*C. albicans* possui três mecanismos independentes para captação de ferro a partir de diferentes substratos, como sideróforos, quelantes férricos variados e grupo heme (HAMMACOTT, 2000; HEYMAN, 2002; HU, 2002; KNIGHT, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; PENDRAK, 2004; WEISSMAN, 2004; revisado por ALMEIDA *et al.*, 2009). É provável que estes mecanismos auxiliem *C. albicans* a adaptar-se ao contexto fisiológico, no que se refere à variabilidade nas formas e disponibilidade do ferro.

Sideróforos são pequenas moléculas, sintetizadas e secretadas por muitos microrganismos, as quais podem ligar-se e solubilizar íons ferro com alta afinidade. Embora *C. albicans* aparentemente não possua a maquinaria enzimática necessária para sintetizar e secretar estas moléculas, esta espécie é capaz de capturar ferro de diferentes tipos de sideróforos, secretados por outros microrganismos (HU, 2002; LAN *et al.*, 2004). Para capturar o ferro presente em

quelantes férricos, como a transferrina, *C. albicans* utiliza o sistema de captação redutivo, localizado na membrana plasmática da levedura. Este sistema também é empregado para a utilização do ferro da ferritina e de fontes ambientais (HAMMACOTT *et al.*, 2000; KNIGHT, *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; WEISSMAN e KORNITZER, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2008). Já para a utilização do ferro presente no grupo heme, *C. albicans* e outras espécies do gênero produzem fator hemolítico, qual provoca a lise dos eritrócitos e conseqüente liberação da hemoglobina (MANNIS *et al.*, 1994; WATANABE *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 2001). Atualmente são poucos os dados relativos à atividade hemolítica em leveduras, em contraste com extensivos trabalhos descritos para bactérias.

Manns e colaboradores (1994) relataram que *C. albicans* utiliza ferro derivado da hemoglobina por meio da produção de um fator hemolítico, o qual promove a lise dos eritrócitos. Em 1997, Watanabe e colaboradores reportaram que esse fator hemolítico é liberado no sobrenadante de cultivo. Posteriormente o fator hemolítico de *C. albicans* foi caracterizado como uma manoproteína componente da parede celular (WATANABE *et al.*, 1999). Segundo estes autores, a fração carboidrato desta manoproteína seria importante por ligar-se a proteína Banda 3, presente na membrana dos eritrócitos, a qual é responsável pelo transporte de íons.

Luo e colaboradores (2001) demonstraram variação na produção de fator hemolítico entre isolados clínicos de diversas espécies do gênero *Candida*. Segundo estes autores, os isolados de *C. parapsilosis* não apresentaram atividade hemolítica. Variações na atividade hemolítica também foram observadas entre isolados de *Candida* spp. obtidos de indivíduos idosos saudáveis (FURLANETO-MAIA *et al.*, 2008).

Lachke e colaboradores (2000), em estudo relacionado à regulação de *switching* fenotípico em *C. glabrata*, obtiveram uma seqüência parcial de DNA com similaridade à de genes relacionados à hemolisinas de uma diversidade de organismos. Tal seqüência foi reconhecida como um possível gene relacionado ao fator hemolítico, sendo denominado de gene *HLP* (“*hemolysin-like protein*”). Posteriormente, esta seqüência foi utilizada por Luo e colaboradores (2004) para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção e análise da expressão do gene *HLP* em *C. glabrata*. Estes autores ainda correlacionaram tal expressão com a atividade hemolítica dos isolados, evidenciando uma possível correlação deste gene com a atividade hemolítica.

### 3.3.2 Proteases Aspárticas Secretadas (Saps)

As enzimas hidrolíticas extracelulares estão entre os principais determinantes de virulência do gênero *Candida*, sendo fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção. Dentre estas, destacam-se as aspartil proteases (Saps). Na espécie *C. albicans*, as proteínas da família Sap são codificadas por pelo menos dez genes (*SAP1- SAP10*), os quais são diferencialmente regulados. Estas proteases podem ser secretadas (Sap1-Sap8) ou ancoradas à parede celular (Sap9-Sap10), apresentando funções fundamentalmente diferentes. Proteases Saps 1-6 são conhecidas por hidrolisar proteínas do hospedeiro, e conseqüentemente, causar danos em tecidos. Em contraste, tem sido demonstrado que Sap 9 e Sap 10 são relacionadas à integridade da parede celular e ainda são necessárias para maior virulência durante a infecção de tecidos orais e epiteliais. (MONOD *et al.*, 1994; MONOD *et al.*, 1998; KRETSCHMAR *et al.*, 2002; ALBRECHT *et al.*, 2006).

Embora o papel primário das Saps de *C. albicans* seja a digestão de proteínas do hospedeiro e conseqüente disponibilização de nitrogênio para as células, estas proteases também desenvolvem funções relacionadas à virulência. Elas facilitam a adesão a muitos tipos celulares e tecidos do hospedeiro, como mucosas do trato oral e vaginal, e atuam na resistência a células fagocíticas. Além disso, estas proteases podem contribuir para a invasão de órgãos profundos causando distúrbios em células e substâncias intercelulares, ou ainda, destruindo células e moléculas do sistema imune (KAMINISHI *et al.*, 1995; revisado por HUBE, 1998). Estudos utilizando pepstatina A, um inibidor de proteases aspárticas, demonstraram prevenção na invasão e dano de mucosa oral, vaginal e pele em modelos experimentais (DE BERNARDIS *et al.*, 1997; FALLON *et al.*, 1997).

Diversos estudos relatam a expressão diferencial de genes *SAPs* de *C. albicans* sob uma variedade de condições laboratoriais, como em modelos experimentais de reconstrução da pele, mucosa oral e vaginal, e *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em tecidos de mucosa oral infetados (HUBE *et al.*, 1994; SCHALLER *et al.*, 2005; STAIB *et al.*, 2008).

Utilizando mutantes *SAP*-deficientes, Schaller e colaboradores (1999) evidenciaram que *SAP* 1-3 contribuem significativamente para infecções *in vitro* por *C. albicans* em células da mucosa oral. O papel preponderante destas

SAPs foi também demonstrado em infecções vaginais experimentais (DE BERNARDIS *et al.*, 1999b). Já as SAP 4-6, parecem ser fundamentais para o estabelecimento de infecções sistêmicas, já que mutantes nocauteados para os genes SAP 4-6 mostraram-se fortemente atenuados em modelos de infecção intravenosa e intraperitoneal (HUBE *et al.*, 1997; SANGLARD *et al.*, 1997; KRETSCHMAR *et al.*, 1999; FELK *et al.*, 2002).

A presença de algumas proteases desta família também tem sido demonstrada em outras espécies do gênero. Genes SAP 1-4 foram identificados em *C. tropicalis*, sendo Sap 1 a proteína predominantemente expressa *in vitro* (ZAUGG *et al.*, 2001). No entanto, ao contrário de *C. albicans*, a deleção do gene SAP 1 parece ter pouco efeito sob a virulência em *C. tropicalis* (TOGNI *et al.*, 1994). Embora algumas proteinases tenham sido detectadas em *C. parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis* e *Candida guilhermondii*, seus papéis ainda não estão bem estabelecidos (MONOD *et al.*, 1994; GILFILLAN *et al.*, 1998; PICHOVA *et al.*, 2001).

Alguns estudos demonstraram que a produção de proteases Saps em espécies patogênicas do gênero *Candida* é induzida por proteína exógena (normalmente albumina soro bovina - BSA) (DOSTÁL *et al.*, 2003; DAGDEVIREN *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009). A intensidade desta produção é diferenciada entre as espécies do gênero e pode estar relacionada à patogenicidade de cada espécie (KUMAR *et al.*, 2006).

### 3.3.3 *Switching* Fenotípico

Uma das principais características de leveduras do gênero *Candida* é sua versatilidade. Além do fato destes microrganismos serem capazes de viver como comensais ou patógenos, eles apresentam extraordinária habilidade de sobreviver e infectar sítios anatômicos amplamente distintos, cada qual com uma série de pressões ambientais (CALDERONE, 2002). Esta versatilidade deve-se, parcialmente, à ampla variedade fisiológica apresentada por estas leveduras. *C. albicans* pode, por exemplo, sobreviver como blastoconídio ou formar pseudo-hifas

e/ou hifas, dependendo das condições ambientais, tais como pH e temperatura (CORNE; MAGEE, 1997; KOBAYASHI; CUTLER, 1998).

Outro mecanismo capaz de provocar alterações morfológicas em *Candida* spp. é conhecido como *switching* fenotípico, o qual possibilita a emergência espontânea de colônias com o fenótipo alterado (revisado por SOLL, 1992). Este fenômeno tem sido observado em microrganismos eucariotos e procariotos, incluindo fungos patogênicos, e permite que o microrganismo realize uma rápida microevolução, possibilitando melhor adaptação ao ambiente (DRENKARD *et al.*, 2002; GUERRERO; FRIES, 2008; revisado por JAIN *et al.*, 2008).

Em fungos, o *switching* fenotípico foi descrito pela primeira vez há mais de 20 anos, em *C. albicans* (SLUTSKY *et al.*, 1985; SLUTSKY *et al.*, 1987). Este mecanismo também já foi demonstrado em outros fungos como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Candida lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* (SOLL *et al.*, 1988; LOTT *et al.*, 1993; GOLDMAN *et al.*, 1998; KUGLER *et al.*, 2000; LACHKE *et al.*, 2000, 2002; BROCKERT *et al.*, 2003; SRIKANTHA *et al.*, 2005; LAFFEY; BUTLER, 2005; MILLER *et al.*, 2006). As principais características do *switching* fenotípico compreendem alta frequência de ocorrência, hereditariedade, reversibilidade e interconvertibilidade, além de ser regulado por variações ambientais (BERGEN *et al.*, 1990; MARESCA *et al.*, 1994; RAMÍREZ-ZAVALA *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Embora o *switching* fenotípico tenha sido inicialmente identificado por mudanças reversíveis na morfologia da colônia, os fenótipos variantes são, em muitos casos, também manifestados em nível celular (ANDERSON; SOLL, 1987; LACHKE *et al.*, 2002; LAFFEY; BUTLER, 2005).

Este mecanismo é capaz de promover variabilidade da população, envolvendo a regulação de vários genes fase-específicos no gênero *Candida* (SONNEBORN *et al.*, 1999). Muitos destes genes proporcionam implicações na virulência, podendo afetar fatores como adesão (VARGAS *et al.*, 1994), antigenicidade (ANDERSON *et al.*, 1990), sensibilidade a neutrófilos (KOLOTILA; DIAMOND, 1990), secreção de proteinases (MORROW *et al.*, 1992; VARGAS *et al.*, 2000), suscetibilidade a drogas (SOLL *et al.*, 1989; VARGAS *et al.*, 2000) e produção de biofilmes (LAFFEY; BUTLER, 2005). Assim, o *switching* fenotípico fornece uma vantagem potencial no caso de alterações no meio, como mudanças fisiológicas no hospedeiro e terapias antifúngicas, além de facilitar a colonização de

sítios anatômicos distintos (ODDS, 1997; BROCKERT *et al.*, 2003; AVERY *et al.*, 2006).

Um dos principais fatores que diferenciam o *switching* fenotípico de outras alterações morfológicas é sua ocorrência em apenas uma pequena parcela da população (revisado por JAIN *et al.*, 2008). A transição levedura-hifa, por exemplo, representa uma diferenciação celular reversível, a qual pode ser induzida em massa por simples manipulação ambiental. Assim, a maioria das células da população irá expressar fenótipo alternativo em determinada condição de crescimento (MITCHELL, 1998; ERNST, 2000; NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2001). Já o *switching* é normalmente espontâneo, não ocorrendo em massa mesmo após estímulo ambiental. Neste caso, apenas uma pequena parcela da população irá expressar o fenótipo diferencial (revisado por SOLL, 1992).

Em *C. albicans*, o sistema *white-opaque* de *switching* tem sido extensivamente estudado (SRIKANTHA; SOLL, 1993; SONNEBORN *et al.*, 1999; ZORDAN *et al.*, 2007; RAMÍREZ-ZAVALA *et al.*, 2008; HNISZ *et al.*, 2009). Este sistema ocorre em determinados isolados da espécie e é caracterizado por variação na coloração das colônias entre branco ou cinza, envolvendo mudanças dramáticas no fenótipo celular. Enquanto as células na fase *white* possuem formato arredondado como a maioria dos outros isolados de *C. albicans*, as da fase *opaque* são duas vezes mais largas e alongadas, exibem padrões de brotamento particulares e apresentam pequenas elevações na parede celular (SLUTSKY *et al.*, 1987; ANDERSON; SOLL, 1987).

Segundo Lan e colaboradores (2002), no sistema *white-opaque* mais de 370 genes são diferencialmente expressos nos morfotipos. Estes genes são responsáveis por diversas funções, incluindo metabolismo, adesão, composição da superfície celular, sinalização e virulência, podendo auxiliar *C. albicans* na evasão ao sistema imune do hospedeiro.

Dentre estes genes está o *SAP1*, o qual é especificamente expresso na fase *opaque* (MORROW *et al.*, 1992) e pode ser responsável pela maior virulência relatada para células nesta fase, em relação às *white*, em modelos de infecção cutânea (KVAAL *et al.*, 1999). Em contraste, em modelos de infecção intravenosa foi demonstrado que células *white* são mais virulentas (KVAAL *et al.*, 1997).

Mais recentemente foi relatado ainda que o *switching* fenotípico entre as fases *white* e *opaque* é fundamental para o processo de *mating* em *C. albicans*, já que apenas células da fase *opaque* são *mating*-competentes (MILLER; JOHNSON, 2002; revisado por SOLL, 2009).

### 3.3.4 Biofilme

Infecções provocadas por *Candida* spp. são comumente associadas à formação de biofilme, o qual pode ocorrer em superfícies mucosas e na superfície plástica de dispositivos médicos invasivos (CHANDRA *et al.*, 2001; KUHN *et al.*, 2002).

Biofilme é uma comunidade microbiana sésil, composta por células fortemente aderidas a um substrato ou umas as outras, e embebidas em uma matriz polimérica extracelular, secretada por elas próprias (revisado por DOLAN; COSTERTON, 2002). As células sésseis do biofilme exibem algumas características fenotípicas diferenciadas quando comparadas a células planctônicas, sendo a principal, sua resistência aumentada a antimicrobianos. (RAMAGE *et al.*, 2002; BACHMANN *et al.*, 2003; revisado por LOPEZ-RIBOT, 2005). Os mecanismos responsáveis por esta resistência ainda não são completamente entendidos, no entanto, tem sido sugerido que a baixa taxa de crescimento, a penetração restrita das drogas à matriz e padrões de expressão associados à formação de biofilmes podem estar relacionados a esta característica (revisado por MAH; O'TOOLE, 2001; KUMAMOTO, 2002).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de espécies não-*albicans* de formar biofilmes (KUHN *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2002; AL-FATTAN e DOUGLAS, 2006; GOKCE *et al.*, 2007). Shin e colaboradores (2002) relataram uma porcentagem de isolados de *C. albicans* produtores de biofilme significativamente inferior à de isolados não-*albicans*. Dentre estas espécies, a produção de biofilme foi mais freqüentemente observada em isolados de *C. tropicalis* (80%). Entre os isolados de *C. tropicalis* avaliados por Gokce e colaboradores (2007), 45% foram produtores de biofilme, enquanto apenas 12% dos isolados de *C. albicans* apresentaram esta característica. Al-Fattani e Douglas (2006) encontraram

diferenças na composição química da matriz do biofilme de *C. tropicalis* e *C. albicans* sendo que hexosamina e glicose, respectivamente, foram os principais componentes encontrados na matriz destas espécies. Em estudo recente, foi constatado que a matriz do biofilme de isolados de *C. parapsilosis* é constituída de grande proporção de carboidratos e pequena proporção de proteínas, enquanto para isolados de *C. tropicalis*, foram verificadas pequenas proporções tanto de carboidratos quanto de proteínas (SILVA *et al.*,2009).

Também foi recentemente demonstrado o potencial diferenciado de variantes fenotípicos de *C. parapsilosis* quanto à formação de biofilme (LAFFEY; BUTLER, 2005).

## REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZON, O. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p.1122-1128, 1997.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICJOVA, I.; NAGLIK, J.R.; SCALLER, M.; DE GROOT, P.; MacCALLUM, D.; ODDS, F.; SCHAFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular process and host pathogen interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, p. 688-694, 2006.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 999–1008, 2006.
- ALMEIDA, R.S.; BRUNKE, S.; ALBRECHT, A.; THEWES, S.; LAUE, M.; EDWARDS, J. E. Jr.; FILLER, S. G.; HUBE, B. The hyphal-associated adhesion and invasion Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **Plos Pathogens**, v.4, 2008.
- ALMEIDA, R.S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1000-1012, 2009.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829–1835, 2005.
- ANDERSON, J.M.; SOLL, D.R. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 5579-5588, 1987.
- ANDERSON, J.M.; MIHALIK, K; SOLL, D.R. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell and pimple of the *Candida* opaque phenotype. **The Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 224-235, 1990.
- AVERY, S.V. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 577– 587.2006.
- BACHMANN, S.P.; RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; PATTERSON, T.F.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p.3657-3659, 2003.
- BARBERINO, M.G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A.P.; NETTO, E.M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.36-40, 2006.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M.P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v.21, 2006.

BASSETTI M.; TRECARCHIB, E.M.; RIGHIA, E.; SANGUINETTIC, M.; BISIOA, F.; POSTERAROC, B.; SOROD, O.; CAUDAB, R.; VISCOLIA, C.; TUMBARELLOB, M. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p.325–331, 2007.

BERGEN, M.; VOSS, E.; SOLL, D.R. Switching at the cellular level in the white-opaque transition of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 1925-1936, 1990.

BLUMBERG, H.M.; JARVIS, W.R; SOUCIE, J.M.; EDWARDS, J.E.; PATTERSON, J.E.; PFALLER, M.A.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; RINALDI, M.G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R.T.; WENZEL, R. P.; NEMIS STUDY GROUP. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.177-186, 2001.

BYERS, B.R.; ARCENEUX, J.E.L. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 35, p.37–66, 1998.

BONASSOLI, I.A.; BERTOLI, M.; SVINDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infections**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BORGES, R.M.; SOARES, L.R.; BRITO, C.S.; BRITO, D.D.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO FILHO, P. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p.431-435, 2009.

BRIELAND, J.; ESSIG, D.; JACKSON, C.; FRANK, D.; LOEBENBERG, D.; MENZEL, F.; ARNOLD, B.; DIDOMENICO, B.; HARE, R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5046–5055, 2001.

BROCKERT, P.J.; LACHKE, S.A.; SRIKANTHA, T.; PUJOL, C.; GALASK, R.; SOLL, D.R. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 7109–7118, 2003.

BRUDER-NASCIMENTO, A; CAMARGO, C.H.; SUGIZAKI, M.F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, C.A.; MONDELLI, A.L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, doi:10.1186/1756-0500-3-1, 2010.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9: 327-335, 2001.

- CALDERONE, R.A. *Candida* and Candidiasis. Washington , DC, **ASM Press**, 2002.
- CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5385-5394, 2001.
- CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO,T.J.; LIN,C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, 22, 2005.
- CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A. W.;CARMELI, Y.;LICHTENBERG, D.A.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.A. HADLEY, S. Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 36,p. 1993-1998, 2008a.
- CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A.W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.1206–1213, 2008b.
- CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRINDKIN, S.K.; HAJJEN, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 4468-4472, 2004.
- COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 4, p.113-118, 2000.
- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.
- CORNER, B.E; MAGEE, P.T. *Candida* pathogenesis: unraveling the threads of infection. **Current Biology**, v.7, p. 691-694, 1997.
- COSTA, K.R.C; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M.C.; CANDIDO, R.C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Oral Candidosis: Quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, p.73–79, 2009.
- CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Reviews in Microbiology**, v.45, p. 187–218, 1991.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. **Mycoses**, v. 48, p. 321-326, 2005.

DE BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M., ADRIANI, D.; SPREGHINI, E.; SANTONI, G.; CASSONE, A. Protective role of antimannan and anti-aspartic proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3399-3405, 1997.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLÀN, R.; PONTÒN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, 3481-3486, 1999a.

DE BERNARDIS, F.; ARANCIA, S.; MORELLI, L.; HUBE, B.; SANGLARD, D.; SCHAFER, W.; CASSONE, A. Evidence that members of the secretory aspartic proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, p. 201- 208, 1999b.

DELISLEA, M.S.; WILLIAMSON, D.R.; MARC, B.C.; PERREAULTC, M.; ALBERTB D. M.; JIANGE, C. X.; HEYLANDE, D.K. The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients **Journal of Critical Care**, v. 23, p. 11–17, 2008.

DEL ROSSO, J.Q.; ZELLIS, S. GUPTA A. K. Itraconazole in the treatment of superficial cutaneous and mucosal *Candida* infections. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 98, p. 497-497, 1998.

DE REPENTIGNY, L.; PHANEUF, M.; MATHIEU, L.G. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4907-4914, 1992.

DIEKEMA, D.J.; BEEKMANN, S.E.; CHAPIN, K.C.; MOREL, K.A.; MUNSON, E.; DOERN, G.V. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3655–3660, 2003.

DIMOPOULOS, G.; KARABINIS, A.; SAMONIS, G.; FALAGAS, M.E. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p.377-384, 2007.

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

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

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍCKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUML, T.; PICHOVÁ, I.; HEIDINGSFELDOVÁ, O.H. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712–716, 2003.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F.M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, v.416, p. 740-743, 2002.

DUNN L.L.; RAHMANTO, Y.S. RICHARDSON, R. Iron uptake and metabolism in the new Millennium. **TRENDS in Cell Biology**, v.17, p.93-100, 2007.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; MCCLISH, D.K.; PHALLER, M.A.; JONES R.N.; WENZEL, R.P.; Nosocomial bloodstream infections in United State hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 239-244, 1999.

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

ERNST, J.F. Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. **Contributions to Microbiology**, v. 5, p.98–111, 2000.

FALLON, K.; BAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E; TAMBURINI, P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 551-556, 1997.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAUER, M.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W. HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3689–3700, 2002.

FIDEL J.R, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 80–96, 1999.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*, **Mycoses**, v.48, p. 62-67, 2003.

FRIDKIN, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 1455–1460, 2005.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 66, p. 209-217, 2008.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122–143, 2000.

GILFILLAN, G. D.; SULLIVAN, D. J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D. C.; GOW, N.A. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v.144, p. 829-838, 1998.

GIRMÊNIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNARDIS, F.; GENTILE, G.; BOCCANERA, M.; MONACO, M.; ANTONUCCI, G.; CASSONE, A. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patientes with hematologic malignances: clinical aspects,

predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. **Clinical Infectious Diseases**, v.23, p. 506-514, 1996.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p.265-269, 2007.

GOLDMAN, D. L.; FRIES, B.C.; FRANZOT, S.P.; MONTELLA, L.; CASADEVAL, A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 14967–14972, 1998.

GUERRERO, A.; FRIES, B.C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. **Infection and Immunity**, v.76, p. 4322–4331 2008.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy **Cancer**, v.112, p. 2493-99, 2008.

HAJJEN, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519–1527, 2004.

HAMMACOTT J.E. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. **Microbiology**, v. 146 p.869–876, 2000.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 591-595, 2001.

HEYMANN, P.; GERADS, M.; SCHALLER, M.; DROMER, F.; WINKELMANN, G.; ERNST J.F. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5246–5255, 2002.

HINRICHSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p.394-398, 2008.

HNISZ, D.; SCHWARZMÜLLER, T.; KUHLER, K. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white–opaque switching in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06772.x, 2009.

HOWARD, D.H. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 394-404, 1999.

HU, C.J. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 30598–30605, 2002.

HUANG, G.; SRIKANTHA, T.; SAHNI, N.; YI, S.; SOLL, D.R. CO<sub>2</sub> regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. **Current Biology**, v.19, p.330-334, 2009.

HUBE, B.; MONOD, M.; SCHOFIELD, D. A.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, 14, 87–99, 1994.

HUBE, B.; SANGLARD, D.; ODDS, F.C.; HESS, D.; MONOD, M.; SCHAFER, W., BROWN, A.J.; GOW, N.A. Disruption of each of the secreted aspartic proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. **Infection and Immunity**, v.65, p.3529-3538, 1997.

HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Revista Ibero-Americana de Micologia**, v.15, p. 68- 71, 1998.

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

KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of humoral

host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 984-988, 1995.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p. 160-165, 2002.

KNIGHT, S.A. Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. **Microbiology**, v.148, p. 29–40, 2002.

KOBAYASHI, G.S; CUTLER, J.E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? **Trends in Microbiology**. v.6, p.92-94, 1998.

KOLOTLA, M. P.; DIAMOND, R. D. Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1174-1179, 1990.

KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T.; SANGLARD, D.; MERKER, R; SCHRODER, M.; HOF, H; NICHTERLEIN, T. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infection and Immunity**, v.67, p. 6637-6642, 1999.

KRETSCHMAR, M.; FELK, A.; STAIB, P.; SCHALLER, M.; HESS, D.; CALLAPINA, M.; MORSCHHAUSER, J.; SCHAFER, W.; KORTING, H.C.; HOF, H.; HUBE, B.; NICHTERLEIN, T. Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1–6 of *Candida*

*albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 32, p.61–70, 2002.

KUGLER, S.; SCHURTZ-SEBGHATI, T; EISSENBERG L.G.; GOLDMAN, W.E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 8794– 8798 2000.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v.70, p.878-888, 2002.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; JYTSONA, C.; HAJJEH, R.A.; WARNOCK, D.R.S.; GHANNOUM, M.A. *Candida parapsilosis* characterization in a outbreak setting. **Past Issue**, v.10, p. 1074- 1081, 2004.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v 5, p.608– 611, 2002.

KUMAR, C.P.G, KUMAR, S.S.J; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v.161, p.213-218, 2006.

KVAAL, C.A; SRIKANTHA, T.; SOLL, D.R. Misexpression of the white-phasespecific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4468–4475, 1997.

KVAAL, C.A.; LACHKE, S.A.; SRIKANTHA, T, DANIELS, K.; MCCOY, J. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6652–6662,1999.

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

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

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

LAN, C. Y.; NEWPORT, G.; MURILLO, L.A.; JONES, T.J.; SCHERER, S.; DAVIS, R. W.; AGABIAN, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 14907– 14912, 2002.

LAN, C.Y; RODARTE, G.; MURILLO, L.A.; JONES, T.; DAVIS, R.W. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1451-1469, 2004.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.M.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3249–3254, 1992.

LIN, D.M.; WU, L.C.; RINALDI, M.G.; LEHMANN, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.1815–1821, 1995.

LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. **Current Biology**, v.15, p. 453-455, 2005.

LOTT, T.J.; KUYKENDALL, R.J.; WELBEL, S.F.; PRAMANIK, A.; LASKER, B.A. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v.23, p. 463-467, 1993.

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

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; CHEUNG, B.P.K.; TANG, G.; Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, p. 283-290, 2004.

MAH, T.F.C. O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, p.34–39, 2001.

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

MARESCA, B.; CARRATU, L.; KOBAYASHI, G.S. Morphological transition in the human fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Trends in Microbiology**, v. 2, p.110–114, 1994.

MARR, K.A.; SEIDEL, K.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A. Candidemia in allogenic blood

and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 309-316, 1999.

MAVOR, A.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process, and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v.6, p. 863–874, 2005.

MELO, N.R.; TAGUCHI, H.; CULHARI, V.P.; KAMEI, K.; MIKAMI, Y.; SMITH, S.N.; VILELA, M.S. Oral candidiasis of HIV-infected children undergoing sequential HIV therapies. **Medical Mycology**, v. 47, p.149-156, 2009.

MILLER, M.G.; JOHNSON, A.D. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, v. 110, p. 293–302, 2002.

MILLER, N.S.; DICK, J.D.; MERZ, W. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1536–1539, 2006.

MITCHELL, A.P. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 687–692, 1998.

MONOD, M.; HUBE, B.; HESS, D.; SANGLARD, D. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 144, p. 2731–2737, 1998.

MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; SANGLARD, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357–368, 1994.

MORRELL, M., FRASER, V.J., KOLLEF M.H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3640–3645, 2005.

MORROW, B.; SRIKANTHA, T.; SOLL, D.R. Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, p. 2997–3005, 1992.

MOYE-ROWLEY, W.S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: Similarities and differences **Eucaryotic Cell**, v.2, p. 381-389, 2003.

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

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.R.; RODGERS, C.A.; WOODMAN, A.J.; CHALLACOMBE, S.J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, p.3266–3280, 2008.

NAVARRO-GARCIA, F.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; PLA, J. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p.245–268, 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p. 77-82, 2007.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, p.2–5, 1994.

ODDS, F. C. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. **Mycoses**, v.40, p.9–12, 1997.

OKZUS, S.; SAHIN, I.; MUSTAFA, Y.; GULCAN, A.; YANUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.P. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Journal of Infections Diseases**, v. 60, p. 280-283, 2007.

OLAECHEA, P. M.; PALOMAR, M.; LEON-GIL, C.; ALVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; OLLA-SALAS, J.; LEON-REGIDOR, M.A.; EPCAN Study Group . Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p.323–30, 2004.

PATTON, L.L. HIV disease. **Dental Clinics of North America**, v. 47, p. 467–492, 2003.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; FOR THE NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 634-643, 2003.

PAYNE, S.M. Iron acquisition in microbial pathogens. **Trends in Microbiology**, v.1, p.66-69, 1993.

PENDRAK, M. L. Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.3426–3433, 2004.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D.J.; International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 11–23, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; RINALDI, M.G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D.L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK GLOBAL antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5848–5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.;

DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 760–763, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NG, K.P.; COLOMBO, A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 842-849, 2008.

PICHOVA, I.; PAVLICKOVA, L.; DOSTAL, J.; DOLEJSI, E.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O.; WEBER, J.; RUMML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v.268, p.2669-2677, 2001.

PITTET, D.; WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 1177–1184, 1995.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; BACHMANN, S.P.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, p. 3634-3636, 2002.

RAMÍREZ-ZAVALA, B.; REUB, O.; PARK, Y.N.; OHLSEN, K.; MORSCHHÄUSER, J. Environmental induction of white–opaque switching in *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 4 p. 1-14, 2008.

RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, p. 881-941, 2000.

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

RICHTER, S.S.; GALASK, R.P.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p.2155-2162, 2005.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.

ROY, B.; MEYER, S.A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.216–218, 1998.

SANGLARD, D.; HUBE, B.; MONOD, M.; ODDS, F. C.; GOW, N.A. A triple deletion of the secreted aspartic proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. **Infection and Immunity**, v.65, p. 3539-3546, 1997.

SANTOS, R.; BUISSON, N.; KNIGHT, S.; DANCIS, A.; CAMADRO, J.M.; LESUISSE, E. Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. **Microbiology**, v.149, p.579–588, 2003.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.; HUBE, B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 169- 180, 1999.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C., BORELLI, C., HAMM, G.; HUBE, B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, p. 2758–2765, v. 73, 2005.

SHIN, J.H., F.S. NOLTE, C.J. MORRISON. Rapid identification of *Candida* species in blood culture by a clinically useful polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1454–1459, 1997.

SHIN, J.H.; KEE, S.J, SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S. K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.1244–1248, 2002.

SHORR, A.F.; TABAK, Y.P.; JOHANNES, R.S.; SUN, X.; SPALDING, J. KOLLEF, M. H. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v.13, doi:10.1186/cc8110, 2009.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition **Medical Mycology**, v. 47, p. 681–689, 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., STAEBELL M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D. R. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p.189-197, 1987.

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

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

SOLL, D.R. Switching and its possible role in *Candida* pathogenesis. **New Fungal Strategies**, v. 5; p. 156- 172, 1992.

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

SONNEBORN, A.; TEBARTH, B.; ERNST, J.F. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4655-4660, 1999.

SRIKANTHA, T.; SOLL, D.R. A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. **Gene**, v. 131, p.53-60, 1993.

SRIKANTHA, T.; ZHAO, R.; DANIELS, K.; RADKE, J.; SOLL, D.R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. **Eukaryotic Cell**, v.4, p. 1434–1445, 2005.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 97, p. 6102–6107, 2000.

STAIB, P.; LERMANN, U.; WARMUTH, J. B.; DEGEL, B.; WÜRZNER, R.; MONOD, M; SCHIRMEISTER, T. MORSCHHÄUSER, J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 146–156 2008.

SWEET, S.P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Diseases**, v. 3, p.88–95, 1997.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*SAP1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726–4734, 2004.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.; GHELARDI E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1455–1462, 2007.

TIMM, J.; POST, F.A.; BEKKER, L.G.; WALTHER, G.B.; WAIN-WRIGHT, H.C.; MANGANELLI, R. Differential expression of iron, carbon and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 14321-14326, 2003.

TRICK, W.E.; FRIDKIN, S.K.; EDWARDS, J.R.; HAJJEN, R.A.; GAYNES, R.P.; Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical and Infectious Diseases**, v.35, p.627-630, 2002.

TOGNI, G.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: virulence in mice of a proteinase negative mutant. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.32, p. 257-265, 1994.

VAN ASBECK, E.C.; HUANG, Y.C.; MARKHAM, A.N.; CLEMONS, K.; DAVID, A. Stevens *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v.164, p.287–293, 2007.

VARGAS, K.; WERTZ, P.W.; DRAKE, D.; MORROW, B.; SOLL, D.R. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153<sup>a</sup> cells exhibiting switch phenotypes of buccal epithelium and stratum corneum. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1328–1335, 1994.

VARGAS, K. MESSER, S. A.; PFALLER, M.; LOCKHART, S. A.; STAPLETON, J. T.; HELLSTEIN, J.; SOLL, D.R. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3595-3607, 2000.

VEER, P.; PATWARDHAN, N.S.; DAMLE, A.S. Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 53–6, 2007.

WATANABE, T.H.; TANAKA, N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350-353, 1997.

WATANABE, T.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M. AND MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, p. 689-694, 1999.

WEISSMAN Z., KORNITZER, D.A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, p.1209–1220, 2004.

WEINBERG, E.D. Iron loading and disease surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p. 346-352, 1999a.

WEINBERG, E.D. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 46, p. 231-238, 1999b.

WENZEL, R.P. Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.1531–1534,1995.

WILLIAMS, D. M.; KRICK, J. A. REMINGTON. J.S. Pulmonary infection in the compromised host. **American Review of Respiratory Disease**, v.114, p.359–394, 1976.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients, **Clinical and Infectious Diseases**, v. 20, p. 115-125, 1995.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p.272-276, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309–17, 2004.

ZAUGG, C.; ZEPELIN, M.B.V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v.69, p. 405–412, 2001.

ZORDAN, R.E; MILLER, M.G.; GALGOCZY, D.J.; TUCH, B.B.; Johnson, A.D. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching *in Candida albicans*. **Plos Biology**, v. 5, p. 2166- 2176, 2007.

**PARTE I****HEMOLYTIC AND PROTEINASE ACTIVITIES IN CLINICAL ISOLATES OF  
*CANDIDA PARAPSILOSIS* AND *CANDIDA TROPICALIS* WITH REFERENCE TO  
THE ISOLATION ANATOMIC SITE**

## HEMOLYTIC AND PROTEINASE ACTIVITIES IN CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* AND *CANDIDA TROPICALIS* WITH REFERENCE TO THE ISOLATION ANATOMIC SITE

### Summary

The aim of the present study was to determine *in vitro* hemolytic and protease activities of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates, obtained from anatomically distinct sites. Analysis of hemolytic activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. tropicalis* isolates from blood had statistically higher activity ( $P < 0.05$ ) than *C. parapsilosis*. When compared hemolytic activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity than blood isolates. Protease activity was detected in the majority of the isolates analyzed. Analysis of proteinase activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had statistically higher activity than *C. tropicalis* isolates. When compared proteinase activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity than blood and superficial lesions isolates. Furthermore, *C. tropicalis* isolates from superficial lesions had higher activity than tracheal secretion isolates. Our results show the potential of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates, obtained from distinct anatomic sites, to produce hemolytic factor and proteinases. Anatomic sites of isolation seem to be correlated with these activities, particularly for *C. parapsilosis* isolates.

**Keywords:** Non-*albicans Candida*. Hemolytic factor. Proteinase. Anatomic sites

### Introduction

The frequency of *Candida* infections has increased in recent years and it has been accompanied by a significant rise in morbidity and mortality. *Candida albicans* is classified as the major human pathogen in the genus *Candida*. However, other species of this genus have been found to cause an increasing number of candidiasis [1-4].

According to recent surveys, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* are among the commonest species of *Candida* responsible for nosocomial blood infection worldwide [2, 5-8]. *C. parapsilosis* is also associated with nail and skin infections, such that *C. parapsilosis* is emerging as an important cause of onychomycosis [9-11].

*C. albicans* expresses many virulence factors that are important in its adaptation to specific anatomical sites (reviewed in [12]). Non-*albicans* species seem

to share common virulence determinants with *Candida albicans* but also have a distinct repertoire of specific virulence traits [13]. Hemolytic activity is known to be putative virulence factor contributing to disseminated candidal pathogenesis, particularly facilitating hyphal invasion [14]. Manns *et al.* [15] were the first to describe that *Candida* exhibits a hemolytic activity when grown on glucose-enriched blood agar. According to these authors, the hemolytic factor allows *C. albicans* to acquire iron from host erythrocytes. The capability of non-*albicans* *Candida* species to produce hemolytic factor has also been reported [16, 17].

In contrast to few reports available on the hemolytic activity of *Candida* there have been a number of detailed studies on secreted aspartic proteinases (Saps), the most discussed virulence determinant of *C. albicans* (reviewed in [18]). Most of clinical isolates of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are proteinase producers [19-22]. As well as for *C. albicans*, the relationship between the production of Saps and invasiveness has been established for *C. tropicalis*. Proteinases were observed on the surface of fungal elements penetrating tissues during disseminated infection and evading macrophages after phagocytosis of yeast cells [23, 24].

The present study investigated *in vitro* hemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* obtained from distinct anatomic sites and a possible correlation between activities and site of fungal isolation.

## **Materials and Methods**

### ***Candida* isolates and identification**

Thirty-four *C. parapsilosis* and fourteen *C. tropicalis* isolates recovered from clinical specimens of different patients of the Hospital Universitário de Londrina (HU) between 2005 and 2007 and maintained in our laboratory stock collection were included in this study. Isolates were identified by PCR and carried out using genomic DNA obtained as described by Furlaneto-Maia *et al.* [25] and species-specific forward primers for *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* designed from the internal transcribed spacer regions (ITS2) as described by Li *et al.* [26]. Identity of *C. parapsilosis* (formely *C. parapsilosis* group I) isolates was confirmed by the

employment of primers for *URA3* gene (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) as described by Tavanti *et al.* [27]. For the optimum PCR conditions, a reaction volume of 20  $\mu$ l contained 100  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM magnesium chloride, 10 pmol of each primer, 10% of the reaction volume of 10x Taq buffer, 0.5 U of Taq polymerase (INVITROGEN) and 10 ng of DNA template. Negative controls were performed with sterile deionised water in place of the template DNA. Reaction mixtures were subjected to an initial denaturing cycle of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min (denaturation), 60°C for 1 min (annealing) and 72°C for 1 min (elongation). For amplification of *URA3* gene the PCR conditions were the same as described above, except the annealing temperature (51°C). The sizes of amplified DNA fragments were identified by comparison with molecular size marker DNA (100 bp DNA ladder). The origin and distribution of these isolates is shown in Table 1.

**Table 1** – Distribution of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates according to their anatomic sites of isolation

	<b>Candida parapsilosis</b>	<b>Candida tropicalis</b>
	n	n
Clinical specimens		
Blood	7	3
Tracheal secretion	20	6
Nail/Skin	5/2	5/0
Total	34	14

### Hemolytic activity

Hemolytic activity was evaluated using a modification of the plate assay described by Luo *et al.* [16]. Isolates were precultured in Sabouraud dextrose agar and incubated at 37°C for 18 h. The resultant cultures were harvested and washed with sterile water and a yeast suspension was prepared using

haemocytometric counts. A 2  $\mu\text{l}$  ( $2.0 \times 10^5$  cells) amount of this suspension was spot-inoculated on differential medium that was prepared by adding either 7 ml of fresh sheep blood or 3 ml sheep erythrocytes to 100 ml of Sabouraud dextrose agar. For erythrocytes preparation a volume of 7 ml of fresh sheep blood cells were centrifuged at  $1080 \times g$  for 7 min. The supernatant and buffy coat were removed, and the packed erythrocytes were further suspended in 3 ml of sterile PBS ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free). The plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h. The presence of a translucent or a greenish halo circumscribing the inoculum site, viewed with the aid of a white light transilluminator (UVP Bio Imaging Systems Dig Doc - It<sup>®</sup>; UPV, Inc, California, USA), indicated a positive hemolytic activity. The millimetric halo measurements were evaluated as (+) for weak activity (a halo zone of 1.5-2.7 mm around the colony), (++) for mild activity (a halo zone of 2.8-5.3 mm around the colony), and (+++) for strong activity (a halo zone  $> 5.3$  mm around the colony). The experiment was repeated three times, and the results represent mean values  $\pm$  SD.

### **Extracellular acid-proteinase production**

Isolates were precultured in *Candida*- BSA broth medium (1% yeast extract, 0.02%  $\text{MgSO}_4$ , 0.25%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5% NaCl, 0.2% bovine serum albumin), pH 5.0 for 18 h at  $37^\circ\text{C}$ . From this culture, a 2  $\mu\text{l}$  sample ( $2.0 \times 10^5$  cells) was put on a sterile paper disk (6 mm diameter) placed on the surface of *Candida*- BSA agar medium, pH 4.5. The inoculated plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 6 days. The plates were observed for an increasing opacity around the disks caused by the growing fungi. Clearing of the opacity by hydrolysis of precipitated albumin was affected by acid proteinase of the fungi. Proteinase activity was determined as described by Dagdeviren *et al.* [21], with modifications. The millimetric zone measurements were evaluated as (+) for weak activity (a lysis zone of 1.1 mm around the disk), (++) for mild activity (a lysis zone 1.2-3.3 mm around the disk), and (+++) for strong activity (a lysis zone  $> 3.3$  mm around the disk).

### **Statistical analysis**

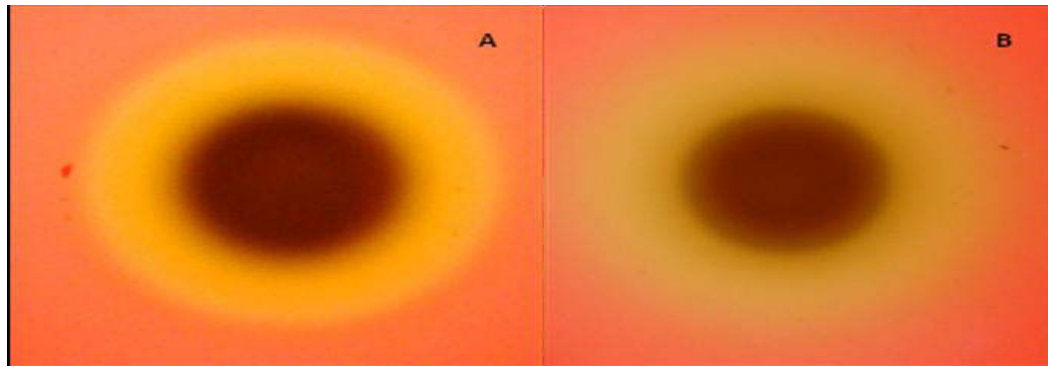
Hemolytic activities in different culture conditions were compared by the Tukey test using the statistical program Sisvar. Student's *t*-test was used to

calculate the difference between either hemolytic and proteinase activities of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates using the statistical program BioStat version 5.0. Student's *t*-test was also used to calculate the difference between the hemolytic and proteinase activities of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site. The same statistical test was used to calculate the difference between the hemolytic and proteinase activities of *C. parapsilosis* isolates obtained from the different anatomic sites, and the difference between the hemolytic and proteinase activities of *C. tropicalis* isolates. In all tests  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Hemolytic activity

In order to analyse the production of hemolytic factor by *Candida* isolates, we firstly evaluate the hemolysis profile using a conventional sheep blood enriched medium with comparison to a sheep erythrocytes enriched medium. This previous analysis was carried out with 18 randomly chosen *Candida* isolates in order to define the culture conditions to be used in further experiments. At 48 h post inoculation on blood medium, all *Candida* isolates tested showed a partially diffuse greenish halo, surrounding the inoculum site, while on erythrocytes medium yellowish halo with more perceptible clear-cut zones was observed (Figure 1). Moreover, on blood enriched medium there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the hemolytic activity among isolates. The employment of erythrocytes instead of blood medium reveals differences in hemolytic activity among isolates ( $P < 0.05$ ). Under this culture condition, four isolates (22.5%) showed strong hemolytic activity, whereas the remaining produced either mild or weak activities (data not shown). Thus, erythrocytes enriched Sabouraud-dextrose agar medium was employed in determining the hemolytic activity of *Candida* isolates.



**Figure 1** – Photograph showing the hemolysis on erythrocytes enriched medium (A) and on blood enriched medium (B) induced by *Candida parapsilosis*.

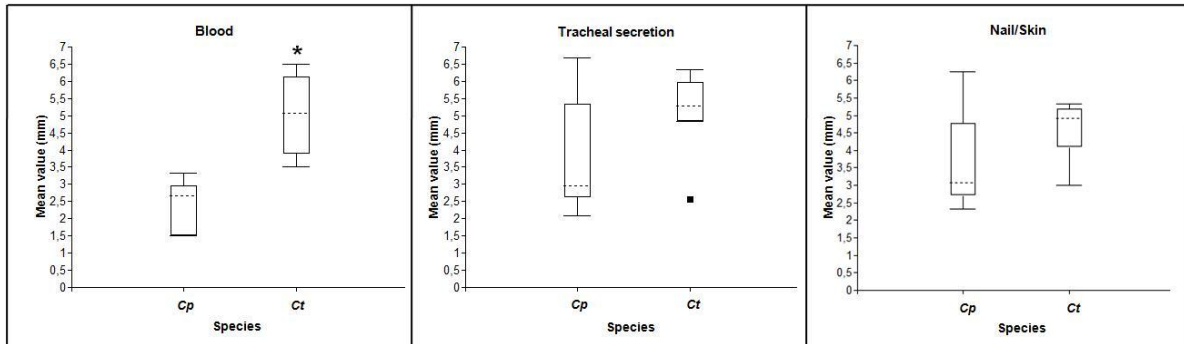
Under this culture conditions, hemolytic activity was observed for all 48 *Candida* isolates tested (Table 2). Overall, the majority of *C. parapsilosis* isolates produced weak activity (+), whereas the majority of *C. tropicalis* produced mild activity (++) (Table 2).

**Table 2** – Comparison of hemolytic and proteinase production of the *Candida* isolates

<i>Candida</i> species (n)	No. of strains (%)							
	Scoring of hemolytic activity			Scoring of proteinase activity				
	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)	
<i>Candida parapsilosis</i> (34)	44.2	32.3	23.5	8.8	3.0	50	38.2	
<i>Candida tropicalis</i> (14)	7.1	64.3	28.6	14.3	28.6	57.1	0	

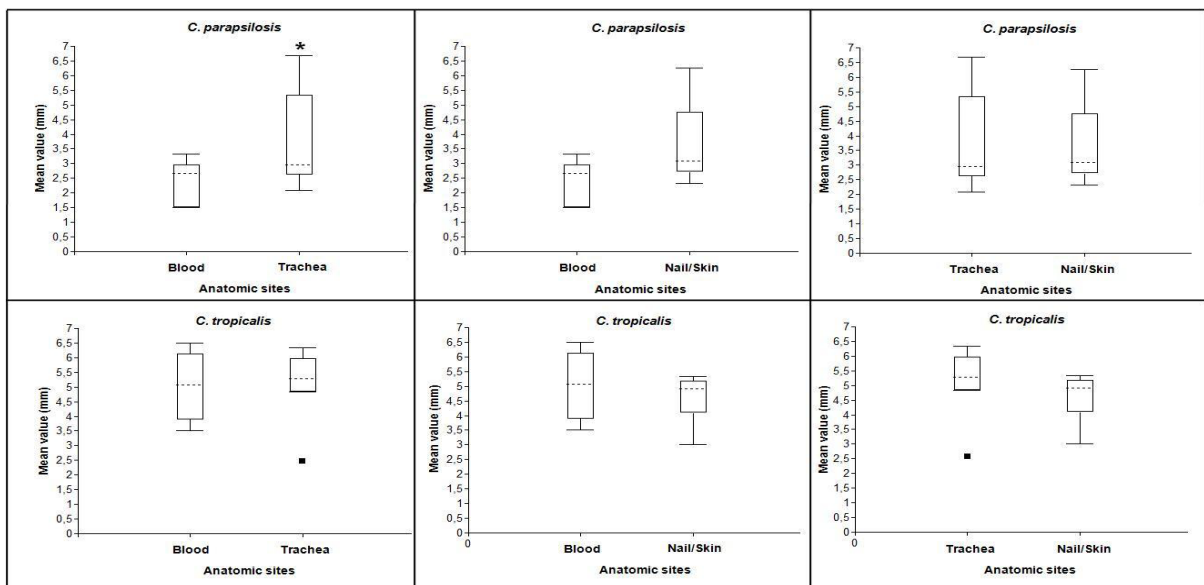
(-) none activity; (+) weak activity; (++) mild activity; (+++) strong activity.

Analysis of hemolytic activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. tropicalis* isolates from blood had statistically higher activity ( $P < 0.05$ ) than that *C. parapsilosis* (Figure 2). No differences were observed between isolates of these species obtained from tracheal secretion and nail/skin (superficial lesions).



**Figure 2** – Hemolytic activity of *Candida parapsilosis* (Cp) and *Candida tropicalis* (Ct) isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions (nail and skin). The results are means of three independent experiments. \* represent a significant difference ( $P < 0.05$ ) according to Student *t* test.

When compared hemolytic activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity ( $P < 0.05$ ) than blood isolates. Furthermore, blood isolates did not differ, as a whole, from nail/skin isolates neither isolates from tracheal secretion and nail/skin (Figure 3). Similarly, no differences were observed on hemolytic activities between *C. tropicalis* isolates from different anatomic sites (Figure 3).



**Figure 3** – Hemolytic activity of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions (nail and skin). The results are means of three independent experiments. \* represent a significant difference ( $P < 0.05$ ) according to Student *t* test.

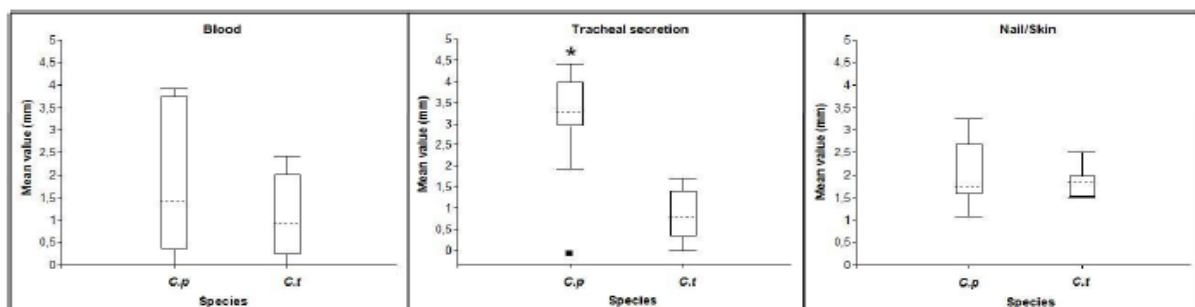
### Secreted acid proteinase activity

Protease activity was revealed as a clearance zone around the colonies on *Candida*-BSA agar medium (Figure 4). Of the 34 isolates of *C. parapsilosis* tested, 31 (91.2%) were protease positive. Among the 14 isolates of *C. tropicalis* tested, 12 isolates (85.7%) produced protease (Table 2). Some 38.2% *C. parapsilosis* isolates produced strong proteinase activity (+++), whereas none *C. tropicalis* isolates showed such high activity.



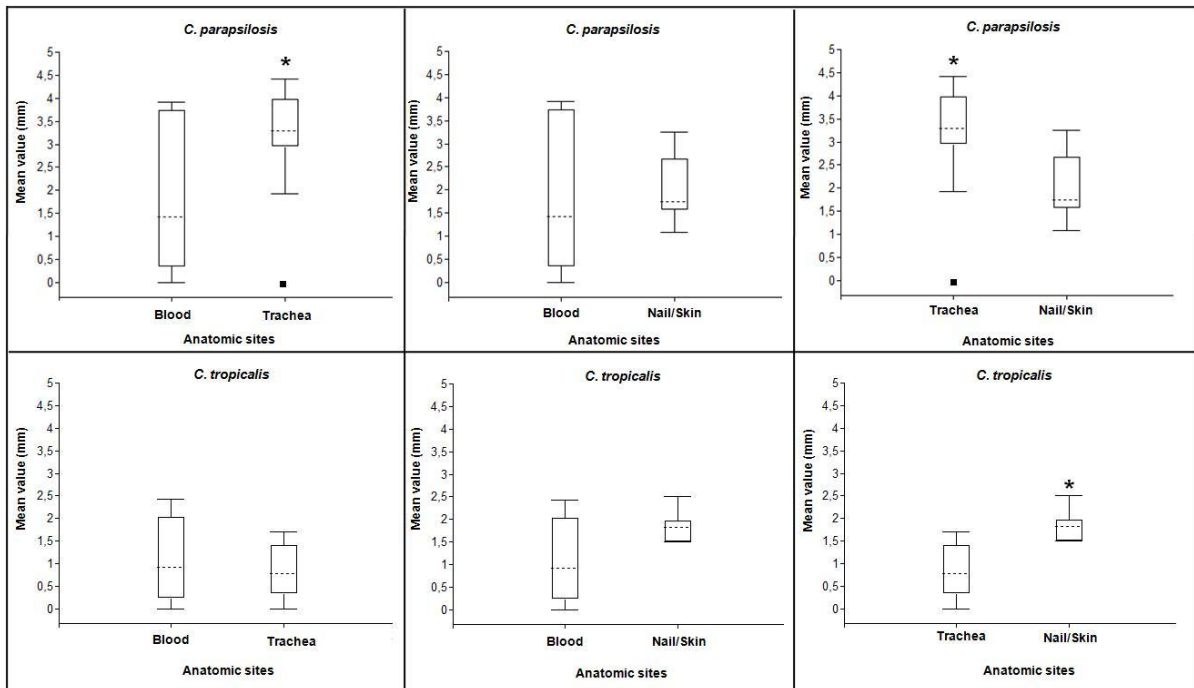
**Figure 4** – Secreted acid proteinase activity of *Candida parapsilosis* showing a clearance zone around the colony on *Candida*-BSA agar medium.

Analysis of proteinase activity of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from the same anatomic site revealed that *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had statistically higher activity ( $P < 0.05$ ) than *C. tropicalis* isolates (Figure 5). No differences were observed between isolates of these species obtained from superficial lesions (nail/skin).



**Figure 5** – Proteinase activity of *Candida parapsilosis* (Cp) and *Candida tropicalis* (Ct) isolates obtained from blood, tracheal secretion and superficial lesions (nail and skin). The results are means of three independent experiments. \* represent a significant difference ( $P < 0.05$ ) according to Student *t* test.

When compared proteinase activities of *Candida* isolates obtained from different anatomic sites, *C. parapsilosis* isolates from tracheal secretion had higher activity ( $P < 0.05$ ) than blood and superficial lesions isolates. In contrast, blood isolates did not differ, as a whole, from superficial lesions isolates (Figure 6). Furthermore, *C. tropicalis* isolates from superficial lesions had higher activity ( $P < 0.05$ ) than tracheal secretion isolates.



**Figure 6** – Proteinase activity of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* isolates obtained from blood, tracheal secretion lesions and superficial lesions (nail and skin). The results are means of three independent experiments. \* represent a significant difference ( $P < 0.05$ ) according to Student *t* test.

## Discussion

The ability of pathogenic organisms to acquire elemental iron has been shown to be of pivotal importance in their survival and ability to establish infection within the mammalian host [28, 29]. It has been demonstrated that the hemolytic factor secreted by *C. albicans* causes the release of hemoglobin [30] which was further characterized as a mannoprotein that promotes the disruption of human erythrocytes by binding to their band 3 protein [31]. According to these authors, although systemic hemolysis may not be caused by the mannoprotein, hemolysis around infected sites may enhance the fungal growth.

In this study, the employment of erythrocytes instead of blood-enriched medium resulted in a more reliable measurement of the halo around the inoculum site. Under this culture conditions, all *Candida* isolates tested showed hemolytic activity. Luo *et al.* [16] found that 100% of *C. tropicalis* isolates produced hemolytic factor, while *C. parapsilosis* failed to demonstrate any hemolytic activity.

In the present study we describe for the first time a correlation between hemolytic activity and source of *Candida* isolates. For *C. parapsilosis* the source of isolates seems to be correlated with the ability to produce hemolytic activity since isolates recovered from tracheal secretion had higher activity than blood isolates, but did not differ of nail/skin isolates. This feature was not observed for *C. tropicalis* isolates.

The occurrence of Saps has been previously demonstrated in *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates obtained from distinct clinical samples [19-22]. However, this is the first report that correlates protease production by isolates of different species obtained from the same anatomic site. Considering isolates recovered from tracheal secretion the *C. parapsilosis* isolates had higher activity than *C. tropicalis* isolates.

Our data also revealed that *C. parapsilosis* isolates obtained from tracheal secretion had higher activity than blood and superficial lesions isolates (Figure 6). According to De Bernardis *et al.* [19] the potential of *C. parapsilosis* to cause mucosal disease is associated with secreted aspartic proteinase production and is substantially distinct from that of systemic invasion. These hypothesis is reinforced by the fact that the ability of *C. albicans* to adhere to mucosae and to evade tissues apparently requires the use of several distinct proteinases suitable to each particular condition during the infection [32, 33].

Although *C. parapsilosis* is an important cause of nail infections, in this study the production of Saps by isolates obtained from nail and skin was less expressive compared to isolates obtained from the others anatomic sites. This data may suggest that acid proteinases may not have a major role in the development of nail infections.

Our results show the potential of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates, obtained from distinct anatomic sites, to produce hemolytic factor and proteinases, in a distinct manner. Further studies should be undertaken in order to

answer whether these traits contribute to the fungal pathogenesis at different anatomic sites.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)–Brazil, Fundação Araucária – Paraná–Brazil and PROPPG/UEL-Brazil. E.J.G.F. and D.F. are fellowship-holder of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) –Brazil.

## REFERENCES

1. Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O, Ozlu N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses* 2007; **50**: 52-57.
2. Caggiano G, Iatta R, Laneve A, Manca F, Montagna MT. Observational study on candidemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. *Mycoses* 2008; **51**: 123-8.
3. Malafiej E, Adamiec AC, Tworzyanska U. Microbial profile and drug resistance of *Candida* strains isolated from the blood of children: an 11-year study. *Mycoses* 2009; **52**: 149-53.
4. Ahmad A, Khan AU. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; **144**: 68-71.
5. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J *et al.* Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1681-5.
6. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centres. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2816-23.
7. Nucci C, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **58**: 77-82.
8. Anunnatsiri S, Chetchotisakd P, Mootsikapun P. Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review. *Int J Infect Dis* 2009; **13**: 90-6.
9. Brilhante RSN, Cordeiro RA, Medrano DJA, Rocha, MFG, Monteiro AJ, Cavalcante CSP, Meireles TEF, Sidrim JJC. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**:131-5.
10. Martins EA, Guerrer LV, Cunha KC, Soares, MMC, Almeida MTG. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. *Rev Socied Bras Med Trop* 2007; **40**: 596-8.
11. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Palacios-Morales Y, Córdova-Martínez E, Bazán-Mora E, *et al.* Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. *Mycopathologia* 2008; **166**: 41-5.
12. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 327-35.
13. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 591-6.

14. Odds FC. *Candida* and candidosis, 2nd Edition, Bailliere Tindall, London UK, 1988.
15. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; **62**: 5154-6.
16. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2971-4.
17. Yigit N, Aktas E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *J Mycol Med* 2009; **19**: 110-5.
18. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; **48**: 365-77.
19. De Bernardis F, Mondello F, San Millàn R, Ponón J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 3481-86.
20. Kantarcioglu AS, Yücel A. phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses* 2002; **45**: 160-5.
21. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. *Mycoses* 2005; **48**: 321-6.
22. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 2006; **161**: 213-8.
23. Borg M, Ruchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp during experimental infection of oral tracheal secretion. *Infect Immun* 1988; **56**: 626-31.
24. Ruchel R, Zimmermann F, Boning-Stutzer B, Helmchen U. Candidiasis visualized by proteinase-directed immunofluorescence. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; **419**: 199-202.
25. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 2008; **166**: 209-17.
26. Li YL, Leaw SN, Chen J H, Chang HC, Chang TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22**: 693-6.
27. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284-92.
28. Bullen J. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981; **3**: 1127-38.

29. Weinberg ED. Iron and infection. *Microbiol Rev* 1978; **42**: 45-66.
30. Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **232**: 350-3.
31. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N *et al.* Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; **145**: 689-94.
32. Schaller M, Schafer W, Korting HC, Hube B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 1998; **29**: 605-15.
33. Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 1999; **34**: 169-80.

**PARTE II**

**SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA TROPICALIS***

## SWITCHING FENOTÍPICO EM *CANDIDA TROPICALIS*

### Resumo

*Switching* fenotípico é um mecanismo reversível capaz de originar variantes em uma população clonal, os quais podem diferir quanto à expressão de diversos genes. Neste estudo, foi descrito um novo sistema de *switching* em *C. tropicalis* e os morfotipos obtidos foram avaliados quanto à organização microestrutural das colônias e quanto ao potencial de produção de biofilme. Foram identificados quatro morfotipos, denominados “liso”, “côncavo”, “anel” e “rugoso”, em frequências de *switching* variando de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$ . Foi verificado que colônias dos variantes “anel” e “rugoso” são estruturalmente mais complexas que as dos demais morfotipos e apresentam cavidades nas quais é verificada presença de matriz. No variante “anel” foi observado aumento na quantidade de matriz em função do tempo de formação da colônia. A produção de biofilme pelo fenótipo parental foi menor que a dos variantes. Foi constatado ainda que o biofilme formado pelo fenótipo parental é composto predominantemente por células blastoconidiais, enquanto o produzido pelos variantes possui ampla proporção de hifas e pseudo-hifas.

**Palavras-chave:** *Switching* fenotípico. *Candida tropicalis*. Morfotipos. Biofilme.

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida tropicalis* está entre espécies mais freqüentemente isoladas do gênero *Candida* (MAROL; YÜCESOY, 2008; LEROY *et al.*, 2009). A colonização por esta espécie é amplamente associada ao desenvolvimento de infecções invasivas, principalmente em pacientes portadores de doenças hematológicas e câncer (KONTOYIANNIS *et al.*, 2001). A maioria destas infecções é originada endogenamente, a partir da microbiota do paciente, provocando altos índices de mortalidade (WALSH *et al.*, 1986; VISCOLI *et al.*, 1999; MARR *et al.*, 1999; LEUNG *et al.*, 2002).

*Switching* fenotípico tem sido observado em microrganismos eucariotos e procariotos, permitindo a realização de uma rápida microevolução, a qual pode proporcionar melhor adaptação do microrganismo ao ambiente (revisado por JAIN *et al.*, 2008). Este mecanismo gera variantes em uma população clonal, os quais podem diferir quanto à expressão de determinantes de virulência e, portanto, quanto à patogenicidade, proporcionando assim maior flexibilidade e melhor adaptação do organismo às condições hostis do hospedeiro (MORROW *et al.*, 1992; VARGAS *et al.*, 2000; ANTONY *et al.*, 2007).

Em *Candida albicans*, o *switching* fenotípico foi descrito pela primeira vez há mais de 20 anos (SLUTSKY *et al.*, 1987), e atualmente a maioria dos estudos concentra-se no sistema *white-opaque* desta espécie. Apesar da importância clínica e virulência de *C. tropicalis*, até o momento apenas um estudo abordou a ocorrência de *switching* fenotípico nesta espécie (SOLL *et al.*, 1988). No referido estudo foi relatado mais de um repertório de *switching*, os quais ocorreram em alta freqüência, no entanto, não foram relatados demais aspectos fisiológicos acerca deste fenômeno.

No presente trabalho foi descrito um novo sistema de *switching* em *C. tropicalis*, sendo analisada a organização microestrutural das colônias morfologicamente distintas. Também foi avaliado o potencial dos diferentes morfotipos do isolado quanto à produção de biofilme.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foi utilizado o isolado clínico 49.07 de *Candida tropicalis*, o qual foi obtido de secreção traqueal de paciente internado no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Este isolado faz parte da coleção de leveduras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina e sua identificação foi realizada utilizando o meio cromogênico CHROMagar® *Candida* e confirmada por PCR, conforme Furlaneto-Maia e colaboradores (2008).

### 2.2 METODOLOGIA

#### 2.2.1 Análise da Ocorrência de *Switching* Fenotípico

A verificação da frequência de *switching* fenotípico no isolado de *C. tropicalis* foi realizada conforme Brockert e colaboradores (2003), com modificações. Células de colônia cultivada por 96 h, exibindo fenótipo parental “liso”, foram inoculadas em 3 mL de meio YPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose) e cultivadas a 28°C, por 15 h, sob agitação. Partindo desta cultura, foram realizados mais dois cultivos consecutivos nas mesmas condições, para a sincronização do crescimento celular. A cultura resultante foi diluída e homogeneamente distribuída em meio YPD ágar a uma densidade de aproximadamente, 300 colônias por placa de petri de 90mm de diâmetro. As placas foram incubadas a 28°C por 96 h e a proporção de colônias exibindo fenótipos diferentes foi computada.

Para determinar as taxas de reversão (conversão parcial das UFCs para o fenótipo parental) e interconversibilidade (conversão parcial para outros fenótipos, que não o parental) dos morfotipos obtidos, células de colônias de quatro dias, visualmente homogêneas foram inoculadas separadamente em 3 mL de meio YPD e incubadas a 28°C, por 8 h, sob agitação. As culturas resultantes foram diluídas, homogeneamente distribuídas em meio YPD ágar, e o procedimento anterior foi repetido.

### 2.2.2 Análise da Morfologia Celular

Para verificação da morfologia celular dos morfotipos, colônias de cada fenótipo, de quatro dias de cultivo, foram suspensas em tampão PBS, coradas com solução de cristal violeta 2% (2g de cristal violeta; 20 mL de etanol absoluto; 1g de oxalato de amônio; 80mL de água destilada) e as células foram observadas em microscópio de luz comum (BIOVAL).

### 2.2.3 Determinação da Cinética de Crescimento

Para determinação da cinética de crescimento dos morfotipos, colônias de quatro dias representativas de cada fenótipo foram inoculadas separadamente em 100mL de meio YPD e cultivadas a 28°C, sob agitação (180rpm). Foram retiradas alíquotas das culturas a cada duas horas durante as primeiras 16 horas e em 24, 48 e 60 horas de incubação. Estas alíquotas foram diluídas conforme o tempo de cultivo e 100µL da diluição foram homogeneamente distribuídos em meio YPD solidificado. Após 48 horas de incubação a 28°C foi realizada contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs).

### 2.2.4 Microestrutura e Organização Celular das Colônias

Colônias de cada fenótipo, de quatro dias de cultivo em YPD ágar a 28°C, foram retiradas do meio de cultivo com auxílio de uma lâmina cortante e fixadas com solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 a 4°C, por 18 horas. As colônias fixadas foram imersas em nitrogênio líquido por cerca de 30 segundos e desidratadas por liofilização na potência  $2 \times 10^{-3}$  MPa (Jouan LP3), por 1:30h. Posteriormente, as colônias foram recobertas com uma camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

Colônias exibindo o fenótipo “anel” também foram analisadas quanto à formação da microestrutura em função do tempo. Para isso, colônias de 40, 48, 55 e 64 horas de cultivo a 28°C, foram retiradas do meio com auxílio de uma lâmina cortante e o procedimento anterior foi repetido.

### 2.2.5 Produção de Biofilme

A produção de biofilme *in vitro* dos morfotipos foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Shin e colaboradores (2002), com modificações. Para cada morfotipo, células de colônias de quatro dias foram cultivadas em 5mL de YPD a 28°C, por 8 h, sob agitação (180rpm). Partindo destas culturas, foram preparadas suspensões de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL em meio YPD e 200µL ( $6 \times 10^5$  células) desta suspensão foram inoculados em 32 poços de microplacas de poliestireno. O meio de cultivo foi utilizado como branco. As microplacas foram incubadas estaticamente a 28°C por 30 min, 6, 12 e 24 horas e após este período, o sobrenadante foi gentilmente aspirado e as placas lavadas uma vez por imersão em tampão PBS. Foram adicionados 200µL de tampão PBS a cada poço da microplaca e posteriormente foram realizadas leituras espectrofotométricas a 490 nm (Asys HiTech UVM 340) da massa celular aderida. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em transmitância (%T) com auxílio de uma tabela de conversão (DEAN, 1999) e a seguir subtraídos de 100 (%T-100). Para cada tempo foi considerado o valor médio de %T-100 obtido para cada morfotipo, o qual foi subtraído da %T-100 do branco. A produção de biofilme dos morfotipos foi ranqueada em 1+ (%T de 5-20), 2+ (%T de 20-35), 3+ (%T de 35-50) e 4+ (% T >50). Foram realizadas três repetições deste experimento.

### 2.2.6 Verificação da Estrutura do Biofilme

Cada morfotipo foi cultivado por 15 horas a 28°C, sob agitação. A partir das culturas resultantes foi preparada uma suspensão de  $3 \times 10^6$  células/mL em meio YPD e 1 mL foi inoculado em poços de microplacas de poliestireno contendo fragmentos de cateter urinário de PCV (policloreto de vinila) de 0,5 cm. As microplacas foram incubadas estaticamente por 30 min, 6, 12 e 24 horas. As células não aderentes foram removidas por duas lavagens consecutivas com tampão PBS. O biofilme formado nos cateteres foi fixado com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 15 horas a 4°C. Posteriormente, foi realizada uma lavagem com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 e as amostras foram pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato. O material foi novamente lavado em tampão fosfato, desidratado por série alcoólica de

concentração crescente (etanol 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e absoluto), seco ao ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), recoberto com uma camada de ouro (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observado em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

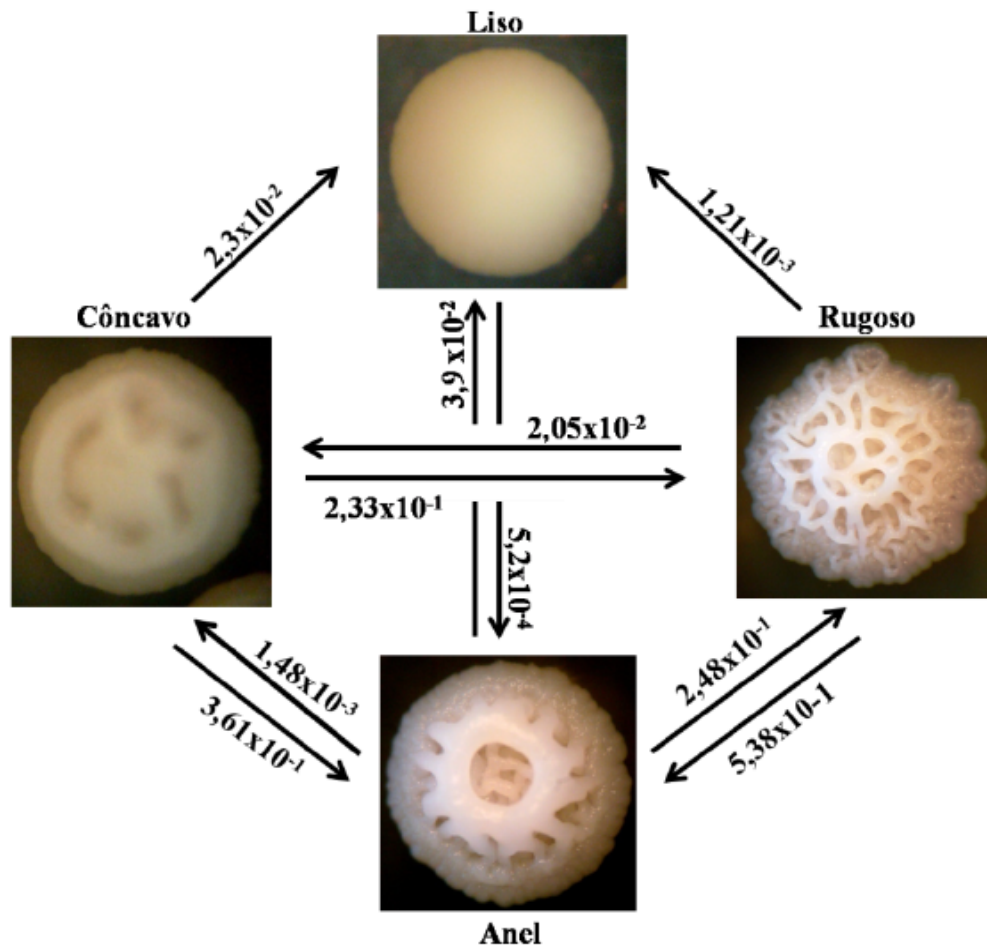
#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DAS COLÔNIAS E ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS DE SWITCHING

Neste estudo, o isolado clínico de *C. tropicalis* (49.07) foi avaliado quanto à ocorrência de *switching* fenotípico. Foram avaliadas cerca de 2100 colônias, sendo identificados quatro morfotipos (Figura 1), os quais diferiram dos descritos por Soll e colaboradores (1988). As frequências de *switching* entre os fenótipos variaram de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$ , sendo superiores às observadas por outros autores para *C. tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida lusitanae* as quais variaram de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  (SOLL *et al.*, 1988; LACHKE *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2006) e inferiores às relatadas para *C. parapsilosis* as quais variaram de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  (LAFFEY; BUTLER, 2005).

O morfotipo parental “liso” apresentou variação para um novo fenótipo, denominado “anel”, na frequência  $5,2 \times 10^{-4}$ . A partir deste variante, colônias de outras duas morfologias, denominadas “rugoso” e “côncavo”, foram encontradas em maiores frequências ( $2,48 \times 10^{-1}$  e  $1,48 \times 10^{-3}$ , respectivamente).

Todos os variantes foram reversíveis e interconvertíveis, concordando com o observado para outras espécies do gênero (LACHKE *et al.*, 2002; BROCKERT *et al.*, 2003; LAFFEY; BUTLER, 2005).

Entre os morfotipos obtidos, o variante “anel” foi o mais estável (71%), enquanto os variantes “rugoso” e “côncavo” apresentaram estabilidades menores (44% e 40%, respectivamente), nas condições testadas. No entanto, o morfotipo parental foi altamente estável (99,95%) e as taxas de reversão de todos os variantes para o parental foram baixas (0,12-3,9%) (Figura 1).



**Figura 1** – *Switching* fenotípico em *Candida tropicalis*. Colônias representativas dos quatro fenótipos observados no isolado 49.07. A frequência de variação entre cada fenótipo está indicada.

As taxas de estabilidade verificadas neste estudo foram menores que as relatadas para outros variantes fenotípicos, de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, as quais foram próximas a 90% (LACHKE *et al.*, 2002; BROCKERT *et al.*, 2003; LAFFEY; BUTLER, 2005).

### 3.2 Análise da Morfologia Celular dos Variantes

Como já mencionado, no sistema de *switching white-opaque* de *C. albicans*, os morfotipos apresentam diferenças acentuadas na morfologia celular. Células de colônias *white* possuem formato arredondado enquanto as de colônias *opaque* são alongadas, cerca de duas vezes maiores, exibem padrões de brotamento particulares, além de apresentarem elevações na parede celular (SLUTSKY *et al.*, 1987; ANDERSON; SOLL, 1987).

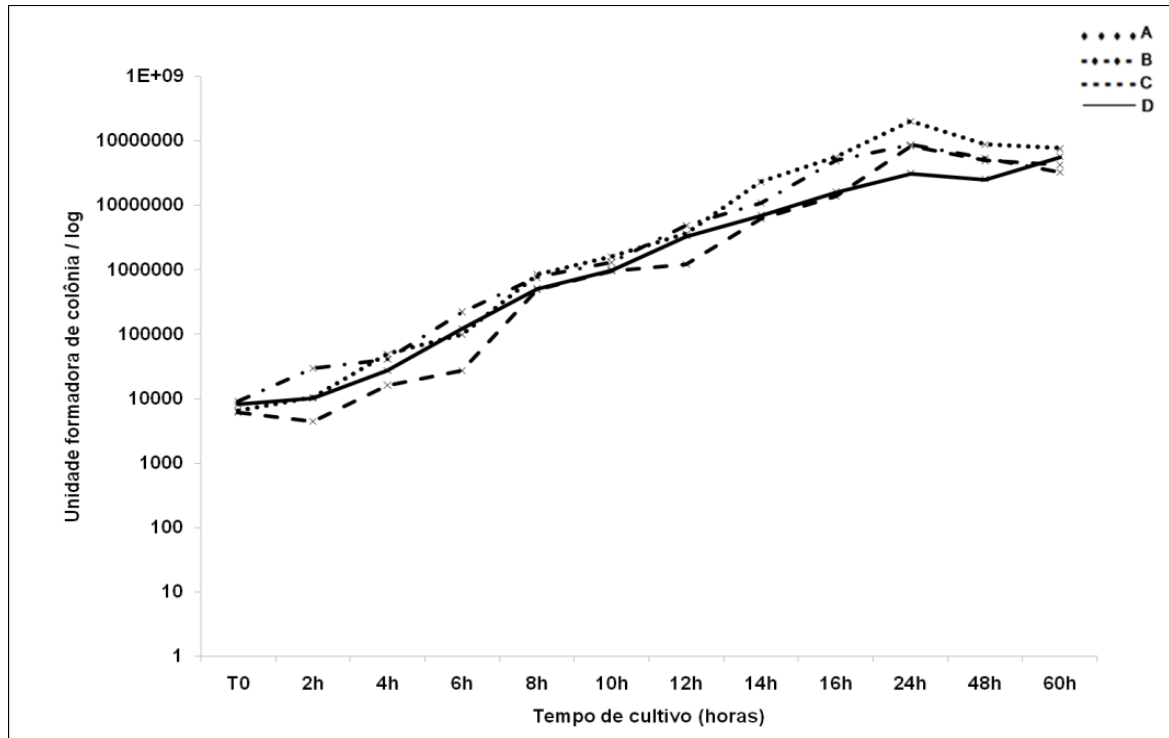
No presente estudo também foram observadas variações na morfologia celular dos diferentes morfotipos obtidos. Colônias dos morfotipos “liso” e “côncavo” possuem predominantemente células blastoconidiais, enquanto os variantes “anel” e “rugoso” apresentam grande proporção de pseudo-hifas.

Resultados semelhantes foram relatados no sistema de *switching* 3153A de *C. albicans*, para o qual foram verificadas que colônias do fenótipo parental são compostas por células blastoconidiais, enquanto nas colônias dos variantes são encontradas hifas e pseudo-hifas (VARGAS *et al.*, 1994). Diferenças na composição celular também foram relatadas para morfotipos de *C. parapsilosis*, nos quais ainda foram verificadas variações na disposição de quitina das células (LAFHEY; BUTLER, 2005). Já em *C. glabrata*, o sistema *core* de *switching* parece não estar correlacionado a alterações no fenótipo das células, já que os morfotipos apresentam a mesma proporção de blastoconídeos, pseudo-hifas e tubos germinativos (LACKHE *et al.*, 2002).

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A comparação da cinética de crescimento dos morfotipos revelou tempos de geração semelhantes para todos os fenótipos, sendo o menor tempo verificado para o tipo parental “liso” (cerca de 2 horas), seguido dos variantes “côncavo” (2:20 horas), “anel” (2:35 horas) e “rugoso” (3 horas) (Figura 2).

Laffey e Butler (2005) também relataram menor tempo de geração para o fenótipo “liso” dentre os morfotipos de *C. parapsilosis*. Além disso, foi demonstrado que o fenótipo parental *white* de *C. albicans* apresenta tempo de geração menor quando comparado ao do variante *opaque* (HUANG *et al.*, 2009).

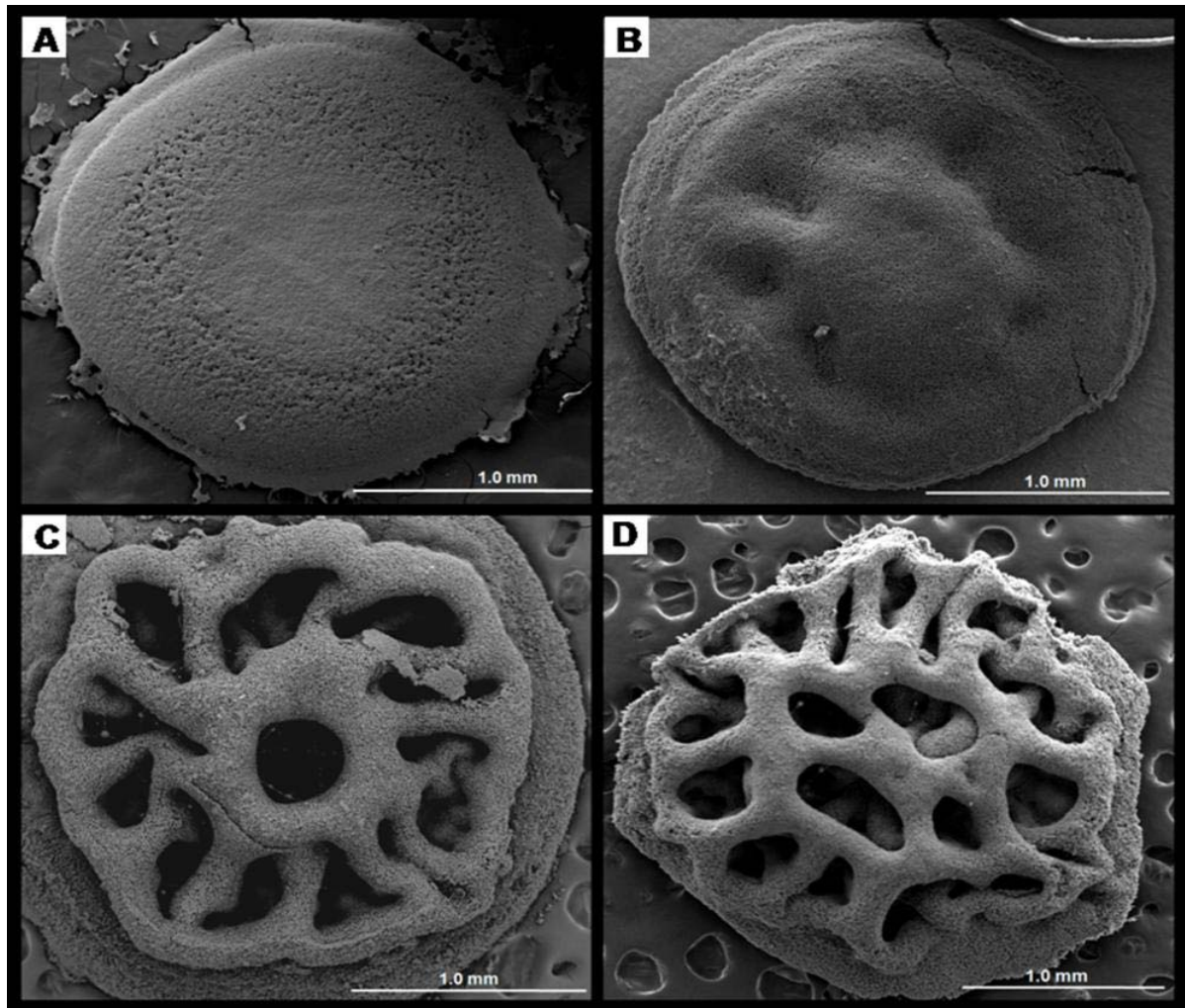


**Figura 2** – Curva de crescimento dos morfotipos de *Candida tropicalis*. (A) “liso”, (B) “côncavo”, (C) “anel”, (D) “rugoso”.

### 3.4 MICROESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO CELULAR DOS VARIANTES

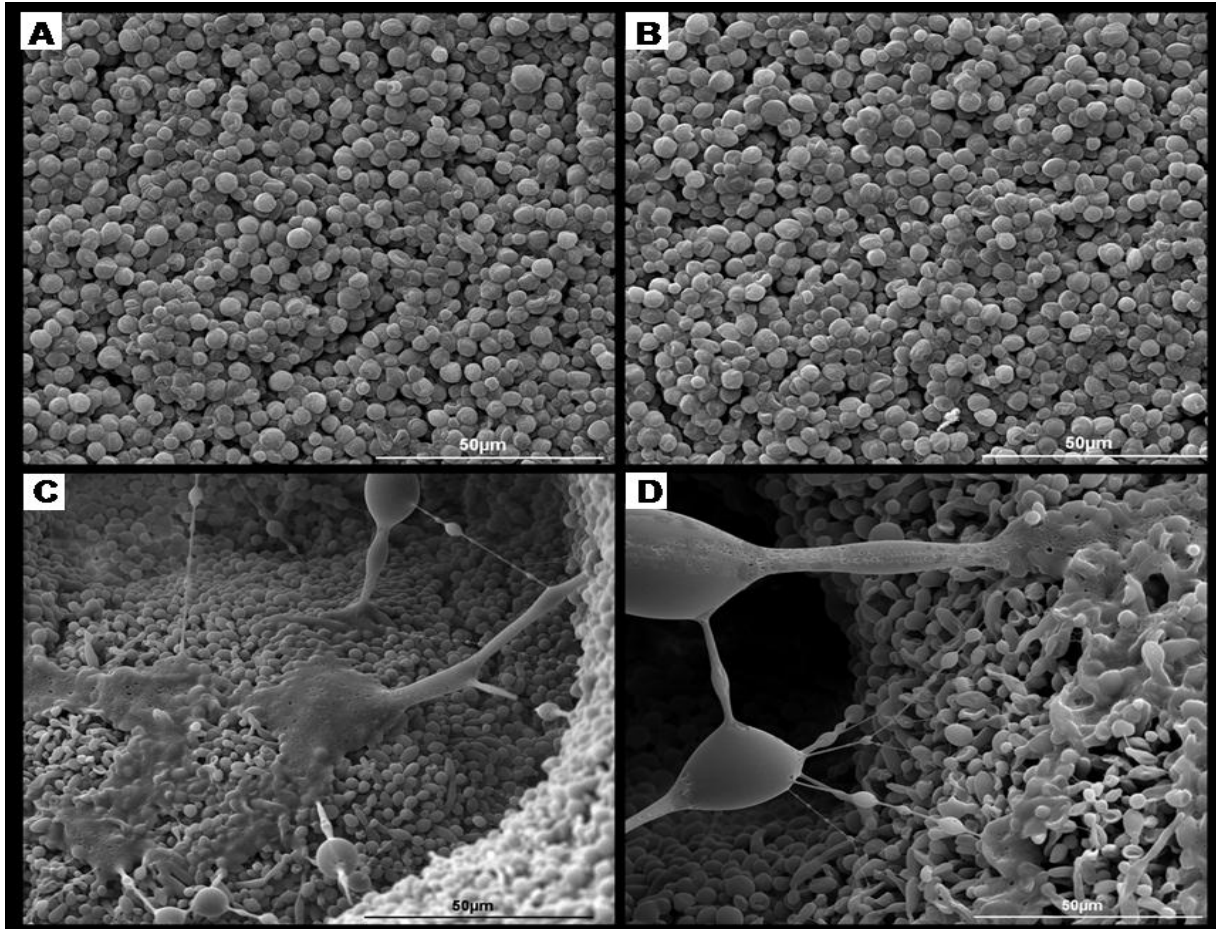
Para analisar a composição estrutural das colônias dos quatro morfotipos apresentados pelo isolado 49.07, foi realizada microscopia eletrônica de varredura.

Colônias do fenótipo parental possuem superfície lisa, semelhante à da maioria dos isolados do gênero *Candida*. O variante “côncavo” parece apresentar uma morfologia intermediária entre os morfotipos “liso” e “anel”, já que possui pequenas concavidades acima da colônia sem, no entanto, apresentar a arquitetura tridimensional complexa, como a observada no variante “anel”. Colônias do fenótipo “anel” possuem uma cavidade central arredondada e elevada, ao redor da qual são observadas demais cavidades de menor dimensão e profundidade. Em colônias rugosas são observadas quatro cavidades centrais circundadas por orifícios (Figura 3).



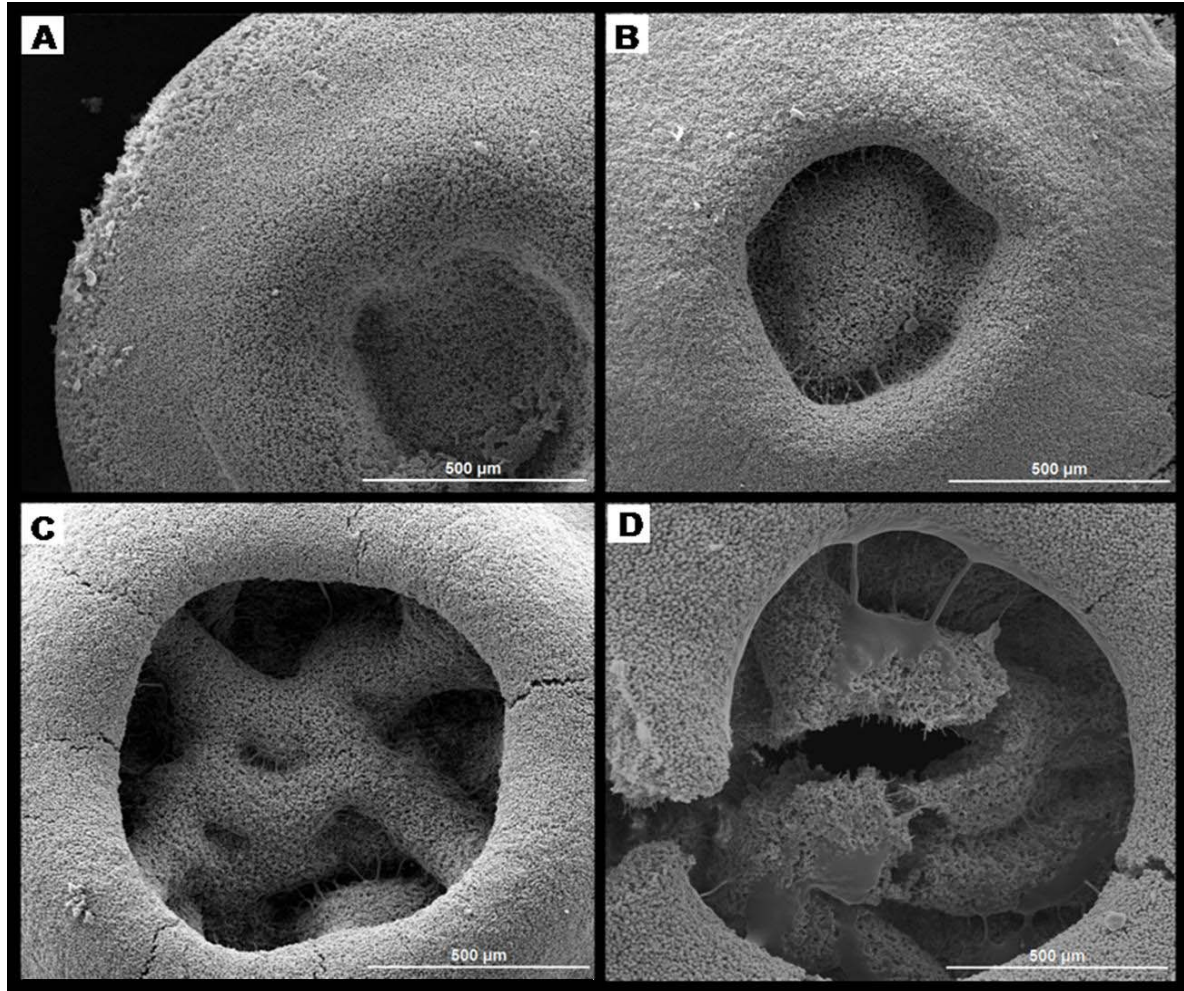
**Figura 3** – Eletromicrografia de varredura de morfotipos de *C. tropicalis*. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 100x.

Nas colônias dos variantes “anel” e “rugoso” foi observada a presença de matriz, principalmente no interior das cavidades. Já nas colônias de fenótipo “liso” e “côncavo” não foi verificada matriz entre as células (Figura 4). Até o momento não havia sido relatada presença de matriz em colônias de variantes fenotípicas no gênero *Candida*.



**Figura 4** – Eletromicrografia de varredura de morfotipos de *Candida tropicalis*. (A) e (B) superfície de “liso” e “côncavo”, respectivamente; (C) e (D) presença de matriz na cavidade de “anel” e “rugoso”, respectivamente. Aumento 2000x.

O variante “anel”, o qual apresentou maior estabilidade fenotípica, foi também analisado quanto à formação da colônia em função do tempo. Em colônias de 40 horas foi possível verificar início de formação da cavidade central, porém não foi constatada presença de matriz. Colônias de 48 horas apresentaram matriz apenas nas margens da cavidade central, na qual foi verificado maior aprofundamento comparativamente às colônias de 40 horas. Já em colônias de 55 e 64 horas foi constatado que a cavidade é mais estruturada, com maior dimensão e profundidade, além de presença de matriz por toda região. Em colônias de 64 horas, a cavidade central já está totalmente formada, com grande quantidade de material não celular em seu interior, porém as cavidades periféricas ainda não se formaram (Figura 5).



**Figura 5** – Eletromicrografia de varredura de colônia do variante “anel” em diferentes etapas de formação. (A) 40 horas; (B) 48 horas; (C) 55 horas e (D) 64 horas de cultivo.

A acentuada presença de matriz em colônias dos fenótipos “anel” e “rugoso” e seu aumento durante as etapas de formação da colônia do variante “anel” parecem indicar que a matriz tenha função estrutural, participando da sustentação do formato tridimensional da colônia.

### 3.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS MORFOTIPOS

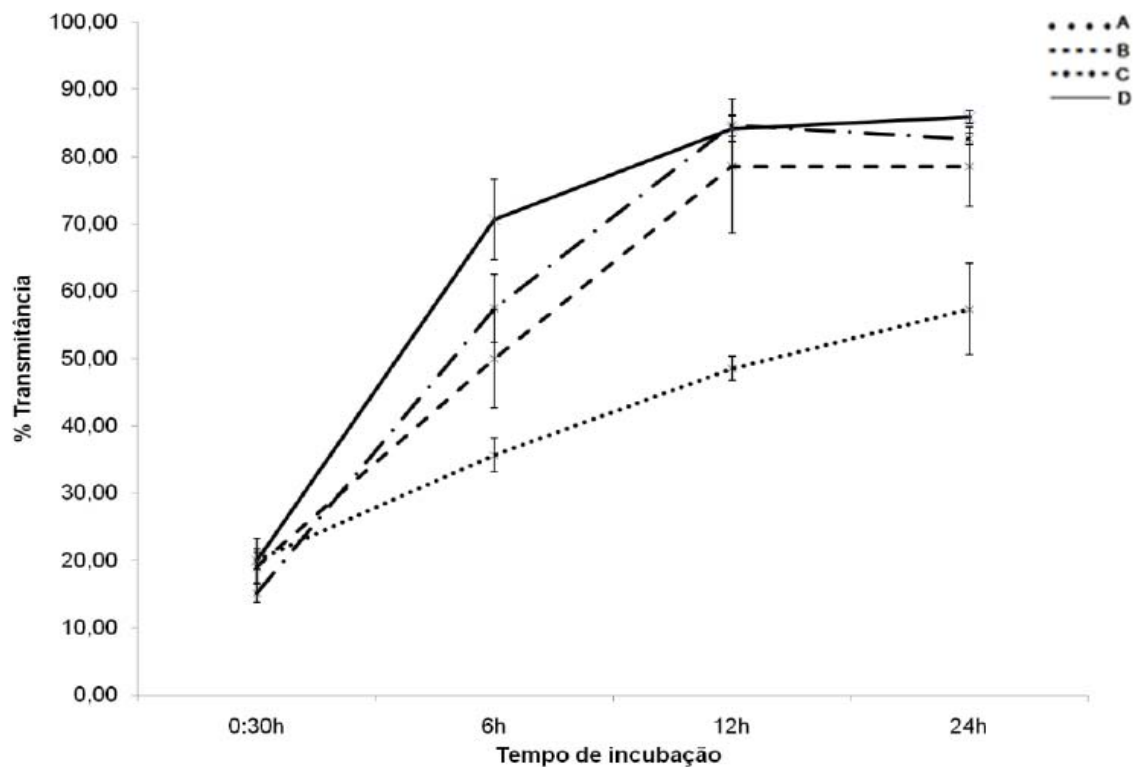
A formação de biofilme é relacionada à aderência das células a superfícies. Alguns estudos têm relatado diferenças na capacidade de adesão de variantes fenotípicas de *C. albicans* (KENNEDY *et al.*, 1988; VARGAS *et al.*, 1994; ANTONY *et al.*, 2007). No presente estudo, os morfotipos foram avaliados quanto à produção de biofilme nos tempos 30 min, 6, 12 e 24 horas de cultivo e classificados

em (+), (2+), (3+) e (4+), de acordo com a intensidade desta produção em função do tempo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Intensidade de formação de biofilme por morfotipos de *Candida tropicalis* em diferentes tempos de incubação

Morfotipo	Tempo de incubação (horas)	Intensidade de formação de biofilme			
		(+)	(++)	(+++)	(++++)
Liso	0,5	x			
	6		x		
	12			x	
	24				x
Côncavo	0,5	x			
	6			x	
	12				x
	24				x
Anel	0,5	x			
	6				x
	12				x
	24				x
Rugoso	0,5	x			
	6				x
	12				x
	24				x

No tempo inicial de incubação (30 min), os valores de transmitância obtidos para todos os morfotipos foram agrupados na classe 1+, sugerindo semelhanças na capacidade de adesão, etapa inicial da formação de biofilme. A partir de 6 horas foram verificadas diferenças na geração de biofilme entre os morfotipos, sendo que, no geral, a produção de biofilme do fenótipo “liso” foi 20-50% inferior à dos variantes (Figura 6).



**Figura 6** – Formação de biofilme por morfotipos de *C. tropicalis*. (A) “liso”, (B) “côncavo”, (C) “anel”, (D) “rugoso”. A produção de biofilme do fenótipo “liso” foi inferior à dos variantes.

Em 12 horas de incubação, a produção de biofilme de todos os variantes foi classificada em 4+, enquanto a do parental qualificada em 3+. As maiores taxas de produção de biofilme foram verificadas para os variantes “rugoso” e “anel”, enquanto o variante “côncavo” apresentou valores intermediários entre “liso” e “anel”. As maiores diferenças entre os morfotipos foram verificadas em tempos iniciais, de 6 e 12 horas de incubação, sendo que em 24 horas a geração de biofilme de todos os morfotipos foi classificada como (4+) (Tabela 1). Para isolados distintos de *C. tropicalis*, após 24 horas de incubação também foram relatados valores médios de produção de biofilme qualificados na classe 4+ (TAMURA *et al.*, 2007).

Nossos dados sugerem que as diferenças observadas na capacidade de produção de biofilme pelos diferentes morfotipos não são decorrentes de variações nos tempos de geração, já que o fenótipo “liso”, o qual tem crescimento mais rápido, produziu as menores quantidades de biofilme, enquanto os variantes “rugoso” e “anel”, que foram os maiores produtores de biofilme, apresentaram os maiores tempos de geração.

Resultados semelhantes foram encontrados em morfotipos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, para os quais foi relatada menor produção de biofilme pelo fenótipo “liso” (JIN *et al.*, 2005; LAFFEY; BUTLER, 2005). Para *Cryptococcus neoformans*, também foi demonstrado que o *switching* fenotípico interfere na capacidade de produção de biofilme do isolado, no entanto, neste fungo o fenótipo “liso” apresentou maior potencial de formação de biofilme que os demais morfotipos (MARTINEZ *et al.*, 2008).

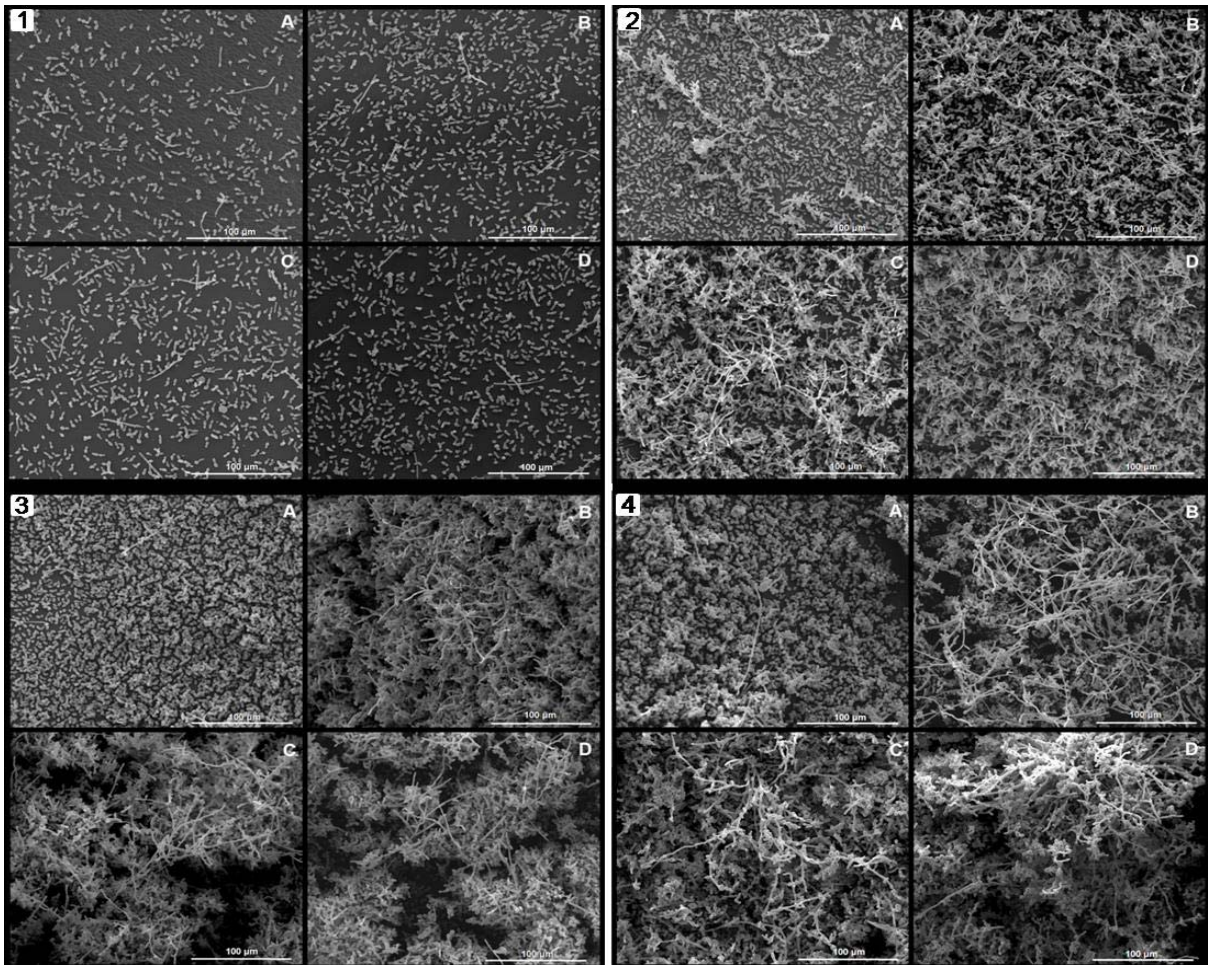
Vargas e colaboradores (1994) e Antony e colaboradores (2007) relataram maior capacidade de adesão para o fenótipo parental que para os variantes em isolados de *C. albicans*.

Negri e colaboradores (2009) relataram diferenças na capacidade de adesão de isolados clínicos distintos de *C. tropicalis*, no entanto não observaram diferenças no potencial de formação de biofilme dos isolados.

### 3.6 VERIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DO BIOFILME

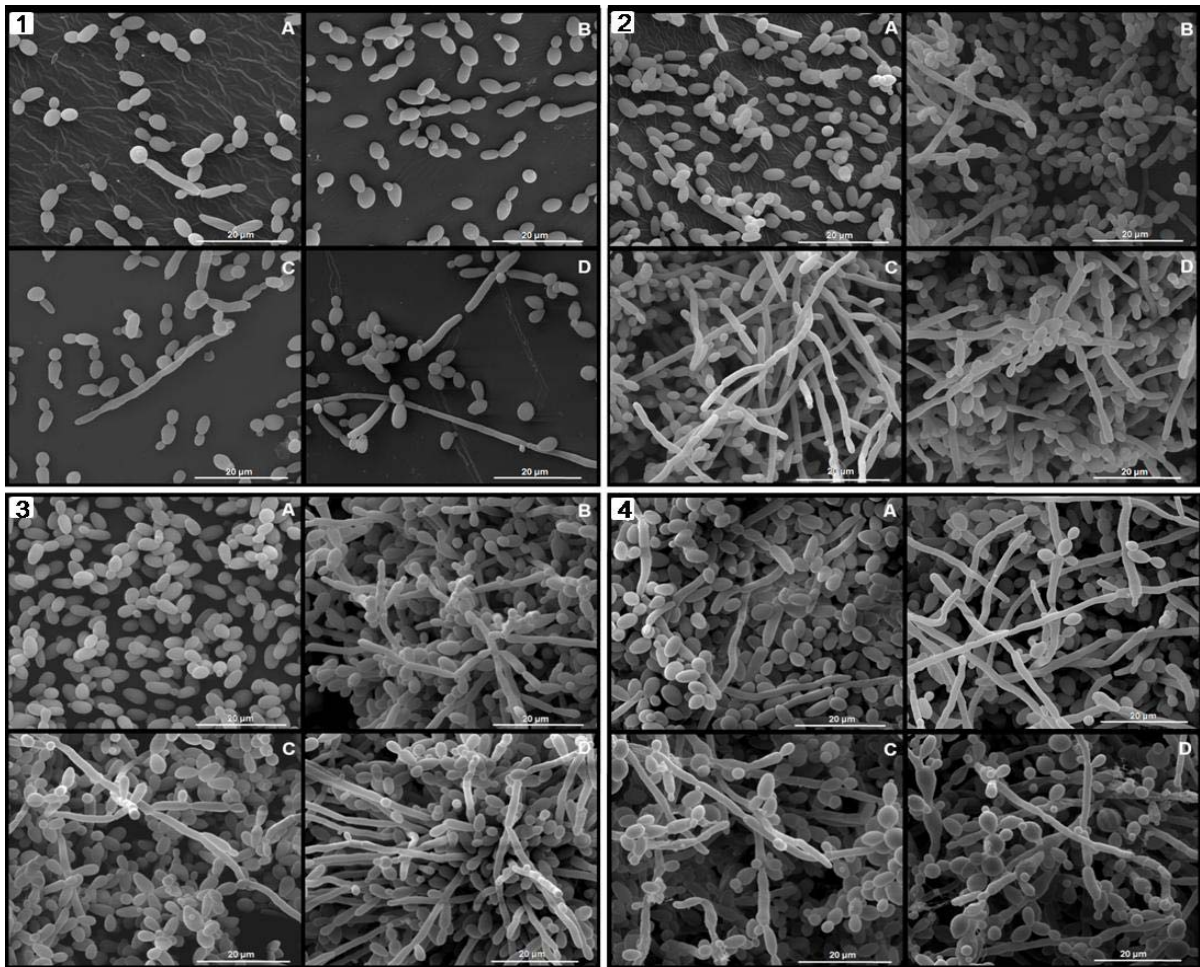
Em vista das diferenças observadas na intensidade de biofilme formado pelos morfotipos, a estrutura do biofilme formado em cateter urinário foi examinada por microscopia eletrônica de varredura.

Nos primeiros 30 minutos de incubação foi observada adesão das células dos variantes ao cateter, sendo a menor quantidade de células aderentes verificada para o morfotipo “liso”. Nos tempos de incubação subseqüentes, a microscopia permitiu a confirmação da menor produção de biofilme pelo fenótipo parental, porém não possibilitou visualizar diferenças na intensidade de produção entre os demais fenótipos (Figura 7).



**Figura 7** – Eletromicrografia de varredura do biofilme de morfotipos de *C. tropicalis* formado em fragmentos de cateter urinário em diferentes tempos de incubação. (1) 30 min; (2) 6 horas; (3) 12 horas e (4) 24 horas. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 900x.

A característica mais evidenciada pela microscopia foi a diferença na morfologia das células formadoras de biofilme. Para o fenótipo “liso”, houve predomínio de células blastoconidiais, sendo que apenas após 24 horas de incubação foi observada presença de hifas no biofilme formado por este morfotipo. Para os variantes, o início de formação de hifas foi evidenciado nos primeiros 30 minutos e nos demais tempos de incubação foi verificada grande quantidade de hifas e pseudo-hifas (Figura 8).

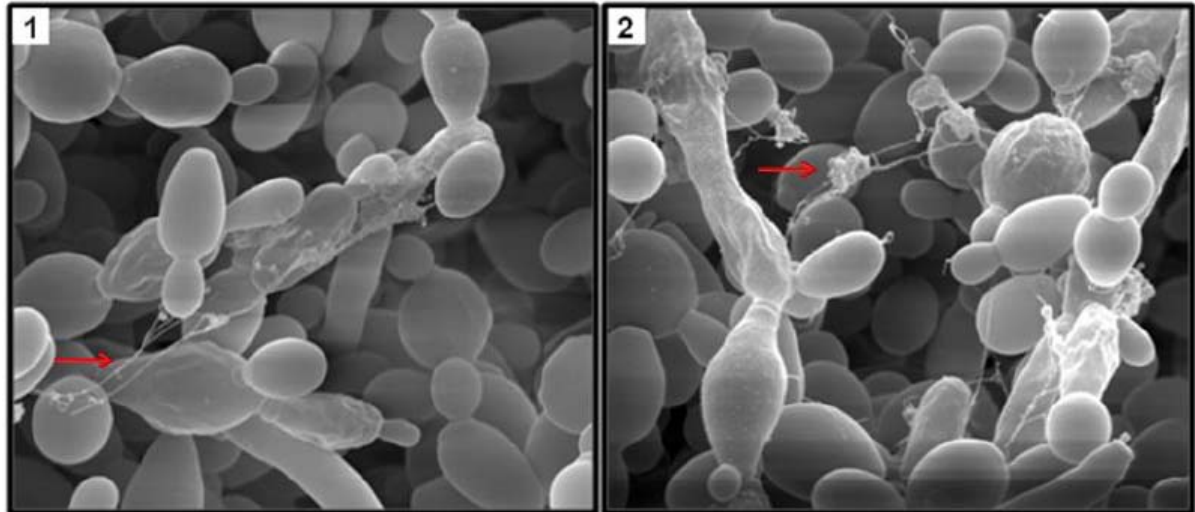


**Figura 8** – Eletromicrografia de varredura do biofilme de morfotipos de *C. tropicalis* formado em fragmentos de cateter urinário, em diferentes tempos de incubação. (1) 30 min; (2) 6 horas; (3) 12 horas e (4) 24 horas. (A) “liso”; (B) “côncavo”; (C) “anel” e (D) “rugoso”. Aumento 4000x.

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

Em *C. albicans* também foi relatado que mutantes defectivos para a formação de hifas produzem menor quantidade de biofilme comparativamente a mutantes deficientes para a formação de células blastoconidiais (BAILLIE; DOUGLAS, 1999). Sendo assim, neste estudo, a menor produção de biofilme verificada para o morfotipo “liso” pode ser decorrente de seu menor potencial de filamentação comparativamente aos variantes.

A presença de matriz foi verificada apenas no biofilme formado pelos variantes “anel” e “rugoso”, após 24 horas de incubação (Figura 9).



**Figura 9** – Eletromicrografia de varredura do biofilme formado pelos variantes (1) “anel” e (2) “rugoso”, após 24 horas de incubação. As setas destacam presença de matriz. Aumento 10000x.

Segundo Chandra e colaboradores (2001), a formação de biofilme por *C. albicans* em lâminas de polimetilmetacrilato ocorre em três fases de desenvolvimento distintas, sendo elas, inicial (0 a 11 horas), intermediária (12 a 30 horas) e de maturação (38 a 72 horas). A fase intermediária é marcada pela emergência de material não celular, no entanto, a produção desse material é mais evidenciada na fase de maturação. Assim, no presente estudo a observação de matriz não era esperada nos biofilmes formados até 12 horas. No entanto, a ausência de matriz após 24 horas nos biofilmes dos morfotipos “liso” e “côncavo” sugere diferenças no tempo de maturação do biofilme comparativamente ao do variante “anel” e “rugoso”, ou mesmo deficiência na produção do material acelular por estes fenótipos.

Nossos resultados mostraram que as diferenças fenotípicas dos morfotipos do isolado 49.07 são decorrentes de alterações na morfologia celular, bem como da produção de uma matriz que parece auxiliar na manutenção do formato da colônia.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J.M.; SOLL, D.R. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 5579-5588, 1987.
- ANTONY, G; SARALAYA, V; BHAT, G.K, SHIVANANDA, P.G. Phenotypic switching and its influence on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, 241-244, 2007.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Role of dimorfism in the development of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 671-679, 1999.
- BROCKERT, P.J.; LACHKE, S.A.; SRIKANTHA, T.; PUJOL, C.; GALASK, R.; SOLL, D.R. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 7109–7118, 2003.
- CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5385-5394, 2001.
- DEAN, J. A. Lange's Handbook of Chemistry, 15th ed. McGraw-Hill: Beijing, 1999.
- FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.
- HUANG, G.; SRIKANTHA, T.; SAHNI, N.; YI, S.; SOLL, D.R. CO<sub>2</sub> Regulates White-to-Opaque Switching in *Candida albicans*. **Current Biology**, v.19, p.330-334, 2009.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. Phenotypic Switching in Fungi, **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180 – 188, 2008.
- JIN, Y.; SAMARANAYKE, H.K.; SAMARANAYKE, L.P. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 160, p. 191–200, 2005.
- KENNEDY, M.J.; ROGERS, A.L.; HANSELMEN, L.R.; SOLL, D.R. YANCEY JR, R.J. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes **Mycopathologia**, v. 102, p. 149-156, 1988.
- KONTOYIANNIS, D.P.; VAZIRI, I.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M. ; THORNBY, R.; HACHEM, G.P.; BODEY, I.; RAAD, I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1676–1681, 2001.
- LACHKE, S. A.; JOLY, S.; DANIELS, K.; SOLL, D.R. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v. 148, p. 2661-2674, 2002.

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

LEROY, O.; GANGNEUX, J.P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J.P.; GOUIN, F.; SOLLET, J.P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37 p. 1612-1618, 2009.

LEUNG, A. Y.; CHIM, C. S.; HO, P. L.; CHENG, V. C.; YUEN, K. Y.; LIE, A. K.; AU, W. Y.; LIANG, R. KWONG, Y. L. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 316–319, 2002.

MAROL, S.; YÜCESOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v.51, p. 40-49, 2008.

MARTINEZ, L.R.; IBOM, D.C.; CASADEVALL, A.; FRIES, B. C.Characterization of Phenotypic Switching in *Cryptococcus neoformans* Biofilms. **Mycopathologia**, v. 166, p.175–180, 2008.

MARR, K.A.; SEIDEL, K.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 309–316. 1999.

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

MORROW, B.; SRIKANTHA, T.; SOLL, D.R. Transcription of the Gene for a Pepsinogen, PEPJ, Is Regulated by White-Opaque Switching in *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 2997-3005, 1992.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, DOI 10.1007/S11046-009-9246-0, 2009.

SHIN, J. H.; KEE, S.J, SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S.K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p.1244–1248, 2002.

SLUTSKY, B., STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D.R. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p.189-197, 1987.

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

TAMURA, N.K.; NEGRI, M. F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p.91-93, 2007.

VARGAS, K.; WERTZ, P.W.; DRAKE, D.; MORROW, B.; SOLL, D.R. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153<sup>a</sup> cells exhibiting switch phenotypes of buccal epithelium and stratum corneum. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1328–1335, 1994.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A.; COLLETTE, L.; MARTINO, P.; VANDERCAM, B.; DOYEN, C.; LEBEAU, B.; SPENCE, D.; KRCMERY, V. DE PAUW, B.; MEUNIER, F. Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**, v.28, p.1071-1079, 1999.

WALSH, T.J.; MERZ, W.G. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 85, p.498–502, 1986.

## CONCLUSÕES

- Considerando-se os isolados provenientes de sangue, os de *C. tropicalis* foram mais hemolíticos que os de *C. parapsilosis*.
- Houve correlação entre sítio de isolamento dos isolados de *C. parapsilosis* e expressão de fator hemolítico, o mesmo não sendo observado para isolados de *C. tropicalis*;
- Considerando-se os isolados provenientes de secreção traqueal, os de *C. parapsilosis* foram mais proteolíticos que os de *C. tropicalis*.
- Houve correlação entre sítio de isolamento dos isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e atividade proteolítica;
- O *switching* fenotípico no isolado 49.07 de *C. tropicalis* está relacionado a alterações na morfologia celular;
- A matriz parece ter função estrutural nas colônias dos variantes “anel” e “rugoso”.
- A variação fenotípica em *C. tropicalis* interfere na capacidade de produção de biofilme do isolado;
- A formação de biofilme parece estar correlacionada à filamentação nos morfotipos de *C. tropicalis*.