



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIRULÊNCIA, SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMOS
DE RESISTÊNCIA A AZÓLICOS EM CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM
HUMANA E VETERINÁRIA**

FORTALEZA

2017

JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA VIRULÊNCIA, SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA A AZÓLICOS EM CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM HUMANA
E VETERINÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Co-orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O47a Oliveira, Jonathas Sales de.
Análise da virulência, sensibilidade antifúngica e mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária / Jonathas Sales de Oliveira. – 2017.
156 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
Coorientação: Profa. Dra. Raimunda Sânia Nogueira Brilhante.

1. *Candida tropicalis*. 2. Fatores de virulência. 3. Biofilme. 4. Sensibilidade antifúngica. 5. Mecanismos de resistência. I. Título.

CDD 616.9

JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA VIRULÊNCIA, SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA A AZÓLICOS EM CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM HUMANA
E VETERINÁRIA

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação
em Microbiologia Médica da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 07/11/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira
Brilhante
Universidade Federal do Ceará
Co-orientadora

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

A Deus, pelo novo fôlego a cada dia,
ao meu filho, por ser minha principal motivação,
à minha família, que é a base da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois creio que Ele é o arquiteto e mentor por trás das obras-primas que são a vida e todo o universo e que, por esse simples e maravilhoso motivo, merece minha gratidão, a qual demonstrarei a Ele até o fim dos meus dias.

Aos meus pais, Emília Maria de Oliveira e Manoel Sales, por terem grande influência na pessoa e cidadão que sou hoje, embora acreditem que, de alguma forma, eu não tenha seguido os passos que me apontaram. Saibam que eu sempre serei grato pelo amor que entregam a mim e pelos seus ensinamentos.

Ao meu filho, Dan Lucas Ferreira Sales, que, embora tenha apenas amostras do pai de vez em quando, envolve-me com seu amor e carinho e sua risada encantadora sempre que estou com ele. Espero ser um exemplo para ele, assim como meu pai o foi para mim. Espero que o brilho que vejo em seus olhos quando estamos juntos nunca se apague.

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo apoio financeiro aos projetos, e ao Centro Especializado em Micologia Médica e à Universidade Federal do Ceará pela estrutura que proporcionou a execução desse trabalho.

À professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela dedicação e imenso carinho dispensado a mim em todos esses anos. Agradeço por ser uma grande mentora e por sempre ter as palavras certas nos momentos difíceis pelos quais passei. Eu sempre serei grato pelo papel de mãe que exerceu, me acolhendo e sendo o suporte que me fez ficar em pé e seguir adiante.

Ao professor Marcos Fábio Gadelha Rocha, que me guiou durante essa jornada, a âncora que firmava meus pensamentos, clareava minhas ideias e me incentivava a sempre dar o meu melhor. Obrigado por me acolher quando eu precisei e por acreditar no meu potencial. Mesmo quando eu mesmo duvidava de mim, o senhor era um farol que irradiava conhecimento e conseguia dissipar a névoa que encobria meu pensar, me mostrando que eu era capaz.

À professora Rossana de Aguiar Cordeiro, por ter sido a pessoa que abriu as portas pra mim desse universo que é a micologia médica. Pela sua dedicação e por seu profissionalismo, um exemplo a ser seguido por todos os professores/pesquisadores. Obrigado pelos momentos de discussão, esclarecimento e ensinamento e por sempre instigar meu pensamento crítico, me fazendo ampliar a visão.

Ao professor José Júlio da Costa Sidrim, por ser a base de sustentação do CEMM por todos esses anos com sua incrível experiência e dedicação ao estudo da micologia médica, uma verdadeira fonte de conhecimento da qual podemos saciar a sede de nossas mentes. Obrigado por sempre estar disposto a dividir suas gotas de sabedoria e conhecimento que nos fazem crescer como pessoa e profissionalmente.

À professora Débora Castelo-Branco, por ser uma incrível mentora e amiga, que sempre está disposta a dar o seu melhor para que possamos superar obstáculos juntos. Obrigado por sempre estar de ouvidos e coração aberto para resolver problemas, construir soluções e, claro, rir um pouco da vida para que essa difícil jornada se torne um pouco mais leve. Sei que posso contar contigo.

Aos demais professores do PPGMM, em especial à professora Lília Câmara por ter disponibilizado seu tempo para o ensino e esclarecimento de técnicas utilizadas neste trabalho. Um exemplo de professora, que ama o que faz: ensinar. Que eu possa ter a paixão pelo ensino que pude observar emanando de suas palavras e ações.

À Carolinda de Oliveira, secretária do PPGMM, que faz o possível e impossível para nos ajudar nessa jornada chamada pós-graduação. Obrigado por ser o suporte técnico e psicológico dos alunos, por ser nossa bússola nesse mar bravio que decidimos enfrentar. Na minha caminhada pela pós-graduação, havia uma estrada de tijolos dourados a qual não me deixava desviar o caminho, e o nome da estrada era Carol.

À Terezinha de Jesus Rodrigues, nossa amada técnica, que tem um abraço que cabe a todos e um coração sempre aberto pra receber mais um filho postiço. Tetê, você é o coração pulsante e o fôlego de vida do CEMM, mantendo o funcionamento deste lugar por tanto anos. Todos te amamos. E sei que o sentimento é recíproco.

Ao meu companheiro, Tibério Ferreira, por me compreender e me apoiar durante esse final de doutoramento. Obrigado por ser meu suporte, meu parceiro, meu confidente, meu assessor, meu ajudador. Obrigado pelos sorrisos bobos que você me faz esboçar e pela sensação de felicidade que me proporciona simplesmente por estar do meu lado.

Aos grandes amigos que fiz durante esse período que passei no CEMM e que sempre farão parte da minha vida. Rosana Serpa, não há um dia que se passe sem eu me lembrar de você e de nosso convívio. A saudade é real e palpável e, por vezes, dói demais, mas sou grato todos os dias por ter te conhecido. A gaúcha que roubou meu coração. Vandbergue Santos, meus braços e pernas nesses últimos anos de doutoramento, que sempre me ajudou e se doou mais do que eu mereci. Um dia recompensarei tudo o que fez e faz por mim. As definições de irmão não-sanguíneo foram atualizadas. Aline Lobão, minha

confidente, minha companheira, minha veterinária preferida. Ir pra academia sem você não é a mesma coisa. Obrigado por deixar a minha vida mais florida e com mais açaí, mesmo que no breve período no qual convivemos juntos. Gláucia Guedes, que esteve lado a lado comigo nessa longa jornada, me aguentando por tanto tempo. Não sabe quantas vezes você me ajudou a seguir em frente. Que sempre possamos ter essa nossa cumplicidade e companheirismo. Quando eu crescer, quero ser como você.

Aos tantos, e tantos, e tantos alunos que passaram pelo CEMM durante minha estadia por aqui. Em especial aos queridos Eduardo Teixeira, Jakelyne Marques, Manoel Paiva, Paula Bittencourt, Érica Pacheco, Amanda Chaves, Lucas Alencar, Joyce Ribeiro, Sabrina Tainah, Giovanna Riello, Silviane Bandeira, Natalya Fechine, Ramila Macedo, Charlline Melo, Sabrynnna Brito, José Erisvaldo, Lucilene Queiroz, Edmilson Corrêa, Felipe Magalhães, Ewerton Caracas, Yago Brito e Valquíria Mota. Cada um contribuiu para que eu chegassem até esse momento, de uma forma ou de outra. Uma experiência única ter convivido com todos vocês.

Aos alunos que estão nessa jornada, os futuros formandos do CEMM, Gleiciane Rocha, Lívia Galdino, Renan Vasconcelos, Jamille Alencar, Antônio Evangelista, Fernando Monteiro, Ana Luiza Ribeiro, Kleybson Sousa, Raquel Collares, Lana Glerieide, Lara de Aguiar, Jaime Acosta, Jamila Ricarte, Patrícia Mendes, Jônatas Franco, Gessica Araújo, Juliana Maciel e Raíssa Geovanna. Sempre bom estar na companhia de vocês, das risadas às discussões calorosas no restaurante universitário. A jornada é sempre melhor quando é feita em grupo.

Aos amigos que sempre fizeram parte da minha vida, e com os quais sempre dou ótimas risadas e vivo incríveis momentos. Mesmo distantes, os laços que se formam nunca se rompem. Obrigado, Maycon Lopes, Elizabeth Araújo, Rebeca Sales, Samuel Arruda e Caroline Gurgel.

Ao professor Ernani Magalhães, meu pai científico. Obrigado por ter me dado a oportunidade de descobrir o mundo da pesquisa e de me apaixonar pela micologia. Serei sempre grato pela porta que abriu pra mim. E olha onde essa porta me levou! Muito obrigado, em todas as línguas possíveis.

Aos colegas do tempo de graduação que decidiram seguir a jornada da pós-graduação e àqueles que acompanharam a minha jornada, em especial para Alexandre Lopes, Gleiziane Araújo, Cris Paiva, Daniele Rodrigues e Sandra Barbosa.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista.

Meu muito obrigado, e segue o baile.

“Os caminhos que me trouxeram até aqui foram diferentes dos quais um dia eu quis trilhar. Não me tornei em quem eu queria, mas quem eu precisava ser. E isso é a melhor coisa que poderia ter acontecido.”

Jonathas Sales

RESUMO

Candida tropicalis, uma levedura comensal presente na microbiota de homens e outros animais, é uma das principais espécies de *Candida* associadas a infecções invasivas graves em humanos, podendo também causar infecções em outros animais. O presente estudo objetivou analisar fatores de virulência, perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *C. tropicalis* de origem humana (n = 24) e veterinária (n = 28), bem como avaliar o efeito da prometazina sobre células de *C. tropicalis* resistentes a derivados azólicos. Na primeira parte da pesquisa, foi avaliada a produção *in vitro* de fosfolipase e protease, atividade hemolítica, produção de biofilme e infecção experimental utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, além de avaliar a sensibilidade de células planctônicas e sésseis frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. Na segunda parte, foram avaliados a quantidade de esteróis totais, o efluxo de rodamina 6G e a expressão dos genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* em cepas de origem humana (n = 13) e veterinária (n = 13). Por fim, na terceira parte, a sensibilidade de células planctônicas e sésseis frente à prometazina sozinha e em combinação com antifúngicos foi analisada utilizando 2 cepas resistentes a azólicos e uma cepa sensível de *C. tropicalis*. A atividade antifúngica da prometazina foi investigada através da curva de tempo de morte e observando o efeito da droga sobre o efluxo da rodamina 6G, tamanho/granulosidade celular, integridade de membrana e potencial transmembrana mitocondrial, utilizando citometria de fluxo. Quanto à produção de fatores de virulência, *in vitro*, 21,15% das cepas apresentaram a produção de fosfolipase, 44,23% produziram protease e 96% foram positivos para a atividade hemolítica. Quanto à produção de biofilme, 98% das cepas foram capazes de produzir essa formação fúngica, a maioria mostrando forte produção (65,38%). Altas taxas de mortalidade de *C. elegans* foram observadas quando os vermes foram expostos a cepas de *C. tropicalis*, atingindo 96% de nematódeos mortos após 96 h da exposição. No tocante à sensibilidade antifúngica, 10 cepas foram resistentes a pelo menos 1 azólico, sendo que 5 cepas foram resistentes a todos os azólicos testados. Caspofungina e anfotericina B apresentaram os melhores resultados de inibição frente ao biofilme maduro de *C. tropicalis* quando comparados com os derivados azólicos. Efeito paradoxal no biofilme foi observado em concentrações elevadas de caspofungina (8-64 µg/mL). Em relação ao estudo dos mecanismos de resistência a azólicos, não foi observado diferença entre os conteúdos de esteróis totais das cepas testadas, porém foi observado que 6 cepas não-sensíveis ao fluconazol apresentaram aumento do efluxo de rodamina 6G. Cepas não-sensíveis e pouco-sensíveis ao fluconazol apresentaram uma média de expressão para os genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* maior que as cepas sensíveis, sendo que 2 cepas não-sensíveis apresentaram expressão elevada para todos os três genes. A prometazina inibiu as células planctônicas e sésseis nas concentrações 64 e 128 µg/mL, respectivamente. A adição de concentração sub-inibitórias de prometazina reduziu as CIMs dos azólicos testados para as cepas resistentes, alterando o fenótipo de resistência. Pré-incubação com prometazina reduziu o efluxo de rodamina 6G, além de causar alteração no tamanho/granulosidade celular, dano na membrana plasmática e despolarização da membrana mitocondrial. O presente trabalho mostrou que cepas humanas e veterinárias de *C. tropicalis* apresentam similar produção de fatores de virulência e patogenicidade. Além disso, a resistência a azólicos em cepas veterinárias está relacionada, em parte, à expressão elevada do gene *ERG11* e de bombas de efluxo. Por fim, prometazina apresenta sinergismo com azólicos frente a cepas resistentes de *C. tropicalis*, causando danos na membrana celular e atividade mitocondrial da célula fúngica.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Fatores de virulência. Biofilme. Sensibilidade antifúngica. Mecanismos de resistência. Prometazina.

ABSTRACT

Candida tropicalis, a yeast isolated as comensals from humans and other animals, is a major *Candida* species associated with serious invasive infections in humans, being also able to cause infection in several animal species. The present study aimed to analyze virulence factors, the susceptibility profile and mechanisms of resistance to azoles in human (n = 24) and veterinary (n = 28) isolates of *C. tropicalis*, as well as to evaluate the effect of promethazine on cells of *C. tropicalis* isolates resistant to azoles. In the first part of this research, the in vitro production of phospholipases and proteases, hemolytic activity, biofilm production and experimental infection using the nematode *Caenorhabditis elegans* was evaluated, as well as the susceptibility of planktonic and sessile cells against the antifungals fluconazole, itraconazole, voriconazole, caspofungin and amphotericin B. Total sterols content, efflux of rhodamine 6G and expression levels of *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* genes in human (n = 13) and veterinary (n = 13) isolates were also assessed. Finally, the susceptibility of planktonic and sessile cells to promethazine alone and in combination with antifungals was analyzed using 2 strains resistant to azoles and a sensitive strain of *C. tropicalis*. Antifungal activity of promethazine was investigated through the time-kill curve and assessing the effects of the drug on the efflux of 6G rhodamine, cell size/granularity, membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential, through flow cytometry. Regarding the in vitro production of virulence factors, 21.15% of the strains showed phospholipase production, 44.23% produced protease and 96% were positive for hemolytic activity. 98% of the strains were able to produce biofilm, most showing strong production (65.38%). High mortality rates of *C. elegans* were observed when worms were exposed to *C. tropicalis* strains, reaching 96% of death after 96 h of exposure to the strains. Concerning the antifungal susceptibility profile, 10 isolates were resistant to at least 1 azole and 5 isolates were resistant to all azoles tested. Caspofungin and amphotericin B showed the best inhibition results against *C. tropicalis* mature biofilm when compared to the azole antifungals. Paradoxical effect on mature biofilm was observed at high concentrations of caspofungin (8-64 µg/mL). Regarding the study of mechanisms of azole resistance, no difference was observed between total sterols contents of the groups analyzed, however, 6 fluconazole-non-susceptible isolates showed increased efflux of 6G rhodamine. Fluconazole-non-susceptible and fluconazole-less-susceptible isolates showed a mean expression for *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* genes greater than the susceptible isolates, with 2 fluconazole-non-susceptible isolates showing high expression for all three genes. Promethazine showed inhibition of planktonic and sessile cells at concentrations of 64 and 128 µg/mL, respectively. The addition of sub-inhibitory concentrations of promethazine reduced the MIC of the azoles tested against the resistant strains, altering the resistance phenotype. Pre-incubation with promethazine reduced the efflux of 6G rhodamine, in addition to causing changes in cell size/granularity, plasma membrane damage and mitochondrial membrane depolarization. The present work showed that human and veterinary isolates of *C. tropicalis* presented similar production of virulence factors and pathogenicity. In addition, azole resistance in veterinary *C. tropicalis* strains is related, in part, to elevated *ERG11* gene expression and efflux pump activity. Finally, promethazine shows synergism with azoles against resistant strains of *C. tropicalis*, causing cell membrane and mitochondrial activity impairment on fungal cells.

Keywords: *Candida tropicalis*. Virulence factors. Biofilm. Antifungal susceptibility. Mechanisms of resistance. Promethazine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Micromorfologia de *Candida tropicalis*. (A) Microcultivo de *C. tropicalis* em ágar fubá acrescido de Tween 80 analisado em microscópio óptico de campo claro. Observa-se a presença de blastoconídios em cadeias simples ou ramificadas brotando, geralmente aos pares, a partir da pseudo-hifa (seta preta). (B) e (C) Microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis* apresentando vários blastoconídios, filamento (hifa, seta branca) e pseudo-hifa caracterizada por blastoconídios alongados em brotamento (seta verde)..... 29
- Figura 2.** Diferentes modelos de infecção utilizados para estudar a patogenicidade de *C. tropicalis*. (A) Secção histopatológica de rim dissecado de camundongo infectado com *C. tropicalis* corada com ácido periódico-Schiff. (B) Microscopia eletrônica de varredura de células *C. tropicalis* aderidas ao epitélio em modelo ex vivo. A pele está lesada e as leveduras estão “integradas” ao tecido (seta). (C) Secção de tecido, corada com ácido periódico-Schiff, de *Galleria mellonella* infectado por *C. tropicalis* (seta) e tratado com fluconazol. 33
- Figura 3.** Fatores de virulência expressos por *Candida tropicalis*. (1) flexibilidade morfológica; (2) mudança (*switching*) branco-opaco e *mating*; (3) expressão de adesinas; invasão das células do hospedeiro por (4) endocitose induzida ou (5) penetração ativa; (6) liberação de enzimas hidrolíticas (por exemplo, proteinases aspárticas secretadas [Saps]) que ajudam na penetração e rompimento do material tissular; (7) aquisição de nutrientes e micronutrientes das células hospedeiras, como, por exemplo, sistemas de captação de zinco e ferro. 36
- Figura 4.** Avaliação da produção de fatores de virulência de *Candida* em meios sólidos. (A) Produção de fator hemolítico em meio ágar RPMI suplementado com glicose e sangue de carneiro; observa-se a formação de um halo esverdeado (seta preta), indicando alfa-hemólise. (B) Produção de fosfolipases extracelulares em meio ágar gema de ovo; observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca ao redor da colônia (seta branca), indicando produção enzimática. (C) Produção de proteases extracelulares em meio ágar BSA; observa-se a formação de uma zona clarificada ao redor da colônia (seta verde), que indica a produção da enzima. 40

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura (A) e microscopia confocal de varredura a laser (B) de biofilmes maduro de *Candida tropicalis*. Observa-se uma arquitetura complexa composta de blastoconídios (setas pretas) e filamentos (setas brancas). Na microscopia confocal (B), células em verde são viáveis, enquanto em vermelho são células mortas. As barras laterais (B) indicam a espessura do biofilme..... 47

Figura 6. Mecanismos de resistência a antifúngicos descritos em *Candida tropicalis*. (A) Produção de esteróis alternativos pela célula devido à inativação de Erg3. (B) Sugere-se que o β-glucano da parede celular interaja com o antifúngico, inibindo sua penetração. Aumento da expressão de bombas de efluxo do tipo (C) *ATP-binding cassette* e (D) *major facilitator superfamily*, reduzindo os níveis intracelulares de azólicos. (E) Atividade mitocondrial alterada causa redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio intracelular. (F) A atividade de drogas azólicas pode ser superada pelo aumento da expressão de Erg11. (G) A elevada expressão do fator de transcrição Upc2 induz um aumento da expressão de *ERG11*. (H) Mutações e (I) deleções em diferentes genes podem diminuir a afinidade da droga pelo sítio alvo. (J) Mutação e perda de heterozigosidade em *FCY2* leva a uma diminuição da entrada de flucitosina na célula. 51

Figura 7. Organograma e estruturação experimental deste estudo..... 65

Figura 8. Avaliação da patogenicidade de *Candida tropicalis* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Os vermes foram alimentados com colônias de *C. tropicalis* (20 cepas humanas e 20 cepas veterinárias) por 2 h e então transferidos para meio líquido sem o patógeno. Nematódeos mortos foram contados e removidos diariamente. Vermes alimentados somente com *E. coli* OP50 foram utilizados como controle negativo. *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo. Imagens de microscopia mostraram nematódeos infectados com cepas de *C. tropicalis*, apresentando filamentos (B e C) rompendo o pseudoceloma e a cutícula de vermes infectados. 85

Figura 9. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), atividade metabólica e biomassa de biofilmes de *C. tropicalis* expostos a diferentes concentrações de caspofungina. Atividade metabólica das células no biofilme (ensaio da redução do XTT) e a quantificação da biomassa (coloração com cristal violeta) estão expressas como média ± desvio padrão da densidade óptica. Contagem de UFC está expresso como média ± desvio padrão da

quantidade de colônias crescidas após semeio em ágar batata dextrose. Barras pretas correspondem ao biofilme não tratado (controle). (A) contagem de UFC; (B) ensaio de redução do XTT; (C) coloração com cristal violeta..... 90

Figura 10. Imagens obtidas através de microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de caspofungina. Há uma redução significativa na viabilidade do biofilme na menor concentração testada (0,0625 μ g/mL), entretanto efeito paradoxal pode ser observado em concentrações maiores. (A) Biofilme maduro não tratado (controle); Biofilme maduro após exposição à caspofungina nas concentrações (B) 0,0625 μ g/mL, evidenciando redução no número de células viáveis, perda da estrutura do biofilme e blastoconídios maiores arredondados (setas); (C) 8 μ g/mL, note um aumento no número de células viáveis e da espessura do biofilme comparado ao tratamento com 0,0625 μ g/mL, além de blastoconídios maiores e arredondados (seta); (D) 16 μ g/mL, note um aumento no número de células viáveis, espessura do biofilme similar à espessura do controle sem tratamento e blastoconídios maiores e arredondados; (E) 32 μ g/mL e (F) 64 μ g/mL, observando-se um aumento no número de células viáveis em comparação com o tratamento com 0,0625 μ g/mL, com redução do tamanho dos blastoconídios quando comparado com o controle sem tratamento..... 91

Figura 11. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de caspofungina. (A) Biofilme maduro não tratado (controle). Biofilme maduro tratado com caspofungina nas concentrações (B) 0,0625 μ g/mL, evidenciando ruptura da estrutura do biofilme com poucos blastoconídios (setas) embebidos em uma matriz fragmentada; (C) 8 μ g/mL, note a ruptura da estrutura do biofilme e aumento do número de células embebidas na matriz do biofilme quando comparado ao tratamento com 0,0625 μ g/mL, além de blastoconídios colapsados e enrugados (setas); (D) 16 μ g/mL, note a ruptura da estrutura do biofilme e aumento do número de células embebidas na matriz do biofilme quando comparado ao tratamento com 0,0625 μ g/mL, e menos blastoconídios colapsados e enrugados quando comparado com o tratamento com 8 μ g/mL; (E) 32 μ g/mL e (F) 64 μ g/mL, onde se observa aumento no número de células alteradas morfologicamente (setas) e uma estrutura desorganizada e fragmentada do biofilme..... 92

Figura 12. Intensidade colorimétrica das imagens obtidas por microscopia confocal de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com caspofungina. A intensidade colorimétrica (pixel/μm) está expressa como média ± desvio padrão da fluorescência emitida. Total representa a fluorescência de células viáveis e mortas juntas. Barras pretas representam a intensidade colorimétrica do biofilme não tratado (controle). Números no eixo X indicam as concentrações testadas de caspofungina (μg/mL) 93

Figura 13. Concentração de ergosterol total em cepas de *Candida tropicalis* apresentando diferentes perfis de sensibilidade. SF: cepas sensíveis ao fluconazol. PSF: cepas pouco sensíveis ao fluconazol. NSF: cepas não-sensíveis ao fluconazol. Nenhuma diferença significativa foi observada. O resultado para cada cepa é dado como valores médios obtidos de experimentos em triplicata..... 94

Figura 14. Análise representativa do efluxo de rodamina 6G em células de *Candida tropicalis* utilizando citometria de fluxo. A aquisição do fluorocromo pelas células foi quantificada após incubação de células de *C. tropicalis* com rodamina 6G por 20 min após um período de privação de energia (barras e linhas pretas). O efluxo foi avaliado quantificando a fluorescência residual das células após incubação adicional por 30 min na presença de glicose (barras e linhas cinza). A e D: cepa representativa sem atividade de efluxo significativa. B e E: cepa representativa apresentando atividade de efluxo aumentada. Uma cepa de *C. parapsilosis* resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo foi utilizada como controle positivo (C e F). * indica diferença significativa ($p<0,05$). Cada barra representa média ± desvio padrão de leituras em triplicata. 96

Figura 15. Níveis de expressão relativa de *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* de cepas de *Candida tropicalis* apresentando diferentes perfis de sensibilidade ao fluconazol. SF: cepas sensíveis ao fluconazol ($CIM \leq 0,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$). PSF: cepas pouco sensíveis ao fluconazol (CIM de 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$). NSF: cepas não-sensíveis ao fluconazol ($CIM \geq 4 \text{ } \mu\text{g/mL}$). O nível relativo de expressão de cada gene é calculado relativo às médias de 6 cepas controles (3 cepas veterinárias e 3 cepas humanas), ajustado para 1,0. Círculos cheios representam cepas individuais de *C. tropicalis*. Barras mostram a média dos níveis de expressão gênica de cada grupo. Diferença significativa ($p<0,05$) apenas entre o grupo NSF e o grupo SF para todos os genes. 97

Figura 16. Média ± desvio padrão representativo da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para o estabelecimento da curva de tempo de morte de *Candida tropicalis* após exposição à prometazina a 32 µg/mL (quadrado), 64 µg/mL (losango), 128 µg/mL (círculo) e 256 µg/mL (×). O controle de crescimento sem droga também foi adicionado para fins comparativos (triângulo)..... 100

Figura 17. Imagens de microscopia confocal do biofilme maduro de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de prometazina. Note uma diminuição na espessura do biofilme e no número de células viáveis em todas as concentrações testadas. Um aumento da biomassa é observado nas concentrações, entretanto nenhuma célula viável é detectada. A: controle sem tratamento; B: 32 µg/mL; C: 64 µg/mL; D: 128 µg/mL; E: 256 µg/mL; F: 512 µg/mL; G: 1024 µg/mL; H: 2048 µg/mL..... 103

Figura 18. Imagens Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de prometazina. (A) controle sem tratamento; (B) 32 µg/mL, note a redução no número de células e perda da estrutura do biofilme; (C) 64 µg/mL; (D) 128 µg/mL, um aumento da biomassa é observado; (E) 256 µg/mL, observa-se um aumento no número de células morfologicamente alteradas (células com aspecto murcho, setas) e biofilme fragmentado e desorganizado; (F) 512 µg/mL; (G) 1024 µg/mL, observa-se um aumento na biomassa e presença de restos de matriz; (H) 2048 µg/mL. 104

Figura 19. Análise da captação e efluxo da rodamina por células de *Candida tropicalis* após pré-exposição à prometazina. A rodamina 6G é um substrato para transportadores do tipo ABC. Aumento da média de intensidade de fluorescência indica uma alta concentração de corante dentro das células, significando baixa atividade de efluxo. A captação do fluorocromo foi realizada incubando as células de *C. tropicalis* com rodamina 6G após privação de energia (privação de glicose, barras pretas) e após incubação de 1 h (durante privação) com três concentrações de prometazina (PRM, µg/mL). Subsequentemente, células privadas de energia não expostas (controle) e células expostas à prometazina (PRM) foram incubadas com glicose por 30 min. (A) cepa resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo. (B) cepa resistente a azólicos sem atividade de efluxo. (C) cepa sensível a azólicos. (D) cepa de *C. parapsilosis* resistente que apresenta atividade de efluxo, utilizada como controle positivo. * indica diferença significativa ($p<0,05$) entre a intensidade fluorescência de células em

privação e do controle sem exposição à droga. ** indica diferença significativa ($p<0,05$) entre a intensidade de fluorescência das células expostas à prometazina e do controle sem exposição. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata. 105

Figura 20. Análise representativa das alterações no tamanho relativo (FSC, *forward scatter*) e granulosidade relativa (SSC, *side scatter*) de células de *Candida tropicalis* após 4 h de exposição à prometazina (PRM), fluconazol (FLC) e anfotericina B (AMB). (A) controle não tratado; (B) FLC 64 μ g/mL; (C) AMB 2 μ g/mL; (D) PRM 64 μ g/mL; (E) PRM 128 μ g/mL; (F) PRM 256 μ g/mL. Linhas tracejadas representam controle sem tratamento (A). Redução na fluorescência captada indica redução no tamanho relativo (FSC) e/ou granulosidade relativa (SSC) celular. Observa-se uma redução no tamanho e granulosidade celular relativa quando as células são expostas à prometazina e anfotericina B, o qual é comum para células que estão morrendo..... 106

Figura 21. Análise representativa da intensidade de fluorescência média do iodeto de propídio no interior de células de *Candida tropicalis* após 2 h (A) e 4 h (B) de incubação com a prometazina. Controle: células não expostas à droga. FLC: fluconazol. AMB: anfotericina B. PRM: prometazina. Aumento da intensidade de fluorescência indica dano na membrana plasmática. * indica diferença significativa quando comparado com o controle sem tratamento. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata de uma cepa representativa..... 107

Figura 22. Intensidade de fluorescência média da rodamina 123 em células de *Candida tropicalis* após 2 h (A) e 4 h (B) de incubação com a prometazina. Controle: células não expostas à droga. FLC: fluconazol. AMB: anfotericina B. PRM: prometazina. Diminuição da fluorescência da rodamina 123 indica despolarização e desenergização da mitocôndria e deficiência da função mitocondrial. * indica diferença significativa quando comparado com o controle sem tratamento. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata por cepa testada (n=3). 107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mutações e superexpressão de genes relacionados à resistência a derivados azólicos descritos em cepas de <i>Candida tropicalis</i>	53
Quadro 2. Origem das cepas de <i>Candida tropicalis</i> utilizadas neste estudo.....	64
Quadro 3. Pontos de corte clínicos (<i>clinical breakpoints</i>) e valores de corte epidemiológicos (<i>epidemiological cutoff values</i>) para <i>Candida tropicalis</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de fatores de virulência <i>in vitro</i> de cepas de <i>Candida tropicalis</i> de origem humana e veterinária.....	84
Tabela 2. Sensibilidade a antifúngicos <i>in vitro</i> de cepas de <i>Candida tropicalis</i> de origem humana e veterinária.....	86
Tabela 3. Sensibilidade a antifúngicos de biofilmes maduros de cepas de <i>Candida tropicalis</i> de origem humana e veterinária.....	88
Tabela 4. Concentração inibitória minima (CIM) da prometazina e das drogas antifúngicas isoladas ou em combinação com a prometazina frente a <i>Candida tropicalis</i>	99
Tabela 5. Concentração inibitória minima para células sésseis (CIMS) da prometazina e das drogas antifúngicas isoladas ou em combinação com a prometazina frente ao biofilme maduro de <i>Candida tropicalis</i>	101
APÊNDICE A – Tabela 1 – Distribuição das cepas de <i>C. tropicalis</i> por espécie animal, sítio de isolamento, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – *ATP-binding cassette*

aids – *Acquired immunodeficiency syndrome*

AMB – Anfotericina B

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

BHI - *Brain heart infusion*

BSA - *Bovine serum albumin*

CAS – Caspofungina

cDNA – *Complementary deoxyribonucleic acid*

CDR – *Candida drug resistance*

CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica

CFM – Concentração fungicida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CIMS – Concentração inibitória mínima de células sésseis

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

CNA – *Candida* *não-albicans*

DMSO – Dimetilsufóxido

DO – Densidade óptica

EUA – Estados Unidos da América

FLC – Fluconazol

HIV – *Human immunodeficiency virus*

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

IP – Iodeto de propídeo

ITC – Itraconazol

KOH – Hidróxido de potássio

MDR – *Multiple drug resistance*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MOPS – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

MSF – *Major facilitator superfamily*

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NSF – Não-sensível ao fluconazol

NWT – *Non-wild-type*

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PRM – Prometazina

PSF – Pouco sensível ao fluconazol

qPCR – *Quantitative polymerase chain reaction*

SF – Sensível ao fluconazol

R123 – Rodamina 123

R6G – Rodamina 6G

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – *Reverse transcription polimerase chain reaction*

UFC – Unidade formadora de colônia

VRC – Voriconazol

WT – *Wild-type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 O gênero <i>Candida</i>	25
2.2 <i>Candida tropicalis</i>	28
2.2.1 <i>Infecções causadas por C. tropicalis</i>	31
2.2.1.1 <i>Modelos experimentais de infecção</i>	32
2.3 Fatores de virulência de <i>C. tropicalis</i>	35
2.3.1 <i>Produção de fator hemolítico</i>	38
2.3.2 <i>Produção de enzimas hidrolíticas</i>	41
2.3.3 <i>Formação de biofilme</i>	45
2.4 Resistência a antifúngicos	47
2.4.1 <i>Mecanismos de resistência em C. tropicalis</i>	50
2.4.1.1 <i>Azólicos</i>	50
2.4.1.2 <i>Outras drogas antifúngicas</i>	54
2.4.2. <i>Resistência em biofilme</i>	56
2.5 Compostos que apresentam sinergismo com drogas antifúngicas	57
3 HIPÓTESES	61
4 OBJETIVOS	62
4.1 Objetivo geral	62
4.2 Objetivos específicos	62
5 MATERIAL E MÉTODOS	63
5.1 Local do estudo	63
5.2 Microrganismos	63
5.3 Desenho experimental	63
5.4 Produção de fatores de virulência por <i>C. tropicalis</i>	66
5.4.1 <i>Produção de fosfolipases</i>	66
5.4.2 <i>Produção de proteases</i>	66
5.4.3 <i>Atividade hemolítica</i>	67
5.4.4 <i>Formação de biofilme</i>	67
5.5 Ensaio de patogenicidade utilizando <i>Caenorhabditis elegans</i>	68
5.6 Teste de sensibilidade antifúngica	69
5.6.1 <i>Drogas antifúngicas</i>	69

5.6.2 Inóculo fúngico	69
5.6.3 Ensaio de microdiluição das células planctônicas	70
5.6.4 Ensaio de microdiluição das células sésseis	71
5.6.5 Quantificação do biofilme após exposição à caspofungina	72
5.6.5.1 Análise da viabilidade e biomassa	72
5.6.5.2 Microscopia confocal de varredura a laser	73
5.6.5.3 Microscopia eletrônica de varredura	73
5.6 Análise dos esteróis totais.....	74
5.7 Análise do efluxo de rodamina 6G	75
5.8 RT-PCR quantitativo em tempo real.....	75
5.8.1 Extração e quantificação do RNA	75
5.8.2 Transcriptase reversa	76
5.8.3 PCR quantitativo em tempo real	76
5.9 Teste de sensibilidade frente a antifúngicos e a prometazina.....	77
5.9.1 Ensaio de microdiluição das células planctônicas	77
5.9.2 Ensaio de microdiluição das células sésseis	78
5.9.3 Avaliação da interação entre prometazina e drogas antifúngicas	78
5.10 Curva de tempo de morte	79
5.11 Microscopia confocal de varredura a laser	79
5.12 Microscopia eletrônica de varredura.....	80
5.13 Análise do efeito da prometazina sobre a atividade de bomba de efluxo.....	80
5.14 Análise do efeito da prometazina sobre o tamanho/granulosidade celular	81
5.15 Análise do efeito da prometazina sobre a integridade da membrana	81
5.16 Mensuração do potencial transmembranar mitocondrial	81
5.17 Análise estatística.....	82
6 RESULTADOS	83
6.1 Fatores de virulência	83
6.1.1 Produção de enzimas hidrolíticas	83
6.1.2 Atividade hemolítica	83
6.1.3 Formação de biofilme	84
6.2 Ensaio de patogenicidade utilizando <i>Caenorhabditis elegans</i>	84
6.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos	85
6.3.1 Perfil de sensibilidade de células planctônicas	85
6.3.2 Perfil de sensibilidade de células sésseis	87

6.4 Análise do biofilme após exposição à caspofungina	89
6.4.1 Quantificação da viabilidade celular e biomassa	89
6.4.2 Análise da estrutura do biofilme	89
6.5 Análise dos esteróis totais.....	94
6.6 Análise do efluxo de rodamina 6G	95
6.7 Expressão de <i>CDR1</i>, <i>MDR1</i> e <i>ERG11</i>	95
6.8 Teste de sensibilidade de células planctônicas à prometazina.....	98
6.9 Interação entre prometazina e drogas antifúngicas	98
6.10 Curva de tempo de morte	100
6.11 Teste de sensibilidade de células sésseis à prometazina e interação entre drogas.	101
6.12 Ultraestrutura do biofilme após incubação com prometazina	102
6.13 Efeito da prometazina sobre a atividade de bomba de efluxo	102
6.14 Efeito da prometazina sobre a morfologia celular, integridade da membrana e atividade mitocondrial	106
7 DISCUSSÃO	108
8 CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICE	151
Apêndice A	152
Apêndice B	154
Apêndice C	155

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* estão entre os principais patógenos fúngicos causadores de infecções invasivas em pacientes humanos imunocomprometidos. Esses microrganismos são considerados comensais, colonizando cerca de 50% dos indivíduos de uma população, em sítios como a pele e tratos gastrointestinal e genitourinário. Espécies de *Candida* também são isoladas do ambiente e são componentes da microbiota de diversas espécies animais, podendo causar infecções nestes quando há fatores pré-disponentes.

Candida albicans é a espécie mais comumente isolada nos casos de infecções invasivas. Contudo, nos últimos anos, houve um aumento na taxa de isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA). Entre essas espécies, *Candida tropicalis* tem ganhado destaque, sendo habitualmente a espécie de CNA mais isoladas de quadros de candidemia e candidúria, apresentando altas taxas de mortalidade. Além disso, essa espécie também é responsável por infecções em outras espécies animais, como gatos, cães e ruminantes.

Estudos utilizando modelos animais não-humanos e cultura de tecidos humanos já mostraram a alta patogenicidade desta espécie fúngica. Entre os modelos utilizados, podem ser destacados modelos murinos e animais invertebrados. A utilização de animais invertebrados para o estudo da virulência e patogenicidade de espécies fúngicas apresenta, quando comparada a modelos murinos, uma alternativa que demonstra menor custo, rapidez e simplicidade no uso.

Os fatores de virulência apresentados por *C. tropicalis* são importantes para a patogenicidade deste microrganismo. Fatores de virulência já descritos para *C. tropicalis* incluem a adesão a células do hospedeiro, o pleomorfismo, a secreção de enzimas hidrolíticas, como fosfolipases e proteases, e a atividade hemolítica. Esses fatores são importantes no estabelecimento da infecção, contribuindoativamente para a invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro.

A formação de biofilmes também pode ser considerada um fator de virulência, sendo a principal causa de infecções relacionadas a dispositivos médicos. *C. tropicalis* exibe a capacidade de se associar em biofilme tanto em superfícies abióticas como bióticas, como os tecidos do hospedeiro. Essas infecções são difíceis de tratar uma vez que os biofilmes apresentam resistência aumentada a agentes antifúngicos e proteção contra as defesas do hospedeiro.

Outro fator importante, com impacto direto no tratamento de infecções por *C. tropicalis*, é o aumento de cepas apresentando resistência a drogas antifúngicas,

principalmente aos azólicos. A resistência a derivados azólicos em *C. tropicalis* já foi descrita tanto em cepas isoladas de humanos como isoladas de animais e do ambiente. Essa resistência está relacionada, em *C. tropicalis*, ao aumento da expressão de genes que codificam a enzima alvo (lanosterol 14 α -demetilase) e/ou bombas de efluxo, bem como mutações no gene *ERG11*. A resistência *in vitro* é um fator que pode contribuir para falhas no tratamento de infecções por *C. tropicalis*.

Sendo assim, diante da emergência de *C. tropicalis* como agente de infecções sistêmicas e diante do aparecimento de fenótipos resistentes aos antifúngicos clássicos utilizados na clínica, torna-se necessário o estudo de compostos que apresentam ação antifúngica ou que apresentem sinergismo com os antifúngicos já utilizados na clínica, potencializando a atividade inibitória destes contra células fúngicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (LEVETIN et al., 2016), comprehende fungos leveduriformes ubíquos que podem ser encontrados tanto no ambiente como sendo parte da microbiota de humanos e de outras espécies animais (CORDEIRO et al., 2015a; GOUBA; DRANCOURT, 2015; VADKERTIOVÁ; SLÁVIKOVÁ, 2006). Nos seres humanos, espécies de *Candida* são encontradas como comensais da pele e dos tratos gastrointestinal, geniturinário e respiratório (KRAUSE et al., 2016; SAFAVIEH et al., 2017). Entretanto, quando as defesas do hospedeiro são enfraquecidas, essas leveduras podem passar do estado de comensalismo para um estado parasitário, causando desde infecções da pele e mucosa até infecções invasivas graves (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015).

São conhecidas mais de 150 espécies de *Candida*, sendo que cerca de 15 destas espécies são mais frequentemente isoladas de casos de candidíase (YAPAR, 2014). Entre as espécies de *Candida* que causam infecções, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* estão implicadas em 95% dos casos de candidíase humana (SAFAVIEH et al., 2017; YAPAR, 2014). Essas leveduras também são encontradas causando infecções em outras espécies animais (BIEGANSKA; DARDZINSKA; DWORECKA-KASZAK, 2014; BRITO et al., 2009b).

Como resultado do aumento da expectativa de vida de pacientes oncológicos, portadores do HIV e transplantados e dos avanços nos tratamentos em unidades de terapia intensiva (UTI), o número de indivíduos suscetíveis a infecções fúngicas oportunistas apresentou um aumento nos últimos anos (YAPAR, 2014). *Candida* é o principal patógeno fúngico causando infecções nosocomiais em humanos, principalmente em pacientes admitidos nas UTIs, sendo estimados cerca de 46000 casos de infecções nosocomiais invasivas por ano na América (GARBEE; PIERCE; MANNING, 2017; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

Os fatores de risco associados a infecções por *Candida* spp. são doenças de base e imunosupressivas, transplante de células-tronco hematopoiéticas ou de órgãos sólidos, uso de antibióticos ou corticosteróides de amplo espectro, intervenções invasivas, quimioterapia agressiva, alimentação parenteral, próteses internas, hospitalização prolongada e hemodiálise (ANTINORI et al., 2016; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016; YAPAR, 2014). Por ser parte da microbiota humana, a maioria das infecções por *Candida* são de origem endógena, o que

explica a alta prevalência desse gênero fúngico em relação a outros patógenos oportunistas (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

As infecções por *Candida* em seres humanos variam desde doenças mais superficiais em mucosas, como candidíase orofaríngea, esofágica, oral ou vulvovaginal, até infecções invasivas severas (DONDERS; SOBEL, 2017; MILLSOP; FAZEL, 2016; PAPPAS, 2006). Entre as candidíases invasivas, as mais comuns são infecções da corrente sanguínea (candidemia), do trato urinário (candidúria), endocardite, infecção disseminada, osteomielite, infecções do sistema nervoso central, candidíase intra-abdominal e endoftalmite (ALFOUZAN; DHAR, 2017; ANTINORI et al., 2016; PAPPAS, 2006). Em animais não-humanos, *Candida* spp. são responsáveis por infecções no trato urinário, infecções no trato gastrointestinal, endoftalmites, lesões cutâneas e infecções sistêmicas de diferentes espécies animais (BRADFORD et al., 2013; DOYLE et al., 2013; JUNIANTITO et al., 2009; KRAMER et al., 2008; LINEK, 2004; OZAWA et al., 2005).

Em humanos, candidemia é a apresentação clínica mais frequente entre as candidíases invasivas, podendo ou não estar associada à invasão de tecidos profundos (ANTINORI et al., 2016). *Candida* spp. é o gênero fúngico mais isolado de infecções da corrente sanguínea, sendo o quarto microrganismo mais isolado em culturas nos EUA e o sexto na Europa (DELALOYE; CALANDRA, 2014), sendo a causa de 8% a 10% das infecções da corrente sanguínea no âmbito hospitalar na América (YAPAR, 2014). Candidíase invasiva está associada com altas taxas de morbidade e mortalidade, esta última atingindo até 60% dos casos (DELALOYE; CALANDRA, 2014).

Candida albicans é a principal espécie do gênero isolada de infecções em humanos ao redor do mundo, sendo detectada em 38 a 70% dos casos analisados em estudos baseados em população (GUINEA, 2014). Porém, nos últimos anos, um aumento na incidência de espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) tem sido observado. A incidência de espécies de CNA varia dependendo do perfil do paciente acometido e da região geográfica estudada (QUINDÓS, 2014), além do uso de terapia antifúngica profilática, que pode aumentar os casos de infecção conhecidos como *breakthrough* por espécies com baixa sensibilidade (VUICHARD et al., 2014).

Quanto aos fatores de risco associados a infecções em humanos por espécies de CNA, *C. glabrata* é frequentemente associada a infecções orais em pacientes idosos e portadores de prótese dentária (WHIBLEY; GAFFEN, 2015) e candidemia em pacientes com idade avançada (GLÖCKNER; CORNELY, 2015). Neonatos, transplantados e pacientes recebendo nutrição parenteral apresentam maior risco de infecção por *C. parapsilosis* comparada a

outras espécies de *Candida* (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Pacientes que receberam células-tronco são suscetíveis à infecção por *C. krusei*, provavelmente pelo uso difundido de azólicos nesse cenário (GUINEA, 2014). *Candida tropicalis* é causa comum de infecções nas UTIs e em pacientes neutropênicos (TURNER; BUTLER, 2014).

Nos EUA e no norte da Europa, *C. glabrata* é a espécie de CNA mais prevalente causando infecções sistêmicas, enquanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies mais prevalentes na América Latina e na Ásia (GONÇALVES et al., 2016; GUINEA, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2016). No Brasil, *C. albicans* é a principal causa de candidemia, seguido por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (DOI et al., 2016; NUCCI et al., 2010), sendo a espécie prevalente dependente da região e do paciente estudado.

Poucos são os relatos sobre a epidemiologia de *Candida* spp. no Nordeste brasileiro. Um estudo em hospitais terciários de Recife mostrou que *C. tropicalis* foi a espécie de CNA mais isolada de diferentes quadros infeciosos (HINRICHSEN et al., 2009), enquanto em Fortaleza, *C. parapsilosis* foi a espécie mais isolada de casos de candidíase em um hospital terciário (MEDRANO et al., 2006). *C. tropicalis* foi a espécie de CNA mais isolada da mucosa oral de pacientes HIV positivo em um hospital em São Luiz, Maranhão (TERÇAS et al., 2017).

Na clínica humana, uso de agentes antifúngicos também apresenta um impacto na distribuição de *Candida* spp. A exposição prévia ao fluconazol ou a caspofungina é um fator de risco para o desenvolvimento de infecções da corrente sanguínea por *C. glabrata* e *C. krusei* (GONÇALVES et al., 2016). Infecções *breakthrough* por *C. glabrata* são comumente observadas em pacientes recebendo tratamento profilático com azólicos (GLÖCKNER; CORNELY, 2015), mais especificamente o fluconazol. Já o uso de equinocandinas é associado ao desenvolvimento de infecções *breakthrough* por *C. parapsilosis* (CUERVO et al., 2016). Além disso, nos últimos anos, um aumento nos casos de candidemia por cepas resistentes de espécies consideradas primariamente sensíveis aos azólicos vem sendo notada, incluindo cepas das espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (GONÇALVES et al., 2016).

Assim como observado na clínica humana, as espécies de *Candida* podem sair do estado comensal e causar infecções em animais não-humanos quando há comprometimento das barreiras físicas e imunológicas do hospedeiro (SPANAMBERG et al., 2009). Entre os fatores pré-disponentes para a infecção por *Candida* em animais não-humanos estão a idade do animal, a presença de doenças auto-imunes, neoplasias, antibioticoterapia, uso de dispositivo médico implantado, uso de glicocorticoides, *diabetes mellitus* e administração de nutrição parenteral (BRADFORD et al., 2013; BRITO et al., 2009b; PRESSLER et al., 2003).

Ademais, animais malnutridos em cativeiro, que estão em uso de antibióticos, mantidos em condições sanitárias inadequadas ou que passam por estresse contínuo também estão suceptíveis a infecções fúngicas oportunistas causadas por *Candida* spp. (VIEIRA; COUTINHO, 2009).

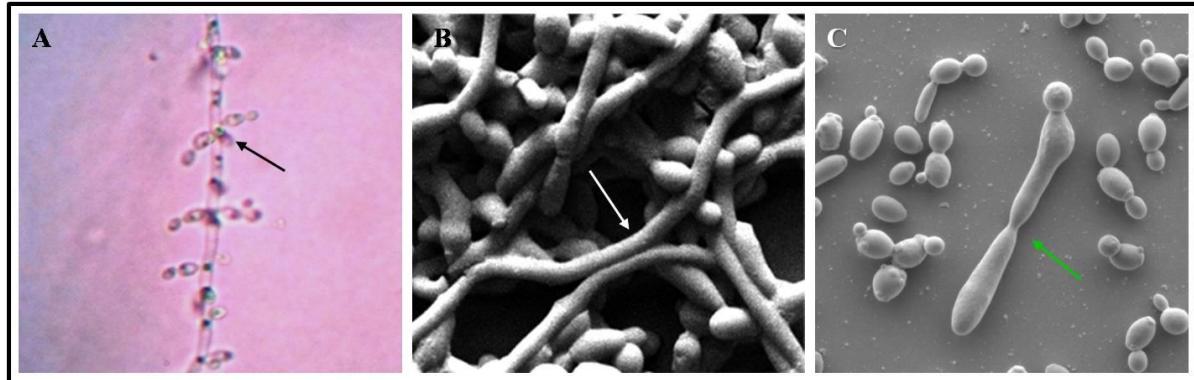
Na clínica veterinária, *C. albicans* é a principal espécie de *Candida* isolada de diferentes quadros infeciosos, como ceratite (LEDBETTER; IRBY; KIM, 2011), infecção muco-cutânea (ZLOTOWSKI et al., 2006), dermatite e otite externa (BRITO et al., 2007), infecções do trato urinário (JIN; LIN, 2005; PRESSLER et al., 2003), infecções do trato gastrintestinal e peritonite (BRADFORD et al., 2013; RIPPON; ALLEY; CASTRO, 2010) e infecções sistêmicas (KRAMER et al., 2008; REILLY; PALMER, 1994). Entre as espécies de CNA associadas a infecções em animais não-humanos, as mais isoladas são *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa* (BRADFORD et al., 2013; BRITO et al., 2007; JIN; LIN, 2005; PRESSLER et al., 2003). Porém, os dados referentes a infecções por *Candida* na clínica veterinária são escassos quando comparados com os da clínica humana, sendo que, na maioria das vezes, a identificação da espécie fúngica é feita apenas ao nível de gênero.

2.2 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis, descoberta em 1910 pelo patologista e bacteriologista italiano Aldo Castellani e primeiramente identificada como *Oidium tropicale* (NEGRI et al., 2012), é uma levedura diploide pleomórfica, apresentando-se tanto na forma de blastoconídios em brotamento como na forma de pseudo-hifa (DATTA et al., 2016) (Figura 1). *C. tropicalis* pode apresentar a capacidade de formar hifas verdadeiras (Figura 1) (JIANG et al., 2016a; LACHANCE et al., 2011; WU et al., 2016), porém não apresenta positividade no teste do tubo germinativo quando na presença de soro (NEGRI et al., 2012). Além disso, esta espécie também é capaz de apresentar variabilidade fenotípica (*switching*), apresentando colônias que variam do fenótipo branco para opaco (MANCERA et al., 2015).

Esta espécie de levedura pertence a um clado monofilético de fungos ascomicetos que traduzem o códon CTG como serina ao invés de leucina denominado “clado *Candida*” (BUTLER et al., 2009). Aproximadamente 6 pares de cromossomos homólogos são encontrados em *C. tropicalis* (BUTLER et al., 2009; CHAI; DENNING; WARN, 2010). O tamanho do genoma desta espécie é aproximadamente 15 Mb, contendo cerca de 6.400 sequências codificadoras (BUTLER et al., 2009; LI et al., 2014). Um total de 2.743 proteínas

diferentes produzidas por *C. tropicalis* já foram identificadas, o que representa em torno de 44% dos genes codificantes previstos *in silico*. Do lisado celular, foram identificadas 2.591 proteínas, enquanto 152 proteínas secretadas por *C. tropicalis* foram identificadas apenas na análise do meio de cultura condicionado (DATTA et al., 2016).



FONTE: CEMM, 2013; 2016.

Figura 1. Micromorfologia de *Candida tropicalis*. (A) Microcultivo de *C. tropicalis* em ágar fubá acrescido de Tween 80 analisado em microscópio óptico de campo claro. Observa-se a presença de blastoconídios em cadeias simples ou ramificadas brotando, geralmente aos pares, a partir da pseudo-hifa (seta preta). (B) e (C) Microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis* apresentando vários blastoconídios, filamento (hifa, seta branca) e pseudo-hifa caracterizada por blastoconídios alongados em brotamento (seta verde). Aumento: (A) 400x, (B) 8000x e (C) 3000x.

Embora não apresente forma sexuada conhecida, células diploides de *C. tropicalis* podem unir-se para formar células tetraplóides, as quais, se induzidas, podem sofrer perda cromossômica para regenerar a forma diploide, a qual pode recomeçar o ciclo parassexual (SEERVAI et al., 2013). Uma das vantagens potenciais do ciclo parassexual é que não há produção de esporos sexuados, os quais são, geralmente, altamente antigênicos (SHERWOOD; BENNETT, 2009).

Quanto ao seu habitat, *C. tropicalis* é encontrada associada a diferentes nichos. Esta levedura já foi isolada do ambiente em amostras de solo (YANG et al., 2012) e da superfície de frutas vendidas em supermercados (LO et al., 2017). *C. tropicalis* também é isolada de alguns tipos de bebidas e comidas fermentadas, demonstrando a utilização dessa levedura na produção de alimentos (AMOA-AWUA et al., 1997; OBINNA-ECHEM; KURI; BEAL, 2014; RAMOS et al., 2015).

Wang et al. (2012) isolaram uma cepa de *C. tropicalis* a partir do lodo de esgoto utilizando meio contendo apenas fenol como fonte de carbono. Além disso, esta espécie já foi

isolada da água de cativeiro de mamíferos aquáticos (TAKAHASHI et al., 2010) e de fezes de aves coletadas em região urbana (LORD et al., 2010).

Em animais não humanos, *C. tropicalis* já foi isolada como parte da microbiota do trato digestivo de diferentes insetos (SUH; NGUYEN; BLACKWELL, 2007) e de camarão-da-amazônia (BRILHANTE et al., 2011); orofaringe e cloaca de répteis de estimação e em cativeiro (BRILHANTE et al., 2015b; MILDE et al., 2000; NARDONI et al., 2008); orofaringe e cloaca de emas (BRILHANTE et al., 2013), aves de rapina (BRILHANTE et al., 2012) e calopsitas (SIDRIM et al., 2010) e cloaca de aves migratórias (CAFARCHIA et al., 2006); mucosas e pele de mamíferos aquáticos em cativeiro (SIDRIM et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2010), intestino de pandas (TUN et al., 2014), rúmen de cabra (PRIJI et al., 2013), ducto nasolacrimal e conjuntiva de cavalos (BRILHANTE et al., 2015a, 2017), leite bovino (LAGNEAU; LEBTAHI; SWINNE, 1996), intestino de gorilas (HAMAD et al., 2014) e pele, mucosa, orelha e trato genital de cães (BRITO et al., 2007, 2009a; YURAYART et al., 2011).

Em relação ao hospedeiro humano, *C. tropicalis* já foi isolada, em indivíduos saudáveis, colonizando o trato genital feminino e masculino de adultos e idosos (ARIDOĞAN et al., 2005; BENTUBO et al., 2015), a pele (OKSUZ et al., 2007), a cavidade oral (BRUSCA et al., 2014; SHETH et al., 2016), o trato respiratório (OKSUZ et al., 2007) e o trato gastrintestinal (BIASOLI; TOSELLLO; MAGARÓ, 2002; MADEEHA; IKRAM; IMRAN, 2016; UKHANOVA et al., 2014). Ademais, *C. tropicalis* também já foi reportada como colonizando o trato respiratório de pacientes imunocompetentes recebendo ventilação mecânica por mais de dois dias (AZOULAY et al., 2006), pacientes com sequela de tuberculose ou apresentando doença pulmonar obstrutiva crônica (BISWAS et al., 2010).

Em humanos, quando há um enfraquecimento das defesas do hospedeiro, espécies fúngicas comensais, como *C. tropicalis*, podem tornar-se patógenos oportunistas, causando diferentes tipos de infecções, podendo atingir altos níveis de mortalidade (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015). O mesmo pode ocorrer com diferentes espécies animais, nos quais as leveduras podem sair do estado comensal e causar infecções em decorrência do comprometimento das barreiras físicas e imunológicas do hospedeiro (SPANAMBERG et al., 2009).

2.2.1 Infecções causadas por *C. tropicalis*

Infecções por *C. tropicalis* podem ter origem endógena, quando o fungo já se encontrava colonizando o hospedeiro, ou de forma exógena, por meio do contato com pessoas ou fômites contaminados, sendo a forma endógena a principal via de infecção (NEGRI et al., 2012). Em pacientes humanos, os principais fatores predisponentes relacionados a infecções por *C. tropicalis* são doenças hematológicas, como leucemia aguda, terapia anti-neoplásica, infecção pelo HIV, neutropenia e transplante de órgãos (CHAI; DENNING; WARN, 2010; SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015).

C. tropicalis já foi reportada causando desde infecções superficiais e localizadas até infecções invasivas e disseminadas. Entre os quadros clínicos já relatados em seres humanos, podem ser citados onicomicose (ARRUA et al., 2015), candidíase cutânea primária (SCHRAM et al., 2014), candidíase ocular (TANAKA et al., 2016), cistite (WANG et al., 2015), empiema pleural (SRINIVASNAKSHATRI et al., 2014), endocardite (FESHARAKI et al., 2013), peritonite (GIACOBINO et al., 2016), artrite (GAMALETSOU et al., 2016) e meningite (CECCARELLI et al., 2016).

Infecções por *C. tropicalis* em pacientes humanos considerados imunocompetentes ou previamente saudáveis também já foram reportadas. *C. tropicalis* já foi isolada causando perfuração gástrica aguda em uma paciente jovem previamente saudável (FAURE-FONTENLA et al., 1997). Pacientes idosos que não apresentam imunossupressão ou alguma doença prévia também podem apresentar infecção por *C. tropicalis*, como esofagite e pneumonia (HAMILTON; LOCKHART; CRAIN, 2015; SHARMA et al., 2015).

C. tropicalis é uma das espécies de CNA mais frequentemente isoladas de infecções sanguíneas (candidemia) e do trato urinário (candidúria), sendo a primeira ou segunda CNA mais isolada (DOI et al., 2016; KULLBERG et al., 2017; NUCCI et al., 2013; SILVA et al., 2007; YISMAW et al., 2013). A frequência de isolamento desta espécie causando diferentes quadros de candidíase depende da região e da população de estudo. Porém, essa espécie vem sendo considerada a espécie mais frequente isolada de candidíases na região Ásia-Pacífico, Brasil e Europa (DOI et al., 2016; NEGRI et al., 2012; NUCCI et al., 2010).

No Brasil, em um hospital terciário do Estado do Paraná, *C. tropicalis* foi a espécie mais isolada de mais de 100 casos de candidemia, totalizando 30,5% dos isolados (COSTA et al., 2014). Um estudo multicêntrico realizado por Doi et al. (2016) mostrou que *C. tropicalis* foi a terceira espécie de *Candida* mais isolada de quadros de candidemia,

causando cerca de 15% das infecções estudadas. Um estudo prospectivo realizado por Colombo et al. (2006) em onze centros médicos brasileiros apontou que *C. tropicalis* representava cerca 21% das causas de candidemia. Outros estudos realizados no Brasil também demonstram o frequente isolamento de *C. tropicalis* em infecções de corrente sanguínea e urinária (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; DE FREITAS et al., 2013; HINRICHSEN et al., 2009; SILVA et al., 2007; XAVIER; CHANG, 2008).

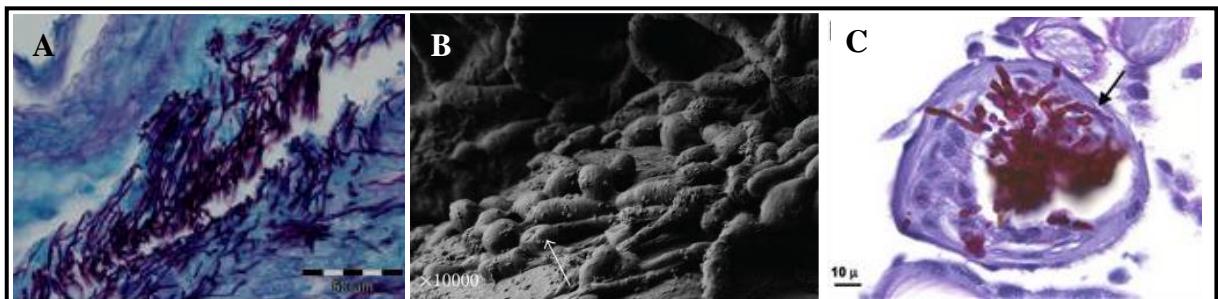
C. tropicalis também já foi relatada como causa de infecções em diferentes espécies animais, sendo frequentemente isolada de mastite clínica e sub-clínica em bovinos (SANTOS; MARIN, 2005; DWORECKA-KASZAK et al., 2012; KRUKOWSKI et al., 2001; ZARAGOZA et al., 2011). Esta espécie também já foi relatada causando quadros diarréicos em bezerros (ELAD et al., 1998), gastroenterite em quelônios (ZWART; BUITELAAR, 1980), cistite em gatos e cachorros (PRESSLER et al., 2003) e infecções cutâneas e do trato urinário de cães (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016a; MORETTI et al., 2006; OKABAYASHI et al., 2009). Além disso, Kuttin et al. (1975) demonstraram o estabelecimento de infecção por *C. tropicalis* no trato respiratório de perus que receberam água e alimentos suplementados com antibacterianos. Esses achados mostram a importância dessa espécie de levedura também na Medicina Veterinária, embora os relatos sejam escassos.

2.2.1.1 Modelos experimentais de infecção

Alguns trabalhos utilizando diferentes modelos de infecção experimental mostraram a alta capacidade de invasão e disseminação de *C. tropicalis*. Um dos modelos animais mais utilizados é a infecção em camundongos, imunossuprimidos ou não (Figura 2). Um estudo apontou que 60-70% das cepas de *C. tropicalis* foram capazes de causar infecções letais após 28 dias quando inoculados em camundongos imunocompetentes (BISTONI et al., 1984). Já Fromling, Abruzzo e Giltinan (1987) observaram que camundongos neutropênicos eram mais suscetíveis à infecção sistêmica por *C. tropicalis* do que camundongos diabéticos ou normais, apontando o rim como principal órgão alvo para a infecção disseminada.

Em outro estudo, *C. tropicalis* foi capaz de invadir a mucosa do trato gastrointestinal de camundongos imunocomprometidos e se disseminar rapidamente 30 minutos após a inoculação no animal (DE REPENTIGNY; PHANEUF; MATHIEU, 1992). *C. tropicalis* apresentou maior mortalidade em camundongos quando comparada a outras espécies de CNA, sendo isolada dos rins de todos os camundongos inoculados (ARENDRUP; HORN; FRIMODT-MØLLER, 2002).

Embora o modelo murino seja o mais comumente utilizado para estudar infecções fúngicas, restrições éticas e logísticas retardam o entendimento no campo da micologia, sendo necessários modelos alternativos para melhor compreender os mecanismos de infecção por patógenos fúngicos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). Além disso, faz-se necessária a busca de métodos alternativos para modelos de infecção que permitam resultados mais rápidos, de baixo custo, e que auxiliem na compreensão dos mecanismos de infecção por patógenos fúngicos, bem como o *screening* de novos compostos que possam interferir nos processos de interação parasita-hospedeiro. Visando sobrepujar essas dificuldades, diferentes modelos de infecção vêm sendo propostos para substituir os experimentos utilizando modelos murinos.



FONTE: (A) Chen et al., 2012; (B) Raz-Pasteur, Ullmann e Berdicevsky, 2011; (C) Mesa-Arango et al., 2013

Figura 2. Diferentes modelos de infecção utilizados para estudar a patogenicidade de *C. tropicalis*. (A) Secção histopatológica de rim dissecado de camundongo infectado com *C. tropicalis* corada com ácido periódico-Schiff. (B) Microscopia eletrônica de varredura de células *C. tropicalis* aderidas ao epitélio em modelo ex vivo. A pele está lesada e as leveduras estão “integradas” ao tecido (seta). (C) Secção de tecido, corada com ácido periódico-Schiff, de *Galleria mellonella* infectado por *C. tropicalis* (seta) e tratado com fluconazol. Aumento em A: 40x. Magnificação em B: 10000x. Aumento em C: 100x.

Entre os modelos propostos para o estudo de infecção por fungos patogênicos estão animais invertebrados (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013), ovos de galinha embrionados (JACOBSEN; GROSS; HUBE, 2012) e infecção de tecidos humanos e animais não humanos *ex vivo* (PINNOCK et al., 2017). Raz-Pasteur, Ullmann e Berdicevsky (2011) estudaram a patogênese de cepas de *Candida* em um modelo de infecção utilizando pele normal de coxa *ex vivo*, mostrando a capacidade de adesão de células de *C. tropicalis* a esse tecido (Figura 2).

Modelos invertebrados apresentam menor custo, simplicidade no uso e um tempo de vida curto, sendo ideais em estudos de larga escala. Além disso, muitos aspectos do sistema imune inato são conservados entre invertebrados e mamíferos (ARVANITIS;

GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). Entre os invertebrados utilizados como modelos de infecção por *Candida* spp., podem ser citados a mosca *Drosophila melanogaster* (QUINTIN et al., 2013), o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (ORTEGA-RIVEROS et al., 2017), a larva da mariposa *Galleria mellonella* (FUCHS et al., 2010) e a larva do bicho-dafarinha *Tenebrio molitor* (DE SOUZA et al., 2015).

Utilizando o modelo invertebrado *G. mellonella* (Figura 2), Mesa-Arango et al. (2013) avaliaram a virulência de *C. tropicalis* em diferentes temperaturas, além da eficácia de antifúngicos nesse modelo de infecção, mostrando que *C. tropicalis* foi capaz de matar as larvas de *G. mellonella* tanto a 30 °C como a 37 °C, sendo a temperatura de 37 °C apontada como a temperatura na qual a virulência foi mais evidente.

Morey et al. (2016) utilizaram larvas de *T. molitor*, as quais são susceptíveis à infecção por *C. tropicalis*, para estudar a atividade antifúngica de taninos condensados isolados de *Stryphnodendron adstringens* e os efeitos desses compostos sobre *C. tropicalis*. Nesse trabalho, larvas infectadas por *C. tropicalis*, sem tratamento com taninos, atingiram 100% de mortalidade após 24 h de incubação com o fungo, sendo esse tempo aumentado na presença do tanino testado.

Introduzido pela primeira vez na década de 1960, o nematódeo *C. elegans* é um dos organismos modelos mais importantes no estudo da biologia. Esses invertebrados de 1 mm de comprimento são vermes cilíndricos hermafroditas de vida livre que se alimentam de bactérias (TEOTÓNIO et al., 2017; UNO; NISHIDA, 2016). Devido a sua ampla utilização, várias características genotípicas e fenotípicas deste nematódeo já estão bem elucidadas, sendo seu genoma é totalmente sequenciado, com aproximadamente 20.359 genes codificadores de proteínas, e sua morfologia simples, apresentando 959 células somáticas nos hermafroditas, incluindo 302 neurônios (SUGI, 2016).

O ciclo de vida desse nematódeo é de cerca de três dias, com um tempo de vida de aproximadamente duas semanas. *C. elegans* pode crescer e reproduzir em uma variedade de dietas de bactérias encontradas na microbiota humana, como *Escherichia coli* (ZHANG; HOLDORF; WALHOUT, 2017). O órgão utilizado na alimentação do *C. elegans* é a faringe, um tubo neuromuscular que liga a boca ao intestino do verme e responsável por captar bactérias, concentrá-las e levar o alimento para ser triturado no moedor (DAVIS et al., 2017).

O *C. elegans* é utilizado para o estudo de vários processos fisiológicos, como o envelhecimento (UNO; NISHIDA, 2016), a morfogênese embrionária (VUONG-BRENDER; YANG; LABOUESSE, 2016), o comportamento alimentar (LEMIEUX; ASHRAFI, 2015) e a regulação de doenças neurodegenerativas (MAGLIONI; VENTURA, 2016), além de ser

utilizado em testes de toxicidade (HUNT, 2017), avaliação de novos compostos com ação antimicrobiana (KIM et al., 2017) e estudo da interação parasita-hospedeiro (SHAPIRA, 2017).

Por ser geneticamente rasterável, fácil de cultivar, apresentar corpo transparente e ter um tempo de vida curto, *C. elegans* pode ser utilizado em larga escala nos estudos da interação parasito-hospedeiro (CLARK; HODGKIN, 2014; ZHANG; HOU, 2013). Vários patógenos já foram estudados utilizando o modelo de infecção em *C. elegans*, incluindo diferentes espécies fúngicas como os patógenos humanos *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e o parasita intracelular de nematódeos *Nematocida parisi* (CORDEIRO et al., 2016; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011; TROEMEL, 2016). Kumar e Mohandas (2017) utilizaram *C. elegans* como modelo para avaliar a atividade antifúngica do ácido protoliquesterínico isolado do líquen *Usnea albopunctata* sobre a infecção causada por *C. tropicalis*, mostrando a sobrevivência dos nematódeos infectados na presença do ácido.

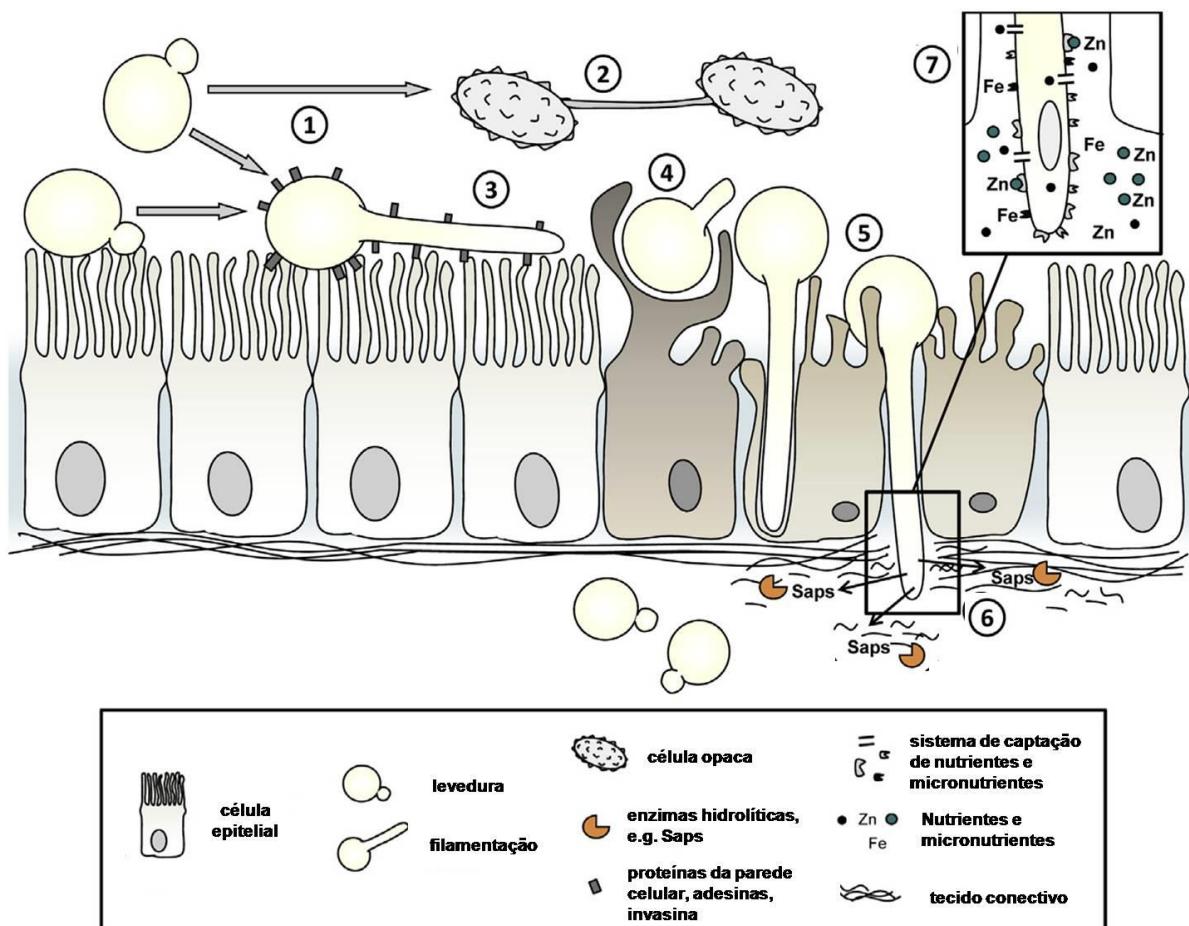
Esses estudos mostram a importância do uso de metodologias alternativas na compreensão dos eventos associados ao processo de infecção por *C. tropicalis*, seja através de infecções em modelos animais invertebrados ou de tecidos *ex vivo*. Além disso, entender o papel dos fatores de virulência envolvidos nessa patogênese também é de grande valia para combater os mecanismos que esse fungo utiliza para iniciar e estabelecer a infecção.

2.3 Fatores de virulência de *C. tropicalis*

Fatores de virulência são todas as características expressas pelo microrganismo que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). Em espécies de *Candida*, esses fatores são responsáveis pela adesão a células do hospedeiro e a invasão dessas células,ativamente ou por endocitose, causando dano progressivo ao tecido. Alguns destes fatores são essenciais para que o microrganismo consiga sobreviver no hospedeiro, como a habilidade de crescer a 37 °C e suportar o pH fisiológico do sítio da infecção (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013). Achados importantes apontam que *C. tropicalis* apresenta uma alta patogenicidade quando comparada a outras espécies de CNA (NEGRI et al., 2012). Essa patogenicidade está relacionada com os diferentes mecanismos de virulência descritos para essa levedura (Figura 3).

Entre os fatores de virulência apresentados por *C. tropicalis*, podem ser mencionados produção de adesinas (YU et al., 2016), pleomorfismo (JIANG et al., 2016a), switching fenotípico (MORALEZ et al., 2016), capacidade hemolítica (FURLANETO et al.,

2015), e produção de enzimas hidrolíticas, como fosfolipase e protease (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Além disso, a formação de biofilme, tanto em tecidos do hospedeiro como em dispositivos médicos intracorpóreos, também pode ser considerada um fator de virulência importante de *C. tropicalis* (FERREIRA et al., 2016; YU et al., 2017).



FONTE: adaptado de Polke, Hube e Jacobsen, 2015.

Figura 3. Fatores de virulência expressos por *Candida tropicalis*. (1) flexibilidade morfológica; (2) mudança (switching) branco-opaco e mating; (3) expressão de adesinas; invasão das células do hospedeiro por (4) endocitose induzida ou (5) penetração ativa; (6) liberação de enzimas hidrolíticas (por exemplo, proteinases aspárticas secretadas [Saps]) que ajudam na penetração e rompimento do material tissular; (7) aquisição de nutrientes e micronutrientes das células hospedeiras, como, por exemplo, sistemas de captação de zinco e ferro.

A adesão do organismo às superfícies do hospedeiro representa o primeiro passo na patogênese de infecções por *Candida*. Geralmente, o processo de invasão tecidual pelo patógeno envolve a destruição das barreiras mecânicas de células epiteliais ou endoteliais. Durante o comprometimento das barreiras, adesinas expostas na superfície do patógeno têm um papel importante (KOZIK et al., 2015).

DeMuri e Hostetter (1996) evidenciaram, pela primeira vez, a presença de uma proteína de ligação à fibronectina de 105 KDa na superfície celular de blastoconídios de *C. tropicalis*, a qual apresenta similaridade funcional e antigênica ao receptor de fibronectina integrina β_1 de vertebrados. Em comparação com *C. albicans*, *C. tropicalis* apresentou maior capacidade de adesão à fibronectina e à laminina, proteínas que compõem a matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro, em testes *in vitro* (DA COSTA et al., 2012). Proteínas associadas à parede celular da pseudo-hifa de *C. tropicalis* são cruciais para a ligação dessas células à fibronectina, vitronectina e laminina, sendo provável uma contribuição menor dos polissacarídeos nessa ligação (KOZIK et al., 2015).

A família de genes denominada sequência semelhante à aglutinina (ALS), a qual está relacionada com a adesão a superfícies do hospedeiro, foi primeiramente descrita em *C. tropicalis* por (HOYER et al., 2001). Neste estudo, três sequências semelhantes à aglutinina (*ALST1-3*) foram caracterizadas. Além disso, um estudo utilizando uma abordagem filogenômica identificou 16 genes na família de genes ALS em *C. tropicalis* (BUTLER et al., 2009).

Yu et al. (2016) observaram que a expressão dos genes *ALST2-3* e a adesão a células epiteliais apresentavam uma correlação positiva com o dano celular causado por *C. tropicalis*. Proteínas da família ALS também foram descritas na superfície celular de pseudo-hifas de *C. tropicalis* (KARKOWSKA-KULETA et al., 2015). O gene *ALS3* é regulado positivamente (*up-regulated*) durante a filamentação, enquanto o gene *ALS3* é regulado negativamente (*down-regulated*) (WU et al., 2016).

A capacidade de *C. tropicalis* alterar sua morfologia de levedura para uma forma filamentosa alongada está correlacionada com a virulência dessa espécie, de modo que permite ao patógeno se adaptar rapidamente às mudanças ambientais no hospedeiro (ZHANG et al., 2016a). Cepas de *C. tropicalis* que não são capazes de filamentação causam reduzido dano celular (YU et al., 2016).

Cerca de 330 genes associados à produção de hifa já foram identificados em *C. tropicalis* (WU et al., 2016). Além disso, a calcineurina, uma enzima fosfatase, e o fator de transcrição Crz1 são requeridos no crescimento de hifas de *C. tropicalis* (CHEN et al., 2014). Porman et al. (2013) reportaram que a superexpressão do fator de transcrição Wor1 promove a filamentação de *C. tropicalis*. Esse fator também é o regulador da mudança fenotípica branco-opaco (*white-opaque switch*). Outro fator de transcrição que também regula tanto a filamentação como a mudança fenotípica em *C. tropicalis* é o Efg1 (MANCERA et al., 2015).

A mudança epigenética e fenotípica entre os estados distintos “branco” e “opaco” tem um papel importante na modulação do comportamento. As formas branca e opaca são distinguíveis pelas diferentes morfologias da célula e da colônia e expressão de genes (PORMAN et al., 2013). Células brancas geralmente são arredondadas e suas colônias são lisas e brilhantes, enquanto células opacas são alongadas com colônias mais escuras e sem brilho (PORMAN et al., 2011). Todos os três tipos de *mating* encontrados para *C. tropicalis* (**a**, α e α/α) são capazes de sofrer a mudança branco-opaco (PORMAN et al., 2013). Recentemente, um novo fenótipo foi descrito para *C. tropicalis*, denominado fenótipo cinza, cujas células se apresentam relativamente pequenas e alongadas. Os fatores de transcrição Wor1 e Efg1, reguladores chave na mudança branco-opaca, não são requeridos para o fenótipo cinza (ZHANG et al., 2016b).

Moralez et al. (2016) avaliaram a virulência de três fenótipos de colônia de *C. tropicalis*, liso, crepe e ásperto, utilizando *G. mellonella* como modelo de infecção. A variante crepe apresentou ser mais virulenta que as variantes lisa e áspera, sendo a variante áspera a menos virulenta. Um estudo com camundongos BALB/c mostrou que o fenótipo branco apresenta uma virulência maior que os fenótipos cinza e opaco, sendo o opaco menos virulento que o cinza (ZHANG et al., 2016b).

As mudanças morfológicas de células de *C. tropicalis* são importantes para a adaptação desse fungo ao ambiente encontrado no hospedeiro, permitindo a adesão e invasão de tecidos. Após a invasão, ocorre a proliferação e disseminação do patógeno. O ferro é um elemento essencial para patógenos e a absorção deste metal durante a infecção é considerado um atributo de virulência (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017). Uma das possíveis formas de aquisição de ferro pelo patógeno quando no hospedeiro é através da produção de fator hemolítico.

2.3.1 Produção de fator hemolítico

Em *C. albicans*, a espécie do clado *Candida* mais estudada, o fator hemolítico é uma manoproteína que apresenta uma unidade de manana de parede celular que se liga a eritrócitos, causando a ruptura dessas células e a liberação de hemoglobina (WATANABE et al., 1999). A secreção de fator hemolítico por esse patógeno e a consequente aquisição de ferro facilita a invasão da hifa durante a infecção (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017).

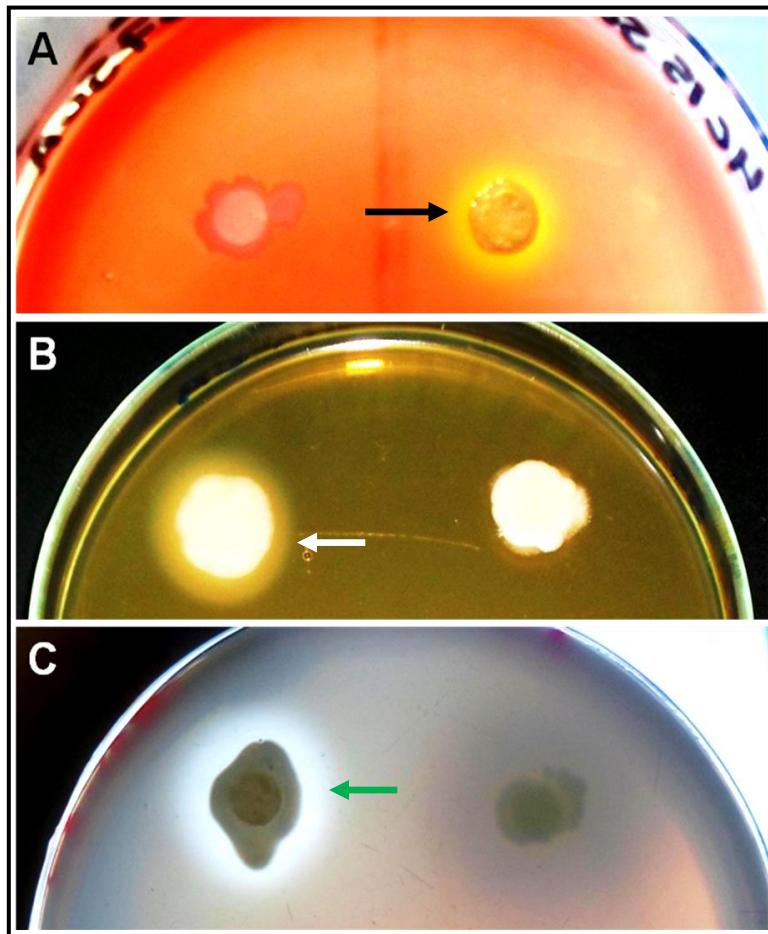
Atividade hemolítica *in vitro* de cepas de *C. tropicalis* foi reportada a primeira vez em ensaio utilizando meio ágar sangue de carneiro enriquecido com açúcar (LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001). Neste primeiro estudo, *C. tropicalis* apresentou tanto hemólise parcial (alfa) quanto completa (beta). Diferentes meios de cultura já foram descritos para estudo da produção de fator hemolítico por cepas de *C. tropicalis* e outras espécies de *Candida*, fator que influencia na porcentagem de isolados positivos. A maioria dos testes utiliza um meio sólido adicionado de sangue de carneiro ou humano (Figura 4).

Kumar et al. (2009) utilizaram meio ágar Sabouraud acrescido de 7% de sangue de humano para avaliar a atividade hemolítica de cepas clínicas de *Candida* spp. Menos de 30% das cepas foram positivos, sendo que apenas uma das sete cepas de *C. tropicalis* testados apresentou atividade. Já Favero et al. (2011), utilizando diferentes meios de cultura, observaram que todas as cepas de *C. tropicalis*, quando testados em meio contendo sangue de carneiro, exibiram um halo interno translúcido circundado por halo esverdeado periférico. Além disso, foi observado também que a concentração de CO₂ não afeta a atividade hemolítica de *C. tropicalis*, porém baixas concentrações de glicose no meio diminuem a capacidade hemolítica.

Alguns estudos mostraram que *C. tropicalis* exibe uma maior taxa de hemólise *in vitro* quando comparada com outras espécies de *Candida*, como *C. albicans* e *C. parapsilosis* (FAVERO et al., 2014; RICETO et al., 2015). Anil et al. (2014) observaram que *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentavam uma produção de hemolisina similar entre si. Ademais, após exposição a antifúngicos de uso clínico, houve significante redução da atividade hemolítica de ambas as espécies testadas, sendo a maior redução causada pela anfotericina B.

Utilizando ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro, Deorukhkar, Saini e Mathew (2014) reportaram que cepas clínicas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes sítios anatômicos de humanos apresentam taxas de atividade hemolítica distintas, sendo as cepas isoladas de mucosa vaginal as mais produtoras (57,8%).

O fator hemolítico de *C. tropicalis* é secretado no meio e não é inibido pela pepstatina A ou por tratamento por calor, similar ao fator hemolítico produzido por *C. albicans* (FAVERO et al., 2011). Embora *C. tropicalis* tenha a capacidade de produzir hemolisina tanto na ausência como na presença de eritrócitos, essa produção aumenta significativamente na presença de células sanguíneas vermelhas humanas (FURLANETO et al., 2015). Adicionalmente, células de *C. tropicalis* crescidas em meio com restrição de ferro apresentam hemólise reduzida (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017).



FONTE: CEMM, 2013; 2015

Figura 4. Avaliação da produção de fatores de virulência de *Candida* em meios sólidos. (A) Produção de fator hemolítico em meio ágar RPMI suplementado com glicose e sangue de carneiro; observa-se a formação de um halo esverdeado (seta preta), indicando alfa-hemólise. (B) Produção de fosfolipases extracelulares em meio ágar gema de ovo; observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca ao redor da colônia (seta branca), indicando produção enzimática. (C) Produção de proteases extracelulares em meio ágar BSA; observa-se a formação de uma zona clarificada ao redor da colônia (seta verde), que indica a produção da enzima.

Em meio de cultura suplementado com eritrócitos humanos, há um aumento da expressão do gene *HLPt* (*hemolysin-like protein*) em cepas de *C. tropicalis* que também apresentaram aumento da atividade hemolítica na presença de células vermelhas humanas (FURLANETO et al., 2015). A carência de ferro e a presença de hemoglobina determinam a indução do gene *CtHMX1* em *C. tropicalis*, porém a expressão de *CtHMX1* é suprimido na presença de eritrócitos. Em *C. albicans*, o gene ortólogo *CaHMX1* codifica uma heme

oxigenase (HO) que auxilia na assimilação do ferro do grupo hemoglobina-heme (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017).

Além do fator hemolítico, secretado no meio para obtenção de moléculas necessárias para sobrevivência do fungo, *C. tropicalis* secreta enzimas hidrolíticas necessárias para a adesão, penetração, destruição dos tecidos circunjacentes e aquisição de nutrientes a partir desses tecidos e células que os compõem. As enzimas hidrolíticas já descritas em *C. tropicalis* são as lipases, as fosfolipases, e as proteases aspárticas (NEGRI et al., 2012).

2.3.2 Produção de enzimas hidrolíticas

Lipases são enzimas com a capacidade de hidrolisar as ligações éster de mono-, di- e triacilgliceróis ou até mesmo fosfolipídios (SCHALLER et al., 2005). A secreção dessas enzimas por *Candida* spp. está associada com a habilidade do fungo em crescer em meios ricos em lipídios, a sobrevivência nos macrófagos e a atenuação da resposta inflamatória no hospedeiro (BADER, 2014; GÁCSER et al., 2007). Embora seja conhecido que as lipases possuam papel na virulência de *Candida*, poucos são os estudos sobre essas enzimas.

A principal técnica para avaliar a produção de lipases por *C. tropicalis* é a crescimento de colônias em meio sólido contendo butirina. Entretanto, o ensaio em placa é relativamente insensível e pode não detectar a atividade de cepas com baixa produção de lipase (BUZZINI; MARTINI, 2002; YU et al., 2016). Ensaios colorimétricos apresentam maior sensibilidade e podem ser utilizados para melhor analisar as lipases produzidas por *C. tropicalis* (BRAMONO et al., 2006).

Na sequência genômica de uma cepa de *C. tropicalis*, foram descobertos 5 genes *LIP* codificadores de lipases (BUTLER et al., 2009), entretanto a sequência de apenas dois desses genes (*LIP1* e *LIP4*) estão disponíveis no *GenBank*. *C. tropicalis* apresenta uma expressão do gene *LIP1* quando aderidos à superfície de placas de microtitulação de poliestireno, porém não é observada correlação entre expressão de *LIP1* e *LIP4* e a adesão de *C. tropicalis* a células epiteliais (YU et al., 2016).

O termo fosfolipases (PL, *phospholipases*) descreve um grupo heterogêneo de enzimas que apresentam a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster de glicerofosfolipídios. Além de *Candida* spp., as fosfolipases são consideradas fatores de virulência de outras espécies fúngicas, como *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (SCHALLER et al., 2005).

Cada fosfolipase possui a habilidade de clivar uma ligação éster específica (GHANNOUM, 2000). Assim, as fosfolipases são classificadas, dependendo da ligação éster específica que a enzima tem como alvo, em cinco subclasses: A (PLA), A2 (PLA2), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) (PARK; DO; JUNG, 2013). Entre as subclasses de fosfolipases, a fosfolipase B (PLB) está associada com a virulência de cepas de *C. albicans* (GHANNOUM, 2000; OKSUZ et al., 2007).

A fosfolipase B, encontrada no sobrenadante de culturas de *C. albicans*, é codificada pelos genes *PLB1* e *PLB2*, porém apenas o gene *PLB1* parece contribuir para a virulência em *C. albicans* (SAMARANAYAKE et al., 2005; SCHALLER et al., 2005). O papel das fosfolipases durante a infecção de *Candida* não é claro, mas implica na adesão à células epiteliais e invasão de epitélio humano reconstituído, de modo que a virulência de cepas mutantes de *C. albicans* para o gene *PLB1* é atenuada em modelo murino de candidíase sistêmica (SCHALLER et al., 2005).

O método mais utilizado para a detecção de produção de fosfolipases secretadas é o ensaio em meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de gema de ovo (Figura 4). Esse meio é rico em fosfolipídios e, quando a cepa é positiva para a produção da enzima, é possível observar a formação de uma zona de precipitação densa ao redor da colônia, relacionada à quebra dos fosfolipídios em complexos de cálcio e ácidos graxos decorrente da ação enzimática (GHANNOUM, 2000; NEGRI et al., 2012).

C. tropicalis apresenta baixa produção de fosfolipases extracelulares *in vitro*, principalmente quando comparada a *C. albicans*, sendo essa produção altamente dependente da cepa (GALAN-LADERO et al., 2010; NEGRI et al., 2012; SILVA et al., 2012), podendo haver relatos de elevada produção de fosfolipases por *C. tropicalis* (SHARMA; CHUMBER; KAUR, 2017). Essa produção também varia dependendo do sítio de isolamento de cepas clínicas de *C. tropicalis*, como apontado por Deorukhkar, Saini e Mathew (2014), que reportaram uma maior produção de fosfolipases em cepas isoladas de vagina. Além de cepas clínicas, estudos também mostram que cepas ambientais e isoladas de diversas espécies animais apresentam uma reduzida capacidade de produzir fosfolipases *in vitro* (CORDEIRO et al., 2015a; ZUZA-ALVES et al., 2016).

Uma sequência associada ao gene *CAPLC1* presente em *C. albicans* já foi observada em algumas cepas de *C. tropicalis* (BENNETT; MCCREARY; COLEMAN, 1998). Butler et al. (2009) descreveram 8 genes codificadores de fosfolipases B em uma cepa de *C. tropicalis* (MYA 3404). Ademais, uma fosfolipase B foi identificada no sobrenadante de meio de cultivo de *C. tropicalis* (DATTA et al., 2016). Essa proteína é ortologa a proteína

PLB4.5 de *C. albicans*. Os estudos acerca de fosfolipases produzidas por *C. tropicalis* são escassos quando comparados à *C. albicans*.

Além dos diferentes tipos de lipases e fosfolipases, *Candida* spp. podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas denominadas proteases. As proteases são todas as enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas (CO-NH) das proteínas (MONOD et al., 2002). Proteases são classificadas, dependendo do seu sítio de ação, em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. Exopeptidases clivam a ligação peptídica no grupo amina (-NH₂) ou carboxila (-COOH) terminal da proteína, enquanto endopeptidases clivam ligações peptídicas dentro de uma cadeia polipeptídica (DOS SANTOS, 2011).

De acordo com a natureza do grupo funcional do sítio ativo e o tipo de mecanismo enzimático, as proteases podem ser divididas em oito tipos: asparagina, aspártica, cisteína, glutâmica, metalo, serina, treonina e “desconhecido”. Opcionalmente, com respeito ao pH ótimo no qual são ativadas, todas as proteases podem ser classificadas em ácidas, alcalinas (básicas) e neutras (YIKE, 2011).

As proteases aspárticas secretadas (Sap, *secreted aspartic proteinase*) são um grupo de isoenzimas que são inibidas pela pepstatina A, um hexapeptídio de *Streptomyces*. A maioria dessas enzimas apresenta atividade ótima em pH ácido (SCHALLER et al., 2005). As proteases aspárticas contêm dois resíduos Asp que ativam a molécula de água que medeia o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica (YIKE, 2011).

Saps podem degradar um grande número de substratos celulares, incluindo proteínas estruturais e aquelas relacionadas às defesas imunológicas e homeostase bioquímica do hospedeiro, tais como IgG de cadeias pesadas, α 2-macroglobulina, proteína C3, β -lactoglobulina, interleucina-1 β , lactoperoxidase, catepsina D, colágeno, fibronectina e histatina 5 (BOCHENSKA et al., 2016; PICHOVÁ et al., 2001).

O papel das Saps como fator de virulência de *Candida* é objetivo de vários estudos. No hospedeiro, essas enzimas promovem a penetração e a destruição de tecidos adjacentes, liberando nutrientes que podem ser utilizados pelo patógeno (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015), degradam proteínas envolvidas na defesa contra microrganismos (BOCHENSKA et al., 2016, 2015) e estão relacionadas com o desenvolvimento de inflamação em determinados sítios, como a mucosa vaginal (GABRIELLI et al., 2016; PERICOLINI et al., 2015).

Proteases aspárticas são algumas das proteínas secretadas por *C. tropicalis* para o meio (DATTA et al., 2016). A produção de proteases *in vitro* por *C. tropicalis* varia interespécie dependendo do sítio de isolamento e origem da cepa. A observação da produção

de proteases secretadas por *C. tropicalis* é comumente feita utilizando um meio, ajustado a um pH ácido, contendo albumina sérica bovina (BSA) como fonte de nitrogênio (Figura 4). Quando há degradação da BSA por proteases, um halo claro é observado ao redor da colônia (GALAN-LADERO et al., 2010; NEGRI et al., 2012)

Kumar et al. (2009) detectaram que 100% das cepas de *C. tropicalis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar foram capazes de produzir e secretar proteases. Cepas isoladas de cavidade orofaríngea e vaginal apresentam produção de protease elevada em relação a outros sítios anatômicos (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Outros autores, contudo, observaram que somente algumas cepas de *C. tropicalis* foram positivas para a produção enzimática de proteases quando comparados a cepas de *C. albicans* (DA COSTA et al., 2009, 2012; GOKCE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007). Cepas ambientais e isoladas de animais também apresentam produção de proteases (CORDEIRO et al., 2015a; ZUZA-ALVES et al., 2016).

A discrepância entre os resultados de produção de proteases por *C. tropicalis* pode estar relacionado com o pH do meio de cultura utilizado para a detecção enzimática, uma vez que as Saps apresentam atividade ótima dependendo da acidez do meio (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI; KHALID, 2016). A temperatura de incubação também é um fator que pode alterar a atividade proteolítica (GALAN-LADERO et al., 2010).

Butler et al. (2009) identificaram 5 genes que codificam Saps em *C. tropicalis*, porém apenas quatro genes (*SAPT1-4*) estão depositados no GenBank (YU et al., 2016). Quando crescidas na presença de BSA como fonte de nitrogênio, cepas de *C. tropicalis* expressam os genes *SAPT1* e *SAPT2* (YU et al., 2016). Há um aumento da expressão de genes *SAP* quando as células são crescidas na superfície de placas de poliestireno (SILVA et al., 2011; YU et al., 2016).

Proteases também são produzidas por *C. tropicalis* quando na forma de biofilme (NEGRI et al., 2016), embora o papel dessas enzimas na produção e manutenção do biofilme não esteja ainda bem elucidado. Outros fatores de virulência como adesinas e a capacidade de mudança morfológica estão relacionadas com a capacidade de formação de biofilme, considerado um importante fator de virulência de *C. tropicalis* (JONES JR; HIRAKAWA; BENNETT, 2014; YU et al., 2016).

2.3.3 Formação de biofilme

O termo “filme”, que se refere à adesão, agregação e multiplicação de microrganismos sobre superfícies, foi utilizado na microbiologia marinha para distinguir bactérias aderidas (sésseis) de organismos “planctônicos” de nado livre de 1933 a 1935, e o termo biofilme foi utilizado pela primeira vez por Zobell e Allen (1935) em um estudo da aderência e crescimento de bactérias sobre lâminas de vidro submersas em água do mar (HØIBY, 2017). A primeira imagem de biofilme em uma infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa* foi publicada em 1977, mostrando agregados de bactéria envoltos por um abundante lodo viscoso em escarro de paciente com fibrose cística (HØIBY, 2017; HØIBY et al., 1977).

Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a uma superfície e submersas em uma matriz extracelular polimérica (MEC). As células sésseis do biofilme exibem fenótipo e genótipo diferenciados das células planctônicas em relação à transcrição gênica, taxa de crescimento e resistência antifúngica. No meio ambiente, os microrganismos são predominantemente encontrados na forma de biofilme em vez da sua forma planctônica (DONLAN, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TOURNU; VAN DIJCK, 2012). A quantidade de nutrientes disponíveis, moléculas de *quorum-sensing* liberados pelo microrganismo e o contato com superfícies são alguns dos fatores que contribuem para a formação do biofilme (FANNING; MITCHELL, 2012; HIROTA et al., 2016).

Os biofilmes se mostram vantajosos para a sobrevivência do microrganismo uma vez que esse modo de organização celular confere proteção contra o ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012). O material extracelular complexo que compõe a MEC do biofilme tem papel essencial na defesa contra células fagocitárias, age como suporte na manutenção da integridade do biofilme e forma uma barreira que impede a difusão das substâncias tóxicas, características essas que, junto com a complexidade arquitetônica, conferem proteção contra as defesas do hospedeiro (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015; SANDAI et al., 2016).

Acredita-se que aproximadamente 65% das infecções nosocomiais e 80% de todas as infecções microbianas são causadas por biofilmes (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Essas comunidades de células sésseis são a principal causa de infecções relacionadas a dispositivos médicos, sendo *Candida* um dos patógenos mais comumente isolados dessas infecções (HIROTA et al., 2016). Uma vez que *Candida* aderiu e evadiu o sistema imune do

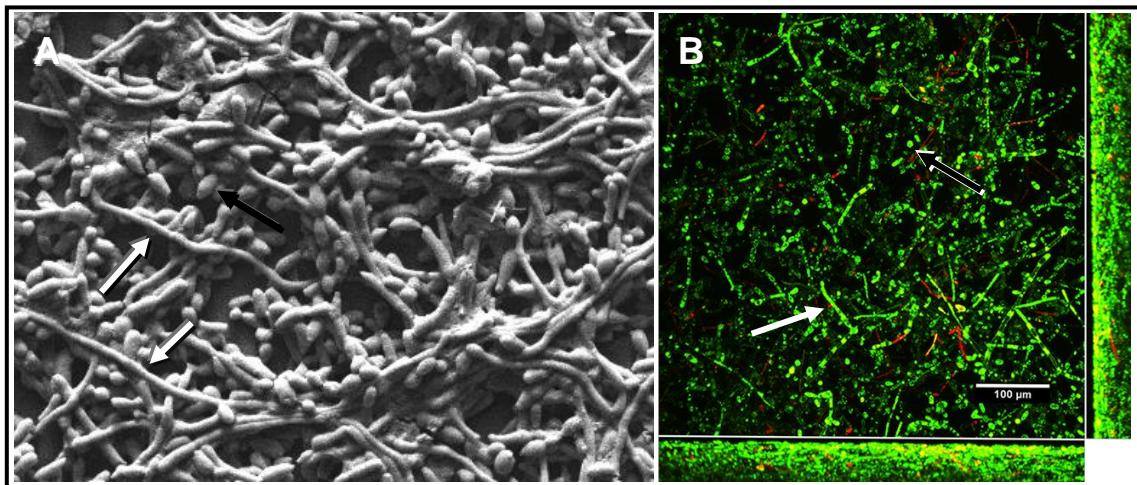
hospedeiro, pode formar biofilmes que colonizam órgãos internos e implantes médicos (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Candida spp. possuem a capacidade de formar biofilme em lentes de contato ou intraoculares, implantes mamários, cateteres venosos, próteses articulares, acessos de diálise, válvulas prostéticas, marca-passo, dispositivo de assistência ventricular, cateter urinário, implante peniano e derivação ventrículo-peritoneal (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; KOJIC; DAROUCHE, 2004). Essas infecções associadas a implantes são inherentemente difíceis de tratar e podem requerer terapia antifúngica a longo-prazo e a remoção física do implante para controle da infecção (KOJIC; DAROUCHE, 2004; RAMAGE et al., 2012).

C. tropicalis possui uma notável capacidade de aderir a superfícies abióticas, células humanas e tecidos (NEGRI et al., 2012). Infecções por biofilme de *C. tropicalis* já foram relatadas em dispositivos de assistência ventricular, derivação ventrículo-peritoneal e *plug* de ponto lacrimal (CECCARELLI et al., 2016; KOJIC; DAROUCHE, 2004; YOKOI et al., 2000). Os biofilmes maduros desta espécie apresentam-se como uma densa rede de leveduras e células filamentosas evidentes, sendo os isolados clínicos de *C. tropicalis* classificados como ótimos formadores de biofilme (SILVA et al., 2012), por vezes com porcentagens de produção de biofilmes maiores que as encontradas para *C. albicans* (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Biofilmes maduros de *C. tropicalis* (Figura 5) são constituídos de uma densa rede de células de leveduras e filamentos, como observado por Bizerra et al. (2008), porém algumas cepas podem apresentar biofilme composto apenas por blastoconídios (SILVA et al., 2009). Além disso, dependendo da cepa, o biofilme produzido pode ser espesso com co-agregados celulares ou monocamadas descontínuas de leveduras aderidas à superfície (SILVA et al., 2009). Deorukhkar, Saini e Mathew (2014) observaram que cepas de *C. tropicalis* isoladas de urina apresentaram a maior produção de biofilme entre isolados de diferentes sítios.

Um estudo realizado por Galán-Ladero et al. (2013) reportou que cepas de *C. tropicalis* que apresentavam maiores taxas de filamentação e hidrofobicidade de superfície celular apresentaram maior capacidade de formação de biofilme. O pH do meio também influencia o biofilme, sendo que *C. tropicalis* apresenta uma produção mais pronunciada de biofilme em pH neutro ou alcalino (pH 7 a 8), apresentando maior taxa de filamentação, espessura do biofilme e quantidade de MEC em pH 8 (FERREIRA et al., 2016).



FONTE: CEMM (2017).

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura (A) e microscopia confocal de varredura a laser (B) de biofilmes maduro de *Candida tropicalis*. Observa-se uma arquitetura complexa composta de blastoconídios (setas pretas) e filamentos (setas brancas). Na microscopia confocal (B), células em verde são viáveis, enquanto em vermelho são células mortas. As barras laterais (B) indicam a espessura do biofilme. Aumento: 2000x (A), 400x (B).

A MEC do biofilme de *C. tropicalis* é composta majoritariamente por hexosamina. Outros compostos são encontrados em menores concentrações, como carboidratos, proteínas, fósforo e ácido urônico (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; SILVA et al., 2009). Tratamento com lipase tipo VII, quitinase e lische induz uma redução da biomassa do biofilme de *C. tropicalis*, enquanto DNase I e proteinase K não apresentam efeito (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Quando os biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* são tratados com anfotericina B, há um aumento na concentração de proteínas e carboidratos na MEC (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015).

Além dos fatores de virulência envolvidos na capacidade do fungo em causar e estabelecer infecção, é importante destacar a importância do surgimento de cepas fúngicas apresentando resistência a drogas antifúngicas utilizadas na clínica, o qual é considerado um dos fatores implicados no aumento de infecções por *Candida*, principalmente casos de candidemia persistente (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015).

2.4 Resistência a antifúngicos

Resistência microbiana é descrita como a não-sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico em um teste de sensibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória

mínima (CIM) da droga excede o ponto de corte de sensibilidade daquele microrganismo. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca (ou primária) é encontrada ocorrendo naturalmente entre certos fungos sem exposição prévia à droga, como ocorre na resistência à fluconazol por *C. krusei*. Resistência adquirida (ou secundária) é observada em cepas anteriormente sensíveis após a exposição a agentes antifúngicos e geralmente é dependente de expressão gênica alterada (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A resistência clínica é definida como falha na erradicação de uma infecção fúngica mesmo após a administração de um agente antifúngico que apresenta atividade *in vitro* contra o organismo (KANAFANI; PERFECT, 2008). A resistência *in vitro* a um determinado agente antimicrobiano pode levar a uma falha terapêutica (ALEXANDER et al., 2013; WALSH et al., 2000), porém essa correlação, por vezes, não ocorre. A discordância entre os dados *in vitro* e *in vivo* é explicado pela “regra 60-90” a qual versa que infecções causadas por isolados sensíveis respondem ao tratamento em 90% dos casos, enquanto infecções por isolados resistentes respondem em 60% dos casos (REX; PFALLER, 2002).

A sensibilidade a antifúngicos, *in vitro*, de fungos leveduriformes e filamentosos de importância clínica pode ser avaliada utilizando técnicas de referência padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou pelas diretrizes publicadas pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). Utilizando essas técnicas, é possível encontrar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e determinar se o microrganismo é sensível ou resistente, *in vitro*, a determinada droga quando há ponto de corte estabelecido. Os dados obtidos a partir dos testes realizados seguindo essas diretrizes podem ser utilizados para comparação com dados clínicos (ARENDRUP et al., 2016; CLSI, 2008a, 2008b).

Além disso, os dados obtidos em testes de sensibilidade podem ser utilizados para estabelecer do perfil de sensibilidade da população de determinada espécie microbiana e determinar os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dessa população. O CIM₅₀ representa o valor da concentração inibitória na qual 50% ou mais dos isolados em uma população teste são inibidos e é equivalente à mediana do valor de CIM. O CIM₉₀ representa o valor da concentração inibitória na qual 90% ou mais das cepas em uma população teste são inibidas; também conhecido como o percentil 90 (SCHWARZ et al., 2010).

Os antifúngicos utilizados na terapêutica contemporânea podem ser divididos de acordo com o seu alvo de ação na célula fúngica em: inibidores da síntese do ergosterol (azólicos, derivados morfolínicos e alilaminas); compostos que alteram da permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol (derivados poliênicos); inibidores da síntese da

parede celular (equinocandinas, nicamicina); inibição da síntese de ácidos nucleicos (flucitosina) e; inibição da síntese dos microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012).

Estudos realizados com espécies de *Candida* isoladas de infecções humanas mostram um aumento na resistência desses microrganismos a drogas antifúngicas, sendo essa resistência relacionada principalmente a compostos azólicos (DA COSTA et al., 2009; MALDONADO et al., 2014; NEVES-JUNIOR et al., 2015; PAM et al., 2012). Os azólicos, em especial o fluconazol, são os antifúngico mais utilizados tanto na profilaxia quanto na terapia de infecções por *Candida* (SILVA et al., 2013b; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016), o que pode estar relacionado ao aumento na resistência a esses fármacos. Além disso, resistência a outros compostos antifúngicos, como as equinocandinas e derivados poliênicos, também já foi reportada em *Candida* spp., embora seja incomum (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Resistência a compostos de uso clínico também já foi relatada em *Candida* spp. de origem animal, tanto em cepas isoladas como parte da microbiota como causando algum tipo de infecção no animal (BRILHANTE et al., 2012; BRITO et al., 2007; CASTELO-BRANCO et al., 2013; CORDEIRO et al., 2015a; SIDRIM et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2010). Essas estirpes de origem animal apresentam uma baixa sensibilidade aos derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol.

Candida tropicalis foi considerada durante muito tempo uma espécie sensível ao fluconazol, sendo >95-98% das cepas sensíveis a esse antifúngico (CHAI; DENNING; WARN, 2010). Porém, nos últimos anos, houve um aumento nos casos de resistência a esse derivado azólico, como observado em vários estudos de perfil de sensibilidade de cepas clínicas (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015; MALDONADO et al., 2014; NEVES-JUNIOR et al., 2015; XISTO et al., 2017). Além do fluconazol, há relatos de resistência a outros derivados azólicos, como o itraconazol e o voriconazol (CHONG et al., 2012a; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015; XISTO et al., 2017), sendo que esses isolados geralmente apresentam resistência cruzada a mais de um azólico.

Resistência adquirida em cepas de *C. tropicalis* a outros compostos antifúngicos é incomum, entretanto já foram reportados casos de resistência a flucitosina (CHEN et al., 2011), poliênicos (MESA-ARANGO et al., 2016) e equinocandinas (GROSSET et al., 2016; JENSEN; JOHANSEN; ARENDRUP, 2013; PASQUALE et al., 2008). Resistência cruzada entre azólicos e anfotericina B também já foi relatada em cepas de *C. tropicalis* (FORASTIERO et al., 2013). Além disso, resistência também já foi observada em cepas

veterinárias e do solo (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016b; CORDEIRO et al., 2015a; ZUZA-ALVES et al., 2016).

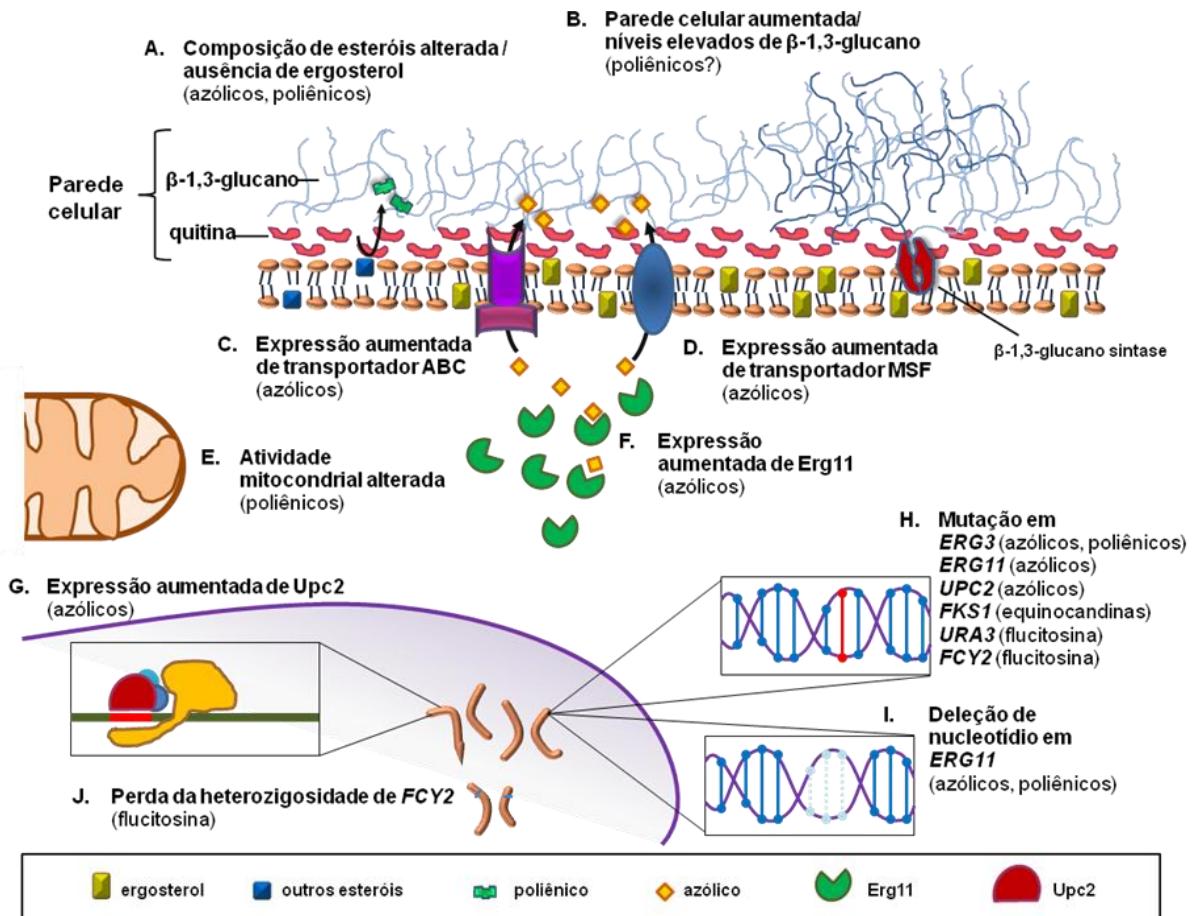
O estudo da resistência em *C. tropicalis* é de grande importância uma vez que cepas que apresentam fenótipo de resistência estão envolvidas em infecções persistentes ou recorrentes (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016b; CHONG et al., 2006; GROSSET et al., 2016) e também podem causar infecções *breakthrough* (CHONG et al., 2012a; GARCIA-EFFRON et al., 2008). Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos utilizados pela célula fúngica para diminuir os efeitos de uma droga podem ajudar na busca de compostos que atuem revertendo o fenótipo de resistência de *C. tropicalis*, aumentando a ação dos antifúngicos de uso clínico.

2.4.1 Mecanismos de resistência em *C. tropicalis*

Os mecanismos envolvidos no fenótipo de resistência em cepas de *C. tropicalis* são diversos e podem envolver, entre outros fatores, diminuição da afinidade pela molécula-alvo, aumento ou diminuição no número de cópias da molécula alvo e extrusão da droga de dentro da célula utilizando bombas de efluxo. Geralmente esses processos envolvem mutações ou deleções em genes específicos e alterações na expressão gênica, como a superexpressão de um gene (Figura 6) (GROSSET et al., 2016; WHALEY et al., 2016).

2.4.1.1 Azólicos

Azólicos são compostos fungistáticos que inibem a enzima dependente do citocromo P450 14 α -lanosterol demetilase (CYP51), codificada pelo gene *ERG11*, a qual converte lanosterol em ergosterol. Essa enzima contém uma unidade protoporfirina como seu sítio ativo. Os azólicos se ligam ao ferro da porfirina e causam o bloqueio da via de biossíntese do ergosterol, resultando no acúmulo de esteróis 14-metilados. Os azólicos podem ser divididos em dois grupos: imidazólicos (p. ex., miconazol e cetoconazol) e triazólicos (p. ex., fluconazol, itraconazol e voriconazol) (CAMPOY; ADARIO, 2017). Vários estudos tentaram elucidar os mecanismos de resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* de origem clínica (Quadro 1).



FONTE: O autor (2017).

Figura 6. Mecanismos de resistência a antifúngicos descritos em *Candida tropicalis*. (A) Produção de esteróis alternativos pela célula devido à inativação de Erg3. (B) Sugere-se que o β -glucano da parede celular interaja com o antifúngico, inibindo sua penetração. Aumento da expressão de bombas de efluxo do tipo (C) *ATP-binding cassette* e (D) *major facilitator superfamily*, reduzindo os níveis intracelulares de azólicos. (E) Atividade mitocondrial alterada causa redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio intracelular. (F) A atividade de drogas azólicas pode ser superada pelo aumento da expressão de Erg11. (G) A elevada expressão do fator de transcrição Upc2 induz um aumento da expressão de *ERG11*. (H) Mutações e (I) deleções em diferentes genes podem diminuir a afinidade da droga pelo sítio alvo. (J) Mutação e perda de heterozigosidade em *FCY2* leva a uma diminuição da entrada de flucitosina na célula.

O primeiro estudo dos mecanismos de resistência a azólicos em *C. tropicalis* foi realizado por Barchiesi et al. (2000). Nesse estudo, foi realizada a indução *in vitro* de resistência ao fluconazol em uma cepa de *C. tropicalis* (ATCC 750). Após crescimento em meios contendo concentrações crescentes de fluconazol, foi observado que a cepa apresentava CIMs elevadas para o fluconazol, itraconazol e terbinafina. As cepas resistentes apresentaram expressão aumentada de *CDR1* e *MDR1*. Esses genes são responsáveis, respectivamente, pela codificação de transportadores dos tipos *ATP-binding cassette* (ABC) e *major facilitator superfamily* (MFS), que são bombas de efluxo que contribuem para a tolerância a antifúngicos. Transportadores do tipo ABC são ATPases e necessitam de ATP para realizar o

efluxo do seu substrato, enquanto a superfamília MFS engloba, entre outros, bombas antiporte de H^+ (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016).

Vandeputte et al. (2005), por sua vez, reportaram a superexpressão do gene *CtERG11* associada a uma mutação *missense* na posição 393 deste gene em uma cepa clínica apresentando sensibilidade reduzida aos derivados azólicos. Essa mutação leva a uma substituição da tirosina por fenilalanina na sequência da enzima na posição 132 (Y132F), o que pode induzir uma diminuição da afinidade dos azólicos a molécula alvo. Essa mutação *missense* também foi observada em outras cepas resistentes a um ou a mais derivados azólicos (CHEW et al., 2017; FORASTIERO et al., 2013; JIANG et al., 2013; TAN et al., 2015).

Outras mutações *missense* no gene *ERG11* foram observadas em cepas apresentando resistência a um ou mais derivados azólicos e cepas apresentando resistência cruzada. Além da mutação Y132F, Jiang et al. (2013) e Chew et al. (2017) observaram mutação na posição 154, levando a uma substituição da serina por fenilalanina (S154F) em todas as cepas resistentes a azólicos. Já Forastiero et al. (2013) observaram que cepas apresentando resistência cruzada a azólicos e anfotericina B apresentavam as mutações *missense* D275V, P511A e G464D na proteína Erg11, além de uma deleção de 132 pb no gene *ERG11* resultando em uma deleção de 44 aminoácidos. Outras substituições de aminoácidos observadas em Erg11 de cepas resistentes a azólicos foram Y132H e S405F (TAN et al., 2015). Xisto et al. (2017) reportaram uma mutação na posição K143R em cepas resistentes a todos os derivados triazólicos testados.

Choi et al. (2016) separaram as cepas de *C. tropicalis* em três categorias: sensível ao fluconazol (SF), pouco-sensível ao fluconazol (PSF, CIM de 1 a 2 μ g/mL) e não-sensível ao fluconazol (NSF, CIM de 4 a 64 μ g/mL). Nesse estudo, foi observado que cepas PSF apresentavam mutações *missense* em Erg11 nas posições G464S, K344N e V362M, enquanto as cepas NSF apresentavam as mutações L333I e G464S. Além dessas mutações, expressão elevada dos genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* foi observada tanto em cepas PSF como em cepas NSF.

Mutações em Erg11 podem ser ou não acompanhadas pela superexpressão do gene que codifica a enzima (JIANG et al., 2013) Essa expressão elevada de *ERG11* pode estar relacionada com a superexpressão do fator de transcrição global Upc2p. Acredita-se que Upc2p é ativado quando há uma diminuição nos níveis de esteróis na membrana fúngica. A superexpressão do gene *UPC2* em *C. tropicalis* é causada, aparentemente, por mutação na posição G392E da região promotora (CHOI et al., 2016; JIANG et al., 2016b).

Quadro 1. Mutações e superexpressão de genes relacionados à resistência a derivados azólicos descritos em cepas de *Candida tropicalis*.

Origem do isolado	Resistência	Mutação* (gene)	Genes com expressão aumentada	Referência
ATCC 750 (indução de resistência <i>in vitro</i>)	FLC, ITC, TRB	ND	<i>CDR1, MDR1</i>	Barchiesi et al. (2000)
urina	CLT, KTC, FLC, VRC	Y132F (<i>ERG11</i>)	<i>ERG11</i>	Vandeputte et al. (2005)
sangue	FLC, VRC, AMB	Δ44aa (<i>ERG11</i>) S258F (<i>ERG3</i>)	ND	Eddouzi et al. (2013)
ATCC 200956, candidemia (CL-6835)	AMB, FLC, VRC	Δ44aa, D275V, P551A, G464D, Y132F (<i>ERG11</i>) S258F, S113G (<i>ERG3</i>)	ND	Forastiero et al. (2013)
candidemia (TP-13650)	FLC, VRC	Y132F (<i>ERG11</i>)		
escarro, fezes, urina,	FLC, ITC, VRC	Y132F, S154F (<i>ERG11</i>)	<i>ERG11</i>	Jiang et al. (2013)
urina, cálculos na bexiga (cão)	FLC, ITC, KTC, POS, VRC	Mudança na sequência a partir da posição 378 (<i>ERG3</i>)	ND	Álvarez-Pérez et al. (2016)
sangue, pus de orelha, urina, <i>swab</i> nasal	FLC, VRC, ITC, POS	L333I, G464S, K344N, V362M (<i>ERG11</i>) A297S, T393I, Δ(301-304), Q320PPQ, S187L, L343F (<i>UPC2</i>)	<i>CDR1, MDR1, ERG11</i>	Choi et al. (2016)
sangue, pus de orelha, urina, <i>swab</i> nasal	FLC, VRC, ITC, POS	-118T-G, -155G-A G392E (<i>UPC2</i>)	<i>UPC2</i>	Jiang et al. (2016)
urina, cateter, secreção abdominal, sangue, fases	ITC, VRC, POS, FLC	K143R (<i>ERG11</i>)	ND**	Xisto et al. (2017)
abscesso subcutâneo, tecido necrótico e baço	FLC, ITC, VRC, POS	Y132C, S154C (<i>ERG11</i>)	<i>MDR1</i>	You et al. (2017)

*Apenas mutações *missense*, *nonsense* ou *frameshift* estão descritas; informações sobre mutações silenciosas foram suprimidas. **Embora não haja avaliação da expressão de genes que codificam bombas de efluxo, uma atividade aumentada de transportador do tipo ABC foi observada fenotípicamente nessas cepas. FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina; CLT: clotrimazol; KTC: cetoconazol; VRC: voriconazol; AMB: anfotericina B; POS: posaconazol; Y: tirosina; F: fenilalanina; D: ácido aspártico; V: valina; P: prolina; A: alanina; G: glicina; S: serina; L: leucina; I: isoleucina; P: prolina; K: lisina; N: asparagina; M: metionina; T: treonina; Q: glutamina; E: glutamato; R: arginina; C: cisteína; ND: não determinado.

Outro fator que pode estar relacionado com a resistência em *C. tropicalis* são mutações no gene *ERG3*, o qual codifica a enzima esterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase. Essa enzima é responsável por converter o esterol intermediário não-tóxico 14 α -metilado, acumulado devido a atividade dos azólicos, no esterol tóxico 14 α -metilergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol (VALE-SILVA et al., 2012). Em *C. tropicalis*, mutações *frameshift* em *ERG3* foram identificadas em cepas causando infecção persistente do trato urinário em um cão (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016b) e mutações *missense* desse gene (S256F e S113G) foram relatadas em cepas com resistência cruzada a derivados azólicos e anfotericina B. Essas mutações podem levar à perda da função da enzima esterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase, permitindo a célula evitar a síntese de esteróis tóxicos. Mutantes que apresentam deleção em *ERG11*, a qual causa a perda de função da enzima esterol 14 α -demetilase, sobrevivem apenas em combinação com mutações *missense* presentes em *ERG3* (EDDOUZI et al., 2013).

2.4.1.2 Outras drogas antifúngicos

Flucitosina (5-fluorocitosina) é um análogo de pirimidina fluorada que apresenta atividade fungistática que interfere no metabolismo de pirimidinas. Esse composto entra na célula via citosina permease e é convertido pela citosina deaminase em 5-fluoruracil, o qual, por sua vez, é convertido em 5-fluorouridina monofosfato pela UMP pirofosforilase. Esse metabólito é incorporado ao RNA no lugar do trifosfato de uridina, resultando na inibição da síntese de proteínas. O 5-fluoruracil também pode sofrer conversão em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um potente inibidor da timidilato sintase, inibindo a síntese de DNA fúngico (CAMPOY; ADARIO, 2017).

Um estudo com cepas de *C. tropicalis* apresentando resistência à flucitosina observou que todas as cepas apresentavam uma mutação *missense* (K177E) no gene *URA3*, o qual codifica uma orotidina 5'-fosfato descarboxilase relacionada com a via biossintética das pirimidinas (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008a). Alterações na sequência de aminoácidos em *URA3* também foram observadas no estudo de Chen et al. (2011). Além disso, uma mutação *nonsense* na posição 145 do gene *FYC2* juntamente com a perda da heterozigosidade desse gene contribui para a resistência de *C. tropicalis* à flucitosina. Esse gene codifica uma purina-citosina permease envolvida na entrada da flucitosina na célula fúngica (CHEN et al., 2011).

Os poliênicos são moléculas macrocíclicas orgânicas conhecidas como macrolídeos. Devido à sua natureza anfifílica, essas moléculas se ligam à bicamada lipídica e formam um complexo com o ergosterol, produzindo poros na célula. A formação de poros

promove a ruptura da membrana celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático e dano oxidativo, resultando em morte celular. Os únicos poliênicos em uso clínico são a anfotericina B, a nistatina e a natamicina. Anfotericina B é o poliênico mais utilizado no tratamento de infecções sistêmicas, enquanto natamicina e nistatina são utilizados apenas como agentes tópicos (CAMPOY; ADARIO, 2017).

Os primeiros casos documentados de *C. tropicalis* apresentando resistência a derivados poliênicos datam da década de 1970. Nesses estudos, foram constatados que essas cepas apresentavam mudanças no conteúdo de esteróis de membrana, apresentando pouco ou quase nenhum ergosterol (MERZ; SANDFORD, 1979; SAFE et al., 1977; WOODS et al., 1974), com aumento de 14-metil fecosterol e lanosterol. Deleções ou substituições nos genes *ERG11* ou *ERG3* estão relacionadas com a baixa sensibilidade de *C. tropicalis* a anfotericina B (FORASTIERO et al., 2013). Uma vez que esses genes codificam enzimas da via de biossíntese do ergosterol, modificações nesses genes podem levar à alteração na estrutura ou diminuição do esgorterol de membrana, diminuindo a ação dos poliênicos e até azólicos (EDDOUZI et al., 2013).

Além da ligação com o ergosterol de membrana, anfotericina B pode causar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula fúngica, indução da apoptose e morte celular (BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013). Mesa-Arango et al. (2014) observaram que cepas de *C. tropicalis* resistentes à anfotericina B apresentam uma alteração na taxa respiratória e no potencial de membrana mitocondrial, apresentando também alta atividade de catalase. Ademais, foi observado também que, nas cepas resistentes, anfotericina B não induz a carbonilação de proteínas, um importante marcador de dano proteico por oxidantes. Altos níveis de β -1,3-glucano na parede celular também podem estar correlacionados com a resistência à anfotericina B, porém os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são elucidados (MESA-ARANGO et al., 2016).

As equinocandinas atuam como inibidores não competitivos do complexo enzimático β -(1,3)-D-glucano sintase, tendo como alvo especificamente a subunidade Fks1, causando perturbação das paredes celulares em crescimento, resultando em instabilidade osmótica e morte celular. As três equinocandinas, caspofungina, anidulafungina e micafungina, são os únicos compostos antifúngicos disponíveis na clínica que atuam em nível de parede celular fúngica. Essas drogas são lipopeptídos semi-sintéticos derivados de produtos naturais fúngicos (CAMPOY; ADARIO, 2017).

O primeiro relato de resistência a equinocandinas por *C. tropicalis*, especificamente caspofungina e micafungina, foi feito por Pasquale et al. (2008). A

resistência a essa classe de antifúngicos é induzida, principalmente, por mutações no gene *FKS1*, levando a alterações de aminoácidos em locais altamente conservados de Fks1p (GARCIA-EFFRON et al., 2008). As mutações já reportadas em *C. tropicalis* foram S645P, F641L, L644W, F76S e S80P (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008b; GARCIA-EFFRON et al., 2010; GROSSET et al., 2016; JENSEN; JOHANSEN; ARENDRUP, 2013).

Ademais, alguns isolados de *Candida*, bem como de *C. tropicalis*, podem crescer na presença de altas concentrações acima da CIM de equinocandinas em testes de sensibilidade *in vitro*, mesmo havendo inibição em concentrações baixas do fármaco. A esse fenômeno dá-se o nome de efeito paradoxal (CHAMILOS et al., 2007). Altas concentrações de quitina na parede celular fúngica estão correlacionadas com o efeito paradoxal em *C. tropicalis* e outras espécies (COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2013). Embora possa ser frequentemente observado em testes de sensibilidade *in vitro*, aparentemente o efeito paradoxal não influencia no resultado clínico (RUEDA et al., 2017).

2.4.2. Resistência em biofilme

Os biofilmes de *Candida* spp. são resistentes a uma variedade de estresses, incluindo drogas antifúngicas, estresse mecânico e mecanismos de defesa imunológica. Os principais fatores envolvidos na resistência dos biofilmes são sua complexa arquitetura, a captura de moléculas ou células que tentam atravessar os componentes da MEC, a regulação elevada de bombas de efluxo e mecanismos de defesa contra o estresse e plasticidade metabólica e fenotípica de células presentes no biofilme, como nas células persistentes (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; SANDAI et al., 2016).

Al-Fattani e Douglas (2004) investigaram a penetração dos antifúngicos fluconazol e flucitosina em biofilmes de *Candida* spp. A penetração das drogas foi mais lenta nos biofilmes formados por *C. tropicalis* do que em outras espécies, apontando um possível papel dos componentes da MEC dessa espécie na resistência a drogas. *C. tropicalis* produz uma grande quantidade de MEC, mesmo em crescimento estático (sem fluxo contínuo), levando a uma resistência a antifúngicos como fluconazol e anfotericina B (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

Quando os biofilmes de *C. tropicalis* são pré-expostos à anfotericina B, há um aumento nos carboidratos e proteínas presentes na MEC, causando um aumento na matriz e contribuindo para a resistência (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015). Ademais, um aumento da biomassa total é observado quando os biofilmes pré-formados de *C. tropicalis* são

tratados com concentrações baixas de voriconazol. Esses fenômenos ocorrem, provavelmente, devido a resposta das células de *C. tropicalis* ao estresse causado pela droga antifúngica (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2016).

Bizerra et al. (2008) reportaram que as células sésseis no biofilme de *C. tropicalis* apresentaram uma superexpressão dos genes *ERG11* e *MDR1*, responsáveis pela regulação da enzima lanosterol 14 α -demetilase e pela regulação de bomba de efluxo, respectivamente. Fernandes, Silva e Henriques (2016) também relataram expressão elevada do gene *ERG11* em biofilmes de *C. tropicalis* tratados com voriconazol, o que pode estar implicado com a resistência dos biofilmes esse derivado azólico. Embora os biofilmes de *C. tropicalis* apresentem baixa sensibilidade para drogas de importante uso clínico, como os azólicos e a anfotericina B, poucos são os estudos dedicados à compreensão dos mecanismos de resistência nessa comunidade microbiana.

Uma das maneiras de superar os mecanismos de resistência que levam a uma baixa sensibilidade de cepas de *C. tropicalis* a compostos antifúngicos de uso clínico é a busca por compostos que reduzam as concentrações inibitórias dos antifúngicos. Compostos específicos que tenham como alvo moléculas que ajudem na aquisição de resistência pela célula fúngica podem atuar em sinergismo com antifúngicos, resultando em alteração do fenótipo de resistência.

2.5 Compostos que apresentam sinergismo com drogas antifúngicas

Dois compostos, quando testados juntos frente a um microrganismo em um ensaio de sensibilidade *in vitro*, podem ter interação sinérgica, antagônica ou nenhuma interação (ODDS, 2003). A interação é sinérgica se o efeito conjunto das drogas for mais forte do que as drogas isoladas, enquanto na antagônica o efeito é mais fraco (BOLLENBACH, 2015). Vários estudos analisaram a interação entre diferentes compostos e drogas antifúngicas frente a cepas de *Candida tropicalis* resistentes a azólicos, a fim de encontrar efeitos sinérgicos e alteração do fenótipo de resistência das cepas.

Muitos compostos extraídos de plantas foram estudados em combinação com antifúngicos frente a *C. tropicalis*. Moraes-Braga et al. (2016) observaram reduções na concentração inibitória de fluconazol quando combinado com extratos das folhas de *Psidium guajava* (goiaba) e *Psidium brownianum*. Glabridina, um isoflavano isolado do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) possui fraca atividade antifúngica, porém apresenta um potente efeito sinérgico com o fluconazol frente a cepas resistentes de *C. tropicalis* (LIU et al., 2014). Um

peptídio semelhante à tionina isolado do fruto de *Capsicum annuum* (um tipo de pimenta) apresentou atividade antifúngica frente a *C. tropicalis*, causando permeabilização da membrana plasmática, induzindo estresse oxidativo, além de apresentar sinergismo com fluconazol (TAVEIRA et al., 2016).

Cordeiro et al. (2013) reportaram que o farnesol, um sesquiterpeno descrito como molécula de *quorum sensing* em *C. albicans*, apresenta atividade antifúngica contra *Candida* spp. Ademais, farnesol reduziu consideravelmente a concentração inibitória mínima para anfotericina B, fluconazol e itraconazol de cepas de *C. tropicalis*. Resultados semelhantes foram encontrados para o tirosol, um composto fenólico que também é uma molécula de *quorum sensing* de *C. albicans* (CORDEIRO et al., 2015b).

Estudos com berberina mostraram que este alcalóide de origem vegetal apresenta atividade de inibição de bombas de efluxo, diminuindo a expressão de *CDR1* sozinho ou na presença de fluconazol, além de aumentar a concentração de EROs na célula (SHAO et al., 2016; SHI et al., 2017), mecanismos que podem explicar tanto a atividade antifúngica deste composto como o sinergismo com o fluconazol frente a cepas resistentes de *C. tropicalis*.

O efeito anti-biofilme de compostos diversos também já foi avaliado frente a cepas de *C. tropicalis*, podendo ser citados: óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*, os quais apresentam em sua composição geraniol e linaool (SOUZA et al., 2016); sais de imidazólio (BERGAMO et al., 2015a, 2015b); e nanopartículas de óxido de zinco (JOTHIPRAKASAM et al., 2017). Além disso, sinergismo entre compostos com potencial antifúngico e drogas utilizadas na clínica também já foi relatado, os quais apresentaram resultados promissores, como os relatados para o tirosol e rubiadina (MARIONI et al., 2016; SHANMUGHAPRIYA et al., 2014).

Fármacos que não são classicamente utilizados como antifúngicos também já foram testados em combinação com drogas antifúngicas para observar sinergismo frente a cepas resistentes de *C. tropicalis*. Entre os compostos já reportados apresentando sinergismo com azólicos estão: almidorona, usada para o tratamento da fibrilação atrial e droga de escolha para pacientes com arritmia (SILVA et al., 2013a); cloroquina, uma droga utilizada no tratamento da malária (LI et al., 2015); ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteróide que apresenta atividade inibitória de bombas de efluxo (SHARMA et al., 2015); tracolimus (FK506), um imunossupressor e inibidor clássico de transportadores do tipo ABC (NEVES-JUNIOR et al., 2015). Alguns desses compostos também apresentaram atividade *in vitro* contra *C. tropicalis*.

A prometazina ((*RS*)-*N,N*-dimetil-1-(10*H*-fenotiazina-10-il)propan-2-amina), um composto pertencente à classe das fenotiazinas, é um antagonista do receptor H1 de primeira geração que apresenta efeitos anti-histamínicos, antieméticos e sedativos (CANTISANI et al., 2013). Possui baixo peso molecular e característica lipofílica, não sendo substrato para a glicoproteína-p, a qual é responsável pelo efluxo de moléculas pela barreira-hematoencefálica (BAUMANN-BIRKBECK et al., 2014).

Além de bloquear os receptores H1, atuando como antagonista para a histamina, a prometazina também apresenta afeta canais iônicos dependentes de ligantes, como os receptores purinérgicos (P2) e receptores colinérgicos (ACh), e canais de íons dependentes de voltagem, como os canais de sódio, cálcio ou potássio. A prometazina também inibe a bomba Na^+/K^+ -ATPase do cérebro e a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (CANTISANI et al., 2013). Ademais, as fenotiazinas, classe à qual a prometazina pertence, são considerados compostos que apresentam atividade inibidora de bombas de efluxo (KOLACZKOWSKI; MICHALAK; MOTOHASHI, 2003).

Na clínica humana, a prometazina é utilizada no tratamento de náuseas e vômitos pós-operatórios (DEITRICK et al., 2015), cinetose (DIAZ-ARTILES et al., 2017), náuseas e vômitos na gravidez e hiperêmese gravídica (TAYLOR et al., 2017), sintomas alérgicos (CANTISANI et al., 2013), enxaqueca (ASADOLLAHI et al., 2014) e agressão induzida por psicose (HUF et al., 2016). Na clínica veterinária, a prometazina é utilizada como tratamento para choque anafilático em aves (MILBRADT et al., 2017) e apresenta efeitos antieméticos em gatos (KOLAHIAN; JAROLMASJED, 2012) e efeitos antioxidantes em testes realizados com cavalos adultos (PÉTERS et al., 2009).

Brilhante et al. (2012) observaram que a prometazina, quando testada em concentração sub-inibitória, reduz a concentração inibitória do fluconazol e itraconazol frente a cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes à azólicos. O mesmo foi observado em outros estudos com *Candida* spp. (CASTELO-BRANCO et al., 2013; ROCHA et al., 2016), nos quais a prometazina aumentou a sensibilidade de cepas resistentes, alterando o fenótipo de resistência a azólicos. Os autores sugerem que essa interação se deve a inibição de transportadores do tipo ABC, que estariam sendo superexpressos nessas cepas resistentes. Porém, os efeitos da prometazina sobre as células e a atividade antifúngica dessa droga, principalmente em cepas resistentes a azólicos, não foram o alvo desses estudos. Sendo assim, são necessários estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dessa droga frente a células fúngicas.

Entre as metodologias que podem ser utilizadas para o estudo dos mecanismos de ação de compostos com atividade antifúngica, a citometria de fluxo se destaca como uma importante ferramenta, sendo empregada na investigação de muitos aspectos fisiológicos e biologia celular de leveduras. As vantagens do uso da citometria de fluxo incluem aquisição de dados em alta velocidade, não-dependência do crescimento das células, investigação e isolamento de células individuais e alta significância estatística dos dados provenientes de um grande número de células individuais (OVERTON, 2015).

Entre os mecanismos de ação contra células de *C. tropicalis* que podem ser analisados através da citometria de fluxo estão a inibição da atividade de bombas de efluxo (NEVES-JUNIOR et al., 2015), mudanças no tamanho e complexidade interna da célula, danos causados à membrana celular, alteração da atividade mitocondrial, indução de apoptose (SILVA et al., 2016) e detecção de níveis intracelulares de íons (JIA et al., 2016). Através dessas metodologias, é possível estabelecer quais os possíveis efeitos de um determinado composto sobre as células fúngicas e avaliar seus possíveis sítios de ação.

3 HIPÓTESES

1. *Candida tropicalis*, seja de origem humana ou veterinária, apresenta o mesmo perfil de produção de fatores de virulência *in vitro*;
2. *C. tropicalis* de origem humana e veterinária causam elevada mortalidade em modelo de infecção utilizando *Caenorhabditis elegans*;
3. Os biofilmes de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária apresentam baixa sensibilidade aos antifúngicos de uso clínico;
4. Expressão elevada de bombas de efluxo e da enzima Erg11 são mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária;
5. A prometazina apresenta ação antifúngica e reduz as concentrações inibitórias de antifúngicos frente à cepas de *C. tropicalis* resistentes a azólicos;
6. A prometazina age causando perturbação na membrana plasmática e na atividade mitocondrial das células de *C. tropicalis*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os fatores de virulência, o perfil de sensibilidade de células planctônicas e sésseis e os mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária, bem como avaliar o efeito da prometazina sobre cepas de *C. tropicalis* resistentes a azólicos

4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar, *in vitro*, a produção de fosfolipases e proteases, a atividade hemolítica e a formação de biofilme por cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária;
2. Investigar a patogenicidade de cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária utilizando o modelo de infecção experimental *Caenorhabditis elegans*;
3. Determinar o perfil de sensibilidade de células planctônicas e associadas em biofilme de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária a drogas antifúngicas;
4. Analisar o conteúdo de esteróis totais e a atividade de efluxo em cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária resistentes a azólicos;
5. Quantificar o nível de expressão gênica dos genes *ERG11*, *CDR1* e *MDR1* em cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária;
6. Determinar a sensibilidade à prometazina de cepas de *C. tropicalis* resistentes a azólicos na forma planctônica e em biofilme;
7. Avaliar a interação entre a prometazina e drogas antifúngicas frente a cepas de *C. tropicalis* resistentes a azólicos;
8. Investigar o efeito da prometazina sobre a atividade de efluxo, estrutura e morfologia celular e atividade mitocondrial de células de *C. tropicalis*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise morfológica dos biofilmes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada na Central Analítica, pertencente ao Departamento de Física da UFC.

5.2 Microrganismos

Um total de 52 cepas de *C. tropicalis* foi utilizado ao longo deste estudo, sendo 24 cepas de origem humana e 28 cepas de origem veterinária. A origem e sítio de isolamento das cepas estão descritos no Quadro 02. Todas as cepas veterinárias foram isolados como parte da microbiota de animais sadios vivos, à exceção das cepas de cachalote-anão, as quais foram isoladas de animais mortos sem sinais de infecção fúngica. As cepas humanas foram isoladas de quadros infecciosos. Todas as cepas pertencem a Micoteca do CEMM e encontravam-se estocadas em solução salina a 4 °C. Os microrganismos foram recuperados em ágar batata dextrose e a confirmação da pureza e identificação das cepas foi realizada através de testes fisiológicos, como produção de urease em ágar ureia de Christensen (Difco Laboratories, Inglaterra), assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrato, além da análise das características micromorfológicas das colônias em ágar fubá-Tween 80 (DE HOOG et al., 2000; LACHANCE et al., 2011) e semeio em meio cromogênico (HiCrome *Candida* Differential Agar; HiMedia Laboratories, Índia). Colônias puras foram, então, transferidas para ágar batata dextrose e mantidas até o momento de uso. As cepas de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram utilizadas em diferentes momentos como cepas controle.

5.3 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em três etapas distintas. A primeira etapa constituiu na avaliação dos fatores de virulência produzidos por *C. tropicalis* de origem humana e veterinária, como produção de proteases e fosfolipases, atividade hemolítica e produção de

biofilme, determinação do perfil de sensibilidade das células na forma planctônica e dos biofilmes maduros frente às drogas antifúngicas de uso clínico, bem como avaliar a patogenicidade das cepas frente ao nematódeo *C. elegans*. Na segunda etapa, foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica dos mecanismos de resistência aos azólicos nas cepas não-susceptíveis de *C. tropicalis*. Finalmente, foi analisado o efeito da prometazina sobre a concentração inibitória mínima das drogas antifúngicas frente células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis*, além de investigar os potenciais mecanismos de dano celular apresentados pela prometazina contra esta espécie de levedura. As análises das três etapas experimentais foram conduzidas conforme apresentado na Figura 7.

Quadro 2. Origem das cepas de *Candida tropicalis* utilizadas neste estudo

Origem (espécie)	Sítio Anatômico	Cepas (n)	Total (n)
Caprino (<i>Capra aegragus hircus</i>)	cavidade nasal	9	11
	cavidade oral	2	
Arara (<i>Ara ararauna</i>)	inglúvio	1	1
Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	cavidade oral	1	1
Periquito-do-sertão (<i>Aratinga cactorum</i>)	cloaca	1	1
Ema (<i>Rhea americana</i>)	cavidade oral	1	3
	cloaca	2	
Peixe-boi-da-Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>)	pele	1	1
Cachalote-anão (<i>Kogia sima</i>)	espiráculo	1	3
	genital	1	
	cavidade retal	1	
Camarão (<i>Macrobrachium amazonicum</i>)	trato digestivo	1	1
Jabuti (<i>Chelonoidis</i> spp.)	cavidade oral	2	6
	cloaca	4	
Humano	urina	15	24
	aspirado traqueal	3	
	lavado broncoalveolar	2	
	ponta de cateter	2	
	secreção de ferida	1	
	unha	1	
Total		52	

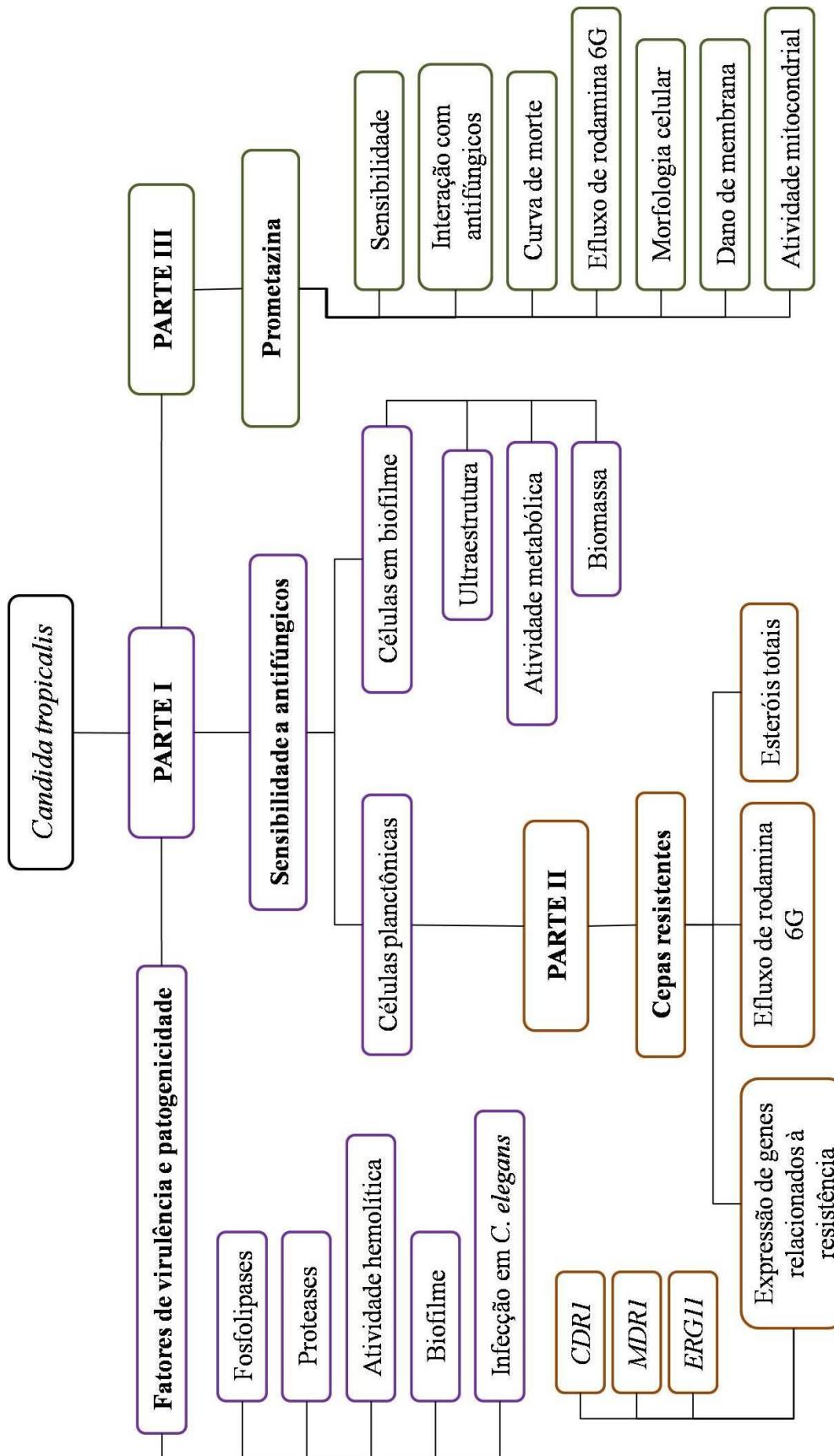


Figura 7. Organograma e estruturação experimental deste estudo.

1^a PARTE EXPERIMENTAL

5.4 Produção de fatores de virulência por *C. tropicalis*

5.4.1 *Produção de fosfolipases*

Para a avaliação da produção de fosfolipases, utilizou-se o protocolo descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982). O meio ágar gema de ovo (ágar Sabouraud dextrose 2% adicionado de 1 mol/L de cloreto de sódio, 0,05 mol/L de cloreto de cálcio e 8% de uma emulsão de gema de ovo estéril a 30%) foi distribuído em placas de Petri de 90 mm estéreis e mantidas sob refrigeração até momento de uso. Células de *C. tropicalis* (24 cepas de origem humana e 28 cepas de origem veterinária) foram previamente crescidas em ágar batata dextrose por 24 h a 35 °C. Após esse período, o inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril, atingindo uma concentração final de 4 na escala de McFarland. Cinco microlitros de cada inóculo foram pipetados em discos de papel filtro esterilizados de aproximadamente 5 mm, os quais foram depositados nas placas contendo o meio ágar gema de ovo. Após um período de incubação de 7 dias a 35 °C, a atividade enzimática (Pz) foi determinada calculando a razão entre o diâmetro da colônia fúngica e o diâmetro total (colônia + halo da zona de precipitação). As cepas foram classificadas como não produtora (Pz = 1), produtora ($1 > Pz \geq 0,64$) ou forte produtora de fosfolipases ($Pz < 0,64$) (SIDRIM et al., 2010). *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo em todos os testes.

5.4.2 *Produção de proteases*

A produção de proteases foi avaliada como descrito por Aoki et al. (1994), com modificações. Para essa finalidade, utilizou-se o meio ágar BSA (2% de dextrose, 0,1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,25% de K₂HPO₄, 0,02% de MgSO₄ · 7H₂O, 1,5% de ágar bacteriológico e 0,25% de albumina sérica bovina), ajustado para o pH 3,5 utilizando-se HCl. Cepas de *C. tropicalis* (24 cepas de origem humana e 28 cepas de origem veterinária) foram previamente crescidas em caldo YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) por 24 h a 35 °C. Após esse período, os tubos com crescimento em caldo foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril a uma concentração final de 5 na escala de McFarland. 10

μL de cada inóculo foram pipetados em discos de papel filtro esterilizados de aproximadamente 5 mm, os quais foram depositados nas placas contendo o meio ágar BSA. Após um período de incubação de 5 dias a 35 °C, a atividade enzimática (Pz) foi determinada calculando a razão entre o diâmetro da colônia fúngica e o diâmetro total, incluindo a colônia e a zona de precipitação. Pz = 1 indica que a cepa é negativa para a produção de protease, enquanto Pz < 1 indica que a cepa é positiva para a produção da enzima (VIDOTTO et al., 2004). *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo em todos os testes.

5.4.3 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica de *C. tropicalis* foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Favero et al. (2011), com modificações. As cepas (24 de origem humana e 28 de origem veterinária) foram previamente cultivados em meio RPMI 1640 e incubados a 37 °C por 24 h. Após esse período, os tubos com crescimento em caldo foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As culturas foram lavadas com solução salina estéril, centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. Após a lavagem, 2 μL da suspensão celular foram inoculadas pontualmente em placas contendo ágar sangue de carneiro enriquecido (meio RPMI 1640 suplementado com 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro desfibrinado). As placas foram, então, incubadas a 37 °C por 48 h. Após a incubação, as placas foram analisadas quanto à presença de halo translúcido e/ou esverdeado ao redor das colônias, indicando atividade hemolítica positiva. Os halos foram mensurados e a atividade hemolítica foi classificada como ausente (sem halo visível), fraca (halo ≤ 1 mm), moderada (halo medindo de 1,1 a 1,49 mm) ou forte (halo $\geq 1,5$ mm) (FAVERO et al., 2014). Uma cepa de *Streptococcus pyogenes* (beta-hemolítico) e uma de *Streptococcus sanguinis* (alfa-hemolítico) foram utilizadas como controle em todos os testes.

5.4.4 Formação de biofilme

Para o teste de formação do biofilme, inóculos foram preparados conforme previamente descrito por Cordeiro et al. (2015a). Todas as cepas (24 de origem humana e 28 de origem veterinária) foram utilizados neste teste. Células de *C. tropicalis* foram ressuspensas em meio RPMI e a suspensão foi ajustada até atingir a concentração 1×10^6 células/mL. Posteriormente, 200 μL do inóculo foram transferidos para placas de poliestireno

de 96 poços de fundo chato, as quais foram incubadas a 37 °C por 48 h. Poços contendo apenas meio de cultura sem inóculo foram utilizados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os poços lavados três vezes com PBS-Tween (0,05% de Tween 20 em PBS). Subsequentemente, os poços foram lavados com 100 µL de metanol 100% e o sobrenadante foi aspirado. Após a secagem das placas, uma alíquota de 100 µL de cristal violeta a 0.3% foi adicionada em cada poço. Após 20 minutos, a solução corante foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com água destilada estéril. Finalmente, 150 µL de uma solução de ácido acético a 33% foram adicionados aos poços e deixados por 30 segundos. O volume foi, então, transferido para uma nova placa de 96 poços, a qual foi lida imediatamente utilizando um espectrofotômetro a 590 nm para obtenção dos valores de densidade óptica (DO). Os valores de ponto de corte (DOc) para o ensaio de formação do biofilme foram definidos como três desvios padrões acima da média da DO do controle negativo. Todas as cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme ($DO \leq DOc$), produtoras fracas ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), produtoras moderadas ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e forte produtoras ($4 \times DOc < DO$).

5.5 Ensaio patogenicidade utilizando *Caenorhabditis elegans*

A patogenicidade de *C. tropicalis* (20 cepas de origem humana e 20 cepas de origem veterinária) foi investigada através de ensaio de infecção experimental utilizando o nematódeo *C. elegans*, de acordo com protocolo proposto por Breger et al. (2007), com modificações. Nematódeos no estágio L4 foram previamente cultivados em ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) contendo *Escherichia coli* OP50. As cepas de *C. tropicalis* foram previamente cultivadas em meio BHI ágar (*Brain Heart Infusion*; HiMedia Laboratories, Índia) suplementado com 100 µg/mL de ciprofloxacina e incubadas por 48 h a 35 °C. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 foi usada como controle positivo em todos os ensaios. A cepa *E. coli* OP50 também foi previamente cultivada em BHI ágar sem adição de antibacteriano a 30 °C por 24 h e usada como controle negativo. Posteriormente, os nematódeos foram lavados das placas contendo NGM com tampão M9 e transferidos para as placas contendo os microrganismos estudados. As placas foram mantidas em estufa a 25 °C por 2 h, para que os nematódeos pudesse se alimentar dos microrganismos. Após a incubação, foram realizadas três lavagens consecutivas dos nematódeos a fim de remover os

microrganismos aderidos à cutícula dos vermes. Aproximadamente 50 nematódeos foram transferidos para placas de cultura de células com 6 poços contendo 1,5 mL de meio líquido composto por tampão M9 (79%), BHI caldo (20%), 100 µg/mL de colesterol em etanol e 100 µg/mL de ciprofloxacina. As placas foram, então, incubadas a 25 °C e a viabilidade dos nematódeos foi analisada após 0, 24, 48, 72 e 96 h. Foram considerados mortos os animais que apresentavam estruturas fúngicas exteriorizando-se do pseudoceloma do nematódeo e/ou que não respondessem a estímulos mecânicos. Cada verme considerado morto era retirado do poço ao longo do experimento, sendo estabelecida uma curva de sobrevivência ao final do teste (BREGER et al., 2007).

5.6 Teste de sensibilidade

5.6.1 Drogas antifúngicas

Para a realização dos testes de sensibilidade de *C. tropicalis* tanto na forma planctônica como no biofilme, foram utilizados os antifúngicos anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Corporation, EUA), itraconazol (ITC; Janssen Pharmaceutica, Bélgica), fluconazol (FLC; Pfizer Pharmaceuticals, EUA), voriconazol (VRC; Pfizer, Brasil) e caspofungina (CAS, Sigma Chemical Corporation, EUA). As soluções-estoque dos antifúngicos foram diluídas em DMSO a 100%, conforme protocolo M27-S4 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2012). As drogas foram estocadas a -20 °C e diluídas no momento de uso em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morpholinepropanesulfônico (MOPS, Sigma Chemical Co., EUA).

5.6.2 Inóculo fúngico

Os inóculos para o teste de sensibilidade das células na forma planctônica foram preparados a partir de culturas de *C. tropicalis* previamente semeadas em ágar batata dextrose e incubadas por 24 horas a 35 °C. No preparo do inóculo, colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,9%) e a suspensão obtida foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída nas

proporções 1:50 e 1:20 em meio RPMI para obtenção de um inóculo apresentando concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL (CLSI, 2008b).

5.6.3 Ensaio de microdiluição das células planctônicas

O teste de sensibilidade foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008b). Os antifúngicos foram testados nas concentrações preconizadas pelo CLSI, com intervalos que variaram de 0,125 a 64 µg/mL para FLC, de 0,03215 a 16 µg/mL para ITC, VRC e AMB e de 0,01625 a 8 para CAS. Alíquotas de 100 µL do inóculo preparado como anteriormente descrito foram adicionadas às placas de cultura de 96 poços já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado das drogas, distribuídas em diluições seriadas. Como controle de crescimento de cada cepa, foram utilizados poços contendo o inóculo e o meio RPMI sem a adição de droga. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata. Para a AMB, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como aquela capaz de inibir 100% do crescimento fúngico visível quando comparado ao controle sem tratamento; para ITC e FLC, CIM foi definido como a menor concentração capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico, quando comparado ao controle sem tratamento (CLSI, 2008b). As cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle de qualidade em todos os testes. Para as drogas FLC, VRC e CAS, as cepas foram classificadas como resistente, sensível dose-dependente, intermediário ou sensível de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012). Para as drogas AMB e ITC, as cepas foram classificadas como do tipo selvagem (*wild-type*, WT) e tipo não-selvagem (*non-wild-type*, NWT) (PFALLER; DIEKEMA, 2012). Os pontos de corte clínicos (*clinical breakpoints*) preconizados pelo CLSI e os valores de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff values*) estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Pontos de corte clínicos (*clinical breakpoints*) e valores de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff values*) para *Candida tropicalis*.

Droga antifúngica	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)					
	S	SDD	I	R	WT	NWT
Fluconazol	≤ 2	4	-	≥ 8	-	-
Voriconazol	$\leq 0,125$	0,25 – 0,5	-	≥ 1	-	-
Itraconazol	-	-	-	-	$\leq 0,5$	$> 0,5$
Caspofungina	$\leq 0,25$	-	0,5	≥ 1	-	-
Anfotericina B	-	-	-	-	≤ 2	> 2

S: sensível; SDD: sensível dose-dependente; I: sensibilidade intermediária; R: resistente; WT: cepa tipo selvagem; NWT: cepa tipo não-selvagem.

5.6.4 Ensaio de microdiluição das células sésseis

O ensaio de sensibilidade antifúngica das células em biofilme de *C. tropicalis* foi realizado conforme descrito por Bizerra et al. (2008), com modificações. Para esse teste, foram escolhidas 12 cepas de *C. tropicalis* formadoras de biofilme (6 cepas de origem humana e 6 cepas de origem veterinária). Os biofilmes foram formados como descrito no item 5.4.4. Após 24 h de formação do biofilme, o meio foi aspirado e cada poço contendo biofilme foi lavado três vezes com PBS estéril para remoção das células não aderentes. Posteriormente, alíquotas de 200 μL de meio RPMI 1640 contendo diluições seriadas de cada antifúngico foram adicionadas aos poços contendo biofilme maduro de *C. tropicalis* e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. As drogas antifúngicas foram testadas nas concentrações 0,5-512 $\mu\text{g/mL}$ para o FLC, 0,125-128 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, ITC e VRC e 0,0625-64 $\mu\text{g/mL}$ para CAS. Para cada cepa testada, poços com biofilme sem a adição de drogas (controle de crescimento) e poços sem crescimento de biofilme (controle de esterilidade) foram incluídos. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween. Finalmente, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT; Sigma Chemical Co., EUA). Para tanto, alíquotas de 100 μL da solução XTT-menadiona [0,1 mg/mL de XTT e 1 μM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)],

preparada em PBS e filtrada em membrana de 0,22 µM, foram adicionadas aos poços e as placas foram incubadas no escuro por 2 h a 37 °C. Posteriormente, a solução de XTT foi transferida para poços de uma nova placa, seguido por leitura em espectrofotômetro a 492 nm. A concentração inibitória mínima das células sésseis (CIMS) frente aos biofilmes maduros foi determinada como a concentração mínima capaz de reduzir em 50% (CIMS₅₀) e 90% (CIMS₉₀) da atividade metabólica do biofilme quando comparado à atividade metabólica do controle de crescimento do biofilme da respectiva cepa sem a adição de antifúngicos. Para CAS, a ocorrência de efeito paradoxal foi considerada presente quando observado um aumento na atividade metabólica, igual ou maior a 20% daquela do controle de crescimento do biofilme, em concentrações da droga acima o CIMS₉₀. Experimentos foram realizados em triplicata.

5.6.5 Quantificação do biofilme após exposição à caspofungina

Para melhor avaliar o efeito da CAS sobre os biofilmes de *C. tropicalis*, foram realizados ensaios de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), viabilidade através da redução do XTT, análise da biomassa utilizando cristal violeta, microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.6.5.1 Análise da viabilidade e biomassa

Biofilmes de *C. tropicalis* (1 cepa representativa) foram formados em placas de poliestireno de 96 poços, como descrito acima. Após exposição dos biofilmes maduros à CAS em diferentes concentrações (0,0625–64 µg/mL) por um período de 48 h, os biofilmes foram quantificados quanto a viabilidade, através das técnicas de redução de XTT e contagem de UFC, e quanto a biomassa, através do ensaio com cristal violeta. Os ensaios com XTT e cristal violeta foram realizados como descrito anteriormente. Para a contagem de UFC, após o período de exposição à CAS, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS-*Tween*. Após a lavagem, os poços foram preenchidos com 200 µL de PBS, os biofilmes foram raspados dos poços com auxílio de ponteiras estéreis e o conteúdo dos poços foi transferido para microtubos estéreis. As células do biofilme foram vigorosamente agitadas em vórtex, diluídas adequadamente em PBS (diluições seriadas de 1:10) e semeadas em placas de Petri contendo ágar batata dextrose. As placas foram incubadas a 35 °C por até 48 h e as colônias foram

contadas para determinação do número de UFC/mL presentes no biofilme. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.6.5.2 Microscopia confocal de varredura a laser

Os efeitos de diferentes concentrações de CAS sobre os biofilmes maduros de *C. tropicalis* (1 cepa representativa) também foram analisados utilizando microscopia confocal de varredura a laser. Os biofilmes foram preparados como descrito anteriormente diretamente na superfície de lamínulas ThermanoxTM (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando uma placa de cultura de 12 poços. Após 24 h de crescimento, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril e diferentes concentrações de CAS (0,0625, 8, 16, 32 e 64 µg/mL) diluídas em RPMI 1640 foram adicionadas aos poços contendo as lamínulas com biofilmes. As placas foram, então, incubadas por 48 h a 37 °C. Biofilmes incubados apenas com RPMI 1640 sem adição de droga foram utilizados como controle. Após a incubação, os biofilmes foram lavados com PBS e, posteriormente, corados com o *kit* de reagentes fluorescentes LIVE/DEADTM (Invitrogen, EUA). As lamínulas foram avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para a detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis (em verde), e a 561 nm para a detecção do iodeto de propídio, o qual identifica células não-viáveis (em vermelho) (DI BONAVVENTURA et al., 2006). Para a análise das imagens, cinco pontos equidistantes foram selecionados nas imagens tridimensionais e a quantificação colorimétrica de intensidade e a mensuração do *Z-slice* foram realizadas utilizando o *software* ImageJ 1.50i (COLLINS, 2007).

5.6.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes de *C. tropicalis* (1 cepa representativa) após exposição à CAS foram analisados por MEV, de acordo com protocolo descrito por Wang, Yang e Ao (2009), com modificações. Biofilmes foram preparados como descrito no item anterior (microscopia confocal de varredura a laser). Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas ThermanoxTM contendo os biofilmes foram lavadas com tampão cacodilato 0,15 M com azul de alcian (0,1%) duas vezes. Biofilmes foram, então, recobertos com glutaraldeído (2,5% em tampão cacodilato 0,15 M) e incubados *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato por 5 minutos cada lavagem e as lamínulas foram

submetidas à desidratação por lavagens seriadas com álcool em concentrações ascendentes (50%, 70%, 80%, 95% e 100%), duas vezes por 10 minutos cada concentração. As lamínulas foram secadas a temperatura ambiente e, então, recobertas com hezametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos. Após esse período, o hexametildisilazano foi retirado e as lamínulas foram secas em dessecador por 24 h. As lamínulas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV. As imagens foram processadas com o *software* Photoshop (Adobe Systems, EUA).

2^a PARTE EXPERIMENTAL

Para o estudo dos mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária, foram selecionadas cepas apresentando diferentes perfis de sensibilidade. Baseado nos dados obtidos no teste de sensibilidade a antifúngicos (item 5.5.3), as cepas foram classificadas em três grupos: sensíveis a fluconazol (SF; CIM ≤ 0,5 µg/mL), pouco-sensíveis a fluconazol (PSF; CIM = 1 a 2 µg/mL) e não-sensíveis a fuconazol (NSF; CIM ≥ 4 µg/mL) (CHOI et al., 2016). No total, foram utilizadas, em todos os testes, 9 cepas consideradas sensíveis (5 humanas e 4 veterinárias), 5 cepas consideradas pouco-sensíveis (3 humanas e 2 veterinárias) e 11 cepas não-sensíveis (5 humanas e 7 veterinárias).

5.6 Análise dos esteróis totais

Esteróis totais foram extraídos como descrito por Moran et al. (2007), com modificações. As cepas de *C. tropicalis* foram crescidas em YEPD caldo *overnight* a 37 °C. Após esse período, cada suspensão celular foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 2 na escala de McFarland. As suspensões foram centrifugadas a 10000 × g por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram ressuspensos em 0,5 mL de uma solução de KOH alcoólico (KOH 20%, etanol 60%) e incubados por 1 h a 95 °C em banho-maria. Após a incubação, 0,6 mL de hexano foi adicionado e os tubos foram agitados em vórtex por alguns segundos. Os tubos foram centrifugados a 10000 × g por 1 minuto e a camada superior de hexano foi cuidadosamente transferida para um novo tubo. Hexano foi adicionado ao conteúdo do tubo até atingir o volume de 1 mL. A quantificação do ergosterol foi realizada

utilizando um espectrofotômetro a 295 nm e os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão pré-determinada de concentrações de ergosterol.

5.7 Análise do efluxo de rodamina 6G

A atividade das bombas de efluxo do tipo ABC foi avaliada através da mensuração do efluxo de rodamina 6G (R6G; Sigma-Aldrich, EUA) utilizando citometria de fluxo como descrito por Jiang et al. (2013) e Ivnitski-Steele et al. (2009), com adaptações. Cepas de *C. tropicalis* foram previamente crescidas em YEPD caldo *overnight* a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS duas vezes, ressuspensas em PBS e incubadas a 30 °C por 4 h para induzir a privação de energia. Posteriormente, R6G foi adicionada a suspensão (concentração final de R6G: 15 µM) e as células incubadas no escuro por 20 minutos a 30 °C. As células foram, então, lavadas com PBS frio para parar a absorção da R6G e a fluorescência das células foram imediatamente quantificadas a 535 nm utilizando citômetro de fluxo FACSCalibur (BD biosciences). Glicose (concentração final: 20 mM) foi adicionada a suspensão celular e incubadas por 30 minutos a 30 °C. A fluorescência das células na presença de glicose foi quantificada como no passo anterior. Em ambas as condições (células em privação e células com glicose), a fluorescência de 10000 células foi analisada. A fluorescência de células incubadas sem a presença de R6G foi utilizada como controle não-corado. A fluorescência foi expressa como valores médios arbitrários e os dados apresentados correspondem a histogramas de distribuição da frequência da fluorescência (número relativo de células versus intensidade de fluorescência relativa, expressa em unidades arbitrárias numa escala logarítmica). Cada experimento foi realizado em triplicata e uma cepa de *C. parapsilosis* resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo aumentada (ROCHA et al., 2016) foi utilizada como controle positivo em todos os testes.

5.8 RT-PCR quantitativo em tempo real

5.8.1 Extração e quantificação do RNA

Para a extração do RNA total das cepas de *C. tropicalis*, as células foram crescidas previamente em YEPD caldo a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas com água Milli-Q e o RNA total foi extraído e purificado utilizando o

High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado através do fluorômetro Qubit® (Life Technologies, EUA), utilizando o *Quibit® RNA HS Assay Kit* (Life Technologies, EUA), conforme as instruções do fabricante.

5.8.2 Transcriptase reversa

Fitas de cDNA foram sintetizados a partir do RNA total extraído através da técnica RT-PCR, utilizando o *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, EUA). Primeiramente, 0,5 µg de RNA e 0,5 µg do *primer* Oligo(dT)₁₅ foram combinados em microtubos e incubados em termociclador a 70 °C por 5 minutos. Após esse período, os tubos forem imediatamente resfriados por pelo menos 5 minutos e o mix de reação para a transcrição reversa foi adicionada aos tubos contendo RNA e *primer*. O mix de reação foi preparado utilizando 4 µL de *ImProm-II™ 5X Reaction Buffer*, 3 mM de MgCl₂, 20 u do inibidor de ribonuclease RNasin® recombinante e 1 µL da transcriptase reversa ImProm-II™. A reação foi adicionada de água livre de nuclease até atingir o volume final de 15 µL. Os tubos foram, então, incubados em termociclador a 42 °C por 1 h (extensão) seguido por 70 °C por 15 minutos (inativação da transcriptase reversa). As fitas de cDNA produzidas foram estocadas a -20 °C para posterior uso na reação de qPCR.

5.8.3 PCR quantitativo em tempo real

A análise dos níveis de expressão dos genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* através da técnica de qPCR foi realizada utilizando o *Power SYBR® Master Mix* (Life Technologies, EUA) e um termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, EUA). O gene *ACT* foi utilizado como controle interno. Os primers utilizados foram descritos previamente em outros trabalhos (JIANG et al., 2013; VANDEPUTTE et al., 2005). O mix da reação foi preparado utilizando 1 µL do cDNA, 0,75 µL de cada *primer* a 5 µM e 7,5 µL de 2×*FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche, EUA), com um volume final de 15 µL por reação. As condições de amplificação foram 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 54 °C por 11 segundos e 72 °C por 22 segundos. O valor de *cycle threshold* (*C_T*) dos genes de estudo foi normalizado utilizando os níveis de expressão do gene *ACT*, expressos como valores de ΔC_T . A expressão relativa dos genes ($\Delta\Delta C_T$) foi calculada

como mudança da expressão das cepas comparado com os valores médio de expressão de 6 cepas controle (3 humanas e 3 veterinárias) apresentando CIM para FLC entre 0,125 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (ajustado para 1,0).

3^a PARTE EXPERIMENTAL

Nesta etapa, três cepas apresentando diferentes fenótipos foram selecionadas a fim de avaliar o efeito da prometazina sobre a concentração inibitória mínima das drogas antifúngicas frente células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis* e investigar os potenciais mecanismos de dano celular apresentados pela prometazina. As cepas escolhidas foram uma cepa resistente a azólicos apresentando atividade aumentada de bomba de efluxo (CEMM 03-6-072), uma cepa resistente a azólicos sem atividade de bomba de efluxo (CEMM 03-6-077) e uma cepa sensível (CEMM 03-6-067).

5.9 Teste de sensibilidade frente a antifúngicos e a prometazina

5.9.1 Ensaio de microdiluição das células planctônicas

O preparo do inóculo, a diluição das drogas antifúngicas utilizadas e o teste de sensibilidade foram realizados como descrito no item 5.6. Para determinar a CIM frente às cepas utilizadas, as drogas foram testadas em concentrações variando de 0,00390625 até 16 $\mu\text{g/mL}$ para CAS, de 0,0625 até 16 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, de 0,125 até 1024 para FLC, de 0,03125 até 512 $\mu\text{g/mL}$ para ITC e VRC e de 1 até 512 $\mu\text{g/mL}$ para prometazina (PRM). A concentração máxima ou mínima da droga foi adaptada quando a CIM não se encontrava dentro da variação estabelecida pelo CLSI. *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram utilizados como controle de qualidade em todos os testes. A cepa *C. tropicalis* ATCC 750 foi utilizada como cepa de referência. Para PRM, o CIM foi definido como a menor concentração de droga capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico, quando comparado com o controle de crescimento sem droga. Para as drogas FLC, VRC e CAS, as cepas foram classificadas como resistente, sensível dose-dependente, intermediário ou sensível de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012). Para as drogas AMB e ITC, as cepas foram classificadas como WT e NWT (PFALLER; DIEKEMA, 2012) (Quadro 3). O efeito paradoxal após 120 h de incubação foi confirmado quando um aumento no crescimento

celular foi observado em concentrações pelo menos quatro vezes maior que o CIM da droga CAS (RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014). A concentração fungicida mínima (CFM) da PRM foi determinada semeando o conteúdo dos poços que não apresentavam crescimento fúngico visível em placas de ágar batata dextrose. Após 24 h de incubação a 35 °C, a CFM foi determinada como a menor concentração da droga que reduziu em 99,9% o inóculo fúngico inicial (CANTÓN et al., 2004).

5.9.2 Ensaio de microdiluição das células sésseis

O teste de sensibilidade dos biofilmes maduros de *C. tropicalis* foi realizado como descrito no item 5.6.5. Os biofilmes foram formados como descrito no item 5.4.4. As drogas antifúngicas foram testadas nas concentrações 0,5-512 µg/mL para o FLC, 0,125-128 µg/mL para AMB, ITC e VRC, 0,0625-64 µg/mL para CAS e 4-2048 µg/mL para PRM. Para cada cepa testada, biofilme sem a adição de drogas (controle de crescimento) e poços sem crescimento de biofilme (controle de esterilidade) foram incluídos. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween. Finalmente, a atividade metabólica do biofilme foi quantificada utilizando o ensaio de redução XTT como descrito no item 6.6.5. A concentração inibitória mínima das células sésseis (CIMS) foi determinada como a concentração mínima capaz de reduzir em 50% (CIMS₅₀) e 90% (CIMS₉₀) a atividade metabólica do biofilme quando comparado à atividade metabólica do controle de crescimento do biofilme da respectiva cepa sem a adição de antifúngicos. Para CAS, a ocorrência de efeito paradoxal foi considerada presente quando observado um aumento na atividade metabólica, igual ou maior a 20% daquela do controle de crescimento do biofilme, em concentrações da droga acima o CIMS₉₀. Experimentos foram realizados em triplicata.

5.9.3 Avaliação da interação entre prometazina e drogas antifúngicas

Para a avaliação da interação entre PRM e as drogas antifúngicas, duas concentrações sub-inibitórias de PRM (16 e 8 µg/mL) foram utilizadas. Os testes de sensibilidade tanto de células planctônicas como de células em biofilme foram realizados como descrito anteriormente utilizando FLC, VRC, ITC, CAS e AMB. Em cada teste, as drogas antifúngicas, em diluições seriadas, eram adicionadas das duas concentrações sub-

inibitórias fixas de PRM. As drogas em combinação eram então adicionadas às células planctônicas e sésseis e incubadas seguindo o protocolo para cada condição. A cepa de referência *C. tropicalis* ATCC 750 foi incluída como cepa controle. Após o período de incubação, as CIMs para cada droga antifúngica foram lidas e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado para cada combinação a fim de avaliar a interação entre as drogas. Sendo assim, a interação foi considerada sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônica ($ICIF > 4$) (CASTELO-BRANCO et al., 2013; ODDS, 2003).

5.10 Curva de tempo de morte

O ensaio para avaliar a curva de tempo de morte foi realizado em meio RPMI 1640 de acordo com a metodologia descrita por Cantón et al. (2004), com modificações. Previamente, as cepas de *C. tropicalis* foram cultivadas em agar batata dextrose e crescidas a 35 °C por 24 h. Após esse período, foi preparado um inóculo em meio RPMI equivalente a turbidez 0,5 na escala de McFarland, com posterior diluição de 1:20 em RPMI contendo PRM nas concentrações 16, 32, 64 e 128 µg/mL, atingindo um volume final de 5 mL. Esse procedimento permitiu a produção de um inóculo a uma concentração inicial de 4 a 6×10^4 UFC/mL. As suspensões fúngicas foram, então, incubadas a 35 °C sem agitação. A cada período de tempo predeterminado (0, 2, 4, 6, 12, 24, e 48 h), uma aliquota de 0,1 mL foi retirada dos tubos contendo os inóculos na presença ou na ausência de prometazina, sendo diluída seriadamente (1:10 cada diluição) em salina estéril, dependendo da concentração de células em cada tubo. Quanto maior a concentração de células no tubo, mais diluições eram necessárias. Após a diluição, 100 µL do inóculo final foram espalhados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose, as quais foram incubadas a 35 °C por até 48 h para determinar o número de unidades formadoras de colônia por mL. Os ensaios de tempo de morte foram realizados em duplicita.

5.11 Microscopia confocal de varredura a laser

Os efeitos de diferentes concentrações da PRM sobre os biofilmes maduros de *C. tropicalis* foram analisados utilizando microscopia confocal de varredura a laser. Os biofilmes foram preparados como descrito anteriormente diretamente na superfície de lamínulas Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando uma placa de cultura de 12 poços.

Após 24 h de crescimento, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril e diferentes concentrações de PRM (32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 µg/mL) diluídas em RPMI 1640 foram adicionadas aos poços contendo as lamínulas com biofilmes. As placas foram, então, incubadas por 48 h a 37 °C. Biofilmes incubados apenas com RPMI 1640 sem adição de droga foram utilizados como controle. Após a incubação, os biofilmes foram lavados com PBS e, posteriormente, corados com o *kit* de reagentes fluorescentes LIVE/DEAD™ (Invitrogen, EUA). As lamínulas foram avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2 como descrito anteriormente.

5.12 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes de *C. tropicalis* após exposição à PRM foram analisados por MEV como descrito no item 5.6.5.3. Biofilmes foram preparados como descrito no item anterior (microscopia confocal de varredura a laser). Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas Thermanox™ contendo os biofilmes foram processadas como descrito anteriormente. As lamínulas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV. As imagens foram processadas com o *software* Photoshop (Adobe Systems, EUA).

5.13 Análise do efeito da prometazina sobre a atividade de bomba de efluxo

A atividade de bombas de efluxo foi avaliada através de citometria de fluxo como descrito no item 5.7. Para avaliar o efeito da PRM sobre a atividade de bombas de efluxo em *C. tropicalis*, após a fase de privação de energia e antes de adicionar R6G, as células privadas de energia foram incubadas com PRM nas concentrações 8, 16 e 32 µg/mL por 1 h. A fluorescência das células após a incubação com R6G e após a incubação com glicose foi mensurada no citômetro de fluxo FACSCalibur nas condições descritas anteriormente. Células sem pré-incubação com PRM foram utilizadas como controle. Cada experimento foi realizado em triplicata e uma cepa de *C. parapsilosis* resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo aumentada (ROCHA et al., 2016) foi utilizada como controle positivo em todos os testes.

5.14 Análise do efeito da prometazina sobre o tamanho/granulosidade celular

A avaliação dos efeitos da prometazina sobre o tamanho/granulosidade celular em cepas de *C. tropicalis* foi avaliada por citometria de fluxo (ANDRADE NETO et al., 2014). As células foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose por 24 h a 35 °C. Posteriormente, as cepas fúngicas foram expostas a PRM (64, 128 e 256 µg/mL), AMB (droga controle, 2 µg/mL) e FLC (droga controle, 64 µg/mL) em meio RPMI 1640, a uma concentração final de 10⁶ células/mL, e incubadas a 35 °C por 2 e 4 h. Após esses períodos, as células foram lavadas com PBS e as células foram analisadas quanto ao seu tamanho/granulosidade utilizando citômetro de fluxo FACSCalibur. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Um total de 10000 células foi avaliado em cada ensaio e os detritos celulares foram omitidos da análise. Células incubadas em RPMI sem a presença de drogas foram utilizadas como controle.

5.15 Análise do efeito da prometazina sobre a integridade da membrana

Para avaliar o efeito da PRM sobre a integridade da membrana de células de *C. tropicalis*, foi utilizado o marcador fluorescente iodeto de propídeo (IP) (ANDRADE NETO et al., 2014). As células foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose por 24 h a 35 °C. Posteriormente, as cepas fúngicas foram expostas a PRM (64, 128 e 256 µg/mL), AMB (droga controle, 2 µg/mL) e FLC (droga controle, 64 µg/mL) em meio RPMI 1640, a uma concentração final de 10⁶ células/mL, e incubadas a 35 °C por 2 e 4 h. Após esses períodos, as células foram lavadas com PBS e incubadas a temperatura ambiente com 2 µg/mL de IP, no escuro, por 30 min. Após a incubação, a fluorescência de 10000 células foi determinada utilizando citômetro de fluxo FACSCalibur. Células incubadas em RPMI sem a presença de drogas foram utilizadas como controle. Os detritos celulares foram omitidos da análise. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.16 Mensuração do potencial transmembranar mitocondrial

O potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi determinado pela retenção do corante rodamina 123 (R123; Sigma-Aldrich, EUA) pela célula fúngica e analisado por citometria de fluxo (ANDRADE NETO et al., 2014). As células foram previamente cultivadas

em ágar batata dextrose por 24 h a 35 °C. Posteriormente, as cepas fúngicas foram expostas a PRM (64, 128 e 256 µg/mL), AMB (droga controle, 2 µg/mL) e FLC (droga controle, 64 µg/mL) em meio RPMI 1640, a uma concentração final de 10^6 células/mL, e incubadas a 35 °C por 2 e 4 h. Após esses períodos, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 5 µg/mL de R123, no escuro, a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e a fluorescência das células foi mensurada utilizando citômetro de fluxo FACSCalibur. Um total de 10000 células foi avaliado em cada ensaio e os detritos celulares foram omitidos da análise. Células incubadas em RPMI sem a presença de drogas foram utilizadas como controle.

5.17 Análise estatística

Os resultados da primeira parte experimental foram analisados através de ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste *post hoc* de Tukey. Para comparar as CIMs das drogas antifúngicas frente a células planctônicas e biofilme, foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman e o teste *post hoc* de Dunn. Para a curva de sobrevivência do *C. elegans*, o teste paramétrico t de Student foi utilizado para detectar a diferença entre os grupos. Um *P*-valor < 0,05 foi considerado significativo.

Os resultados da segunda parte experimental foram analisados através de ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste *post-hoc* de Tukey. A comparação da expressão gênica relativa foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. A relação entre a expressão de *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* foi examinada utilizando o coeficiente de correlação de Sperman. Um *P*-valor < 0,05 foi considerado significativo.

Na terceira parte experimental, todos os testes foram analisados utilizando ANOVA seguido de teste *port hoc* de Tukey. Um *P*-valor < 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

6 RESULTADOS

1^a PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Fatores de virulência

6.1.1 Produção de enzimas hidrolíticas

Os resultados da produção de fosfolipases e proteases secretadas estão descritos na Tabela 1. Um total de 11/52 (21,15%) cepas foi capaz de produzir fosfolipase quando crescidas em meio ágar gema de ovo, sendo 7/24 (29,2%) isoladas de humanos e 4/28 (14,3%) isoladas de animais. Desses, 3/52 (5,8%) (1/24 cepas humanos e 2/28 cepas veterinários) foram considerados fortemente produtores de fosfolipase, apresentando $Pz < 0,64$. Com relação à produção de proteases secretadas em meio ágar BSA, 11/28 das cepas veterinárias e 12/24 das cepas humanas (23/52 no total) apresentaram halos translúcidos ao redor da colônia, indicando proteólise do substrato presente no meio de cultura.

6.1.2 Atividade hemolítica

De todas as 52 cepas testadas, 50 (aproximadamente 96%) apresentaram a capacidade de causar a hemólise de células sanguíneas em meio de cultura sólido. Destas, 36 (69,2%) cepas apresentaram forte atividade hemolítica (18/28 cepas veterinárias e 18/24 cepas humanas), 12 (23,1%) apresentaram moderada atividade (6/28 cepas veterinárias e 6/24 cepas humanas) e 2 (3,8%) apresentaram fraca atividade. Na maioria das cepas apresentando atividade hemolítica, foi observado um halo interno translúcido cercado por um halo esverdeado indicando hemólise completa e parcial, respectivamente. As duas cepas apresentando fraca atividade e as duas cepas que não apresentaram atividade hemolítica eram de fonte veterinária (cabra e jabuti). Os dados referentes à atividade hemolítica estão na Tabela 1.

6.1.3 Formação de biofilme

No tocante à formação de biofilme, 51/52 (98%) das cepas apresentaram a capacidade de formar biofilmes, *in vitro*, sobre a superfície de placas de poliestireno. 34 (65,4%) cepas foram classificadas como fortes produtoras de biofilme (20/28 cepas veterinários e 14/24 cepas humanas), 12 (23,1%) foram produtoras moderadas (4/28 cepas veterinárias e 8/24 cepas humanas) e 5 (9,6%) foram facas produtoras (4/28 cepas veterinárias e 1/24 cepas humanas). A cepa não produtora é uma cepa clínica isolada de urina. Os resultados sobre a formação de biofilme estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de fatores de virulência *in vitro* por cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária.

Origem (n)	Fosfolipases	Proteases	Atividade hemolítica	Biofilme
Humana (24)	+ (6/24)			F+ (1/24)
	++ (1/24)	+ (12/24)	± (6/24)	± (8/24)
	– (17/24)	– (12/24)	++ (18/24)	++ (14/24)
Veterinária (28)	+ (2/28)		F+ (2/28)	F+ (4/28)
	++ (2/28)	+ (11/28)	± (6/28)	± (4/28)
	– (24/28)	– (17/28)	++ (18/28)	++ (20/28)

+: produtor; ++: forte produtor; ±: produtor moderado; F+: fraco produtor; -: negativo/não produtor

6.2 Ensaio de patogenicidade utilizando *Caenorhabditis elegans*

Com relação ao ensaio de patogenicidade utilizando o nematódeo *C. elegans* como modelo de infecção *in vivo*, os resultados mostram uma taxa de mortalidade significativamente alta ($p<0,0001$) quando os vermes são expostos a cepas de *C. tropicalis* em comparação com os vermes alimentados com *E. coli* OP50, que é a cepa rotineiramente utilizada como fonte de alimento para o nematódeo (Figura 8A). A taxa de mortalidade variou de 31 a 98% em 96 h após a exposição dos vermes às cepas de *C. tropicalis*, com média ±

desvio padrão de $86,07 \pm 3,42$ para as cepas humanas e $79,8 \pm 14,9$ para as cepas veterinárias, sem diferença significativa observada entre os dois grupos. Adicionalmente, foi observado que alguns vermes mortos apresentavam filamentação rompendo seu pseudocoelom e cutícula, como observado na Figura 8B e 8C. Essa característica foi observada com mais frequência em cepas humanas (dados não apresentados).

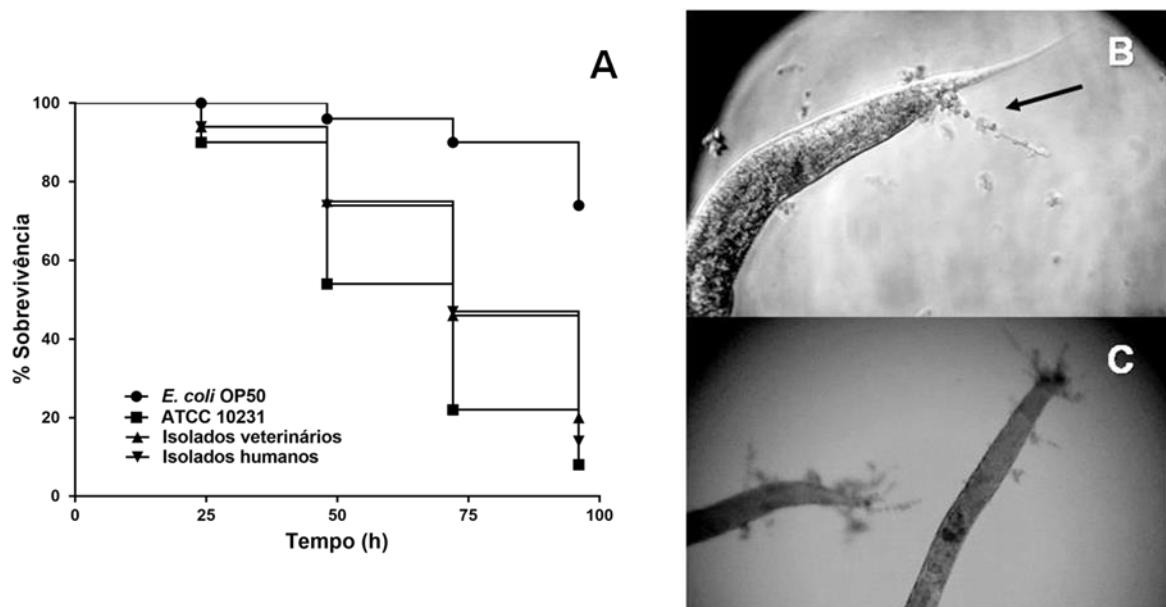


Figura 8. Avaliação da patogenicidade de *Candida tropicalis* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Os vermes foram alimentados com colônias de *C. tropicalis* (20 cepas humanas e 20 cepas veterinárias) por 2 h e então transferidos para meio líquido sem o patógeno. Nematódeos mortos foram contados e removidos diariamente. Vermes alimentados somente com *E. coli* OP50 foram utilizados como controle negativo. *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo. Imagens de microscopia mostraram nematódeos infectados com cepas de *C. tropicalis*, apresentando filamentos (B e C) rompendo o pseudocoeloma e a cutícula de vermes infectados. Aumento: 20x (B) e 10x (C).

6.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos

6.3.1 Perfil de sensibilidade de células planctônicas

A sensibilidade a antifúngicos de cepas planctônicas está apresentada na Tabela 2. Todas as cepas testadas foram sensíveis para a CAS e WT para a AMB, com CIMs variando para essas drogas de $<0,01$ a $0,25 \mu\text{g/mL}$ e de $0,25$ a $1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já para os derivados azólicos, foram observadas cepas resistentes para o FLC e VRC e cepas NWT para ITC, sendo essas cepas NWT consideradas resistentes ao ITC. Entre as cepas veterinárias,

6/28 foram resistentes ao FLC, 2/28 ao VRC e 2/28 resistente ao ITC, sendo que 1 cepa apresentou resistência aos três azólicos testados (isolada de camarão). Sensibilidade dose-dependente frente ao FLC e o VRC foi observada em 1/28 e em 5/28 das cepas veterinárias, respectivamente. Todas as cepas veterinárias sensíveis dose-dependente ao VRC também eram resistentes ou dose-dependente para o FLC. Entre as cepas humanas, 4/24 cepas apresentaram resistência aos três derivados azólicos testados, enquanto 1/24 cepa foi sensível dose-dependente para o FLC e 2/24 para o VRC.

Tabela 2. Sensibilidade a antifúngicos *in vitro* de cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária.

Origem da cepa (n)	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)				
	FLC	ITC	VRC	AMB	CAS
Humana (24)	0,25 (5)	<0,03125 (2)	<0,03125 (2)		
	0,5 (8)	0,03125 (8)	0,03125 (7)		<0,015625 (2)
	1 (3)	0,0625 (6)	0,0625 (2)	0,25 (2)	0,015625 (2)
	2 (3)	0,125 (4)	0,125 (7)	0,5 (18)	0,03125 (11)
	4 (1) ^{SDD}	16 (2) ^{NWT}	0,25 (2) ^{SDD}	1 (4)	0,0625 (7)
	64 (2) ^R	> 16 (2) ^{NWT}	> 16 (4) ^R		0,125 (2)
	> 64 (2) ^R				
Veterinária (28)	0,125 (3)	<0,03125 (6)	<0,03125 (2)		
	0,25 (9)	0,03125 (7)	0,03125 (16)		0,015625 (3)
	0,5 (7)	0,0625 (6)	0,0625 (3)	0,25 (6)	0,03125 (13)
	2 (2)	0,125 (4)	0,125 (1)	0,5 (16)	0,0625 (6)
	4 (1) ^{SDD}	0,25 (2)	0,25 (3) ^{SDD}	1 (6)	0,125 (4)
	8 (3) ^R	0,5 (2)	0,5 (3) ^{SDD}		0,25 (2)
	16 (1) ^R	> 16 (1) ^{NWT}	16 (1) ^R		
	64 (2) ^R				

FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; AMB: anfotericina B; CAS: caspofungina; ^{SDD}: sensível dose-dependente; ^R: resistente; ^{NWT}: cepa não-selvagem.

6.3.2 Perfil de sensibilidade de células sésseis

Quanto aos biofilmes maduros, o CIMS₅₀ encontrado para FLC, ITC e VRC foi significativamente maior ($p<0,0001$) que os CIMs obtidos para as células planctônicas, apresentando valores que variaram de 128 a $>512\text{ }\mu\text{g/mL}$, $>128\text{ }\mu\text{g/mL}$ e $\geq128\text{ }\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 3). CIMS₉₀ para AMB variou de 4 a 32 $\mu\text{g/mL}$, valores significativamente maiores ($p<0,0001$) do que os valores de CIM encontrados para a forma planctônica. CAS apresentou valores de CIMS₅₀ variando de $<0,0625$ a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Efeito paradoxal no biofilme após exposição à CAS foi observado em todas as cepas testadas, tendo início nas concentrações 4, 8 ou 16 $\mu\text{g/mL}$, dependendo da cepa (Tabela 3).

Tabela 3. Sensibilidade a antifúngicos de biofilmes maduros de cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária.

Cepas	ITC			VRC			FLC			AMB			CAS			
	CIM	CIMS ₅₀	CIMS ₉₀	CIM	CIMS ₅₀	CIMS ₉₀	CIM	CIMS ₅₀	CIMS ₉₀	CIM	CIMS ₅₀	CIMS ₉₀	CIM	CIMS ₅₀	CIMS ₉₀	EP
1	0,125	>128	>128	0,03125	128	>128	0,25	128	512	1	4	8	0,125	0,0625	0,125	16
2	0,25	>128	>128	0,5	>128	>128	8	512	>512	1	8	16	0,0625	<0,0625	0,0625	16
3	8	>128	>128	0,0625	>128	>128	0,5	>512	>512	0,5	8	16	0,03125	<0,0625	0,0625	16
4	0,5	>128	>128	0,5	>128	>128	8	>512	>512	0,5	8	32	<0,0312	<0,0625	<0,0625	8
5	0,125	>128	>128	0,03125	>128	>128	0,5	>512	>512	0,5	16	32	0,0625	0,125	0,25	4
6	0,03125	>128	>128	0,0625	>128	>128	0,5	>512	>512	1	4	8	0,03125	<0,0625	0,0625	8
7	0,0625	>128	>128	<0,0312	>128	>128	0,25	512	>512	0,5	4	8	<0,0312	<0,0625	<0,0625	16
8	16	>128	>128	4	>128	>128	2	512	>512	1	8	32	0,5	<0,0625	<0,0625	16
9	0,03125	>128	>128	0,03125	>128	>128	0,25	>512	>512	0,5	8	16	0,0312	0,0625	0,125	8
10	16	>128	>128	0,125	128	>128	1	512	>512	0,5	4	8	0,03125	<0,0625	0,0625	16
11	0,0625	>128	>128	0,0625	>128	>128	1	512	>512	0,5	2	4	0,03125	0,0625	0,25	4
12	8	>128	>128	0,125	>128	>128	1	>512	>512	0,5	8	32	0,125	0,0625	0,125	4

Valores em $\mu\text{g/mL}$. FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; AMB: anfotericina B; CAS: caspofungin; CIM: concentração inibitória mínima (células plântonicas); CIMS: concentração inibitória mínima de células sésseis EP – efeito parodoxal (células sésseis).

6,4 Análise do biofilme após exposição à caspofungina

6.4.1 Quantificação da viabilidade celular e biomassa

O efeito paradoxal dos biofilmes de *C.tropicalis* após exposição à CAS foi analisado utilizando diferentes técnicas (i.e., ensaio de redução do XTT, coloração com cristal violeta e contagem de UFC) (Figura 9). Todos os ensaios de quantificação de viabilidade celular e biomassa apontaram a presença de efeito paradoxal nas células do biofilme. Em altas concentrações, a atividade metabólica apresenta-se igual à do controle sem droga (Figura 9B). Porém, embora haja aumento significativo da biomassa e do número de UFC em concentrações maiores, esse aumento representa menos de 50% em relação ao controle sem tratamento (Figuras 9A e 9C).

6.4.2 Análise da estrutura do biofilme

Imagens de microscopia confocal e MEV foram obtidas dos biofilmes de *C.tropicalis* após exposição à de diferentes concentrações de CAS a fim de observar alterações na estrutura do biofilme e mudanças morfológicas nas células sésseis (Figuras 10 e 11). Na concentração CIMS₉₀ (0,0625 µg/mL), foi observada uma redução na quantidade de células viáveis quando comparado com o controle sem tratamento, com a estrutura do biofilme também alterada apresentando fragmentação e redução na espessura, como observado nas imagens de microscopia confocal. Entretanto, quando os biofilmes eram expostos à concentrações de 8 e 16 µg/mL de CAS, um aumento na quantidade de células viáveis era observado. Nessas concentrações, as células exibiram alterações morfológicas, como blastoconídios arredondados maiores e células colapsadas com superfície enrugada (Figuras 10 e 11). Nas concentrações 32 e 64 µg/mL, os biofilmes apresentaram redução no número de células viáveis. A espessura do biofilme após exposição a 8, 16, 32 e 64 µg/mL de CAS foi maior que a observada em biofilmes expostos a 0,0625 µg/mL (Figura 10).

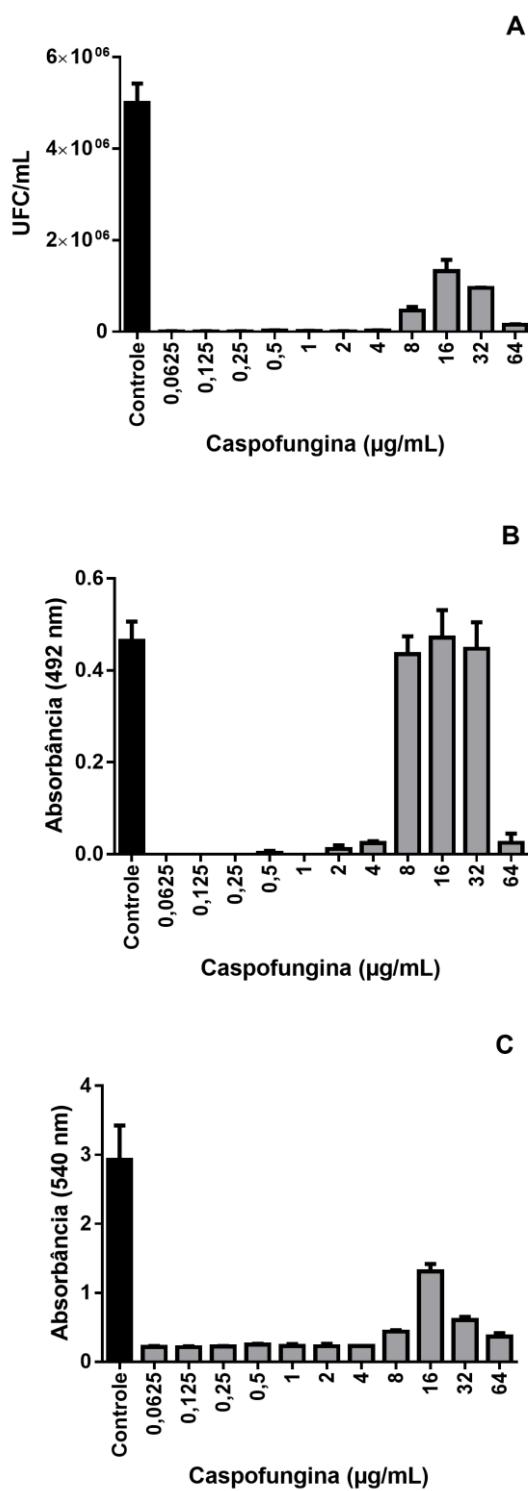


Figura 9. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), atividade metabólica e biomassa de biofilmes de *C. tropicalis* expostos a diferentes concentrações de caspofungina. Atividade metabólica das células no biofilme (ensaio da redução do XTT) e a quantificação da biomassa (coloração com cristal violeta) estão expressas como média \pm desvio padrão da densidade óptica. Contagem de UFC está expresso como média \pm desvio padrão da quantidade de colônias crescidas após semeio em ágar batata dextrose. Barras pretas correspondem ao biofilme não tratado (controle). (A) contagem de UFC; (B) ensaio de redução do XTT; (C) coloração com cristal violeta.

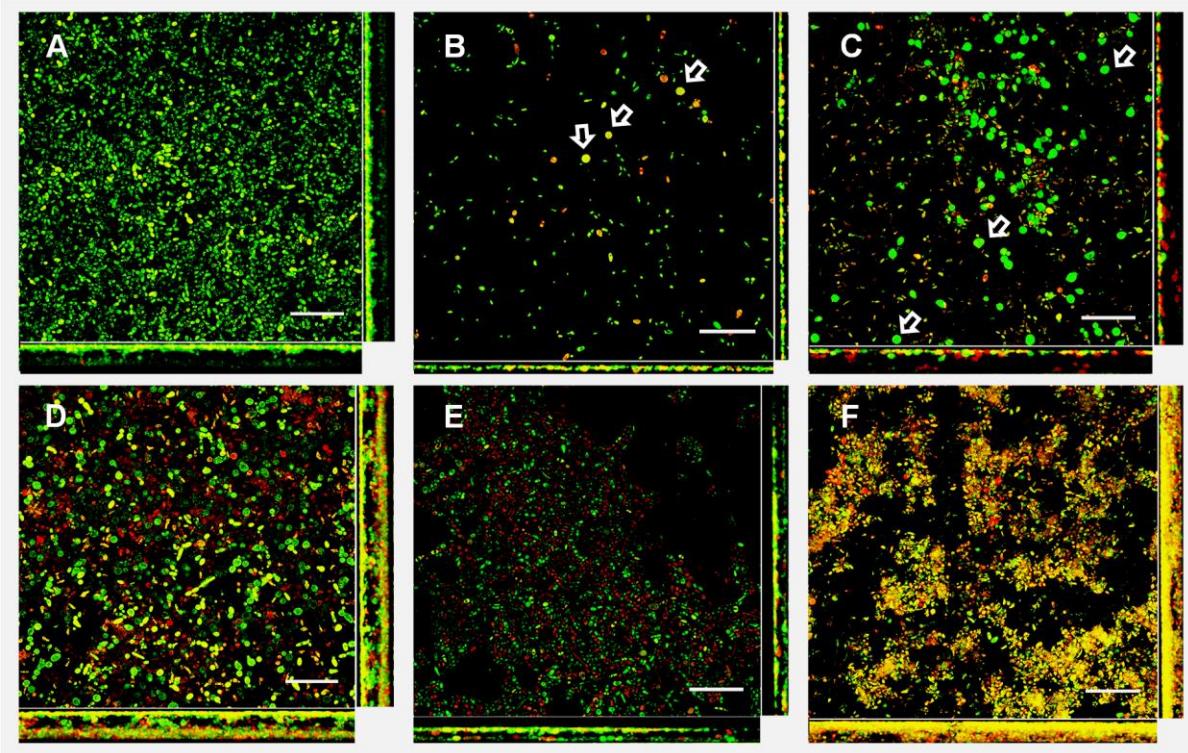


Figura 10. Imagens obtidas através de microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de caspofungina. Há uma redução significativa na viabilidade do biofilme na menor concentração testada ($0,0625 \mu\text{g/mL}$), entretanto efeito paradoxal pode ser observado em concentrações maiores. (A) Biofilme maduro não tratado (controle); Biofilme maduro após exposição à caspofungina nas concentrações (B) $0,0625 \mu\text{g/mL}$, evidenciando redução no número de células viáveis, perda da estrutura do biofilme e blastoconídios maiores arredondados (setas); (C) $8 \mu\text{g/mL}$, note um aumento no número de células viáveis e da espessura do biofilme comparado ao tratamento com $0,0625 \mu\text{g/mL}$, além de blastoconídios maiores e arredondados (seta); (D) $16 \mu\text{g/mL}$, note um aumento no número de células viáveis, espessura do biofilme similar à espessura do controle sem tratamento e blastoconídios maiores e arredondados; (E) $32 \mu\text{g/mL}$ e (F) $64 \mu\text{g/mL}$, observando-se um aumento no número de células viáveis em comparação com o tratamento com $0,0625 \mu\text{g/mL}$, com redução do tamanho dos blastoconídios quando comparado com o controle sem tratamento. Aumento: 400x. Lasers: 488 nm (SYTO9) para células viáveis; 561 nm (iodeto de propídio) para células mortas.

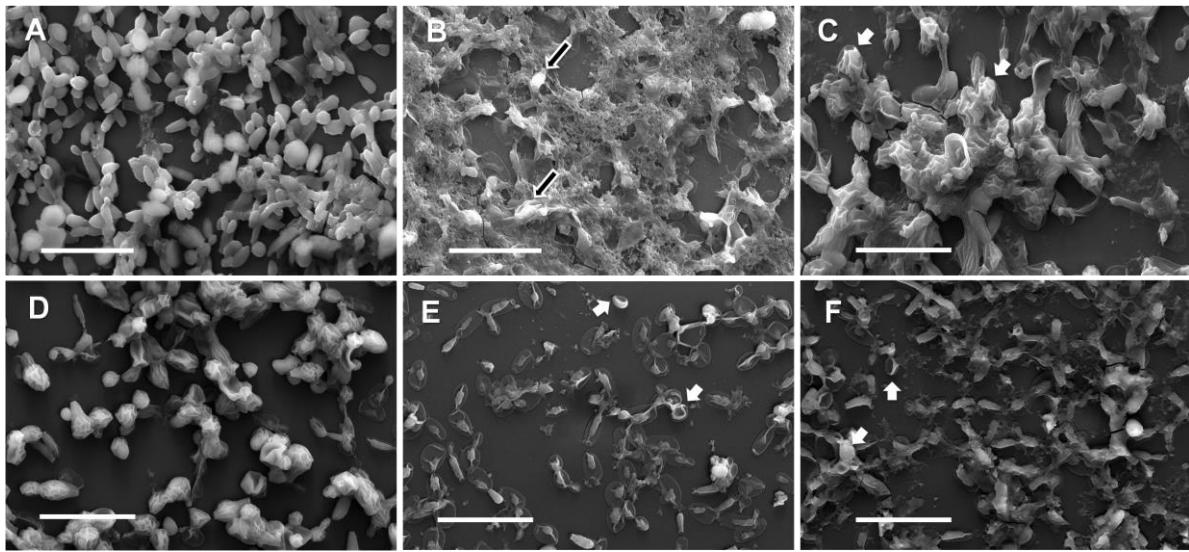


Figura 11. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de caspofungina. (A) Biofilme maduro não tratado (controle). Biofilme maduro tratado com caspofungina nas concentrações (B) 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando ruptura da estrutura do biofilme com poucos blastoconídios (setas) embebidos em uma matriz fragmentada; (C) 8 $\mu\text{g/mL}$, note a ruptura da estrutura do biofilme e aumento do número de células embebidas na matriz do biofilme quando comparado ao tratamento com 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, além de blastoconídios colapsados e enrugados (setas); (D) 16 $\mu\text{g/mL}$, note a ruptura da estrutura do biofilme e aumento do número de células embebidas na matriz do biofilme quando comparado ao tratamento com 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, e menos blastoconídios colapsados e enrugados quando comparado com o tratamento com 8 $\mu\text{g/mL}$; (E) 32 $\mu\text{g/mL}$ e (F) 64 $\mu\text{g/mL}$, onde se observa aumento no número de células alteradas morfologicamente (setas) e uma estrutura desorganizada e fragmentada do biofilme. Aumento: 2500x. Escala: 20 μm .

Uma análise de computador para mensuração da intensidade colorimétrica (pixel/ μm) das imagens obtidas por microscopia confocal também foi realizada. A intensidade colorimétrica de células viáveis no biofilme decaiu quando exposto a 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CAS quando comparado com o controle de crescimento. Nas concentrações 8 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a intensidade colorimétrica aumenta seguido por uma diminuição subsequente na intensidade colorimétrica nas concentrações 32 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12).

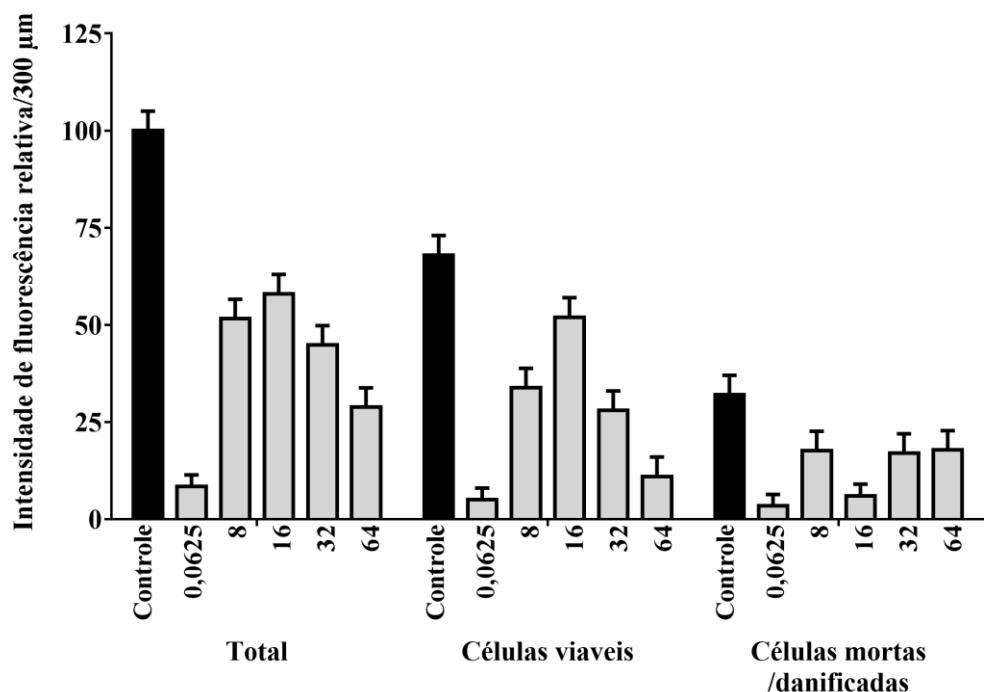


Figura 12. Intensidade colorimétrica das imagens obtidas por microscopia confocal de biofilmes de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com caspofungina. A intensidade colorimétrica (pixel/ μm) está expressa como média \pm desvio padrão da fluorescência emitida. Total representa a fluorescência de células viáveis e mortas juntas. Barras pretas representam a intensidade colorimétrica do biofilme não tratado (controle). Números no eixo X indicam as concentrações testadas de caspofungina ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

2^a PARTE EXPERIMENTAL

6.5 Análise dos esteróis totais

Esteróis totais de cepas de *C. tropicais* SF, PSF e NSF foram quantificados utilizando espectrofotometria após extração com hexano. Os resultados não revelaram nenhuma mudança significativa nos níveis de esteróis entre os grupos estudados, as médias do conteúdo de esteróis dos grupos PSF e NSF foram maiores que a média de grupo SF (Figura 13). A maior concentração de ergosterol foi observada em uma cepa PSF isolada de humano, enquanto a cepa que apresentou a menor concentração de ergosterol foi uma cepa SF também isolada de humano. As cepas humanas apresentaram maior concentração de ergosterol quando comparados a cepas veterinárias, porém essa diferença não se mostrou significativa.

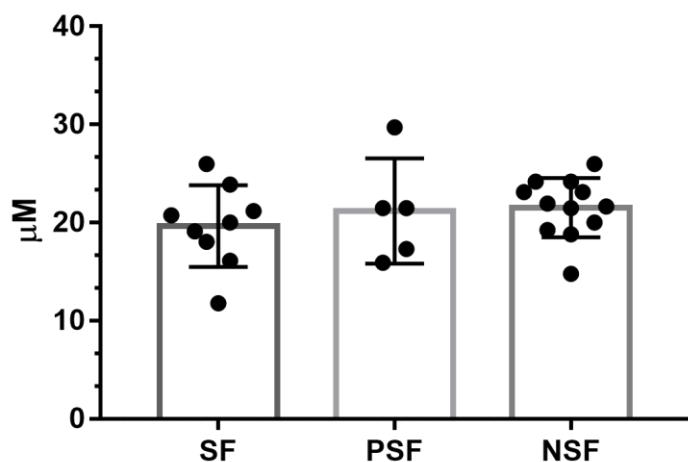


Figura 13. Concentração de ergosterol total em cepas de *Candida tropicalis* apresentando diferentes perfis de sensibilidade. SF: cepas sensíveis ao fluconazol. PSF: cepas pouco sensíveis ao fluconazol. NSF: cepas não-sensíveis ao fluconazol. Nenhuma diferença significativa foi observada. O resultado para cada cepa é dado como valores médios obtidos de experimentos em triplicata.

6.6 Análise do efluxo de rodamina 6G

A captura e o efluxo de R6G por células de *C. tropicalis* foi quantificado por citometria de fluxo a fim de avaliar a atividade de bombas de efluxo. A variação visual da quantidade de R6G nas células de cepas SF, PSF e NSF está representada na Figura 14. Após um período de 4 h de privação de energia seguido por 2 h de incubação com o fluorocromo, a intensidade média de fluorescência das células mudou significativamente nas cepas resistentes. Seis cepas NSF (2 de origem humana e 4 de origem veterinária) apresentaram aumento no efluxo de R6G após incubação com glicose, sendo observado uma redução de mais de 30% da intensidade de fluorescência intracelular. A maior atividade de efluxo foi observada em cepas de origem veterinária apresentando uma redução de mais de 40% na fluorescência captada, resultado semelhante observado para a cepa controle de *C. parapsilosis* que apresenta atividade de efluxo aumentada.

6.7 Expressão de *CDR1*, *MDR1* e *ERG11*

A expressão de genes relacionados à resistência a derivados azólicos foi analisada através de RT-PCR quantitativo e os resultados expressos na Figura 15. A maioria das cepas SF exibiram níveis baixos de expressão para os genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11*, com algumas cepas apresentando-se fora desse padrão. Uma cepa SF apresentou níveis elevados de expressão para *MDR1* (maior que 5 vezes quando comparado com a média dos controles) e outra cepa SF para *ERG11* (maior que 15 vezes quando comparado com a média dos controles), ambas de origem veterinária. Expressão aumentada (acima de cinco vezes em relação ao controle) para os genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* foi observada em 2/5, 3/5 e 4/5 cepas PSF, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as médias de expressão das cepas SF e PSF. Entretanto, as médias de expressão de *MDR1* e *ERG11* das cepas PSF foram 17 e 18 vezes maiores que as médias encontradas para as cepas SF.

A maioria das cepas NSF (9/12) apresentaram expressão elevada (maior que 5 vezes quando comparado com a média dos controles) para o gene *CDR1*, porém apenas metade das cepas (6/12) apresentaram expressão elevada para *MDR1* e *ERG11*. Apenas uma cepa não apresentou expressão elevada para nenhum dos genes estudados (cepa veterinário) enquanto todos os outros apresentaram expressão elevada para pelo menos um gene. Duas cepas NSF e uma PSF (todas isoladas de humanos) mostraram expressão elevada para os três

genes testados. As médias de expressão das cepas NSF para todos os genes testados foram significativamente maiores ($p<0,05$) que as médias das cepas SF, mas não houve diferença entre as médias dos grupos PSF e NSF. As médias de expressão de *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* do grupo NSF foram maiores 28,5, 24,3 e 29 vezes, respectivamente, quando comparado com a média dos controles. Utilizando o teste de correlação de Spearman, não foi observada nenhuma correlação significativa entre a expressão de *CDR1* e *MDR1*, *CDR1* e *ERG11* e *MDR1* e *ERG11* para todas as cepas testadas.

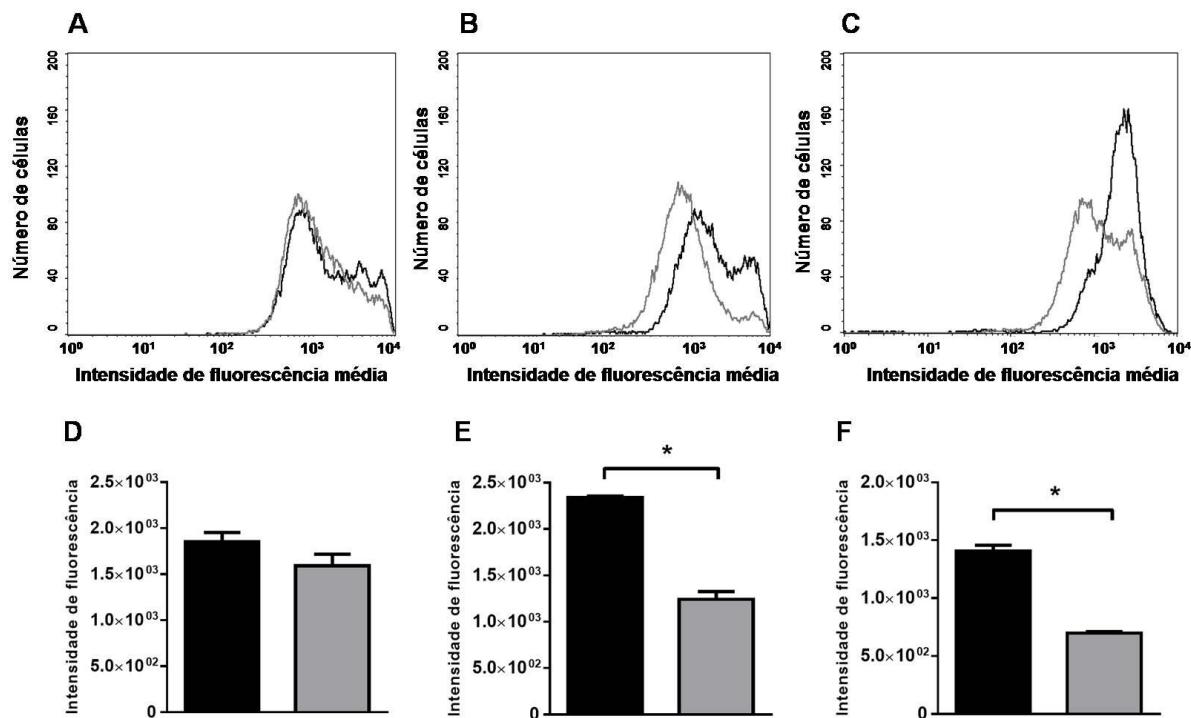


Figura 14. Análise representativa do efluxo de rodamina 6G em células de *Candida tropicalis* utilizando citometria de fluxo. A aquisição do fluorocromo pelas células foi quantificada após incubação de células de *C. tropicalis* com rodamina 6G por 20 min após um período de privação de energia (barras e linhas pretas). O efluxo foi avaliado quantificando a fluorescência residual das células após incubação adicional por 30 min na presença de glicose (barras e linhas cinza). A e D: cepa representativa sem atividade de efluxo significativa. B e E: cepa representativa apresentando atividade de efluxo aumentada. Uma cepa de *C. parapsilosis* resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo foi utilizada como controle positivo (C e F). * indica diferença significativa ($p<0,05$). Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata.

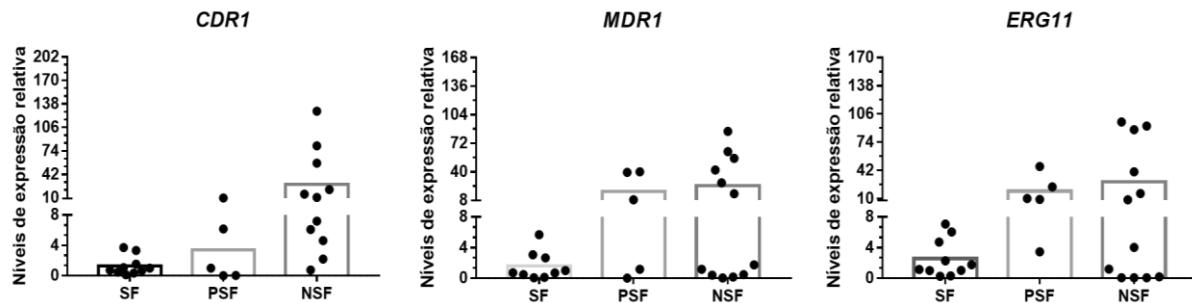


Figura 15. Níveis de expressão relativa de *CDR1*, *MDR1* e *ERG11* de cepas de *Candida tropicalis* apresentando diferentes perfis de sensibilidade ao fluconazol. SF: cepas sensíveis ao fluconazol ($\text{CIM} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$). PSF: cepas pouco sensíveis ao fluconazol (CIM de 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$). NSF: cepas não-sensíveis ao fluconazol ($\text{CIM} \geq 4 \mu\text{g/mL}$). O nível relativo de expressão de cada gene é calculado relativo às médias de 6 cepas controles (3 cepas veterinárias e 3 cepas humanas), ajustado para 1,0. Círculos cheios representam cepas individuais de *C. tropicalis*. Barras mostram a média dos níveis de expressão gênica de cada grupo. Diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o grupo NSF e o grupo SF para todos os genes.

3^a PARTE EXPERIMENTAL

6.8 Teste de sensibilidade de células planctônicas à prometazina

Os resultados referentes à sensibilidade antifúngica das cepas de *C. tropicalis* frente à prometazina estão descritos na Tabela 4. A CIM e a CFM da prometazina foram, respectivamente, 64 µg/mL e 256 µg/mL para todas as cepas testadas. A fim de estudar a interação entre as drogas antifúngicas e a PRM, foi necessário realizar testes adicionais de sensibilidade para determinar precisamente a CIM para as cepas de *C. tropicalis*. As cepas resistentes apresentaram CIM de 265 e 512 µg/mL para o FLC, 32 e 64 µg/mL para VRC e 128 µg/mL para o ITC. Para a CAS, as CIMs variaram de 0,0078 a 0,0156 µg/mL para as cepas resistentes e a cepa sensível.

6.9 Interação entre prometazina e drogas antifúngicas

As concentrações sub-inibitórias de PRM testadas (16 e 8 µg/mL) reduziram as CIMs dos aintifúngicos e alteraram o fenótipo de resistência das duas cepas resistentes a azólicos. A redução dos valores de CIM para as cepas resistentes foi de 64 a 128 vezes para FLC e VRC e de 1024 a 4096 vezes para o itraconazol (Tabela 4). Nenhuma interação sinérgica foi observada para a combinação de PRM e azólicos frente à cepa sensível e a cepa de referência (*C. tropicalis* ATCC 750), ocorrendo antagonismo quando PRM foi combinada com FLC e VRC. Ademais, PRM reduziu de 2 a 16 vezes as CIMs da AMB e da CAS nos para as três cepas estudadas e a cepa de referência. Efeito paradoxal da CAS sozinha foi observada somente na cepa sensível a azólicos, iniciando na concentração 8 µg/mL. Porém, efeito paradoxal foi observado em todas as cepas a partir de 4 a 16 µg/mL de CAS quando em combinação com concentrações sub-inibitórias de PRM.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) da prometazina e das drogas antifúngicas isoladas ou em combinação com a prometazina frente a *Candida tropicalis*.

Drogas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			ICIF	
	Cepas resistentes a azólicos		Cepa sensível	Cepas resistentes a azólicos	
	cepa 1	cepa 2		cepa 1	cepa 2
PRM	64 256 (CFM)	64 256 (CFM)		-	-
AMB	0,5	1	0,25	-	-
AMB+PRM 8	0,125	0,125	0,0625	0,375 ^S	0,250 ^S
AMB+PRM 16	0,125	0,0625	0,0625	0,5 ^S	0,312 ^S
CAS*	0,0156	0,0078	0,0078	-	-
CAS+PRM 8	0,0078	0,0039	0,0078	0,625 ^I	0,625 ^I
CAS+PRM 16	0,0078	0,0039	0,0039	0,75 ^I	0,75 ^I
FLC	512	256	0,5	-	-
FLC+PRM 8	4	4	4	0,133 ^S	0,141 ^S
FLC+PRM 16	4	4	2	0,258 ^S	0,266 ^S
ITC	128	128	0,0625	-	-
ITC+PRM 8	0,0625	0,125	0,125	0,125 ^S	0,126 ^S
ITC+PRM 16	0,03125	0,0625	0,03125	0,25 ^S	0,25 ^S
VRC	32	64	0,0625	-	-
VRC+PRM 8	0,5	1	0,25	0,141 ^S	0,141 ^S
VRC+PRM 16	0,25	0,5	0,25	0,258 ^S	0,258 ^S

Cepa 1: cepa resistente a azólicos com atividade de efluxo aumentada; cepa 2: cepa resistente a azólicos com baixa atividade de efluxo; CFM: concentração fungicida mínima; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; PRM: prometazina; AMB: anfotericina B; CAS: caspofungina; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; PRM 8: prometazina a 8 $\mu\text{g/mL}$; PRM 16: prometazina a 16 $\mu\text{g/mL}$; ^S interação sinérgica (ICIF $\leq 0,5$); ^I interação indiferente (0,5 $>$ ICIF ≤ 4); ^A interação antagonista (ICIF > 4). *Efeito paradoxal da caspofungina sozinha foi observada na concentração 8 $\mu\text{g/mL}$ somente para a cepa sensível a azólicos e nas concentrações 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$ quando combinada com prometazina (8 e 16 $\mu\text{g/mL}$) para as 3 cepas testadas.

6.10 Curva de tempo de morte

O tempo necessário para PRM causar morte celular de *C. tropicalis* está demonstrado na Figura 16. Foi observada uma redução no número de CFU por mL nas primeiras 2 h de incubação das leveduras com diferentes concentrações de PRM. O tempo requerido para matar 50% do inóculo inicial foi de 2 h para as concentrações 64, 128 e 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi observada uma redução de 99% das células viáveis após 4 h de incubação com a concentração quatro vezes maior que a CIM (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e nenhuma célula viável foi observada em tempo superior a 12 h de incubação com essa mesma concentração.

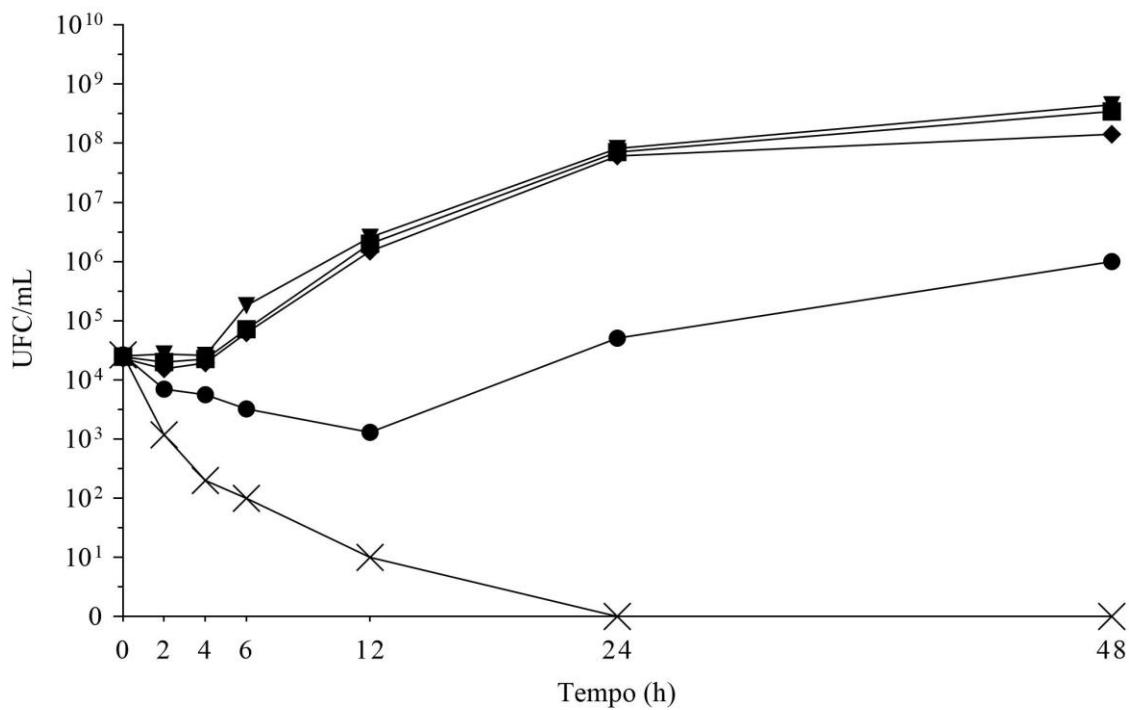


Figura 16. Média ± desvio padrão representativo da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para o estabelecimento da curva de tempo de morte de *Candida tropicalis* após exposição à prometazina a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (quadrado), 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (losango), 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (círculo) e 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x). O controle de crescimento sem droga também foi adicionado para fins comparativos (triângulo).

6.11 Teste de sensibilidade de células sésseis à prometazina e interação entre drogas

No que diz respeito à sensibilidade dos biofilmes maduros de *C. tropicalis* (Tabela 5), foram encontradas CIMS₅₀ de 128 µg/mL e CIMS₉₀ de 256 µg/mL para a PRM, resultados 2 e 4 vezes maiores que a CIM encontrada para as células plantônicas, respectivamente. As CIMS₅₀ e CIMS₉₀ das drogas antifúngicas frente o biofilme maduro de *C. tropicalis* foram, respectivamente, 8 e 32 µg/mL para a AMB, <0,0625 µg/mL para CAS, >512 para FLC e >128 para ITC e VRC. Não houve alteração da sensibilidade do biofilme a derivados azólicos, AMB e CAS quando testados com concentrações sub-inibitórias de PRM (Tabela 7). A concentração mínima de CAS que induziu efeito paradoxal no biofilme diminui 4 a 8 vezes na presença da PRM.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima para células sésseis (CIMS) da prometazina e das drogas antifúngicas isoladas ou em combinação com a prometazina frente ao biofilme maduro de *Candida tropicalis*.

Drogas	CIMS ₅₀ (µg/mL)	CIMS ₉₀ (µg/mL)
PRM	128	256
AMB	8	32
AMB+PRM 8	16	64
AMB+PRM 16	16	64
CAS*	<0,0625	<0,0625
CAS+PRM 8*	<0,0625	<0,0625
CAS+PRM16*	<0,0625	<0,0625
FLC	>512	>512
FLC+PRM 8	>512	>512
FLC+PRM 16	>512	>512
ITC	>128	>128
ITC+PRM 8	>128	>128
ITC+PRM 16	>128	>128
VRC	>128	>128
VRC+PRM 8	>128	>128
VRC+PRM 16	>128	>128

SMIC₅₀: concentração inibitória mínima séssil que causa 50% de inibição da atividade metabolic do biofilme maduro; SMIC₉₀: concentração inibitória mínima séssil que causa 90% de inibição da atividade metabolic do biofilme maduro; PRM: prometazina; AMB: anfotericina B; CAS: caspofungina; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; PRM 8: prometazina a 8 µg/mL; PRM 16: prometazina a 16 µg/mL; *Efeito paradoxal da caspofungina sozinha foi observada na concentração de 4 µg/mL, e nas concentrações 1 e 0,5 µg/mL quando combinada com prometazina a 8 e 16 µg/mL, respectivamente.

6.12 Ultraestrutura do biofilme após incubação com prometazina

Mudanças na estrutura do biofilme e na morfologia das células sésseis associadas após exposição a diferentes concentrações de PRM foram avaliadas através de microscopia confocal (Figura 17) e MEV (Figura 18). Fragmentação do biofilme e redução no número de células viáveis e biomassa foram observadas quando os biofilmes maduros foram expostos a concentrações a partir de 32 $\mu\text{g/mL}$ PRM, duas vezes menos que a CIM para as células planctônicas. Redução na espessura do biofilme foi observada em todas as concentrações testadas (Figura 17). Ademais, foi observado que houve um aumento na biomassa nas maiores concentrações (1024 e 2048 $\mu\text{g/mL}$) (Figuras 17 e 18), porém nenhuma célula viável foi detectada (Figura 17). Mudanças morfológicas nas células de *C. tropicalis* foram observadas nas concentrações 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$, apresentando células colapsadas com superfície enrugada (Figura 18).

6.13 Efeito da prometazina sobre a atividade de bomba de efluxo

O efeito da PRM sobre a captação e efluxo de R6G por células de *C. tropicalis* foi analisado utilizando citometria de fluxo (Figura 19). Inicialmente, a atividade de efluxo das cepas foi avaliad com uma das cepas resistente a azólicos apresentando diminuição significativa da fluorescência intracelular após incubação com glicose quando comparado com as células sem incubação com glicose ($p<0,05$), apresentando atividade de efluxo. A cepa controle também apresentou diminuição da fluorescência intracelular ($p<0,05$). Posteriormente, o efeito da PRM foi avaliado. Pré-incubação com PRM (8, 16 and 32 $\mu\text{g/mL}$) causou um aumento na média de intensidade de fluorescência intracelular na cepa resistente que apresentou atividade de efluxo quando comparado ao controle na presença de glicose sem exposição à PRM ($p<0,05$). Entretanto, para a cepa resistente que não apresentou atividade de efluxo significativa e para a cepa sensível, pré-incubação com PRM causou uma pequena, porém significativa, diminuição na média da intensidade de fluorescência quando comparado às células em privação de energia e ao controle na presença de glicose sem exposição à PRM ($p<0,05$). PRM também induziu um reduzido, porém significante, aumento na média de intensidade de fluorescência da cepa controle ($p<0,05$).

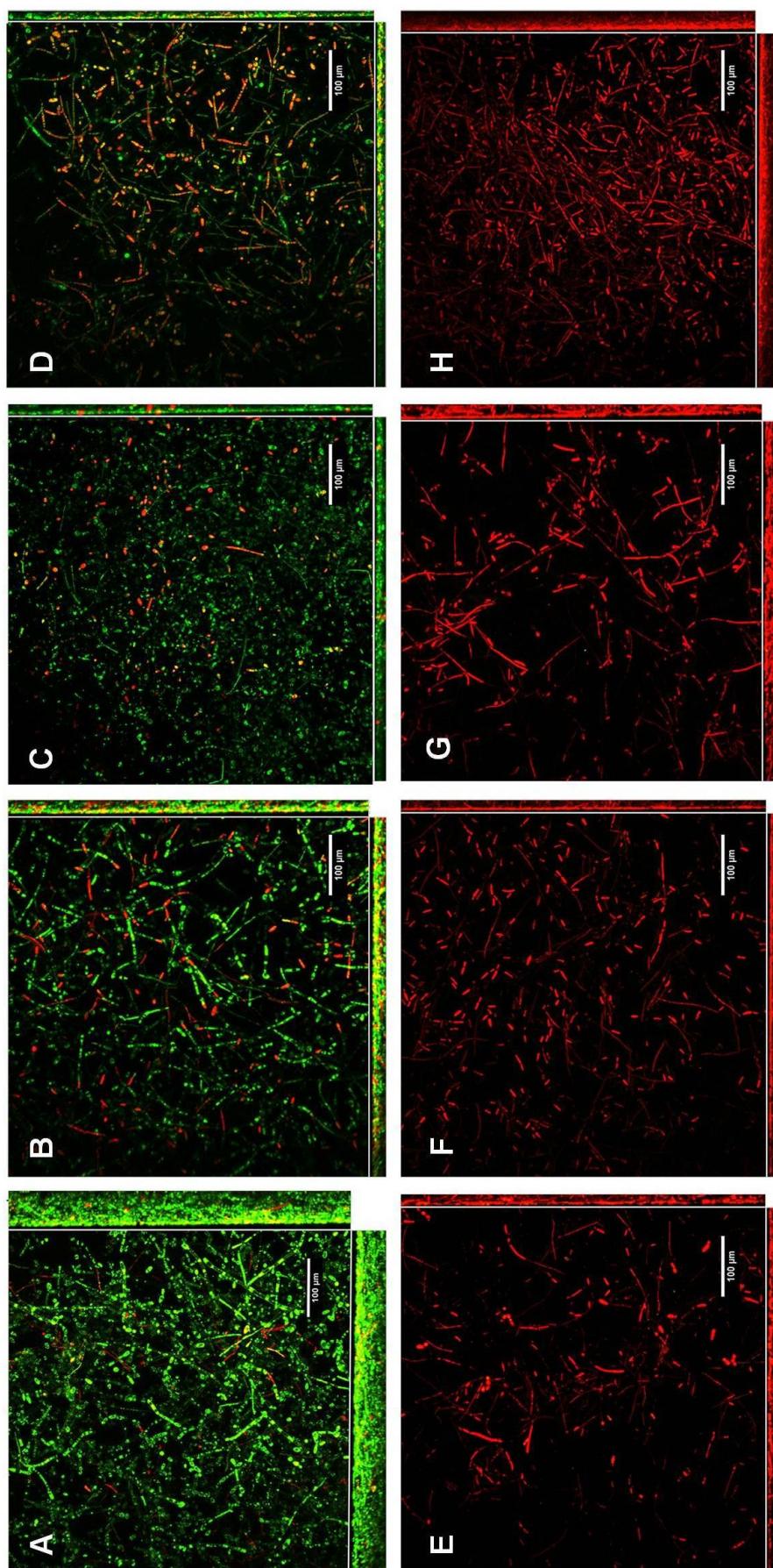


Figura 17. Imagens de microscopia confocal do biofilme maduro de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de prometazina. Note uma diminuição na espessura do biofilme e no número de células viáveis em todas as concentrações testadas. Um aumento da biomassa é observado nas concentrações, entretanto nenhuma célula viável é detectada. A: controle sem tratamento; B: 32 µg/mL; C: 64 µg/mL; D: 128 µg/mL; E: 256 µg/mL; F: 512 µg/mL; G: 1024 µg/mL; H: 2048 µg/mL. Aumento: 400x. Lasers: 488 nm (SYTO9, células viáveis), 561 nm (iodeto de propídio, células mortas).

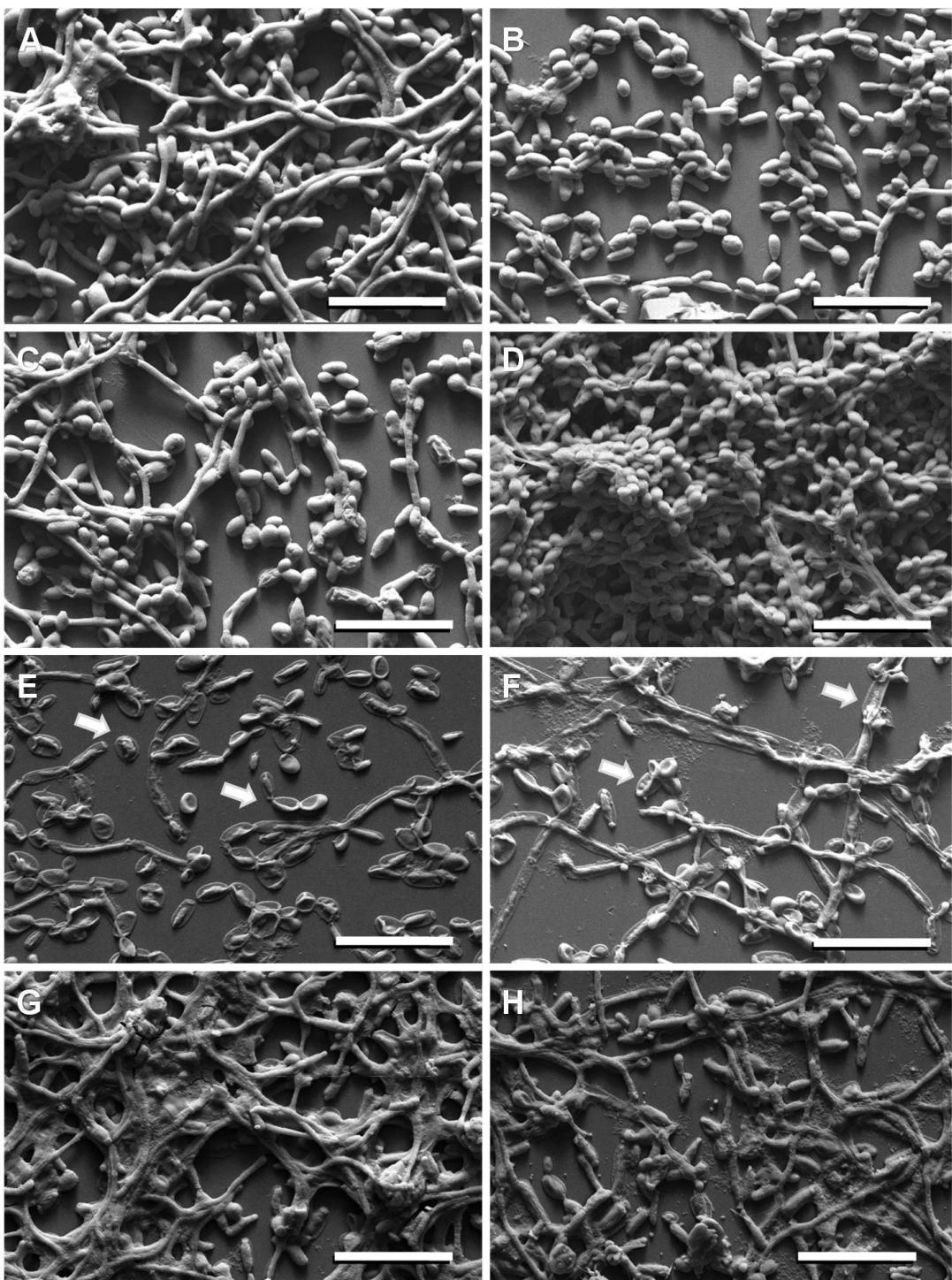


Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *Candida tropicalis* após 48 h de incubação com diferentes concentrações de prometazina. (A) controle sem tratamento; (B) 32 µg/mL, note a redução no número de células e perda da estrutura do biofilme; (C) 64 µg/mL; (D) 128 µg/mL, um aumento da biomassa é observado; (E) 256 µg/mL, observa-se um aumento no número de células morfológicamente alteradas (células com aspecto murcho, setas) e biofilme fragmentado e desorganizado; (F) 512 µg/mL; (G) 1024 µg/mL, observa-se um aumento na biomassa e presença de restos de matriz; (H) 2048 µg/mL. Aumento: 5000x. Escala: 20 µm.

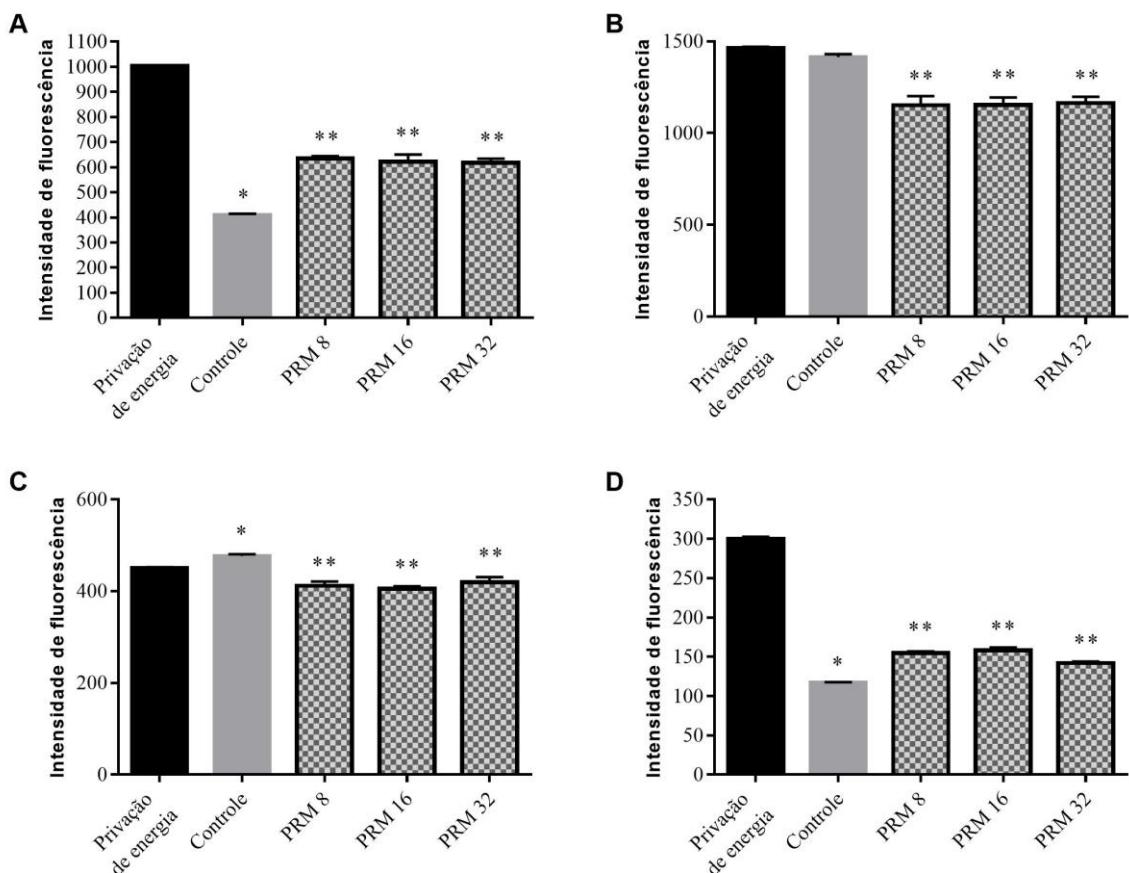


Figura 19. Análise da captação e efluxo da rodamina por células de *Candida tropicalis* após pré-exposição à prometazina. A rodamina 6G é um substrato para transportadores do tipo ABC. Aumento da média de intensidade de fluorescência indica uma alta concentração de corante dentro das células, significando baixa atividade de efluxo. A captação do fluorocromo foi realizada incubando as células de *C. tropicalis* com rodamina 6G após privação de energia (privação de glicose, barras pretas) e após incubação de 1 h (durante privação) com três concentrações de prometazina (PRM, $\mu\text{g/mL}$). Subsequentemente, células privadas de energia não expostas (controle) e células expostas à prometazina (PRM) foram incubadas com glicose por 30 min. (A) cepa resistente a azólicos que apresenta atividade de efluxo. (B) cepa resistente a azólicos sem atividade de efluxo. (C) cepa sensível a azólicos. (D) cepa de *C. parapsilosis* resistente que apresenta atividade de efluxo, utilizada como controle positivo. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre a intensidade fluorescência de células em privação e do controle sem exposição à droga. ** indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre a intensidade de fluorescência das células expostas à prometazina e do controle sem exposição. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata.

6.14 Efeito da prometazina sobre a morfologia celular, integridade da membrana e atividade mitocondrial

Uma diminuição no tamanho/granulosidade de células de *C. tropicalis* foi observada após 2 e 4 h de incubação com PRM nas concentrações de CIM, 2×CIM e 4×CIM, similar ao resultado encontrado para AMB (Figura 20). Incubação com diferentes concentrações de PRM também causou um aumento no número de células com dano na membrana plasmática após 2 e 4 h, como observado no ensaio com IP (Figura 21). Ademais, diferenças significativas no potencial transmembrana mitocondrial foram observadas após 2 e 4 h de exposição à PRM (Figura 22). Fluorescência da R123 foi menor em células expostas à PRM quando comparado com as células não tratadas ($p<0,05$). Diminuição na fluorescência também foi observada nas células expostas à AMB.

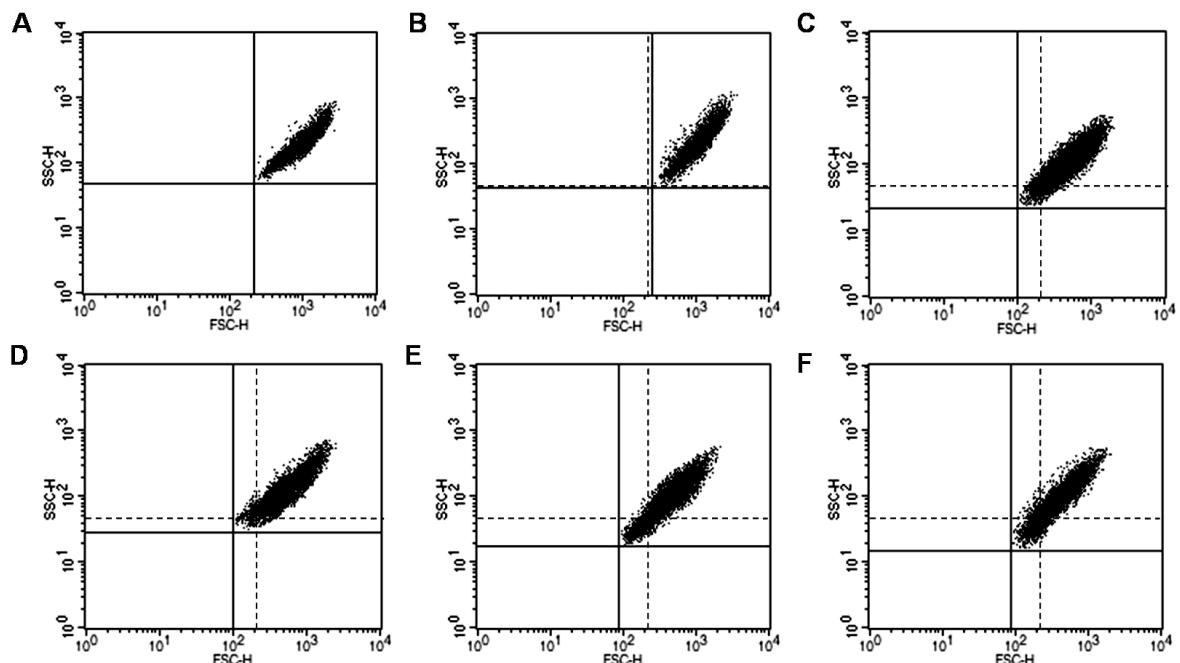


Figura 20. Análise representativa das alterações no tamanho relativo (FSC, *forward scatter*) e granulosidade relativa (SSC, *side scatter*) de células de *Candida tropicalis* após 4 h de exposição à prometazina (PRM), fluconazol (FLC) e anfotericina B (AMB). (A) controle não tratado; (B) FLC 64 μ g/mL; (C) AMB 2 μ g/mL; (D) PRM 64 μ g/mL; (E) PRM 128 μ g/mL; (F) PRM 256 μ g/mL. Linhas tracejadas representam controle sem tratamento (A). Redução na fluorescência captada indica redução no tamanho relativo (FSC) e/ou granulosidade relativa (SSC) celular. Observa-se uma redução no tamanho e granulosidade celular relativa quando as células são expostas à prometazina e anfotericina B, o qual é comum para células que estão morrendo.

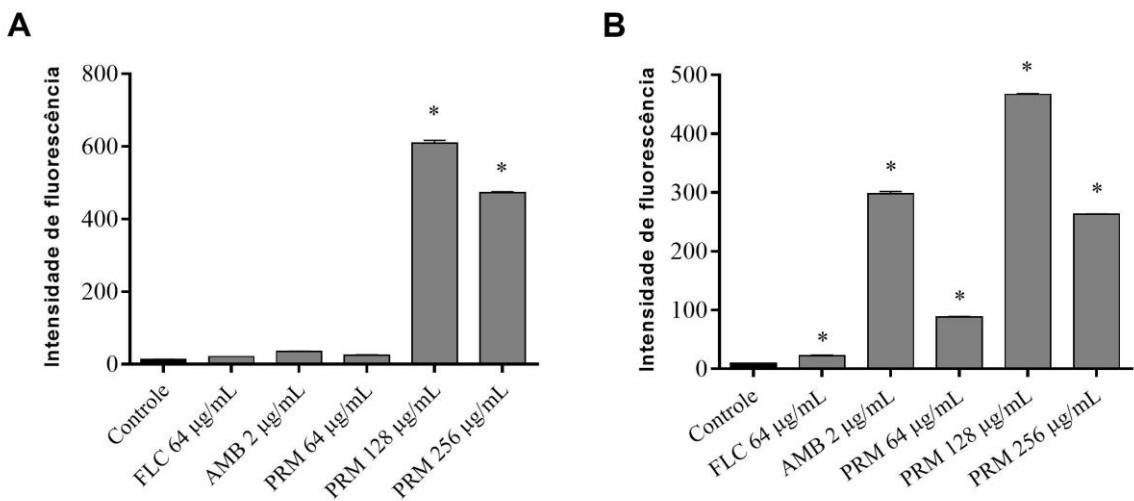


Figura 21. Análise representativa da intensidade de fluorescência média do iodeto de propídio no interior de células de *Candida tropicalis* após 2 h (A) e 4 h (B) de incubação com a prometazina. Controle: células não expostas à droga. FLC: fluconazol. AMB: anfotericina B. PRM: prometazina. Aumento da intensidade de fluorescência indica dano na membrana plasmática. * indica diferença significativa quando comparado com o controle sem tratamento. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata de uma cepa representativa.

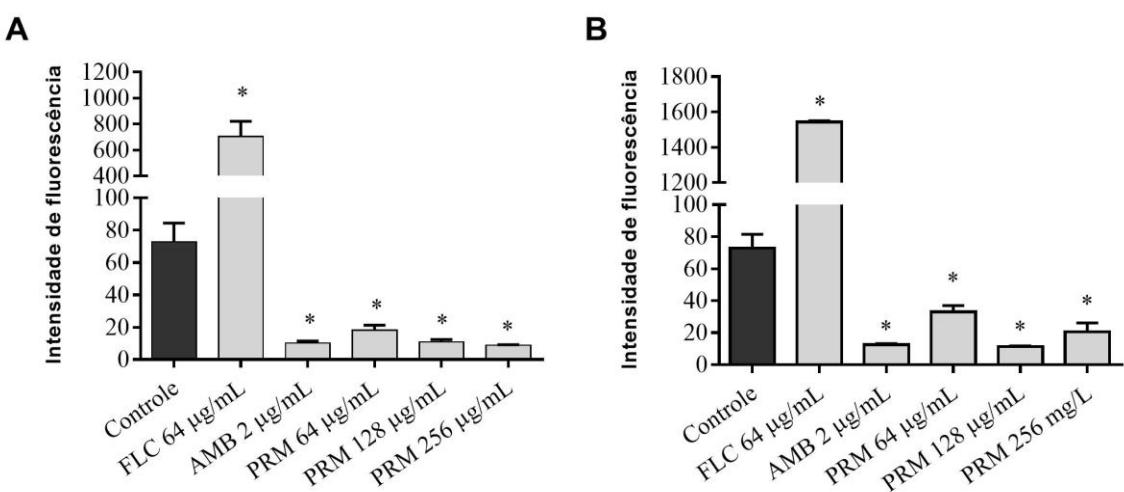


Figura 22. Intensidade de fluorescência média da rodamina 123 em células de *Candida tropicalis* após 2 h (A) e 4 h (B) de incubação com a prometazina. Controle: células não expostas à droga. FLC: fluconazol. AMB: anfotericina B. PRM: prometazina. Diminuição da fluorescência da rodamina 123 indica despolarização e desenergização da mitocôndria e deficiência da função mitocondrial. * indica diferença significativa quando comparado com o controle sem tratamento. Cada barra representa média \pm desvio padrão de leituras em triplicata por cepa testada (n=3).

7 DISCUSSÃO

C. tropicalis é umas das principais espécies de CNA causando quadros de candidemia e candidúria em humanos (ALFOUZAN; DHAR, 2017; ANTINORI et al., 2016), sendo também isolada como comensal ou patógeno em outras espécies animais (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2015a; PRESSLER et al., 2003), demonstrando a acentuada patogenicidade e virulência desse microrganismo. Além disso, a alta capacidade de adesão e formação de biofilmes por esta espécie de levedura também é um importante fator que contribui para o estabelecimento e persistência de infecções de difícil tratamento (NEGRI et al., 2012). Sendo assim, inicialmente, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas hidrolíticas, a atividade hemolítica, a capacidade de formação de biofilmes e a patogenicidade de cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária.

Enzimas hidrolíticas (p. ex., fosfolipases e proteases) podem participar do processo de invasão dos tecidos do hospedeiro e captação de nutrientes nesse ambiente (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Embora não seja totalmente elucidado o papel das fosfolipases durante a infecção, sabe-se que essas enzimas contribuem para a virulência de *Candida* (SCHALLER et al., 2005). No presente trabalho, uma pequena quantidade de cepas foi capaz de produzir fosfolipases *in vitro*. Isso corrobora com dados encontrados em outros estudos, os quais mostram que essa espécie apresenta baixa produção dessa enzima quando testada em meio sólido contendo gema de ovo (GALAN-LADERO et al., 2010; NEGRI et al., 2012; VALE-SILVA et al., 2012; ZUZA-ALVES et al., 2016).

Quando comparada a produção de fosfolipases entre os grupos estudados, as cepas humanas apresentaram maior produção enzimática (29,2%) em comparação com as cepas veterinárias (14,3%). A baixa produção de fosfolipases encontrada em estudos utilizando meio sólido contendo gema de ovo pode ser explicada pela pouca acurácea que essa metodologia apresenta, principalmente quando comparada com métodos moleculares que podem detectar a expressão de genes relacionados a essas enzimas (NEGRI et al., 2010). Métodos alternativos para a avaliação da produção de fosfolipases por cepas apresentando baixa atividade enzimática incluem ensaios radiométricos e colorimétricos específicos, os quais apresentam maior sensibilidade (GHANNOUM, 2000; TANIGUCHI et al., 2009).

Proteases aspárticas podem degradar uma grande variedade de proteínas do hospedeiro, auxiliando na invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro e na nutrição do microrganismo (BOCHENSKA et al., 2016; PICOVÁ et al., 2001; POLKE; HUBE;

JACOBSEN, 2015). Neste estudo, as cepas testadas apresentaram uma maior produção de proteases ácidas (44,23%) em comparação com a produção de fosfolipases (21,15%). Além disso, comparando os grupos testados, 50% das cepas de origem humana apresentam produção de proteases, enquanto 39,3% das cepas de origem veterinária apresentaram essa característica.

A porcentagem de cepas de *C. tropicalis* apresentando produção de proteases pode varia dependendo do meio teste utilizado para a detecção enzimática, porém, usualmente *C. tropicalis* apresenta uma moderada produção enzimática (DA COSTA et al., 2009, 2012; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; GOKCE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007). Embora haja maior produção de fosfolipases e proteases entre as cepas clínicas, a produção dessas enzimas, consideradas fatores de virulência, por cepas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes animais indica que, quando em condições favoráveis, esses microrganismos apresentarão ferramentas que ajudarão no estabelecimento de infecções, seja no próprio animal ou em humanos que entram em contato direto com eles.

A atividade hemolítica de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária também foi analisada. Cepas de *C. tropicalis* comumente apresentam elevada atividade hemolítica, sendo esta atividade, por vezes, mais acentuada quando comparada a *C. albicans* ou outras espécies de CNA (FAVERO et al., 2014; RICETO et al., 2015). No presente estudo, a maioria das cepas (69,23%) apresentou uma forte atividade hemolítica em meio contendo sangue de carneiro. Todas as cepas humanas apresentaram atividade hemolítica e 75% foram consideradas forte produtores.

Embora cepas clínicas apresentem maior atividade hemolítica, a maioria das cepas de origem veterinária apresentaram forte atividade de hemólise (64,28%) e apenas uma cepa não produziu hemólise no meio testado. A alta produção de fator hemolítico por cepas de *C. tropicalis* pode estar relacionada com a captação do ferro presente na hemoglobina das hemárias do hospedeiro, sendo que o microrganismo conseguirá colonizar e proliferar-se apenas se ferro suficiente estiver acessível para captação (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017).

No tocante à produção de biofilme, 51 cepas (98%) foram capazes de aderir em placas de poliestireno e produzir biofilmes. A maioria das cepas foi forte produtor de biofilme, tanto no grupo de cepas veterinárias (71,4%) quanto no grupo de cepas humanas (58,3%). Esse atributo pode representar um fator agravante nas infecções por *Candida*, uma vez que as células sésseis no biofilme podem apresentar baixa sensibilidade aos antifúngicos

de uso clínico e proteção contra as defesas imunológicas do hospedeiro (RAMAGE et al., 2012). Vários estudos apontam *C. tropicalis* como a espécie de CNA com a maior capacidade de produção de biofilme, apresentando alta produção de biomassa (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; GUEMBE et al., 2017; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

Análises utilizando MEV dos biofilmes de cepas de *C. tropicalis* apresentaram uma MEC espessa envolvendo as células dentro da estrutura do biofilme. Essa matriz é um importante fator responsável pela resistência do biofilme ao estresse ambiental e à agressão química e física (RAMAGE et al., 2012). A arquitetura dos biofilmes se apresentou dependente da cepa, com biofilmes apresentando muita filamentação, enquanto outros eram compostos quase que exclusivamente por blastoconídios. Essas diferenças são comuns entre biofilmes de diferentes cepas de *C. tropicalis*, mostrando uma grande heterogenicidade dessas comunidades microbianas, mesmo intraespécie (SILVA et al., 2009).

Para o estudo da patogenicidade das cepas de *C. tropicalis*, foi utilizado o modelo de infecção experimental em *C. elegans*. Diferentes estudos avaliaram a capacidade de espécies fúngicas em infectar e matar o nematódeo *C. elegans* (CORDEIRO et al., 2016; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011; TROEMEL, 2016), demonstrando que esse modelo invertebrado pode ser utilizado para a avaliação da interação parasito-hospedeiro e patogenicidade de fungos. Altas taxas de mortalidade foram observadas 96 h após dos nematódeos serem alimentados com cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as taxas de mortalidade causadas por cepas de origem humana e veterinária. Porém, é importante destacar que as cepas apresentando as menores taxas de mortalidade encontram-se entre as cepas veterinárias.

Durante os ensaios de patogenicidade com *C. elegans*, foi observado que hifas e pseudo-hifas de *C. tropicalis* foram capazes de romper e atravessar o pseudoceloma e a cutícula dos nematódeos, característica essa mais frequente entre as cepas humanas. A produção de filamentos pela levedura que está infectando os vermes indica que a transição morfológica levedura-hifa tem papel importante no estabelecimento da infecção por *C. tropicalis* (ZHANG et al., 2016a). Já foi observado que cepas mutantes de *C. albicans* que não apresentam a capacidade de filamentação são menos virulentos e demonstram menores taxas de mortalidade frente ao *C. elegans* quando comparados com cepas que filamentam (PUKKILA-WORLEY et al., 2009). Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão do papel da filamentação durante a infecção de *C. elegans* por *C. tropicalis*.

De modo geral, tanto as cepas humanas quanto veterinárias apresentaram produção de fatores de virulência importantes e causaram elevada taxa de mortalidade em modelo de infecção utilizando *C. elegans*. Embora não seja significativa, há diferença entre os resultados obtidos para os dois grupos de cepas. A produção enzimática e a mortalidade em *C. elegans* foram sutilmente maiores em cepas de origem humana, enquanto a produção de biofilme foi proeminente em cepas veterinárias. Vale ressaltar que as cepas humanas foram isoladas de quadros infecciosos, o que pode estar relacionado com a sua maior patogenicidade, enquanto as cepas veterinárias foram isoladas de microbiota.

Quanto ao perfil de sensibilidade, resistência aos derivados azólicos foi observada tanto em cepas de origem clínica como cepas veterinárias, incluindo cepas que apresentaram resistência aos três azólicos testados. O amplo uso inapropriado de derivados azólicos na profilaxia e tratamento de candidíases não invasivas é um dos fatores relacionados ao aumento no isolamento de cepas clínicas de *Candida* apresentando resistência (CAPOOR et al., 2005; LORTHOLARY et al., 2011). Cepas de *C. tropicalis* resistentes a azólicos já foram isoladas causando infecção *breakthrough* em pacientes recebendo profilaxia com derivados azólicos (CHONG et al., 2012b; YOU et al., 2017), apontando o surgimento de resistência secundária em cepas dessa espécie devido à expressão alterada de bombas de efluxo e mutações no gene *ERG11*.

Os motivos que levam ao surgimento de resistência a derivados azólicos em cepas de origem veterinária é incerto. Nesse trabalho, as cepas resistentes foram isoladas da microbiota de animais clinicamente sadios sem histórico de terapia antifúngica. O uso de compostos azólicos na prática agrícola, o qual pode selecionar organismos que exibem sensibilidade reduzida a drogas, é, provavelmente, o principal fator implicado no surgimento de cepas resistentes (YANG et al., 2012). Rocha et al. (2016) mostraram que pré-exposição ao tetriconazol, um azólico de uso na agricultura, reduziu a sensibilidade de *C. parapsilosis* aos derivados azólicos de uso clínico, induzindo uma resistência cruzada. Diferentes espécies animais podem entrar em contato com cepas de *Candida* spp. resistentes presentes nos vegetais utilizados para a sua alimentação, as quais podem ser transmitidos por meio de contato direto ou fômites para o homem.

No tocante à sensibilidade a antifúngicos dos biofilmes maduros de *C. tropicalis*, a droga que mais se mostrou efetiva contra as células sésseis foi a caspofungina, com concentrações inibitórias menores que 0,25 µg/mL. Em algumas cepas, a concentração inibitória da caspofungina frente o biofilme maduro foi menor que a encontrada para as

células planctônicas. Todas as análises realizadas, tanto de viabilidade quanto microscopia, confirmaram a efetividade dessa equinocandina frente o biofilme de *C. tropicalis*. Um estudo de Marcos-Zambrano et al. (2016) mostrou que a micafungina, outra equinocandina, foi mais eficiente contra biofilmes de *C. tropicalis* quando comparada à anfotericina B lipossomal. Outro estudo mostrou que um novo inibidor da síntese de glucano, SCY-078, também se foi efetivo contra o biofilme de diversas espécies fúngicas, entre elas *C. tropicalis* (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2017). A alta eficácia das equinocandinas aponta um possível papel da síntese de glucanos na manutenção da integridade das células sésseis e nos biofilmes de *C. tropicalis*.

Durante os estudos de sensibilidade, foi observada a ocorrência de efeito paradoxal quando os biofilmes eram tratados com caspofungina. A persistência de células em biofilme foi observada a partir 8 µg/mL, variando dependendo da cepa. Em células planctônicas, esse efeito geralmente é observado após quatro dias (>96 h) de incubação com altas concentrações de uma equinocandina (RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014), porém, em biofilmes de *C. tropicalis*, o efeito paradoxal foi observado após 24 h de incubação com caspofungina, como reportado no presente estudo. Em um estudo com diferentes espécies de *Candida*, Melo, Colombo e Arthington-Skaggs (2007) observaram a ocorrência de efeito paradoxal, iniciando em concentrações de 4 µg/mL de caspofungina, em biofilmes e células planctônicas, porém nem todas as cepas de *C. tropicalis* apresentaram essa característica.

Um estudo, através da MEV, reportou a presença de células atípicas, aumentadas e cônicas, em biofilmes de *C. tropicalis* tratados com altas concentrações de caspofungina (FERREIRA et al., 2009), fato que pode estar relacionado com a ocorrência de efeito paradoxal e células tolerantes à caspofungina. Neste estudo, células globosas tumescentes foram observadas através de microscopia confocal nos biofilmes de *C. tropicalis* tratados com caspofungina. Nas mesmas concentrações da droga, quando analisadas por MEV, as células no biofilme apresentaram uma superfície enrugada, com uma aparência de desidratação. Essa característica pode ser resultado do processamento das células com concentrações diferentes de etanol, requerido para a análise por MEV, sugerindo perda da rigidez da parede celular do fungo.

Aparentemente, o efeito paradoxal é um mecanismo adaptativo que a célula fúngica utiliza para superar os efeitos da caspofungina através de alterações na parede celular (RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014). Por exemplo, um aumento no

conteúdo de quitina bem como uma reorganização da parede celular pode representar mecanismos importantes durante o efeito paradoxal. Entretanto, essas alterações podem alterar funções da parede celular e, consequentemente, levam a irregularidades relacionadas com a estrutura celular, rigidez mecânica e resistência à pressão osmótica (RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014), o que pode explicar parcialmente as mudanças morfológicas observadas quando os biofilmes foram analisados por MEV e microscopia confocal. Contudo, embora geralmente observado, ainda não está elucidado o impacto clínico do efeito paradoxal nas infecções por *Candida* (RUEDA et al., 2017).

Os derivados azólicos não apresentaram eficácia frente os biofilmes maduros de *C. tropicalis*, sendo que, na maioria das cepas, não foi observado redução da atividade metabólica do biofilme mesmo na concentração mais elevada. Por outro lado, a anfotericina B apresentou uma melhor inibição da atividade metabólica do biofilme quando comparada aos azólicos, semelhante aos resultados encontrados por Bizerra et al. (2008). Os mecanismos envolvidos na baixa sensibilidade das células sésseis aos antifúngicos ainda não são totalmente elucidados para *C. tropicalis*, porém acredita-se que a ação de bombas de efluxo, metabolismo diferenciado e a complexa estrutura da MEC sejam tenham papel fundamental nesse fenótipo exibido pelos biofilmes dessa espécie (BIZERRA et al., 2008; FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2016).

Embora diferentes mecanismos de resistência a derivados azólicos sejam relatados para cepas clínicas de *C. tropicalis*, pouco se sabe sobre os fatores que levam à redução da sensibilidade a esses antifúngicos em cepas de origem veterinária. Geralmente, em cepas clínicas, a resistência a azólicos é relacionada à expressão diferenciada ou mutação nas moléculas alvo e atividade aumentada de bombas de efluxo (CHOI et al., 2016; JIANG et al., 2013). No presente trabalho, tanto características fenotípicas como genotípicas de cepas resistentes a azólicos de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária foram analisadas.

Apesar de ser evidenciada uma expressão elevada do gene *ERG11* em cepas não-sensíveis ao fluconazol, não foi observada diferença significativa entre os níveis de esteróis totais extraídos de cepas sensíveis e resistentes. Entretanto, as cepas PSF e NSF apresentaram um leve aumento na concentração de esteróis totais quando comparado às cepas sensíveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Jiang et al. (2013), não havendo diferença entre os níveis de ergosterol de cepas de *C. tropicalis* sensíveis e resistentes mesmo com a expressão aumentada de *ERG11*. No presente trabalho, tanto cepas humanas quanto veterinárias apresentaram expressão aumentada desse gene.

O aumento da expressão do gene que codifica a enzima 14 α -lanosterol demetilase, juntamente com mutações que conferem substituição de aminoácidos, é um dos principais mecanismos de resistência descritos em cepas clínicas de *C. tropicalis*. A primeira descrição dos mecanismos de resistência a azólicos de uma cepa clínica de *C. tropicalis* mostra que a superexpressão de *ERG11* e mutações nesse gene podem ser responsáveis pela resistência a mais de um derivado azólico (VANDEPUTTE et al., 2005), fato também observado em um estudo com 52 cepas clínicas de *C. tropicalis* (JIANG et al., 2013). Nesses trabalhos, não foi observado aumento de atividade de bombas de efluxo. Além disso, mutações no fator de transcrição Upc2 podem estar diretamente envolvidas no aumento da expressão de *ERG11* (CHOI et al., 2016).

Um estudo por Álvarez-Pérez et al. (2016) apontou uma mutação no gene *ERG3* como responsável pela aquisição de resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* causando infecção urinária em um cão. Ao contrário do que é geralmente observado em *C. tropicalis*, as cepas resistentes no estudo citado não apresentaram mutações que levam à troca de aminoácidos em Erg11, mostrando que essa nem sempre é a causa da resistência em cepas veterinárias. Entretanto, vale salientar que não foi avaliada a expressão desses genes sendo esses possíveis mecanismos envolvidos na resistência dessas cepas de origem veterinária, como observado no presente trabalho.

Uma atividade aumentada de efluxo foi observada em seis cepas de *C. tropicalis* PSF, tanto de origem veterinária como de origem clínica. Essa atividade foi evidenciada pelo efluxo do fluoróforo R6G, o qual é um substrato de transportadores do tipo ABC (IVNITSKI-STEELE et al., 2009). Ademais, essas mesmas cepas apresentaram expressão aumentada do gene *CDR1*, mostrando que bombas de efluxo do tipo ABC estão relacionadas com a resistência a azólicos tanto em cepas humanas quanto cepas veterinárias. Duas cepas PSF e duas cepas NSF tiveram uma expressão de *CDR1* acima das cepas controle (>5 vezes), porém não foi observado um aumento elevado de efluxo de R6G nos testes através de citometria de fluxo. Além do gene *CDR1*, expressão elevada de *MDR1* também foi observada em cepas PSF e NSF. O papel das bombas de efluxo na resistência de *C. tropicalis* a derivados azólicos já foi evidenciado em estudos com cepas clínicas (CHOI et al., 2016; XISTO et al., 2017), embora se acredite que *ERG11* tenha papel mais crucial nesse fenótipo.

Nem todas as cepas apresentaram expressão elevada para os três genes, sendo essa característica observada apenas em duas cepas NSF, mostrando que a resistência aos derivados azólicos pode ser um fenômeno multifatorial ou não. Esse fato é corroborado pelos

resultados encontrados por Choi et al. (2016), onde diferentes níveis de expressão foram encontrados entre as cepas NSF e PSF de *C. tropicalis* para os genes *CDR1*, *MDR1* e *ERG11*. Uma das cepas com baixa sensibilidade a azólicos (de origem veterinária) não apresentou expressão elevada de nenhum dos genes testados, podendo outros mecanismos estar relacionados com esse fenótipo, como mutações no gene *ERG11* ou no gene *ERG3* (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016a; FORASTIERO et al., 2013). Estudos posteriores devem ser realizados a fim de elucidar outros mecanismos que possam estar envolvidos com a resistência em cepas de origem veterinária.

Relatos de resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* tem aumentado nos últimos anos (CORDEIRO et al., 2015a; KOTHAVADE et al., 2010; LI et al., 2013), levando a uma busca por métodos alternativos que possam ser utilizados para superar esse problema. Neste estudo, a prometazina, um composto derivado da fenotiazina, foi avaliada frente a células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis* resistentes a azólicos. Ademais, análises da morfologia e fisiologia das células expostas à prometazina foram realizadas a fim de melhor compreender os efeitos desse anti-histamínico sobre as células da levedura.

O fenótipo de resistência foi alterado quando as cepas de *C. tropicalis* foram tratados com concentrações sub-inibitórias de prometazina, apresentando redução de até 2048 vezes para a CIM dos compostos azólicos. Resultados similares foram observados por Castelo-Branco et al. (2013) e Brilhante et al. (2012), os quais testaram a prometazina em combinação com azólicos frente a *Candida* spp., mostrando interação sinérgica entre as drogas. Os autores supracitados sugerem que o sinergismo se deu devido à inibição de bombas de efluxo pela prometazina. Iatta et al. (2017) sugeriram que o efeito sinérgico entre prometazina e azólicos frente a cepas de *Malassezia* spp. pode estar relacionado com a presença de atividade de bombas elevada nessas cepas. Esse também aparenta ser o mecanismo de interação entre as drogas contra *C. tropicalis*, uma vez que interação sinérgica entre prometazina e azólicos foi observada somente nas cepas resistentes. Ademais, reduções na CIM da anfotericina B e da caspofungina foram significativamente menores que as reduções observadas para os azólicos.

A prometazina também apresentou atividade contra o biofilme maduro de *C. tropicalis*, causando redução da atividade metabólica do biofilme em concentrações 2 vezes a CIM, mostrando uma atividade antibiofilme efetiva. Além disso, alterações na estrutura dos biofilmes também foram observadas após exposição à prometazina, diminuindo a quantidade

de hifas no agregado celular e reduzindo a sua espessura. Essas mudanças estruturais foram mais proeminentes em concentrações mais baixas de prometazina, enquanto um aumento na biomassa foi observado nas maiores concentrações testadas, embora nenhuma célula viável tenha sido observada nessas estruturas remanescentes.

Os efeitos antibiofilme da prometazina pode se apresentar como interesse para a terapêutica uma vez que biofilmes são comumente associados a infecções por *Candida* e são inherentemente difíceis de tratar (LOCKHART, 2014). Por outro lado, a prometazina não reduziu as concentrações inibitórias dos antifúngicos frente aos biolmes maduros de *C. tropicalis*, ao contrário dos resultados encontrados para as células planctônicas. Adicionalmente, efeito paradoxal causado pela caspofungina em biofilmes maduros foi detectado em concentrações menores quando a equinocandina foi combinada com a prometazina, porém não está claro como a prometazina influenciou nesse mecanismo adaptativo das células de *C. tropicalis*.

O ensaio de tempo de morte mostrou que as células de *C. tropicalis* morriam após 2 h de incubação com prometazina nas concentrações CIM, 2×CIM e 4×CIM. A taxa de morte celular aumentou juntamente com o aumento das concentrações da droga, atingindo 100% de morte após 12 h de incubação das células com prometazina à 4×CIM (256 µg/mL), corroborando os resultados encontrados para a CFM. Os resultados obtidos indicam um possível mecanismo fungicida da prometazina frente à *C. tropicalis* (CANTÓN et al., 2004). A morte celular causada pela prometazina pode ser causada por diferentes mecanismos, entre eles podem ser citados dano na função mitocondrial, taxa respiratória alterada, indução de apoptose e mudanças na estrutura celular, principalmente danos na membrana celular fúngica.

A inibição da atividade de bombas de efluxo é um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo aumento da sensibilidade a antifúngicos (IATTA et al., 2017), principalmente drogas azólicas, como observado em estudos com *Candida* spp. (BRILHANTE et al., 2012; CATELO-BRANCO et al., 2013; ROCHA et al., 2016). Dessa forma, a inibição de bombas de efluxo induzida pela prometazina foi avaliada por citometria de fluxo através da quantificação do efluxo de R6G. Apenas uma das cepas resistentes estudadas apresentou aumento significativo do efluxo da R6G após incubação com glicose em comparação com as células com privação de energia, indicando atividade de bombas de efluxo. Quanto aos efeitos da prometazina sobre as cepas resistentes a azólicos, após pré-incubação das células com prometazina durante 1 h, um aumento da intensidade de fluorescência intracelular foi observada na cepa resistente que apresentou atividade de efluxo,

demonstrando que a prometazina teve um efeito inibitório no efluxo da R6G. Essa diminuição da atividade de efluxo causado pela prometazina pode ser devido à perturbações no funcionamento da membrana celular ou alterações no metabolismo/produção de ATP.

Após as células serem expostas à prometazina, mudanças no tamanho e complexidade celular foram observadas, sendo essas alterações associadas com a morte celular observada nos ensaios de tempo de morte. Além disso, essas mudanças morfológicas podem estar relacionadas aos danos causados membrana celular pela prometazina, como apontado pela análise da integridade da membrana utilizando IP, um corante intercalante de DNA impermeável à membrana o qual é utilizado para detectar aumento na permeabilidade da membrana celular após tratamento com compostos antifúngicos (RAMANI; CHATURVEDI, 2000). É notório que compostos que causam um influxo de IP podem afetar diretamente as membranas fúngicas, levando à morte celular (LEE; LEE, 2014; SHRESTHA et al., 2015).

Alterações na integridade da membrana e na sua função podem também estar associadas com o sinergismo apresentado entre a prometazina e as drogas antifúngicas. Um fato interessante notado é que, em altas concentrações de prometazina (256 µg/mL), há uma redução da fluorescência observada, indicando uma diminuição no dano causado à membrana celular. Entretanto, como observado no ensaio de tempo de morte, altas concentrações de prometazina começam a matar as células de *C. tropicalis* após 2 h de incubação. Esse fato indica que o dano à membrana plasmática não é o único efeito que leva à morte das células de *C. tropicalis* quando essas são expostas a concentrações elevadas de prometazina.

As células de *C. tropicalis* tratadas com prometazina tiveram sua função mitocondrial alterada, sugerindo que este composto interfere na função respiratória exercida pela mitocôndria. A diminuição da fluorescência intracelular de R123, um corante catiônico usado para marcar a mitocôndria de células vivas, está relacionada com a despolarização e desenergização da mitocôndria, levando a uma redução na atividade mitocondrial (EMAUS; GRUNWALD; LEMASTERS, 1986; PETIT, 1992). É importante frisar que o colapso do potencial transmembranar da mitocôndria pode causar a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol da célula, levando à morte celular (ANDRADE-NETO et al., 2014).

Ademais, drogas específicas que apresentam como alvo a mitocôndria da célula fúngica pode atuar em sinergismo com derivados triazólicos uma vez que essa organela tem um papel na produção de energia necessária para diversos processos celulares, incluindo a biossíntese de ergosterol (SUN et al., 2013). De fato, disfunção na respiração mitocondrial

pode levar a um decaimento nas concentrações de NADPH e oxigênio, os quais são requeridos, respectivamente, para a dimerização do esqualeno e a para a conversão do esqualeno em 2,3-oxidosqualeno, etapas prévias àquela alvo dos azólicos (GERAGHTY; KAVANAGH, 2003). Dessa forma, o sinergismo observado entre a prometazina e os azólicos pode estar associado com a ação do anti-histamínico sobre a estrutura celular e função mitocondrial, levando a uma diminuição da atividade de efluxo e da biossíntese do ergosterol, resultando na redução das CIM dos antifúngicos frente a cepas resistentes a azólicos.

Alterações na atividade mitocondrial e morfologia celular causadas pela prometazina foram observadas tanto nas cepas resistentes como na cepa sensível. Entretanto, sinergismo com os derivados azólicos ocorreu apenas nas cepas resistentes. Essa discrepância pode estar associada com as diferenças no metabolismo, uma vez que cepas resistentes a azólicos comumente apresentam elevada atividade metabólica, geralmente associada a um aumento na taxa respiratória e superexpressão de genes, incluindo *ERG11*, *CDR* e *MDR* (JIANG et al., 2013). Adicionalmente, Denardi et al. (2015) reportaram que a combinação entre tacrolimus, um inibidor da calcineurina conhecido por sua atividade de inibição de bombas de efluxo (TEGOS et al., 2011), e derivados azólicos apresentou elevada taxas de sinergismo frente a cepas de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, porém o mesmo não foi observado frente a cepas sensíveis. Além disso, interação antagônica entre tacrolimus e fluconazol também foi observada frente a cepas sensíveis de *C. glabrata*, resultado similar ao encontrado no presente estudo, no qual interações antagônicas entre prometazina e azólicos (fluconazol e voriconazol) foram observadas em cepas sensíveis de *C. tropicalis*. Sendo assim, esses resultados corroboram os encontrados neste trabalho.

8 CONCLUSÕES

- Cepas de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária apresentam similar produção de fatores de virulência, com cepas humanas apresentando secreção de enzimas hidrolíticas e atividade hemolítica levemente superior, enquanto cepas veterinárias apresentam maior produção de biofilme;
- Cepas de origem humana e veterinária causam taxas elevadas de mortalidade no ensaio de patogenicidade utilizando o nematódeo *C. elegans*, sendo as taxas observadas para as cepas humanas ligeiramente superiores quando comparadas às cepas veterinárias;
- Caspofungina, uma equinocandina, apresentou os melhores resultados de inibição frente os biofilmes maduros de *C. tropicalis* de origem humana e veterinária quando comparada com a anfotericina B e os derivados azólicos, apesar de apresentar efeito paradoxal do biofilme em altas concentrações;
- A resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* de origem clínica e veterinária está relacionado com um aumento na expressão dos genes *ERG11*, *CDR1* e *MDR1*, sendo essa expressão cepa-dependente, com cepas apresentando um ou mais genes superexpressos;
- Sinergismo entre a prometazina e os derivados azólicos foi observado frente a cepas de *C. tropicalis* resistentes, alterando o fenótipo de resistência nessas cepas para todos os azólicos testados;
- A prometazina apresentou atividade antibiofilme, inibindo o biofilme maduro de *C. tropicalis* em concentrações quatro vezes a concentração inibitória para células planctônicas;
- Os efeitos da prometazina sobre as células de *C. tropicalis* envolvem a inibição da atividade de bombas de efluxo do tipo ABC, alteração do tamanho e granulosidade celular, perda da integridade da membrana celular e dano à função mitocondrial.

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 999–1008, 2006.
- ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 2013.
- ALFOUZAN, W. A.; DHAR, R. Candiduria: Evidence-based approach to management, are we there yet? **J. Mycol. Med.**, 2017.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; GARCÍA, M. E.; CUTULI, M. T.; FERMÍN, M. L.; DAZA, M. Á.; PELÁEZ, T.; BLANCO, J. L. Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 11, p. 9–12, 2016a.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; GARCÍA, M. E.; TERESA, M.; LUISA, M.; ÁNGELES, M.; PELÁEZ, T.; BLANCO, J. L. Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 11, p. 9–12, 2016b.
- AMOA-AWUA, W. K.; FRISVAD, J. C.; SEFA-DEDEH, S.; JAKOBSEN, M. The contribution of moulds and yeasts to the fermentation of “agbelima”cassava dough. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. 288–296, 1997.
- ANDRADE NETO, J. B.; DA SILVA, C. R.; NETA, M. A. S.; CAMPOS, R. S.; SIEBRA, J. T.; SILVA, R. A. C.; GASPAR, D. M.; MAGALHÃES, H. I. F.; DE MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e93698, 2014.
- ANIL, S.; HASHEM, M.; VELLAPPALLY, S.; PATIL, S.; BANDARA, H.; SAMARANAYAKE, L. P. Sub-inhibitory concentrations of antifungals suppress hemolysin activity of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates from HIV-infected individuals. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 207–215, 2014.
- ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 34, n. 1, p. 21–28, 2016.
- AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; KATO, J.; NINOMIYA, K.; VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, n. 3, p. 143–150, 1994.
- ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; GUINEA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LAGROU, K.; HOWARD, S. J.; (EUCAST, S. ON A. S. T. (AFST) OF

THE E. E. C. FOR A. S. T. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 22, n. 6, p. 571-e1, 2016.

ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MØLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, n. 5, p. 286–291, 2002.

ARIDOĞAN, I. A.; ILKIT, M.; IZOL, V.; ATES, A. *Malassezia* and *Candida* colonisation on glans penis of circumcised men. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 352–356, 2005.

ARRUA, J. M. M.; RODRIGUES, L. A. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Prevalence of *Candida tropicalis* and *Candida krusei* in onychomycosis in João Pessoa, Paraíba, Brazil from 1999 to 2010. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 87, n. 3, p. 1819–1822, 2015.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.**, v. 1832, n. 9, p. 1378–1383, 2013.

ASADOLLAHI, S.; HEIDARI, K.; VAFAEE, R.; FOROUZANFAR, M. M.; AMINI, A.; SHAHRAMI, A. Promethazine plus sumatriptan in the treatment of migraine: A randomized clinical trial. **Headache J. head face pain**, v. 54, n. 1, p. 94–108, 2014.

AZOULAY, E.; TIMSIT, J.-F.; TAFFLET, M.; DE LASSENCE, A.; DARMON, M.; ZAHAR, J.-R.; ADRIE, C.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; COHEN, Y.; MOURVILLIER, B. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent *pseudomonas* ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v. 129, n. 1, p. 110–117, 2006.

BADER, O. Looking into the virulence of *Candida parapsilosis*: A diagnostic perspective. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 457–459, 2014.

BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; DI FRANCESCO, L. F.; CASELLI, F.; GIANNINI, D.; GIACOMETTI, A.; GAVAUDAN, S.; SCALISE, G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 6, p. 1578–1584, 2000.

BAUMANN-BIRKBECK, L.; GRANT, G. D.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; KAVANAGH, J. J. Drowsiness and motor responses to consecutive daily doses of promethazine and loratadine. **Clin. Neurophysiol.**, v. 125, n. 12, p. 2390–2396, 2014.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell Rep.**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 2013.

BENNETT, D. E.; MCCREARY, C. E.; COLEMAN, D. C. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 55–72, 1998.

BENTUBO, H. D. L.; MANTOVANI, A.; YAMASHITA, J. T.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Yeasts of the genital region of patients attending the dermatology service at

Hospital São Paulo, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 32, n. 4, p. 229–234, 2015.

BERGAMO, V. Z.; BALBUENO, E. A.; HATWIG, C.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, R. K.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 504–510, 2015a.

BERGAMO, V. Z.; DONATO, R. K.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. J. Z.; ORTEGA, G. G.; SCHREKKER, H. S.; FUENTEFRIA, A. M. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 1, p. 66–71, 2015b.

BIASOLI, M. S.; TOSELLLO, M. E.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**, v. 45, n. 11-12, p. 465–469, 2002.

BIEGANSKA, M.; DARDZINSKA, W.; DWORECKA-KASZAK, B. Fungal colonization—an additional risk factor for diseased dogs and cats? **Ann. Parasitol.**, v. 60, n. 3, 2014.

BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; SBARAGLIA, G.; PERITO, S.; CASSONE, A. A comparison of experimental pathogenicity of *Candida* species in cyclophosphamide-immunodepressed mice. **Sabouraudia**, v. 22, n. 5, p. 409–18, 1984.

BISWAS, D.; AGARWAL, S.; SINDHWANI, G.; RAWAT, J. Fungal colonization in patients with chronic respiratory diseases from Himalayan region of India. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 9, n. 1, p. 28, 2010.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; ESTIVALET SVIDZINSKI, T. I.; BORSATO QUESADA, R. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, n. 3, p. 442–450, 2008.

BOCHENSKA, O.; RAPALA-KOZIK, M.; WOLAK, N.; AOKI, W.; UEDA, M.; KOZIK, A. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. **Acta Biochim. Pol.**, v. 63, n. 3, 2016.

BOCHENSKA, O.; RAPALA-KOZIK, M.; WOLAK, N.; KAMYSZ, W.; GRZYWACZ, D.; AOKI, W.; UEDA, M.; KOZIK, A. Inactivation of human kininogen-derived antimicrobial peptides by secreted aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Biol. Chem.**, v. 396, n. 12, p. 1369–1375, 2015.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 27, p. 1–9, 2015.

BRADFORD, K.; MEINKOTH, J.; MCKEIRNEN, K.; LOVE, B. *Candida* peritonitis in dogs: report of 5 cases. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 42, n. 2, p. 227–233, 2013.

BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 59, n. 2, p. 73, 2006.

BREGER, J.; FUCHS, B. B.; APERIS, G.; MOY, T. I.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 2, p. e18, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; BITTENCOURT, P. V.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; DE OLIVEIRA, J. S.; ALENCAR, L. P. DE; CORDEIRO, R. DE A.; PINHEIRO, M.; NOGUEIRA-FILHO, E. F.; PEREIRA-NETO, W. DE A.; SIDRIM, J. J. C. Trends in antifungal susceptibility and virulence of *Candida* spp. from the nasolacrimal duct of horses. **Med. Mycol.**, v. 54, n. 2, p. 147–154, 2015a.

BRILHANTE, R. S. N.; BITTENCOURT, P. V.; SOUZA COLLARES CASTELO-BRANCO, D.; MELO GUEDES, G. M.; OLIVEIRA, J. S.; ALENCAR, L. P.; AGUIAR CORDEIRO, R.; PINHEIRO, M.; NOGUEIRA-FILHO, E. F.; AQUINO PEREIRA-NETO, W. Biofilms of *Candida* spp. from the ocular conjunctiva of horses with reduced azole susceptibility: a complicating factor for the treatment of keratomycosis? **Vet. Ophthalmol.**, 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO BRANCO, D. S. C. M.; DUARTE, G. P. S.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; ZEFERINO, J. P. O.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 4, n. 2, p. 189–193, 2012.

BRILHANTE, R. S. N.; DE ALENCAR, L. P.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; CASTELO, D. DE S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; DE BRITO MACEDO, R.; LIMA, D. T.; PAIVA, M. DE A. N.; MONTEIRO, A. J.; ALVES, N. D. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, n. 6, p. 889–895, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; DE ARAGÃO RODRIGUES, P. H.; DE ALENCAR, L. P.; RIELLO, G. B.; RIBEIRO, J. F.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO, D. DE S. C. M.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Evidence of fluconazole-resistant *Candida* species in tortoises and sea turtles. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 421–426, 2015b.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LEITE, J. J. G.; MOREIRA, C. A.; SILVA, L. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 76, n. 2, p. 268–277, 2011.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; JÚNIOR, F. A. S.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **Vet. J.**, v. 174, n. 1, p. 147–153, 2007.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **Vet. J.**, v. 182, n. 2, p. 320–326, 2009a.

BRITO, E. H. S.; OLIVEIRA DOS SANTOS FONTENELLE, R.; NOGUEIRA BRILHANTE, R. S.; AGUIAR CORDEIRO, R. DE; COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA ROCHA, M. F. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, 2009b.

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

BRUSCA, M. I.; VERDUGO, F.; AMIGHINI, C.; ALBAINA, O.; MORAGUES, M. D. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota. **Clin. Oral Investig.**, v. 18, n. 6, p. 1579–1586, 2014.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A. S.; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C. A.; RHEINBAY, E.; GRABHERR, M.; FORCHE, A.; REEDY, J. L. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657, 2009.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, n. 6, p. 1020–1025, 2002.

CAFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N. C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 229–234, 2006.

CAMPOY, S.; ADARIO, J. L. Antifungals. **Biochem. Pharmacol.**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **Biomed Res. Int.**, v. 2013, n. 151509, p. 1–9, 2013.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 7, p. 2477–2482, 2004.

CAPOOR, M. R.; NAIR, D.; DEB, M.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, L.; AGGARWAL, P. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 58, n. 6, p. 344, 2005.

CASTELO-BRANCO, D.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Med. Mycol.**, v. 51, n. 5, p. 555–560, 2013.

CECCARELLI, G.; GHEZZI, M. C.; RAPONI, G.; BRUNETTI, G.; MARSIGLIA, C.; FALLANI, S.; NOVELLI, A.; VENDITTI, M. Voriconazole treatment of *Candida tropicalis*

meningitis: persistence of (1,3)- β -D-glucan in the cerebrospinal fluid is a marker of clinical and microbiological failure: a case report. *Medicine (Baltimore)*., v. 95, n. 31, p. e4474, 2016.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 36, n. 4, p. 282–98, 2010.

CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; ALBERT, N.; KONTOYIANNIS, D. P. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, n. 6, p. 2257–2259, 2007.

CHEN, Y.-L.; YU, S.-J.; HUANG, H.-Y.; CHANG, Y.-L.; LEHMAN, V. N.; SILAO, F. G. S.; BIGOL, U. G.; BUNGAY, A. A. C.; AVERETTE, A.; HEITMAN, J. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot. Cell*, v. 13, n. 7, p. 844–854, 2014.

CHEN, Y.-N.; LO, H.-J.; WU, C.-C.; KO, H.-C.; CHANG, T.-P.; YANG, Y.-L. Loss of heterozygosity of *FCY2* leading to the development of flucytosine resistance in *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, n. 6, p. 2506–2514, 2011.

CHEN, Y. V.; ROSLI, R.; FONG, S. H.; SIDIK, S. M.; PEI, C. P. Histopathological characteristics of experimental *Candida tropicalis* induced acute systemic candidiasis in BALB/c mice. *Int. J. Zool. Res.*, v. 8, n. 1, p. 12, 2012.

CHEW, K. L.; CHENG, J. W. S.; JUREEN, R.; LIN, R. T. P.; TEO, J. W. P. *ERG11* mutations are associated with high-level azole resistance in clinical *Candida tropicalis* isolates, a Singapore study. *Mycoscience*, v. 58, n. 2, p. 111–115, 2017.

CHOI, M. J.; WON, E. J.; SHIN, J. H.; KIM, S. H.; LEE, W.-G.; KIM, M.-N.; LEE, K.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 60, n. 6, p. 3653–3661, 2016.

CHONG, P. P.; CHIENG, D. C.-S.; LOW, L. Y.; HAFEEZ, A.; SHAMSUDIN, M. N.; SEOW, H. F.; NG, K. P. Recurrent candidaemia in a neonate with Hirschsprung's disease: fluconazole resistance and genetic relatedness of eight *Candida tropicalis* isolates. *J. Med. Microbiol.*, v. 55, n. 4, p. 423–428, 2006.

CHONG, Y.; SHIMODA, S.; YAKUSHIJI, H.; ITO, Y.; MIYAMOTO, T.; SHIMONO, N.; KAMIMURA, T.; AKASHI, K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Chemother.*, v. 18, n. 5, p. 741–746, 2012a.

CHONG, Y.; SHIMODA, S.; YAKUSHIJI, H.; ITO, Y.; MIYAMOTO, T.; SHIMONO, N.; KAMIMURA, T.; AKASHI, K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Chemother. Off. J. Japan Soc. Chemother.*, v. 18, n. 5, p. 741–746, 2012b.

CLARK, L. C.; HODGKIN, J. Commensals, probiotics and pathogens in the *Caenorhabditis elegans* model. **Cell. Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 27–38, 2014.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard - second edition.** M27-A3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition.** M38-A2. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, fourth informational supplement.** M27-S4. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1 Suppl, p. 25–30, 2007.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; GIFFONI LEITE, J. J.; LIMA, D. T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 1, p. 53–59, 2013.

CORDEIRO, R. DE A.; DE JESUS EVANGELISTA, A. J.; SERPA, R.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; DE MELO, C. V. S.; DE OLIVEIRA, J. S.; DA SILVA FRANCO, J.; DE ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309–317, 2016.

CORDEIRO, R. DE A.; OLIVEIRA, J. S. DE; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; MARQUES, F. J. DE F.; BITTENCOURT, P. V.; CARVALHO, V. L.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N.; MOREIRA, J. L. B. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 2, p. 145–152, 2015a.

CORDEIRO, R. DE A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P.; DE OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. **FEMS Yeast Res.**, v. 15, n. 4, p. fov012, 2015b.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; SALVADOR, A.; AZEVEDO, M. M.; MUNRO, C. A.; RODRIGUES, A. G.; PINA-VAZ, C. Determination of

chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. **Cytom. Part A**, v. 83, n. 3, p. 324–328, 2013.

COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C.; DA COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 2014.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; RUIZ-BACA, E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 6, p. 755–771, 2012.

CUERVO, G.; GARCIA-VIDAL, C.; NUCCI, M.; PUCHADES, F.; FERNÁNDEZ-RUIZ, M.; OBED, M.; MANZUR, A.; GUDIOL, C.; PEMÁN, J.; AGUADO, J. M. Breakthrough candidaemia in the era of broad-spectrum antifungal therapies. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 22, n. 2, p. 181–188, 2016.

DA 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, n. 2, p. 73, 2009.

DA COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; LAVRADOR, M. A. S.; BARUFFI, M. D.; CANDIDO, R. C. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e97–e105, 2012.

DATTA, K. K.; PATIL, A. H.; PATEL, K.; DEY, G.; MADUGUNDU, A. K.; RENUSE, S.; KAVIYIL, J. E.; SEKHAR, R.; ARUNIMA, A.; DASWANI, B. Proteogenomics of *Candida tropicalis* — An opportunistic pathogen with importance for global health. **Omi. a J. Integr. Biol.**, v. 20, n. 4, p. 239–247, 2016.

DAVIS, K.; CHEONG, M. C.; PARK, J. S.; YOU, Y.-J. Appetite Control in *C. elegans*. **Appet. Food Intake Cent. Control**, 2017.

DE FREITAS, A. R.; BAEZA, L. C.; FARIA, M. G. I.; DOTA, K. F. D.; GODOY MARTÍNEZ, P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: antifungal susceptibility and biofilm production. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 31, n. 2, p. 104–8, 2013.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Baarn: The Nederlands: Centraalbureau voor Schimmelscultures, 2000.

DE REPENTIGNY, L.; PHANEUF, M.; MATHIEU, L.-G. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 11, p. 4907–4914, 1992.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; FURLANETO, M. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; COSTA, I. N.; MORA-MONTES, H. M. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host

to study fungal infections. **J. Microbiol. Methods**, v. 118, p. 182–186, 2015.

DEITRICK, C. L.; MICK, D. J.; LAUFFER, V.; PROSTKA, E.; NOWAK, D.; INGERSOLL, G. A comparison of two differing doses of promethazine for the treatment of postoperative nausea and vomiting. **J. Perianesth. Nurs.**, v. 30, n. 1, p. 5–13, 2015.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 161–169, 2014.

DEMURI, G. P.; HOSTETTER, M. K. Evidence for a $\beta 1$ integrin fibronectin receptor in *Candida tropicalis*. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 1, p. 127–132, 1996.

DENARDI, L. B.; MARIO, D. A. N.; LORETO, É. S.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 125–129, 2015.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **Int. J. Microbiol.**, v. 2014, n. 456878, p. 1–6, 2014.

DESNOS-OLLIVIER, M.; BRETAGNE, S.; BERNÈDE, C.; ROBERT, V.; RAOUX, D.; CHACHATY, E.; FORGET, E.; LACROIX, C.; DROMER, F.; GROUP, Y. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, p. 557, 2008a.

DESNOS-OLLIVIER, M.; BRETAGNE, S.; RAOUX, D.; HOINARD, D.; DROMER, F.; DANNAOUI, E. Mutations in the fks1 gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 9, p. 3092–3098, 2008b.

DI BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.

DIAZ-ARTILES, A.; PRIESOL, A. J.; CLARK, T. K.; SHERWOOD, D. P.; OMAN, C. M.; YOUNG, L. R.; KARMALI, F. The impact of oral promethazine on human whole-body motion perceptual thresholds. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, p. 1–10, 2017.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DONDERS, G. G. G.; SOBEL, J. D. *Candida* vulvovaginitis: A store with a buttery and a show window. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 70–72, 2017.

- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- DOS SANTOS, A. L. S. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. **World J. Biol. Chem.**, v. 2, n. 3, p. 48, 2011.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 30–6, 2003.
- DOYLE, A.; LÓPEZ, A.; PACK, L.; MUCKLE, A. *Candida* osteomyelitis in a gelding. **Can. Vet. J.**, v. 54, n. 2, p. 176, 2013.
- DWORECKA-KASZAK, B.; KRUTKIEWICZ, A.; SZOPA, D.; KLECZKOWSKI, M.; BIEGAŃSKA, M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in poland. **Sci. World J.**, v. 2012, n. 196347, p. 1–5, 2012.
- EDDOUZI, J.; PARKER, J. E.; VALE-SILVA, L. A.; COSTE, A.; ISCHER, F.; KELLY, S.; MANAI, M.; SANGLARD, D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.
- ELAD, D.; BRENNER, J.; MARKOVICS, A.; YAKOBSON, B.; SHLOMOVITZ, S.; BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 7–14, 1998.
- EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 850, n. 3, p. 436–448, 1986.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.
- FAURE-FONTENLA, M. A.; BRACHO-BLANCHET, E.; YAÑEZ-MOLINA, C.; BARRAGAN-TAME, L. Gastric perforation with *Candida tropicalis* invasion in a previously healthy girl. **Mycoses**, v. 40, n. 5-6, p. 175–177, 1997.
- FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, v. 54, n. 6, 2011.
- FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. **Curr. Microbiol.**, v. 68, n. 2, p. 161–166, 2014.
- FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix — involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 83, n. 2, p. 165–169, 2015.
- FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Effect of voriconazole on *Candida*

tropicalis biofilms: relation with *ERG* genes expression. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9–10, p. 643–651, 2016.

FERNÁNDEZ-RUIZ, M.; PUIG-ASENSIO, M.; GUINEA, J.; ALMIRANTE, B.; PADILLA, B.; ALMELA, M.; DÍAZ-MARTÍN, A.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; AGUADO, J. M. *Candida tropicalis* bloodstream infection: incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. **J. Infect.**, v. 71, n. 3, p. 385–394, 2015.

FERREIRA, C.; GONÇALVES, B.; VILAS BOAS, D.; OLIVEIRA, H.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH. **FEMS Pathog. Dis.**, v. 74, n. 8, p. 101, 2016.

FERREIRA, J. A. G.; CARR, J. H.; STARLING, C. E. F.; DE RESENDE, M. A.; DONLAN, R. M. Biofilm formation and effect of caspofungin on biofilm structure of *Candida* species bloodstream isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 10, p. 4377–4384, 2009.

FESHARAKI, S. H.; HAGHANI, I.; MOUSAVI, B.; KARGAR, M. L.; BOROUMAND, M.; ANVARI, M. S.; ABBASI, K.; MEIS, J. F.; BADALI, H. Endocarditis due to a co-infection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in a drug abuser. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, n. 11, p. 1763–1767, 2013.

FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (*Erg11p*) modifications. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, 2013.

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemolytic capability and expression of a putative haem oxygenase-encoding gene by blood isolates of *Candida tropicalis* are influenced by iron deprivation and the presence of hemoglobin and erythrocytes. **Microb. Pathog.**, v. 105, p. 235–239, 2017.

FROMTLING, R. A.; ABRUZZO, G. K.; GILTINAN, D. M. *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 8, p. 1416–1420, 1987.

FUCHS, B. B.; EBY, J.; NOBILE, C. J.; EL KHOURY, J. B.; MITCHELL, A. P.; MYLONAKIS, E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 6, p. 488–496, 2010.

FURLANETO, M. C.; FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L. Effects of human blood red cells on the haemolytic capability of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **J. Biomed. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 13, 2015.

GABRIELLI, E.; SABBATINI, S.; ROSELLETTI, E.; KASPER, L.; PERITO, S.; HUBE, B.; CASSONE, A.; VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E. In vivo induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 7, n. 7, p. 819–825, 2016.

GÁCSER, A.; TROFA, D.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J. D. Targeted gene deletion in

Candida parapsilosis demonstrates the role of secreted lipase in virulence. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 10, p. 3049, 2007.

GALAN-LADERO, M. A.; BLANCO, M. T.; SACRISTAN, B.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C.; PEREZ-GIRALDO, C.; GOMEZ-GARCIA, A. C. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 1, p. 207–210, 2010.

GALÁN-LADERO, M. A.; BLANCO-BLANCO, M. T.; HURTADO, C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, M. T.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. **Yeast**, v. 30, n. 9, p. 331–339, 2013.

GAMALETSOU, M. N.; RAMMAERT, B.; BUENO, M. A.; SIPSAS, N. V.; MORIYAMA, B.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROILIDES, E.; ZELLER, V.; TAJ-ALDEEN, S. J.; MILLER, A. O. *Candida* arthritis: analysis of 112 pediatric and adult cases. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 3, n 1, 2016.

GARBEE, D. D.; PIERCE, S. S.; MANNING, J. M. Opportunistic fungal infections in critical care units. **Crit. Care Nurs. Clin. North Am.**, v. 29, n. 1, p. 67–79, 2017.

GARCIA-EFFRON, G.; CHUA, D. J.; TOMADA, J. R.; DIPERSIO, J.; PERLIN, D. S.; GHANNOUM, M.; BONILLA, H. Novel *FKS* mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 5, p. 2225–2227, 2010.

GARCIA-EFFRON, G.; KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E.; PERLIN, D. S. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 11, p. 4181–4183, 2008.

GERAGHTY, P.; KAVANAGH, K. Disruption of mitochondrial function in *Candida albicans* leads to reduced cellular ergosterol levels and elevated growth in the presence of amphotericin B. **Arch. Microbiol.**, v. 179, n. 4, p. 295–300, 2003.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 1, p. 122–143, 2000.

GIACOBINO, J.; MONTELLI, A. C.; BARRETTI, P.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; CARAMORI, J. T.; BARBOSA, L.; BAGAGLI, E. Fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis (PD) in Brazil: molecular identification, biofilm production and antifungal susceptibility of the agents. **Med. Mycol.**, v. 54, n. 7, p. 725–732, 2016.

GLÖCKNER, A.; CORNELY, O. A. *Candida glabrata* – unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 445–450, 2015.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, n. 6, p.

265–269, 2007.

GONÇALVES, S. S.; SOUZA, A. C. R.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198–219, 2016.

GOUBA, N.; DRANCOURT, M. Digestive tract mycobiota: a source of infection. **Med. Mal. Infect.**, v. 45, n. 1, p. 9–16, 2015.

GROSSET, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GODET, C.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; CAZENAVE-ROBLOT, F. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 14, p. 20–23, 2016.

GUEMBE, M.; CRUCES, R.; PELÁEZ, T.; MUÑOZ, P.; BOUZA, E.; GROUP, G. STUDY. Assessment of biofilm production in *Candida* isolates according to species and origin of infection. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 35, n. 1, p. 37–40, 2017.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, n. s6, p. 5–10, 2014.

HAMAD, I.; KEITA, M. B.; PEETERS, M.; DELAPORTE, E.; RAOULT, D.; BITTAR, F. Pathogenic eukaryotes in gut microbiota of western lowland gorillas as revealed by molecular survey. **Sci. Rep.**, v. 4, n. 6417, p. 1–9, 2014.

HAMILTON, L. A.; LOCKHART, N. R.; CRAIN, M. R. *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* in an immunocompetent patient: a case report. **J. Pharm. Pract.**, v. 28, n. 3, p. 284–287, 2015.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, É.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; LOPES, G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 325–328, 2009.

HIROTA, K.; YUMOTO, H.; SAPAAR, B.; MATSUO, T.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, p. 321–330, 2016.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **J. Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

HØIBY, N.; FLENSBORG, E. W.; BECK, B.; FRIIS, B.; JACOBSEN, S. V.; JACOBSEN, L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. **Scand. J. Respir. Dis.**, v. 58, n. 2, p. 65–79, 1977.

HOYER, L. L.; FUNDYGA, R.; HECHT, J. E.; KAPTEYN, J. C.; KLIS, F. M.; ARNOLD, J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics*, v. 157, n. 4, p. 1555–1567, 2001.

HUF, G.; ALEXANDER, J.; GANDHI, P.; ALLEN, M. H. Haloperidol plus promethazine for psychosis-induced aggression. *Cochrane Libr.*, 2016.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.*, v. 37, n. 1, p. 50–59, 2017.

IATTA, R.; PUTTILLI, M. R.; IMMEDIATO, D.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles. *Mycoses*, v. 60, n. 3, p. 178–182, 2017.

IVNITSKI-STEELE, I.; HOLMES, A. R.; LAMPING, E.; MONK, B. C.; CANNON, R. D.; SKLAR, L. A. Identification of Nile red as a fluorescent substrate of the *Candida albicans* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Cdr2p and the major facilitator superfamily transporter Mdr1p. *Anal. Biochem.*, v. 394, n. 1, p. 87–91, 2009.

JACOBSEN, I. D.; GROSS, K.; HUBE, B. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. In: BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M. **Host-Fungus Interactions: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Springer, 2012. v. 845p. 487–496.

JENSEN, R. H.; JOHANSEN, H. K.; ARENDRUP, M. C. Stepwise development of a homozygous S80P substitution in Fks1p, conferring echinocandin resistance in *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 57, n. 1, p. 614–617, 2013.

JIA, W.; ZHANG, H.; LI, C.; LI, G.; LIU, X.; WEI, J. The calcineruin inhibitor cyclosporine a synergistically enhances the susceptibility of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by multiple mechanisms. *BMC Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 113, 2016.

JIANG, C.; DONG, D.; YU, B.; CAI, G.; WANG, X.; JI, Y.; PENG, Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 68, n. 4, p. 778–85, 2013.

JIANG, C.; LI, Z.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; DONG, D.; PENG, Y. Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. *Microbiol. Res.*, v. 192, p. 65–72, 2016a.

JIANG, C.; NI, Q.; DONG, D.; ZHANG, L.; LI, Z.; TIAN, Y.; PENG, Y. The role of *UPC2* gene in azole-resistant *Candida tropicalis*. *Mycopathologia*, v. 181, n. 11–12, p. 833–838, 2016b.

JIN, Y.; LIN, D. Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001–2004). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 41, n. 6, p. 373–381, 2005.

JONES JR, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. *Mol. Microbiol.*, v. 92, n. 2, p. 383–398, 2014.

JOTHPRAKASAM, V.; SAMBANTHAM, M.; CHINNATHAMBI, S.; VIJAYABOOPATHI, S. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Arch. Oral Biol.**, v. 73, p. 21–24, 2017.

JUNIANTITO, V.; IZAWA, T.; KUWAMURA, M.; YONEZAWA, M.; ITO, S.; YAMATE, J. Gastrointestinal candidiasis in an Aldabra giant tortoise (*Geochelone gigantea*). **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n. 9, p. 1269–1272, 2009.

KANAFANI, Z. A; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008.

KARKOWSKA-KULETA, J.; ZAJĄC, D.; BOCHĘŃSKA, O.; KOZIK, A. Surfaceome of pathogenic yeasts, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*, revealed with the use of cell surface shaving method and shotgun proteomic approach. **Acta Biochim. Pol.**, v. 62, n. 4, p. 807–819, 2015.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 19, p. 5678–98, 2012.

KIM, W.; HENDRICKS, G. L.; LEE, K.; MYLONAKIS, E. An update on the use of *C. elegans* for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 12, n. 6, p. 625–633, 2017.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 2, p. 255–267, 2004.

KOLACZKOWSKI, M.; MICHALAK, K.; MOTOHASHI, N. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 279–283, 2003.

KOLAHIAN, S.; JAROLMASJED, S. H. Antiemetic efficacy of promethazine on xylazine-induced emesis in cats. **Can. Vet. J.**, v. 53, n. 2, p. 193, 2012.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, n. 8, p. 873–880, 2010.

KOZIK, A.; KARKOWSKA-KULETA, J.; ZAJĄC, D.; BOCHĘŃSKA, O.; KEDRACKA-KROK, S.; JANKOWSKA, U.; RAPALA-KOZIK, M. Fibronectin, vitronectin and laminin binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 197, 2015.

KRAMER, K.; HAIST, V.; ROTH, C.; SCHRÖDER, C.; SIESENHOP, U.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P. Systemic *Candida albicans* infection in two alpacas (*Lama pacos*). **J. Comp. Pathol.**, v. 139, n. 2, p. 141–145, 2008.

KRAUSE, R.; MOISSL-EICHINGER, C.; HALWACHS, B.; GORKIEWICZ, G.; BERG, G.; VALENTIN, T.; PRATTES, J.; HÖGENAUER, C.; ZOLLNER-SCHWETZ, I. Mycobiome

in the Lower Respiratory Tract – A Clinical Perspective. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 2169, p. 1–9, 2016.

KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.; RÓZAŃSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, v. 150, n. 1, p. 5–7, 2001.

KULLBERG, B. J.; VASQUEZ, J.; MOOTSIKAPUN, P.; NUCCI, M.; PAIVA, J.-A.; GARBINO, J.; YAN, J. L.; ARAM, J.; CAPPARELLA, M. R.; CONTE, U. Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: a patient-level pooled analysis of six clinical trials. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, n. 8, p. 2368–2377, 2017.

KUMAR, S. N.; MOHANDAS, C. An antifungal mechanism of protolichesterinic acid from the lichen *Usnea albopunctata* lies in the accumulation of intracellular ROS and mitochondria-mediated cell death due to apoptosis in *Candida tropicalis*. **Front. Pharmacol.**, v. 8, p. 301, 2017.

KUMAR, V. G.; LATHA, R.; VEDHAGIRI, K.; SATHIAMOORTHI, T.; JAYARANI, G.; SASIKALA, R.; SELVIN, J.; NATARAJASEENIVASAN, K. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. **J. Mycol. Médicale/Journal Med. Mycol.**, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2009.

KUTTIN, E. S.; BEEMER, A. M.; BOCK, R. R.; PERLSTEIN, Z. *Candida tropicalis* infecting the respiratory tract of turkeys in Israel. **Avian Dis.**, v. 19, n. 2, p. 393–395, 1975.

LACHANCE, M. A.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; KURTZMAN, C. P. *Candida* Berkout. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J.; BOEKHOUT, T. **The yeasts - A taxonomic study**. 5. ed. Londres: Elsevier, 2011.

LAGNEAU, P. E.; LEBTAHI, K.; SWINNE, D. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. **Mycopathologia**, v. 135, n. 2, p. 99–102, 1996.

LEDBETTER, E. C.; IRBY, N. L.; KIM, S. G. In vivo confocal microscopy of equine fungal keratitis. **Vet. Ophthalmol.**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2011.

LEE, W.; LEE, D. G. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **IUBMB Life**, v. 66, n. 11, p. 780–785, 2014.

LEMIEUX, G. A.; ASHRAFI, K. Neural regulatory pathways of feeding and fat in *Caenorhabditis elegans*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 49, p. 413–438, 2015.

LEVETIN, E.; HORNER, W. E.; SCOTT, J. A.; WORKGROUP, E. A. Taxonomy of allergenic fungi. **J. Allergy Clin. Immunol. Pract.**, v. 4, n. 3, p. 375–385, 2016.

LI, B.; GUO, T.; CHEN, Y.; XIE, J.; NIU, H.; LIU, D.; CHENG, J.; CHEN, X.; WU, J.; ZHUANG, W. Genome sequence of *Candida tropicalis* no. 121, used for RNA production. **Genome Announc.**, v. 2, n. 3, p. e00316-14, 2014.

LI, F.; WU, L.; CAO, B.; ZHANG, Y.; LI, X.; LIU, Y. Surveillance of the prevalence,

antibiotic susceptibility, and genotypic characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 353, 2013.

LI, Y.; WAN, Z.; LIU, W.; LI, R. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 2, p. 1365–1369, 2015.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. **Vet. Ophthalmol.**, v. 7, n. 3, p. 159–162, 2004.

LIU, W.; LI, L. P.; ZHANG, J. D.; LI, Q.; SHEN, H.; CHEN, S. M.; HE, L. J.; YAN, L.; XU, G. T.; AN, M. M. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103442, 2014.

LO, H.-J.; TSAI, S.-H.; CHU, W.-L.; CHEN, Y.-Z.; ZHOU, Z.-L.; CHEN, H.-F.; LEE, C.-F.; YANG, Y.-L. Fruits as the vehicle of drug resistant pathogenic yeasts. **J. Infect.**, v. 75, n. 3, p. 254–262, 2017.

LOCKHART, S. R. Current epidemiology of *Candida* infection. **Clin. Microbiol. Newsl.**, v. 36, n. 17, p. 131–136, 2014.

LORD, A. T.; MOHANDAS, K.; SOMANATH, S.; AMBU, S. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 9, n. 1, p. 11, 2010.

LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; GROUP, F. M. S. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 2, p. 532–538, 2011.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2971–2974, 2001.

MADEEHA, I. R.; IKRAM, A.; IMRAN, M. A preliminary insight of correlation between human fecal microbial diversity and blood lipid profile. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 67, n. 7, p. 865–871, 2016.

MAGLIONI, S.; VENTURA, N. *C. elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders. **Mitochondrion**, v. 30, p. 117–125, 2016.

MALDONADO, N. A.; CANO, L. E.; DE BEDOUT, C.; ARBELÁEZ, C. A.; RONCANCIO, G.; TABARES, Á. M.; ROBLEDO, C. G.; ROBLEDO, J.; GERMEN, G. Association of clinical and demographic factors in invasive candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida* species: a study in 15 hospitals, Medellin, Colombia 2010–2011. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 79, n. 2, p. 280–286, 2014.

MANCERA, E.; PORMAN, A. M.; CUOMO, C. A.; BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Finding a missing gene: *EFG1* regulates morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3 Genes, Genomes, Genet.**, v. 5, n. 5, p. 849–856, 2015.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, n. 8, p. 1192–1198, 2014.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 9, p. 2498–2501, 2016.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; GÓMEZ-PEROSANZ, M.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. The novel oral glucan synthase inhibitor SCY-078 shows in vitro activity against sessile and planktonic *Candida* spp. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, n. 7, p. 1969–1976, 2017.

MARIONI, J.; DA SILVA, M. A.; CABRERA, J. L.; MONTOYA, S. C. N.; PARAJE, M. G. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1321–1328, 2016.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. DE A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17–20, 2006.

MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 9, p. 3081–3088, 2007.

MERZ, W. G.; SANDFORD, G. R. Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 677–680, 1979.

MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 5, p. 461–472, 2013.

MESA-ARANGO, A. C.; RUEDA, C.; ROMÁN, E.; QUINTIN, J.; TERRÓN, M. C.; LUQUE, D.; NETEA, M. G.; PLA, J.; ZARAGOZA, O. Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 4, p. 2326–2335, 2016.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGÜELLES, J. C.; PLA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the

fungicidal effect of this drug. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.

MILBRADT, E. L.; SILVA, T. M.; HATAKA, A.; TEIXEIRA, C. R.; OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L. Massive attack of honeybee on macaws (*Ara ararauna* and *Ara chloropterus*) in Brazil—A case report. **Toxicon**, 2017.

MILDE, K.; KOSTKA, V.; KALETA, E. F.; WILLEMS, H.; JÄGER, C. Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). **Vet. Microbiol.**, v. 76, n. 4, p. 395–402, 2000.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clin. Dermatol.**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2016.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Ann Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 57–66, 2013.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P.; KHALID, K. Comparison of proteolytic activity of *Candida* sp. strains depending on their origin. **J. Mycol. Médicale/Journal Med. Mycol.**, v. 26, n. 2, p. 138–147, 2016.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, n. 5–6, p. 405–419, 2002.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SALES, D. L.; CARNEIRO, J. N. P.; MACHADO, A. J. T.; DOS SANTOS, A. T. L.; DE FREITAS, M. A.; MARTINS, G. M. DE A. B.; LEITE, N. F.; DE MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti-*Candida* effect in association with fluconazole. **Microb. Pathog.**, v. 95, p. 200–207, 2016.

MORALEZ, A. T.-P.; PERINI, H. F.; FURLANETO-MAIA, L.; ALMEIDA, R. S.; PANAGIO, L. A.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379–386, 2016.

MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drugs resistance in pathogenic fungi. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

MORETTI, A.; BONCIO, L.; POSTERARO, B.; MECELLI, L.; BALDUCCI, M.; FADDA, G.; LA SORDA, M.; DI CHIO, M.; GRELLONI, V.; AGNETTI, F. Co-cutaneous infection in a dog: PCR-reverse identification of *Candida tropicalis* on skin biopsy. **J. Med. Mycol.**, v. 16, n. 1, p. 30–36, 2006.

NARDONI, S.; PAPINI, R.; MARCUCCI, G.; MANCIANTI, F. Survey on the fungal flora of the cloaca of healthy pet reptiles. **Rev. Med. Vet. (Toulouse)**, v. 159, n. 3, p. 159–165, 2008.

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*, v. 169, n. 3, p. 175–82, 2010.

NEGRI, M.; SILVA, S.; CAPOCI, I. R. G.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilms: biomass, metabolic activity and secreted aspartyl proteinase production. *Mycopathologia*, v. 181, n. 3–4, p. 217–224, 2016.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 31, n. 7, p. 1399–1412, 2012.

NEVES-JUNIOR, A.; CARTÁGENES-PINTO, A. C.; ROCHA, D. A. S.; SÁ, L. F.; JUNQUEIRA, M. DE L.; FERREIRA-PEREIRA, A. Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. clinical isolates in a Brazilian tertiary hospital in Minas Gerais, Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 87, n. 2, p. 1349–1359, 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.*, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

OBINNA-ECHEM, P. C.; KURI, V.; BEAL, J. Evaluation of the microbial community, acidity and proximate composition of akamu, a fermented maize food. *J. Sci. Food Agric.*, v. 94, n. 2, p. 331–340, 2014.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OKABAYASHI, K.; IMAJI, M.; OSUMI, T.; MURAKAMI, Y.; MARUYAMA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Antifungal activity of itraconazole and voriconazole against clinical isolates obtained from animals with mycoses. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v. 50, n. 2, p. 91–94, 2009.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn. J. Infect. Dis.*, v. 60, n. 5, p. 280, 2007.

ORTEGA-RIVEROS, M.; DE-LA-PINTA, I.; MARCOS-ARIAS, C.; EZPELETA, G.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. Usefulness of the non-conventional *Caenorhabditis elegans* model to assess *Candida* virulence. *Mycopathologia*, p. 1–11, 2017.

OVERTON, T. W. Flow cytometry of yeasts and other fungi. In: WILKINSON, M. G. (Ed.). *Flow Cytometry in Microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015.

OZAWA, H.; OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATARI, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 159–162, 2005.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLO, F. T.; SMITH, S. I. Fluconazole susceptibility and *ERG11* gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. **Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.**, v. 3, n. 1, p. 84–90, 2012.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, n. 3, p. 485–506, 2006.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 67–72, 2013.

PASQUALE, T.; TOMADA, J. R.; GHANNOUN, M.; DIPERSIO, J.; BONILLA, H. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, n. 1, p. 219, 2008.

PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; AMACKER, M.; KASPER, L.; ROSELLETTI, E.; LUCIANO, E.; SABBATINI, S.; KAESER, M.; MOSER, C.; HUBE, B. Secretory aspartyl proteinases cause vaginitis and can mediate vaginitis caused by *Candida albicans* in mice. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00724-15, 2015.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect. Dis.**, 2017.

PÉTERS, F.; FRANCK, T.; PEQUITO, M.; DE LA REBIÈRE, G.; GRULKE, S.; SALCCICIA, A.; VERWILGHEN, D.; CHIAVACCINI, L.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. *In vivo* administration of acepromazine or promethazine to horse decreases the reactive oxygen species production response of subsequently isolated neutrophils to stimulation with phorbol myristate acetate. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 32, n. 6, p. 541–547, 2009.

PETIT, P. X. Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 98, n. 1, p. 279–286, 1992.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 9, p. 2846–2856, 2012.

PICHOVÁ, I.; PAVLÍČKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJŠÍ, E.; HRUŠKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUML, T.; SOUČEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. **FEBS J.**, v. 268, n. 9, p. 2669–2677, 2001.

PINNOCK, A.; SHIVSHETTY, N.; ROY, S.; RIMMER, S.; DOUGLAS, I.; MACNEIL, S.; GARG, P. *Ex vivo* rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis.

Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., v. 255, n. 2, p. 333–342, 2017.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Chapter Three - *Candida* Survival Strategies. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 139–235, 2015.

PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNETT, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 108, n. 52, p. 21158–21163, 2011.

PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M. P.; JONES, S. K.; WANG, N.; BENNETT, R. J. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **PLoS Genet.**, v. 9, n. 3, p. e1003369, 2013.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K.; SHAH, A. H. *Candida* efflux ATPases and antiporters in clinical drug resistance. In: **Yeast Membrane Transport**. [s.l.] Springer, 2016.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; LANE, I. F.; COWGILL, L. D.; DYE, J. A. *Candida* spp. urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 39, n. 3, p. 263–270, 2003.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

PRIJI, P.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; BENJAMIN, S. *Candida tropicalis* BPU1, a novel isolate from the rumen of the Malabari goat, is a dual producer of biosurfactant and polyhydroxybutyrate. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 103–110, 2013.

PUKKILA-WORLEY, R.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 6, p. e1002074, 2011.

PUKKILA-WORLEY, R.; PELEG, A. Y.; TAMPAKAKIS, E.; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 11, p. 1750–1758, 2009.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

QUINTIN, J.; ASMAR, J.; MATSKEVICH, A. A.; LAFARGE, M.-C.; FERRANDON, D. The *Drosophila* Toll pathway controls but does not clear *Candida glabrata* infections. **J. Immunol.**, v. 190, n. 6, p. 2818–2827, 2013.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 7, p. 979–86, 2006.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMANI, R.; CHATURVEDI, V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of

pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 10, p. 2752–2758, 2000.

RAMOS, C. L.; DE SOUSA, E. S. O.; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. DO A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiol.**, v. 49, p. 182–188, 2015.

RAZ-PASTEUR, A.; ULLMANN, Y.; BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of *Candida* infections in a human skin model: scanning electron microscope observations. **ISRN Dermatol.**, v. 2011, n. 150642, p. 1–6, 2011.

REILLY, L. K.; PALMER, J. E. Systemic candidiasis in four foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 205, n. 3, p. 464–466, 1994.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 8, p. 982–989, 2002.

RICETO, É. B. DE M.; MENEZES, R. DE P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. DOS S. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 32, n. 2, p. 79–82, 2015.

RIPPON, R. J.; ALLEY, M. R.; CASTRO, I. *Candida albicans* infection in free-living populations of hihi (stitchbird; *Notiomystis cincta*). **N. Z. Vet. J.**, v. 58, n. 6, p. 299–306, 2010.

ROCHA, M. F. G.; ALENCAR, L. P.; PAIVA, M. A. N.; MELO, L. M.; BANDEIRA, S. P.; PONTE, Y. B.; SALES, J. A.; GUEDES, G. M. M.; CASTELO-BRANCO, D.; BANDEIRA, T. J. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetaconazole: an environmental resistance school? **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281–290, 2016.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **J. Intern. Med.**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

RUEDA, C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 2, p. 1071–1083, 2014.

RUEDA, C.; PUIG-ASENSIO, M.; GUINEA, J.; ALMIRANTE, B.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O.; FROM GEIH-GEMICOMED, C. P. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 23, n. 1, p. 49–e1, 2017.

SAFAVIEH, M.; COARSEY, C.; ESIOBU, N.; MEMIC, A.; VYAS, J. M.; SHAFIEE, H.; ASGHAR, W. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.

SAFE, L. M.; SAFE, S. H.; SUBDEN, R. E.; MORRIS, D. C. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida*

tropicalis. **Can. J. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 398–401, 1977.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 583–593, 2005.

SANDAI, D.; TABANA, Y. M.; EL OUWEINI, A.; AYODEJI, I. O. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. e37385, 2016.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 251–3, 2005.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, 2005.

SCHRAM, A. M.; KIM, B.; CARLOS, C.; TETZLAFF, M. T.; SCHUSTER, M.; ROSENBACH, M. Primary cutaneous *Candida tropicalis* infection in a patient with B-cell lymphoma. **Cutis**, v. 93, n. 4, p. 204–206, 2014.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, n. 4, p. 601–604, 2010.

SEERVAI, R. N. H.; JONES, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; PORMAN, A. M.; BENNETT, R. J. Parosexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. **Eukaryot. Cell**, v. 12, n. 12, p. 1629–1640, 2013.

SHANMUGHAPRIYA, S.; SORNAKUMARI, H.; LENCY, A.; KAVITHA, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. **Med. Mycol.**, v. 52, n. 8, p. 853–861, 2014.

SHAO, J.; SHI, G.; WANG, T.; WU, D.; WANG, C. Antiproliferation of berberine in combination with fluconazole from the perspectives of reactive oxygen species, ergosterol and drug efflux in a fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolate. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1516, 2016.

SHAPIRA, M. Host–microbiota interactions in *Caenorhabditis elegans* and their significance. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 38, p. 142–147, 2017.

SHARMA, M.; BISWAS, D.; KOTWAL, A.; THAKURIA, B.; KAKATI, B.; CHAUHAN, B. S.; PATRAS, A. Ibuprofen-mediated reversal of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida*. **J. Clin. diagnostic Res. JCDR**, v. 9, n. 1, p. DC20, 2015.

SHARMA, Y.; CHUMBER, S. K.; KAUR, M. Studying the prevalence, species distribution, and detection of in vitro production of phospholipase from *Candida* isolated from cases of

invasive candidiasis. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 8, 2017.

SHERWOOD, R. K.; BENNETT, R. J. Fungal meiosis and parasexual reproduction — lessons from pathogenic yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, n. 6, p. 599–607, 2009.

SHETH, C. C.; MAKDA, K.; DILMAHOMED, Z.; GONZÁLEZ, R.; LUZI, A.; JOVANI-SANCHO, M. DEL M.; VESES, V. Alcohol and tobacco consumption affect the oral carriage of *Candida albicans* and mutans streptococci. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 63, n. 4, p. 254–259, 2016.

SHI, G.; SHAO, J.; WANG, T.; WU, D.; WANG, C. Mechanism of berberine-mediated fluconazole-susceptibility enhancement in clinical fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Biomed. Pharmacother.**, v. 93, p. 709–712, 2017.

SHRESTHA, S. K.; FOSSO, M. Y.; GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Amphiphilic tobramycin analogues as antibacterial and antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 8, p. 4861–4869, 2015.

SIDRIM, J. J. C.; CARVALHO, V. L.; DE SOUZA COLLARES MAIA CASTELO-BRANCO, D.; BRILHANTE, R. S. N.; DE MELO GUEDES, G. M.; BARBOSA, G. R.; LAZZARINI, S. M.; OLIVEIRA, D. C. R.; DE MEIRELLES, A. C. O.; ATTADEMO, F. L. N.; DA BÔAVIAGEM FREIRE, A. C.; DE AQUINO PEREIRA-NETO, W.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F. G. Antifungal resistance and virulence among *Candida* spp. from captive amazonian manatees and West Indian manatees: potential impacts on animal and environmental health. **Ecohealth**, v. 13, n. 2, p. 328–338, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; DE SOUZA COLLARES, D. C. B.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G. D. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *in vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Vet. Microbiol.**, v. 145, n. 3, p. 324–328, 2010.

SILVA, A. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; DA SILVA, C. R.; CAMPOS, R. DE S.; COSTA SILVA, R. A.; FREITAS, D. D.; DO NASCIMENTO, F. B. S. A.; DE ANDRADE, L. N. D.; SAMPAIO, L. S.; GRANGEIRO, T. B.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; DE MORAES, M. O.; NOBRE JÚNIOR, H. V. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 6, p. 3551–3557, 2016.

SILVA, C. R.; ANDRADE NETO, J. B.; SIDRIM, J. J. C.; ÂNGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; BRILHANTE, R. S. N.; MACEDO, D. S.; DE MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013a.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans*. *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 681–689, 2009.

SILVA, S.; HOOPER, S. J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. W. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 2, p. 264–272, 2011.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SILVA, C. R. DA; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O. DE; NOBRE JÚNIOR, H. V. Susceptibility to amphotericin B of *Candida* spp. strains isolated in Ceará, Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 2, p. 244–245, 2013b.

SILVA, E. H. DA; RUIZ, L. DA S.; MATSUMOTO, F. E.; AULER, M. E.; GIUDICE, M. C.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C. R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999–2004): characteristics of the yeast isolates. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 349–353, 2007.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections. **Le Infez. Med. Riv. Period. di eziologia, Epidemiol. diagnostica, Clin. e Ter. delle Patol. Infett.**, v. 23, n. 3, p. 211–223, 2015.

SOUZA, C. M. C.; JUNIOR, S. A. P.; MORAES, T. D. S.; DAMASCENO, J. L.; MENDES, S. A.; DIAS, H. J.; STEFANI, R.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; PIRES, R. H. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Med. Mycol.**, v. 54, n. 5, p. 515–523, 2016.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mycotic mastitis in ruminants caused by yeasts. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282–290, 2009.

SRINIVASNAKSHATRI, V. K.; SUBRAMANI, P.; VENKATESHWARAPRASAD, K. N.; VARMA, P. A fatal case of fungal empyema due to *Candida krusei* and *Candida tropicalis*: a rare occurrence with an atypical presentation. **J. Clin. Diagnostic Res.**, v. 8, n. 11, p. DD01, 2014.

SUGI, T. Genome editing in *C. elegans* and other nematode species. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 295, 2016.

SUH, S.-O.; NGUYEN, N. H.; BLACKWELL, M. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, n. 1, p. 88–102, 2007.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 30, n. 4, p. 1023–1052, 2016.

SUN, N.; FONZI, W.; CHEN, H.; SHE, X.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; CALDERONE, R. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron

transport chain complex I mutants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 1, p. 532–542, 2013.

TAKAHASHI, H.; UEDA, K.; ITANO, E. N.; YANAGISAWA, M.; MURATA, Y.; MURATA, M.; YAGUCHI, T.; MURAKAMI, M.; KAMEI, K.; INOMATA, T. *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. **Vet. Med. Int.**, v. 2010, n. 349364, p. 1–12, 2010.

T MOREY, A.; C DE SOUZA, F.; P SANTOS, J.; A PEREIRA, C.; D CARDOSO, J.; SC DE ALMEIDA, R.; A COSTA, M.; CP DE MELLO, J.; V NAKAMURA, C.; PINGE-FILHO, P. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 17, n. 4, p. 365–375, 2016.

TAN, J.; ZHANG, J.; CHEN, W.; SUN, Y.; WAN, Z.; LI, R.; LIU, W. The A395T mutation in *ERG11* gene confers fluconazole resistance in *Candida tropicalis* causing candidemia. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3–4, p. 213–218, 2015.

TANAKA, H.; ISHIDA, K.; YAMADA, W.; NISHIDA, T.; MOCHIZUKI, K.; KAWAKAMI, H. Study of ocular candidiasis during nine-year period. **J. Infect. Chemother.**, v. 22, n. 3, p. 149–156, 2016.

TANIGUCHI, L.; DE FÁTIMA FARIA, B.; ROSA, R. T.; E CARVALHO, A. DE P.; GURSKY, L. C.; ELIFIO-ESPOSITO, S. L.; PARAHITIYAWA, N.; SAMARANAYAKE, L. P.; ROSA, E. A. R. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. **J. Microbiol. Methods**, v. 78, n. 2, p. 171–174, 2009.

TAVEIRA, G. B.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; TRINDADE, F. G.; DA CUNHA, M.; GOMES, V. M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. **BMC Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 12, 2016.

TAYLOR, L. G.; BIRD, S. T.; SAHIN, L.; TASSINARI, M. S.; GREENE, P.; REICHMAN, M. E.; ANDRADE, S. E.; HAFFENREFFER, K.; TOH, S. Antiemetic use among pregnant women in the United States: the escalating use of ondansetron. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, v. 26, n. 5, p. 592–596, 2017.

TEGOS, G. P.; HAYNES, M.; STROUSE, J. J.; KHAN, M. M. T.; BOLOGA, C. G.; OPREA, T. I.; SKLAR, L. A. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, n. 13, p. 1291–1302, 2011.

TEOTÓNIO, H.; ESTES, S.; PHILLIPS, P. C.; BAER, C. F. Experimental evolution with *Caenorhabditis* nematodes. **Genetics**, v. 206, n. 2, p. 691–716, 2017.

TERÇAS, A. L. G.; MARQUES, S. G.; MOFFA, E. B.; ALVES, M. B.; DE AZEVEDO, C. M. P. S.; SIQUEIRA, W. L.; MONTEIRO, C. A. Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 298, 2017.

- TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 845352, 2012.
- TROEMEL, E. R. Host-microsporidia interactions in *Caenorhabditis elegans*, a model nematode host. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, n. 5, 2016.
- TUN, H. M.; MAUROO, N. F.; SAN YUEN, C.; HO, J. C. W.; WONG, M. T.; LEUNG, F. C.-C. Microbial diversity and evidence of novel homoacetogens in the gut of both geriatric and adult giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e79902, 2014.
- TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 4, n. 9, p. a019778, 2014.
- UKHANOVA, M.; WANG, X.; BAER, D. J.; NOVOTNY, J. A.; FREDBORG, M.; MAI, V. Effects of almond and pistachio consumption on gut microbiota composition in a randomised cross-over human feeding study. **Br. J. Nutr.**, v. 111, n. 12, p. 2146–2152, 2014.
- UNO, M.; NISHIDA, E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. **NPJ aging Mech. Dis.**, v. 2, p. 16010, 2016.
- VADKERTIOVÁ, R.; SLÁVIKOVÁ, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. **J. Basic Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 145–152, 2006.
- VALE-SILVA, L. A.; COSTE, A. T.; ISCHER, F.; PARKER, J. E.; KELLY, S. L.; PINTO, E.; SANGLARD, D. Azole resistance by loss of function of the sterol Δ5,6-desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 4, p. 1960–1968, 2012.
- VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.-P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 11, p. 4608–4615, 2005.
- VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21, n. 2, p. 70–74, 2004.
- VIEIRA, R. G.; COUTINHO, S. D. A. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). **Pesqui. Veterinária Bras.**, v. 29, n. 6, p. 452–456, 2009.
- VUICHARD, D.; WEISSE, M.; ORASCH, C.; FREI, R.; HEIM, D.; PASSWEG, J. R.; WIDMER, A. F. Weekly use of fluconazole as prophylaxis in haematological patients at risk for invasive candidiasis. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 573, 2014.
- VUONG-BRENDER, T. T. K.; YANG, X.; LABOUESSE, M. *C. elegans* embryonic morphogenesis. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 116, p. 597–616, 2016.
- WALSH, T. J.; GONZALEZ, C. E.; PISCITELLI, S.; BACHER, J. D.; PETER, J.; TORRES,

R.; SHETTI, D.; KATSOV, V.; KLIGYS, K.; LYMAN, C. A. Correlation between *in vitro* and *in vivo* antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 6, p. 2369–2373, 2000.

WANG, J.; MA, X.; LIU, S.; SUN, P.; FAN, P.; XIA, C. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. **Procedia Environ. Sci.**, v. 16, p. 299–303, 2012.

WANG, L.; JI, X.; SUN, G.; QIN, Y.; GONG, M.; ZHANG, J.; LI, N.; NA, Y. Fungus ball and emphysematous cystitis secondary to *Candida tropicalis*: A case report. **Can. Urol. Assoc. J.**, v. 9, n. 9–10, p. E683, 2015.

WANG, W.; YANG, R.; AO, J.-H. Uncommon characteristics of the structure and development of *Trichosporon asahii*. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v. 122, n. 15, p. 1806–1810, 2009.

WATANABE, T.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 689–694, 1999.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Front. Microbiol.**, v. 7, 2016.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015.

WOODS, R. A.; BARD, M.; JACKSON, I. E.; DRUTZ, D. J. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. **J. Infect. Dis.**, v. 129, n. 1, p. 53–58, 1974.

WU, Y.; LI, Y.; YU, S.; LI, W.; LIU, X.; ZHAO, L.; LU, J. A genome-wide transcriptional analysis of yeast-hyphal transition in *Candida tropicalis* by RNA-Seq. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166645, 2016.

XAVIER, P.; CHANG, M. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 459–463, 2008.

XISTO, M. I. D. S.; CARAMALHO, R. D. F.; ROCHA, D. A. S.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SARTORI, B.; BARRETO-BERGTER, E.; JUNQUEIRA, M. L.; LASS-FLÖRL, C.; LACKNER, M. Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, n. 4, p. 988–992, 2017.

YANG, Y.-L.; LIN, C.-C.; CHANG, T.-P.; LAUDERDALE, T.-L.; CHEN, H.-T.; LEE, C.-F.; HSIEH, C.-W.; CHEN, P.-C.; LO, H.-J. Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34609, 2012.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 10, p. 95–105, 2014.

- YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.
- YISMAW, G.; ASRAT, D.; WOLDEAMANUEL, Y.; UNAKAL, C. Prevalence of candiduria in diabetic patients attending Gondar University Hospital, Gondar, Ethiopia. **Iran. J. Kidney Dis.**, v. 7, n. 2, p. 102, 2013.
- YOKOI, N.; OKADA, K.; SUGITA, J.; KINOSHITA, S. Acute conjunctivitis associated with biofilm formation on a punctal plug. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v. 44, n. 5, p. 559–560, 2000.
- YOU, L.; QIAN, W.; YANG, Q.; MAO, L.; ZHU, L.; HUANG, X.; JIN, J.; MENG, H. *ERG11* gene mutations and *MDR1* up-regulation confer pan-azole-resistance in *Candida tropicalis* causing disseminated candidiasis while on posaconazole prophylaxis in an acute lymphoblastic leukemia patient. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. AAC-02496, 2017.
- YU, S. B.; LI, W. G.; LIU, X. S.; CHE, J.; LU, J. X.; WU, Y. The activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5–6, p. 459–469, 2017.
- YU, S.; LI, W.; LIU, X.; CHE, J.; WU, Y.; LU, J. Distinct expression levels of *ALS*, *LIP*, and *SAP* genes in *Candida tropicalis* with diverse virulent activities. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1175, 2016.
- YURAYART, C.; CHINDAMPORN, A.; SURADHAT, S.; TUMMARUK, P.; KAJIWARA, S.; PRAPASARAKUL, N. Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. **Vet. Microbiol.**, v. 148, n. 2, p. 356–362, 2011.
- ZARAGOZA, C. S.; OLIVARES, R. A. C.; WATTY, A. E. D.; MOCTEZUMA, A. D. L. P.; TANACA, L. V. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 28, n. 2, p. 79–82, 2011.
- ZHANG, J.; HOLDORF, A. D.; WALHOUT, A. J. M. *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host–microbiota interactions. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 46, p. 74–80, 2017.
- ZHANG, Q.; TAO, L.; GUAN, G.; YUE, H.; LIANG, W.; CAO, C.; DAI, Y.; HUANG, G. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Mol. Microbiol.**, v. 99, n. 3, p. 528–545, 2016a.
- ZHANG, R.; HOU, A. Host-microbe interactions in *Caenorhabditis elegans*. **ISRN Microbiol.**, v. 2013, 2013.
- ZHANG, Y.; TAO, L.; ZHANG, Q.; GUAN, G.; NOBILE, C. J.; ZHENG, Q.; DING, X.; HUANG, G. The gray phenotype and tristable phenotypic transitions in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 93, p. 10–16, 2016b.
- ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D. B.; PESCADOR, C. A.; BARCELLOS, D. E.; FERREIRO, L.; SANCHES, E. M. C.; DRIEMEIER, D. Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with

postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. J.**, v. 171, n. 3, p. 566–569, 2006.

ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. **J. Bacteriol.**, v. 29, n. 3, p. 239, 1935.

ZUZA-ALVES, D. L.; DE MEDEIROS, S. S. T. Q.; DE SOUZA, L. B. F. C.; SILVA-ROCHA, W. P.; FRANCISCO, E. C.; DE ARAÚJO, M. C. B.; LIMA-NETO, R. G.; NEVES, R. P.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; CHAVES, G. M. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1783, 2016.

ZWART, P.; BUITELAAR, M. *Candida tropicalis*: enteric infections and their treatment in chelonians. **Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.**, p. 58–59, 1980.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela 1 – Distribuição das cepas de *C. tropicalis* por espécie animal, sítio de isolamento, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade anti-túngica.

Cepa	Origem	Sítio de isolamento	Fosf.	Prot.	Hemol.	Produção de biofilme	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
							FLC	ITC	VRC	AMB	CAS
CEMM 03-6-066	Humano	Aspirado traqueal	-	-	++	Fraco	64	16	>16	1	0,0625
CEMM 03-6-067	Humano	Aspirado traqueal	+	-	+++	Forte	2	0,03125	0,125	0,5	<0,015625
CEMM 03-6-068	Humano	Aspirado traqueal	+	-	+++	Moderado	0,25	0,0625	<0,03125	0,25	0,015625
CEMM 03-6-069	Humano	Ponta de cateter	-	-	+++	Moderado	1	0,03125	0,0625	0,5	0,03125
CEMM 03-6-070	Humano	Ponta de cateter	+	-	+++	Forte	0,5	0,0625	0,125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-071	Humano	LBA	-	+	++	Moderado	2	0,0625	0,125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-072	Humano	LBA	-	-	+++	Forte	>64	>16	>16	0,5	0,015625
CEMM 03-6-073	Humano	Secreção de ferida	+	+++	+++	Forte	4	0,125	0,25	0,5	0,0625
CEMM 03-6-074	Humano	Unha	-	-	+++	Forte	2	0,125	0,0625	0,5	0,125
CEMM 03-6-075	Humano	Urina	-	+	+++	Forte	0,25	0,0625	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-076	Humano	Urina	-	+	+++	Forte	0,5	0,125	0,03125	0,25	0,03125
CEMM 03-6-077	Humano	Urina	-	-	+++	Forte	>64	>16	>16	0,5	<0,015625
CEMM 03-6-078	Humano	Urina	-	+	+++	Forte	0,25	0,03125	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-079	Humano	Urina	+	-	+++	Forte	64	16	>16	1	0,0625
CEMM 03-6-080	Humano	Urina	-	+	+++	Forte	0,5	0,0625	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-081	Humano	Urina	-	-	+++	-	0,5	0,03125	0,125	1	0,03125
CEMM 03-6-082	Humano	Urina	-	+	+++	Moderado	1	0,125	0,25	0,5	0,125
CEMM 03-6-083	Humano	Urina	-	+	++	Forte	0,25	0,03125	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-084	Humano	Urina	-	+	++	Moderado	1	0,0625	0,125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-085	Humano	Urina	-	-	+++	Moderado	0,5	<0,03125	0,125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-086	Humano	Urina	+	+	+++	Moderado	0,5	0,03125	0,125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-087	Humano	Urina	-	+	++	Forte	0,5	<0,03125	<0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-088	Humano	Urina	+	-	++	Moderado	0,25	0,03125	0,03125	1	0,03125
CEMM 03-6-089	Humano	Urina	-	+	+++	Forte	0,5	0,03125	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-090	Caprino	Nasal	-	+	+++	Fraco	0,5	0,0625	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-091	Caprino	Nasal	-	+	±	Forte	0,125	0,125	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-092	Caprino	Nasal	-	-	±	Moderado	0,125	0,03125	0,03125	0,25	0,03125
CEMM 03-6-093	Caprino	Nasal	-	-	++	Forte	64	0,03125	0,25	1	0,03125
CEMM 03-6-094	Caprino	Nasal	+++	+	+++	Forte	0,25	0,0625	0,03125	0,25	0,03125
CEMM 03-6-095	Caprino	Nasal	-	-	++	Fraco	0,25	0,25	0,03125	0,25	0,0625
CEMM 03-6-096	Caprino	Nasal	-	-	+++	Fraco	0,25	0,5	0,03125	0,25	0,125
CEMM 03-6-097	Caprino	Nasal	-	-	+++	Forte	0,25	0,0625	0,03125	1	0,125
CEMM 03-6-098	Caprino	Nasal	+	+	+++	Forte	0,5	0,03125	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-099	Caprino	Oral	+++	-	+++	Forte	0,25	0,125	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-100	Caprino	Oral	-	-	-	Moderado	0,25	0,03125	0,03125	0,5	0,25
CEMM 03-6-101	Papagaio verdadeiro	Papo	-	-	+++	Forte	0,25	0,03125	0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-102	Periquito do sertão	Cloaca	-	-	++	Forte	16	<0,03125	0,125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-103	Papagaio do mangue	Oral	-	+	++	Forte	0,5	<0,03125	0,03125	0,5	0,125
CEMM 03-6-104	Ema	Oral	-	-	+++	Forte	0,5	0,125	0,03125	0,5	0,03125

APÊNDICE A – Tabela 1 – Distribuição das cepas de *C. tropicalis* por espécie animal, sítio de isolamento, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica.

(cont.)

Cepa	Origem	Sítio de isolamento	Fosf.	Prot.	Hemol.	Produção de biofilme	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
							FLC	ITC	VRC	AMB	CAS
CEMM 03-6-106	Ema	Cloaca	-	+	+++	Forte	0,5	0,0625	0,0625	0,5	0,03125
CEMM 03-6-107	Camarão	Trato digestivo	-	-	+++	Moderado	64	>16	16	1	0,015625
CEMM 03-6-108	Peixe-boi da Amazônia	Pele	-	-	+++	Fraco	2	0,03125	0,0625	0,25	0,25
CEMM 03-6-109	Cachalote-anão	Espiráculo	-	+	+++	Forte	8	0,0625	0,5	0,5	0,015625
CEMM 03-6-110	Cachalote-anão	Genital	-	+	+++	Forte	0,125	0,03125	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-111	Cachalote-anão	Retal	-	+	++	Forte	2	0,0625	0,03125	0,5	0,0625
CEMM 03-6-112	Jabuti	Cloaca	-	-	+++	Forte	8	0,5	0,25	1	0,03125
CEMM 03-6-113	Jabuti	Cloaca	-	-	+++	Moderado	0,25	<0,03125	<0,03125	0,5	0,03125
CEMM 03-6-114	Jabuti	Cloaca	-	-	++	Forte	4	0,125	0,5	0,25	0,03125
CEMM 03-6-115	Jabuti	Cloaca	+	-	-	Forte	8	0,25	0,25	1	0,0625
CEMM 03-6-116	Jabuti	Oral	-	+	+++	Forte	0,5	<0,03125	0,03125	1	0,125
CEMM 03-6-117	Jabuti	Oral	-	+	+++	Forte	0,25	<0,03125	<0,03125	0,5	0,015625

- negativo; + positivo; ± fraco positivo; ++ moderado positivo; +++ forte positivo; Fosf.: produção de fosfolipases; Prot.: produção de proteases; Hemol.: atividade hemolítica; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; AMB: anfotericina B; CAS: caspofungina.

APÊNDICE B – Artigo com dados da tese publicado

Veterinary Microbiology 192 (2016) 213–219



Candida tropicalis from veterinary and human sources shows similar *in vitro* hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*



Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{a,b,*}, Jonathas Sales de Oliveira^a,
Antônio José de Jesus Evangelista^b, Rosana Serpa^a, Aline Lobão da Silva^c,
Felipe Rodrigues Magalhães de Aguiar^a, Vandbergue Santos Pereira^a,
Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^a, Waldemiro Aquino Pereira-Neto^a,
Rossana de Aguiar Cordeiro^{a,b}, José Júlio Costa Sidrim^a, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,c}

^aDepartment of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^bPostgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^cSchool of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Received in revised form 26 July 2016

Accepted 27 July 2016

Keywords:

Candida tropicalis

Virulence

Biofilm susceptibility

Pathogenesis

Caenorhabditis elegans

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* hemolytic activity and biofilm antifungal susceptibility of veterinary and human *Candida tropicalis* strains, as well as their pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. Twenty veterinary isolates and 20 human clinical isolates of *C. tropicalis* were used. The strains were evaluated for their hemolytic activity and biofilm production. Biofilm susceptibility to itraconazole, fluconazole, voriconazole, amphotericin B and caspofungin was assessed using broth microdilution assay. The *in vivo* evaluation of strain pathogenicity was investigated using the nematode *C. elegans*. Hemolytic factor was observed in 95% of the strains and 97.5% of the isolates showed ability to form biofilm. Caspofungin and amphotericin B showed better results than azole antifungals against mature biofilms. Paradoxical effect on mature biofilm metabolic activity was observed at elevated concentrations of caspofungin (8–64 µg/ml). Azole antifungals were not able to inhibit mature *C. tropicalis* biofilms, even at the higher tested concentrations. High mortality rates of *C. elegans* were observed when the worms were exposed to with *C. tropicalis* strains, reaching up to 96%, 96 h after exposure of the worms to *C. tropicalis* strains. These results reinforce the high pathogenicity of *C. tropicalis* from veterinary and human sources and show the effectiveness of caspofungin and amphotericin B against mature biofilms of this species.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Candida species are found as components of the commensal microbiota of humans and other animals (Cordeiro et al., 2015; Monteiro-da-Silva et al., 2014). *Candida tropicalis* is the first or second non-*Candida albicans* *Candida* (NCAC) species isolated from patients with candiduria and candidemia (Negri et al., 2012) and it is frequently isolated from healthy animals (Cordeiro et al., 2015).

In humans, predisposing factors to infections with *C. tropicalis* are acute leukemia, neutropenia and anti-neoplastic therapy (Chai et al., 2010). This species displays high disseminating potential and it is associated with a high lethality rate (Negri et al., 2012).

This proclivity for dissemination and high mortality may be associated with the several virulence factors presented by *C. tropicalis* (Negri et al., 2010), such as production of haemolytic factors (Favero et al., 2011), secretion of lytic enzymes, mainly phospholipases and proteases, which play an important role for fungal invasion and survivability in host's tissues (Pichová et al., 2001; Park et al., 2013) and fungal adhesiveness to host surfaces (Negri et al., 2010).

C. tropicalis shows a remarkable capacity to adhere to human cells and tissues and to form biofilms (Estivill et al., 2011; Negri et al., 2010).

* Corresponding author at: Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.
E-mail addresses: brilhante@ufc.br, samiabrilhante@gmail.com (R.S.N. Brilhante).

APÊNDICE C – Artigo com dados da tese publicado



Medical Mycology, 2017, 0, 1–11
 doi: 10.1093/mmy/myx088
 Advance Access Publication Date: 0 2017
 Original Article



Original Article

In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{1,2,*}, Jonathas Sales de Oliveira¹,
 Antonio José de Jesus Evangelista², Vandbergue Santos Pereira¹,
 Lucas Pereira Alencar¹, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹,
 Lília Maria Carneiro Câmara³, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto⁴,
 Rossana de Aguiar Cordeiro^{1,2}, José Júlio Costa Sidrim¹
 and Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,5}

¹Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil, ²Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil,

³Department of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil, ⁴Department of Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil and ⁵School of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Rua Barão de Canindé, 210, Montese, CEP, 60.425-540, Fortaleza, CE, Brazil. Tel: +55 85 3366 8319; Fax: +55 85 3295-1736; E-mail: brilhante@ufc.br

Received 7 March 2017; Revised 13 July 2017; Accepted 25 August 2017; Editorial Decision 14 August 2017

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of promethazine on the antifungal minimum inhibitory concentrations against planktonic cells and mature biofilms of *Candida tropicalis*, as well as investigate its potential mechanisms of cell damage against this yeast species. Three *C. tropicalis* isolates (two azole-resistant and one azole-susceptible) were evaluated for their planktonic and biofilm susceptibility to promethazine alone and in combination with itraconazole, fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and caspofungin. The antifungal activity of promethazine against *C. tropicalis* was investigated by performing time-kill curve assays and assessing rhodamine 6G efflux, cell size/granularity, membrane integrity, and mitochondrial transmembrane potential, through flow cytometry. Promethazine showed antifungal activity against planktonic cells and biofilms at concentrations of 64 and 128 µg/ml, respectively. The addition of two subinhibitory concentrations of promethazine reduced the antifungal MICs for all tested azole drugs against planktonic growth, reversing the resistance phenotype to all azoles. Promethazine decreased the efflux of rhodamine 6G in an azole-resistant strain. Moreover, promethazine decreased cell size/granularity and caused membrane damage, and mitochondrial membrane depolarization. In conclusion, promethazine presented synergy