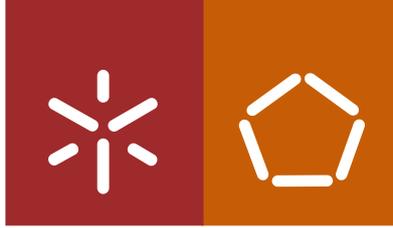


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Catarina Leal Seabra

**Estudo de factores de virulência de
culturas mistas de *Candida albicans*
e *Candida parapsilosis* após adesão
a uma superfície abiótica**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Catarina Leal Seabra

**Estudo de factores de virulência de
culturas mistas de *Candida albicans*
e *Candida parapsilosis* após adesão
a uma superfície abiótica**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Ramo em Engenharia Clínica

Trabalho efectuado sob a orientação de:
Professora Doutora Rosário Oliveira
Doutora Cláudia Botelho

DECLARAÇÃO

NOME: Catarina Leal Seabra

ENDEREÇO ELECTRÓNICO: cati.seab@gmail.com

TELEFONE: +351 937275204

NÚMERO DO BILHETE DE IDENTIDADE: 13352317

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Estudo de factores de virulência de culturas mistas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* após adesão a uma superfície abiótica

ORIENTADORES:

Professora Doutora Rosário Oliveira

Doutora Cláudia Botelho

ANO DE CONCLUSÃO:

2011

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO:

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

ÁREA DE ESPECIALIZAÇÃO:

Engenharia Clínica

**É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO
ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE**

Universidade do Minho, 28 de Outubro de 2011

Catarina Leal Seabra

Catarina Leal Seabra

AGRADECIMENTOS

*“Para saborear o cume das montanhas é preciso passar pelos vales.
E quando descemos aos vales são as memórias das montanhas que nos dão forças para
lutar para subi-las de novo”*

(Margaret F. Powers)

A todos que percorram comigo os caminhos, por vezes com obstáculo, mas que sempre me apoiaram e partilharam comigo para além do conhecimento a amizade. A todos, o meu muitíssimo obrigada!

À **Professora Doutora Rosário Oliveira**, minha orientadora, por ter confiado nas minhas capacidades e proporcionado as condições de orientação necessárias para a aprendizagem das metodologias necessárias para a execução deste trabalho. Pela disponibilidade e partilha de conhecimento científico.

À **Doutora Cláudia Botelho**, minha co-orientadora, que não encontro palavras para expressar o meu agradecimento... por sempre teres confiado em mim, pelo apoio que me deste nos momentos menos bons e de desânimo, pelo pilar e amiga que és. Muito Obrigada!

À **Professora Doutora Mariana Henriques e Professora Doutora Joana Azeredo**, pelas ideias e sugestões que foram expostas nas reuniões do grupo “Candidas”.

Ao **grupo das “Candidas”**, a todos sem exceção, obrigada pela partilha de experiências. Foi um gosto ter-vos conhecido.

À **Lurdes** que durante o seu período de estágio, mostrou-se sempre disponível a ajudar. Além de uma simples passagem, com a sua simplicidade tornou-se uma amiga que deixou a sua marca.

À **Filipa e Lídia**, obrigada pelas conversas e força.

À **Tânia** pela sua paciência por ter “aturado-me” horas ao sonicador, mas principalmente pela amizade e partilha de vivências.

À **Joana e Martina**, mais do que simples colegas de casa, grandes amigas, que partilharam comigo todas emoções vividas, as alegrias, as frustrações e tristezas, os maus humores e desabafos. Meninas, obrigada por tudo, sabem que estão no meu coração.

À **Dani e Joana R.**, pela vossa amizade e apesar de estarem longe, sempre me apoiaram.

Aos **meus amigos** que muitas vezes tiveram que esperar por mim, sempre compreenderam os compromissos que tiveram de ser desmarcados à última hora. Deram-me sempre força e trilharam comigo todos os caminhos.

Fati, já sabes, apesar das discussões típicas de irmãs, apoias-me incondicionalmente, dás-me toda a força para continuar a lutar e estás sempre a lembrar-me:

*“Antes que a tua única herança seja a lembrança
Antes que o fio de prata se rompa e a roldana rebente no poço*

Antes de tudo isto

Põe uma escada e sobre ao cimo do que vês”

(Daniel Faria)

Mãe e Pai devo-vos o que sou hoje. Obrigada pelos valores inculcados, por terem sempre incentivado a percorrer o meu caminho dando-me coragem, educação e principalmente por me terem “ensinado a pescar”. Sois o meu pilar e sem o vosso Amor, nada seria possível. Obrigada por sempre me ensinarem:

*“Que você seja um grande empreendedor,
Quando empreender, não tenha medo de falhar,
Quando falhar, não tenha receio de chorar,
Quando chorar, repense a sua vida, mas não recue,
Dê sempre uma nova oportunidade a si mesmo.”*

(Augusto Cury)

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Na cavidade oral, as espécies de *Candida* co-existem com outras espécies de *Candida* e/ou bactérias. Nos últimos anos as infecções causadas por *Candida* têm aumentado, sendo *Candida albicans* o fungo mais isolado. No entanto, outras espécies como *Candida parapsilosis* têm emergido como agente patogénico e colonizador de superfícies orais, nomeadamente próteses dentárias.

O trabalho desenvolvido teve como objectivo estudar diferentes factores de virulência nomeadamente adesão, formação de biofilme (biomassa total e produção da matriz extracelular) e expressão de enzimas hidrolíticas de isolados clínicos orais de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em sistemas de mono-espécie e de duas-espécies quando aderidos a uma superfície de poliestireno revestida com saliva artificial. Os isolados clínicos orais utilizados neste estudo foram isolados em condições diferentes: *C. albicans* AM e *C. parapsilosis* AM2 isolados de co-infecção e *C. albicans* AC e *C. parapsilosis* AD isolados de mono-infecção.

Neste trabalho, quando as espécies isoladas em co-infecção foram separadas verificou-se que ao fim de 2h de adesão, *C. parapsilosis* AM2 é influenciado pela ausência de *C. albicans* AM, necessitando de mais tempo para se adaptar ao novo ambiente. Todavia, *C. albicans* AM ao fim de 2h tem capacidade de se adaptar a novos ambientes na ausência de *C. parapsilosis* AM2, quer num sistema de mono-espécie e quer num sistema de duas-espécies com a estirpe *C. parapsilosis* AD. Em biofilme simples, as estirpes de *C. parapsilosis* apresentaram maior expressão de factores de virulência do que as estirpes de *C. albicans*.

Em biofilme misto, a expressão de factores de virulência foi menor do que o somatório da expressão de cada espécie em biofilme simples. Verificou-se ainda que o sistema de duas-espécies formado pelas espécies isoladas em co-infecção produziu mais biomassa total e matriz extracelular. Nos biofilmes mistos formados por uma espécie isolada em co-infecção e a outra espécie isolada em mono-infecção não se detectou a produção de polissacáridos da matriz extracelular, apesar de cada uma das espécies produzirem polissacáridos em biofilme simples.

Neste trabalho também se verificou que é durante a fase de adesão que as espécies de *Candida* apresentam maior actividade enzimática, salientando-se que nos sistemas de duas-espécies, na presença de *C. parapsilosis* AM2, a actividade enzimática foi maior do que na presença de *C. parapsilosis* AD.

Assim, neste trabalho evidenciou-se que a expressão de factores de virulência depende das condições em que as espécies foram isoladas (mono-infecção ou co-infecção), da estirpe, do tipo de sistema (mono-espécie ou duas-espécies). A compreensão dos mecanismos de interacção entre as duas espécies poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no controlo destes patogénicos oportunistas.

ABSTRACT

In the oral cavity, *Candida* species co-exist with other *Candida* spp. and/or bacteria. In recent years, infections caused by *Candida* spp. have increased and *Candida albicans* is the most common fungal isolated. However, *Candida parapsilosis* is emerging as pathogen and colonizing oral surfaces, such as dental prosthesis.

This work aimed to study the ability of oral clinical isolates of *C. albicans* and *C. parapsilosis* to express virulence factors such as adhesion, biofilm formation (total biomass and biofilm matrix composition) and secretion of hydrolytic enzymes in systems of single-species and dual-species, after adhesion onto an artificial saliva polystyrene coated surface. The clinical isolates used in this study were isolated from different conditions: *C. albicans* AM and *C. parapsilosis* AM2 were isolated in co-infection and *C. albicans* AC and *C. parapsilosis* AD were isolated in single-infection.

In this study, when species isolated in co-infection were separated, it was verified that after 2h of adhesion, *C. parapsilosis* AM2 was influenced by the absence of *C. albicans* AM, needing more time to adapt to the new environment. However, *C. albicans* AM after 2h of adhesion has the ability to adapt to a new environment in the absence of *C. parapsilosis* AM2, either in mono-specie system and in dual-species system with *C. parapsilosis* AD. In simple biofilm, strains of *C. parapsilosis* had higher expression of virulence factors than strains of *C. albicans*.

In mixed biofilm, the expression of virulence factors was lower than the sum of the expression of each species in simple biofilm. It was also verified that dual-species system formed by species isolated in co-infection produced more total biomass and extracellular matrix. In mixed biofilms formed by the specie isolated in co-infection and other specie isolated in mono-infection the production of polysaccharides was not detected, although each species in simple biofilm produce polysaccharides.

It was also found that during adhesion *Candida* species have higher enzyme activity. The dual-species systems with *C. parapsilosis* AM2 have higher enzymatic activity than the dual-species systems with *C. parapsilosis* AD.

Thus, this study showed that expression of virulence factors is dependent on the condition from which the strains were isolated (single or co-infection), strain, type of culture (mono-specie or dual-specie). The understanding of the interaction mechanisms between these species may contribute to a better control of their pathogenicity.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras e Tabelas	ix
Lista de Símbolos e abreviaturas	xiii
Objectivo e estrutura da dissertação	xv
I- Introdução	1
1. Introdução.....	3
1.1. Cavidade oral	4
1.2. Espécies de <i>Candida</i>	7
1.3. Cultura mista.....	12
1.4. Factores de Virulência.....	13
II- Materiais e Métodos.....	23
2. Materiais e Métodos.....	25
2.1. Isolados clínicos e condições de crescimento	25
2.2. Adesão e formação de biofilme.....	25
2.3. Quantificação do número de células aderidas e viáveis no biofilme.....	26
2.4. Determinação da biomassa total do biofilme	27
2.5. Matriz extracelular: quantificação de proteínas e polissacáridos	28
2.6. Determinação da actividade enzimática: hemolisina, fosfolipase e proteinase.....	28
2.7. Análise estatística	29
III- Resultados	31
3. Resultados.....	33
3.1. Quantificação das células aderidas e das células viáveis do biofilme.....	33
3.2. Quantificação biomassa total dos biofilmes	37

3.3. Composição da matriz extracelular do biofilme	39
3.4. Secreção de enzimas	41
IV -Discussão	43
4. Discussão	45
V- Conclusão e Sugestões de trabalho futuro.....	53
5. Conclusão e sugestões de trabalho futuro	55
5.1. Conclusão	55
5.2. Sugestões de trabalho futuro.....	56
Referências Bibliográficas	59
Anexos.....	75
A.1. Curvas de calibração para o doseamento de proteínas e polissacáridos	77

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

I- Introdução

Figura I.1. Representação esquemática da interação de <i>Candida</i> com moléculas e superfícies da cavidade oral que contribuem para a adesão e colonização das espécies de <i>Candida</i> (adaptado de Cannon <i>et al.</i> (1999)).	4
Figura I. 2. Espécies de <i>Candida</i> em CHROMagar®: (a) <i>C. albicans</i> e (b) <i>C. parapsilosis</i> .	7
Figura I. 3. Morfologia de <i>Candida albicans</i> : (a) hifa; (b) pseudo-hifa e (c) levedura. Adaptado de Sudbery <i>et al.</i> (2004)	8
Figura I. 4. Etapas da formação de um biofilme de <i>C. albicans</i> na superfície de um dispositivo médico, adaptado de Douglas (2003). (a) Superfície revestida com proteínas, por exemplo com uma película de saliva. (b) Fase de adesão: adesão primária de <i>C. albicans</i> à superfície. (c) Fase intermédia: formação das camadas basais das microcolónias de leveduras, ficando cada microcolónia aderida à superfície. (d) Fase de maturação do biofilme: formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz extracelular que envolve as células.	17
Figura I. 5. As fotografias mostram a secreção de enzimas hidrolíticas por espécies de <i>Candida</i> . O halo opaco de degradação em torno da colónia de <i>Candida</i> cultivada em placa de agar com meio específico para identificar cada enzima indica a presença de actividade enzimática. Só a colónia de <i>Candida</i> cultivada no meio sólido específico para cada enzima indica ausência de actividade enzimática. (a) Actividade das proteinases identificada em meio sólido suplementado com BSA; (b) Actividade das fosfolipases identificada em meio sólido suplementado com gema de ovo; (c) Actividade hemolítica identificada em meio sólido suplementado com glucose e sangue desfibrinado de carneiro.	19
Tabela I.1. Factores de virulência das espécies de <i>Candida</i> na cavidade oral (adaptado de Williams <i>et al</i> (2011))	14

III- Resultados

Figura III. 1. Concentração celular das espécies de *Candida* em (A) adesão simples e (B) adesão mista. As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$, * comparando entre diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}); ^ comparando as espécies no sistema de duas-espécies; ■ comparando a mesma estirpe entre sistemas de duas-espécies. 34

Figura III. 2. Concentração celular das espécies de *Candida* em (A) biofilmes simples e (B) biofilmes mistos. As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$, * comparando entre diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}); ^ comparando as espécies no sistema de duas-espécies; ■ comparando a mesma estirpe entre sistemas de duas-espécies. 36

Figura III. 3. Valores de absorvância da solução obtida após aplicação do método de cristal violeta [$(\text{Abs CV} / \text{UFCs}) \times 10^8$], de (A) biofilmes simples formados a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}) e (B) biofilmes mistos formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} . As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$,* comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre biofilmes mistos. 38

Figura III. 4. Concentração [$(\mu\text{g}/\text{UFCs}) \times 10^6$] de proteínas e polissacáridos da matriz extracelular de (A) biofilmes simples formados a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}) e (B) biofilmes mistos formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} . As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$,* comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre biofilmes mistos. 40

Figura III. 5. Actividade enzimática [$(\%/\text{UFCs}) \times 10^6$] das leveduras estudadas em (A) adesão simples formada a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}) e (B) adesão mista formada a partir da concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} . As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$,* comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre sistemas de duas espécies. 42

Anexos - A.1. Curvas de calibração para o doseamento de proteínas e polissacáridos

Figura A.1. 1. Curva de calibração para determinar proteínas na matriz extracelular de biofilmes (ASB como standard) 77

Figura A.1. 2. Curva de calibração para determinar polissacáridos na matriz extracelular de biofilmes (glucose como standard) 78

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SÍMBOLOS

p	valor de significância
Pz	atividade enzimática
%	percentagem

ABREVIATURAS

µg	microgramas
µm	micrometros
Abs	absorvância
ADN	ácido desoxirribonucleico
Als	<i>agglutinin-like sequence</i>
ANOVA	análise de variância
ASB	albumina de soro de bovino
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CHROMagar	<i>Chromogenic media agar</i>
cm	centímetros
CV	cristal violeta
g	gramas
h	horas
Hwp1	<i>hyphal wall protein 1</i>
l	litros
min	minutos
ml	mililitros
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

pH	<i>potencial hydrogen</i>
PL	<i>phospholipases</i>
QS	<i>quorum sensing</i>
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SIDA	síndrome de imunodeficiência adquirida
Sap	<i>secretory aspartyl proteinases</i>
SDA	<i>Saubouraud dextrose agar</i>
SDB	<i>Saubouraud dextrose broth</i>
UCI	unidade de cuidados intensivos
UFC	unidades formadoras de colónias

OBJECTIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A candidíase oral é um problema frequente que afecta o Homem e que ao longo dos anos tem aumento significativamente. *Candida albicans* é o fungo com maior prevalência na cavidade oral, sendo responsável pela colonização e infecção da mucosa humana. Recentemente, os organismos do género *Candida* não *albicans* têm emergido como agentes patogénicos, destacando-se que *Candida parapsilosis* tem sido identificada nas superfícies orais, como gengivas, bochechas e próteses dentária, quer em mono-infecção e quer em co-infecção com *Candida albicans*.

Neste sentido, este trabalho teve como objectivo avaliar e comparar a expressão de diferentes factores de virulência, nomeadamente a capacidade de adesão, formação de biofilmes (biomassa total e matriz extracelular) e secreção de enzimas hidrolíticas de isolados clínicos orais de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em sistema de mono-espécie e de duas-espécies quando aderidos a uma superfície abiótica revestida com saliva artificial. Neste trabalho usou-se saliva artificial e agitação para mimetizar as características existentes na cavidade oral.

Esta dissertação foi dividida em cinco capítulos. Na primeira parte é feita uma breve revisão da literatura existente sobre os aspectos desenvolvidos ao longo deste trabalho, nomeadamente: cavidade oral, biologia das espécies de *Candida* (nomeadamente de *C. albicans* e de *C. parapsilosis*), e os factores de virulência destas espécies, com principal destaque para a capacidade de adesão, formação de biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas. Na segunda parte do trabalho é feita uma descrição das metodologias e protocolos aplicados na avaliação dos factores de virulência. No terceiro e quarto capítulo descreve-se e discute-se pormenorizadamente os resultados obtidos durante este trabalho, respectivamente. Por último no quinto capítulo destacam-se as principais conclusões do trabalho e apresentam-se propostas de trabalho futuro.

I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos tem se verificado um aumento significativo da incidência de infecções fúngicas no Homem, tornando-se um problema de saúde pública. O aumento das infecções fúngicas oportunistas está relacionado com o aumento da esperança média de vida, como consequência dos avanços médicos, nomeadamente o uso de agentes antimicrobianos, terapias médicas e o uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres, próteses e implantes (Lass-Florl, 2009; Williams *et al.*, 2011; Hazen, 1995; Pfaller *et al.*, 2002). De um modo geral, em todo o Mundo, as espécies de *Candida* são reconhecidas como agentes importantes de infecções fúngicas oportunistas. Durante muitos anos, a candidíase, infecção provocada por espécies de *Candida*, era sinónimo de doença causada por *Candida albicans*, uma vez que esta espécie é a mais prevalente no organismo como comensal e agente patogénico. As espécies de *Candida* fazem parte da flora de indivíduos saudáveis, nomeadamente na pele, nos tractos gastrointestinal, urinário e respiratório, e nas cavidades oral e vulvovaginal, (Eggimann *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2011; Bokor-Bratić, 2008).

As infecções causadas por *Candida* podem ser distinguidas em infecções superficiais (surgem na pele, unhas, cabelo) ou sistémicas (surgem em membranas mucosas como a cavidade oral, podem surgir em vários órgãos do corpo humano) (Williams *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, a incidência da candidíase tem aumentado como consequência do aumento do número de pacientes imunocomprometidos, pacientes sujeitos a transplantes de órgãos ou quimioterapia, resultando numa elevada taxa de mortalidade e morbilidade, bem como em elevados custos devido ao aumento do tempo de internamento do paciente, terapêutica necessária, uso de antifúngicos e seus efeitos secundários e tratamentos desses efeitos (Eggimann *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2011; Hennen, 2009).

1.1. CAVIDADE ORAL

A cavidade oral representa um sistema biológico muito complexo o qual possui uma série de superfícies e um ambiente não homogêneo para a colonização microbiana. Na cavidade oral existem habitats distintos, nomeadamente as superfícies mucosas como bochechas, palato e língua, e as superfícies duras como dentes e quando presentes as próteses dentárias, favoráveis à adesão de microrganismos (Figura I.1). Dada a diversidade de superfícies moles e duras, a adesão das espécies de *Candida* é favorecida devido às características das superfícies, tais como rugosidade, hidrofobicidade, presença de proteínas adsorvidas que facilitam, crescimento e formação de biofilmes de *Candida*. Além disso a cavidade oral proporciona um ambiente quente, húmido, rico em nutrientes tais como glucose e péptidos que promovem a colonização e infecção por espécies de *Candida* (Cannon and Chaffin, 1999; Williams *et al.*, 2011; Meurman *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2000; Cannon *et al.*, 1995b; Marsh, 2004; Rosan and Lamont, 2000). No entanto, o fluxo salivar, as forças e movimentos exercidos durante a mastigação, fala e deglutição, bem como os movimentos da língua e higienização oral têm um efeito antagónico na adesão, ou seja, dificultam a adesão das espécies de *Candida* (Marsh, 2006; Marsh, 2004; Rosan and Lamont, 2000).

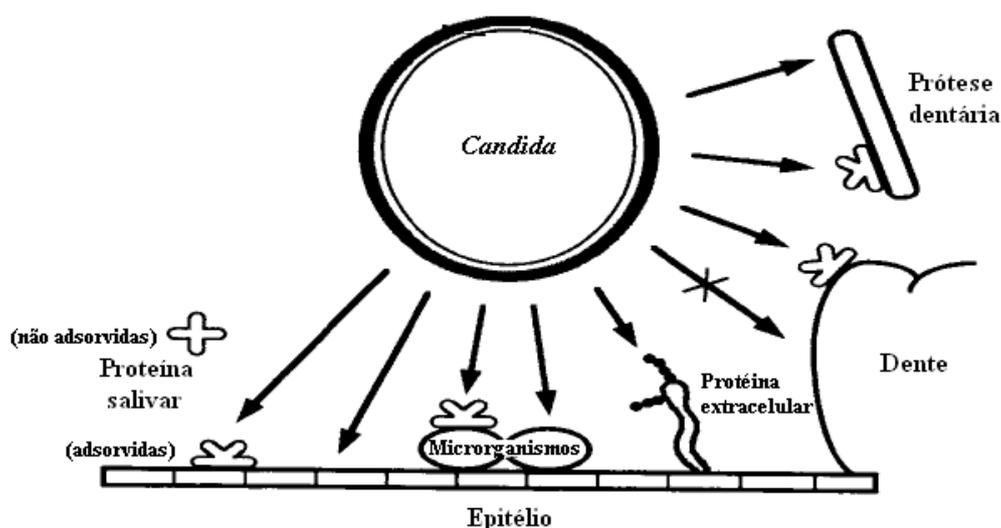


Figura I.1. Representação esquemática da interação de *Candida* com moléculas e superfícies da cavidade oral que contribuem para a adesão e colonização das espécies de *Candida* (adaptado de Cannon *et al.* (1999)).

A saliva é um fluido presente na boca que desempenha um papel importante na saúde oral, regula e mantém a integridade dos tecidos orais, bem como influencia a adesão e crescimento dos microrganismos (Dodds *et al.*, 2005; Humphrey and Williamson, 2001). A saliva é constituída por cerca de 99% de água e 1% de constituintes inorgânicos e orgânicos (Schenkels *et al.*, 1995). De entre os constituintes inorgânicos da saliva incluem-se o bicarbonato de cálcio e uma solução tampão de fosfato que garante a manutenção da integridade mineral do dente; sendo os iões cálcio, fosfato e flúor a chave para a resistência da superfície do dente, reduzindo a sua desmineralização e favorecendo a remineralização (Schenkels *et al.*, 1995). Os compostos orgânicos presentes na saliva incluem uma variedade de proteínas que se ligam aos iões de cálcio e fósforo e contribuem para a formação da película salivar. As proteínas salivares que adsorvem nas superfícies orais são nomeadamente a lisozima, a lactoferrina, a amilase e a mucina de alto peso molecular (Yao *et al.*, 2003). Esta última confere viscosidade à saliva e protege os tecidos da desidratação. As restantes proteínas salivares tem várias funções sendo uma delas o retardar o crescimento dos microrganismos, caso da lisozima que causa hidrólise do peptidoglicano da parede das bactérias e em elevadas concentrações mata as *C. albicans* e em baixas concentrações reduz a secreção de proteinases. A lactoferrina inibe o crescimento de *C. albicans* pois compete pelo ferro. As peroxidases e amilases têm actividade antimicrobiana, e polipéptidos ricos em histidina são capazes de inibir o crescimento ou mesmo matar *C. albicans* (Wyk and Steenkamp, 2011; Budtz-jørgensen, 2000; Schmid *et al.*, 1995). Por outro lado, a película de saliva favorece a adesão de microrganismos, quer pela presença de elevadas concentrações de glucose na saliva, nutriente que promove a multiplicação das espécies de *Candida*, quer pela alteração das propriedades superficiais, nomeadamente a hidrofobicidade (O'Sullivan *et al.*, 2000; Hoffman and Haidaris, 1993; Cannon *et al.*, 1995a).

Outro factor que pode influenciar a presença de microrganismos na cavidade oral é o pH da saliva que varia entre 6,75 e 7,25. Contudo, na presença de próteses dentárias o pH na mucosa palatal diminuiu, mais particularmente na base da prótese. Quando o pH da cavidade oral é baixo (2 a 4,19), este pode proporcionar uma maior adesão das espécies de *Candida* ao epitélio e à superfície das próteses, promovendo a colonização oral (Marsh, 2009; Wyk and Steenkamp, 2011; Budtz-jørgensen, 2000). Num ambiente ácido as espécies de *Candida* produzem fosfolipases e proteinases extracelulares aumentando assim a sua patogenicidade (Budtz-jørgensen, 2000).

A produção média diária de saliva varia entre 1 a 1,5 litros, variando em quantidade e qualidade de pessoa para pessoa. Os volumes de saliva produzida dependem da idade, dieta, hora do dia, tipo e intensidade de estímulos (por exemplo, a mastigação e deglutição) (Dodds *et al.*, 2005). Deste modo, o fluxo contínuo de saliva é importante na prevenção da colonização oral por espécies de *Candida*, pois remove e evita que esta se ligue às superfícies da cavidade oral. Além disso, o fluxo de saliva, bem como a quantidade e a qualidade, afectam a eliminação microbiana (Wyk and Steenkamp, 2011). Por exemplo, em idosos, a taxa de fluxo salivar é reduzida, tornando-se num factor de risco para a colonização e infecção por *Candida* (Budtz-jørgensen, 2000).

A boca é a única parte do corpo em que os tecidos mineralizados estão expostos ao ambiente externo, na forma de dente. Os dentes são compostos principalmente pela dentina e cobertos por uma camada de esmalte que protege o dente. O principal constituinte do esmalte é a hidroxiapatite (HA) e por isso tem sido usada como modelo para os estudos de adesão microbiana, mimetizando a superfície de esmalte dos dentes (Cannon and Chaffin, 1999). Contudo, *C. albicans* não estabelece ligações fortes à HA, mas se esta for pré-revestida com saliva, as estirpes de *C. albicans* orais associadas à candidíase aderem em número significativamente superior comparativamente a outras estirpes menos patogénicas. Existem estudos que demonstram que as espécies de *Candida* não aderem ao esmalte dos dentes, mas sim às proteínas adsorvidas à superfície dos dentes (Figura I.1) (Cannon *et al.*, 1995b; O'Sullivan *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1995).

Quando os dentes são removidos existe a necessidade de colocar uma prótese dentária, o que altera as condições ambientais da cavidade oral e proporciona uma superfície favorável à adesão dos microrganismos. Isto acontece porque na presença da prótese dentária, a acção mecânica de limpeza por acção da língua e o fluxo salivar são afectados (Budtz-jørgensen, 2000). Em 1936 foi documentado pela primeira vez o envolvimento de *Candida* como potencial agente causador de doença devido à presença de prótese dentária. Actualmente, estudos indicam que a presença de *Candida* nas próteses dentárias pode estar associada à má higienização da prótese, seu manuseamento aquando da colocação, micro-fissuras e defeitos, e rugosidade da superfície da prótese, dando assim início a um processo infeccioso (Ramage *et al.*, 2006).

Tal como no esmalte dos dentes, a superfície das próteses dentárias são revestidas com proteínas salivares que promovem a adesão dos microrganismos e alteração do pH na cavidade oral. Sobre a prótese, os valores de pH são baixos e esta promove uma maior retenção de glucose na cavidade oral, proporcionando assim um ambiente favorável à adesão (Ramage *et al.*, 2004; Budtz-jørgensen, 2000; Cannon and Chaffin, 1999). A superfície da prótese dentária ao ser revestida pela película salivar, diminui a sua hidrofobicidade, e como *C. albicans* é mais hidrofílica, a sua adesão é favorecida (Cannon and Chaffin, 1999).

1.2. ESPÉCIES DE *CANDIDA*

O género *Candida* é composto por um grupo heterogéneo de organismos fúngicos em que todos podem crescer com morfologia de levedura. De um modo geral, macroscopicamente, as colónias de espécies de *Candida* crescem em meio *Sabouraud dextrose agar* (SDA), apresentando uma cor branco-amarelada. No entanto, de acordo com a espécie, a colónia pode ser mais cremosa, lisa, pastosa, brilhante ou seca, enrugada e sem brilho (Larone, 2002; Sudbery *et al.*, 2004). Em CHROMagar[®] *Candida*, meio diferencial, é possível distinguir diferentes espécies de *Candida* pela cor que apresentam (Figura I.2), já que desencadeiam diferentes reacções bioquímicas (Ellepola and Morrison, 2005; Furlaneto-Maia *et al.*, 2008).

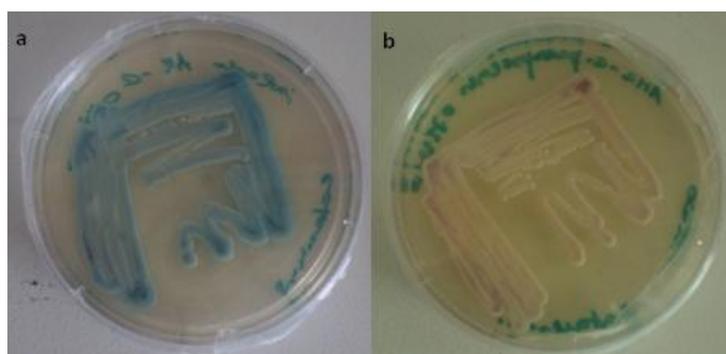


Figura I. 2. Espécies de *Candida* em CHROMagar[®]: (a) *C. albicans* e (b) *C. parapsilosis*.

Microscopicamente, a morfologia de algumas espécies de *Candida* pode variar, de acordo com as condições, nomeadamente nutrientes, pH e temperatura. Durante o crescimento, as espécies de *Candida* podem formar verdadeiras hifas (Figura I.3a) ou

pseudo-hifas (Figura I.3b). As pseudo-hifas são formadas a partir de células de levedura (Figura I.3c) ou a partir de hifas em gemulação, mas não se observa o septo. Em comparação, as verdadeiras hifas são formadas a partir de células de levedura ou mesmo de filamentos de hifas já existentes (Berman, 2006; Sudbery *et al.*, 2004).



Figura I. 3. Morfologia de *Candida albicans*: (a) hifa; (b) pseudo-hifa e (c) levedura. Adaptado de Sudbery *et al.* (2004)

Embora *C. albicans* seja a espécie mais isolada na cavidade oral, tem aumentado a incidência de outras espécies responsáveis por infecções orais, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. Aparentemente, o aumento destas espécies de *Candida* é o reflexo do aumento da resistência aos antifúngicos, terapias imunossupressoras e hábitos tabágicos (Cannon *et al.*, 1995a; Martins *et al.*, 2010b; Henriques *et al.*, 2006b). Além disso, na última década, a incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado significativamente. Na verdade, há estudos que indicam que *C. parapsilosis* tem surgido como a segunda espécie isolada a partir de hemoculturas. *C. parapsilosis* é responsável por 15,5% dos isolados de *Candida* na América do Norte (n= 882), 16,3% na Europa (n= 350) e 23,4% na América Latina (n=316), superada apenas por *C. albicans* (51,5%, 47,8% e 36,5%, respectivamente) (Messer *et al.*, 2006).

1.2.1. *Candida albicans*

Candida albicans é um dos agentes patogênicos que causam candidíase no Homem, sendo a espécie mais estudada e frequentemente isolada, dada a sua elevada prevalência. Este fungo dimórfico pode ser comensal ou oportunista, podendo causar infecções superficiais ou sistêmicas, adaptando-se a condições ambientais específicas (Manns *et al.*, 1994; Bokor-Bratić, 2008; Calderone and Fonzi, 2001; Nett and Andes, 2006; Berman, 2006).

Normalmente, *C. albicans* é responsável por uma variedade de infecções, nomeadamente na cavidade oral e vaginal. Está estimado que aproximadamente 70% das mulheres poderão ter ao longo da sua vida pelo menos uma vez uma candidíase vaginal (Berman, 2006). Por outro lado, na cavidade oral, a língua é um dos principais locais da presença de *C. albicans* (entre 18 a 40% dos indivíduos) (Carlisle *et al.*, 2009; Cannon *et al.*, 1995b).

A virulência é a capacidade de um microrganismo patogénico invadir e causar danos no hospedeiro. Neste sentido, a virulência de *C. albicans* inicia-se com o reconhecimento e ligação às células hospedeiras facilitado pela presença de adesinas específicas na sua parede celular e pela presença de proteínas digestivas que conferem à *C. albicans* a capacidade de apresentarem diferentes morfologias durante o seu crescimento e assim invadirem e colonizarem o hospedeiro (Calderone and Fonzi, 2001; Silva *et al.*, 2011b).

Em termos morfológicos, *C. albicans* durante o seu crescimento tem a capacidade de adquirir a forma de levedura, pseudo-hifa e verdadeiras hifas. Embora seja difícil distinguir a contribuição das diferentes morfologias de *C. albicans* na expressão de genes, existem estudos que revelam que *C. albicans* na forma de hifas alongadas tem capacidade de escapar às células fagocíticas. No entanto, *C. albicans* na forma de levedura tem maior capacidade de se disseminar na corrente sanguínea, garantindo a sua sobrevivência (Berman, 2006; Sudbery *et al.*, 2004). Além do mais, a morfologia de *C. albicans* também varia com as condições de crescimento, uma vez que em laboratório as culturas de *C. albicans* que crescem a temperatura e pH baixos têm maior tendência para se apresentarem na forma de levedura. Em condições de pH neutro a 37°C e em resposta a estímulos externos como soro, *C. albicans* tem tendência a formar hifas.

Relativamente às pseudo-hifas, estas desenvolvem-se a temperaturas e pH intermédios (Berman, 2006).

Macroscopicamente, em SDA *C. albicans*, de acordo com a estirpe, pode formar colónias de cor branco-amarelada, secas, enrugadas e sem brilho ou cremosas, lisas e brilhantes. Por outro lado, em CHROMagar, as colónias de *C. albicans* apresentam uma cor azul-esverdeada (Figura I.2a), como resultado das reacções bioquímicas, dado que *C. albicans* fermenta e/ou assimila um número elevado de açúcares, com excepção da sacarose (Ellepolá and Morrison, 2005; Furlaneto-Maia *et al.*, 2008).

C. albicans tem facilidade de formar biofilmes em dispositivos médicos (Nett and Andes, 2006), que, segundo alguns autores, se estruturam em duas camadas: uma camada fina e compacta de *C. albicans* na forma de levedura e uma camada mais espessa, mas menos compacta de hifas (Trofa *et al.*, 2008; Nett and Andes, 2006).

1.2.2. *Candida parapsilosis*

Inicialmente, *Candida parapsilosis* era considerada como uma espécie não patogénica, no entanto, em 1940 foi identificada pela primeira vez como agente patogénico, num caso de endocardite (Joachim and Polayes, 1940). Na última década, a incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado drasticamente (Martins *et al.*, 2010b; Silva *et al.*, 2009b; Trofa *et al.*, 2008). Esta espécie de *Candida* é um dos fungos mais frequentemente isolados das mãos do Homem (Bonassoli *et al.*, 2005) e em doentes hospitalizados em unidades de cuidados intensivos (UCI). As mãos dos profissionais de saúde são um dos principais vectores de aquisição exógena de *C. parapsilosis*. Como comensal da pele humana e unhas, *C. parapsilosis* representa uma ameaça para os doentes hospitalizados, que necessitam de dispositivos médicos e intervenções constantes dos profissionais de saúde (Trofa *et al.*, 2008). Neste sentido, o aumento acentuado da frequência de infecções provocadas por *C. parapsilosis* pode estar relacionado com a variedade de factores de risco, já que *C. parapsilosis* tem capacidade de crescer e colonizar dispositivos intravasculares como os cateteres, mas também em próteses vasculares ou dentárias (Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009). Na cavidade oral, o aparecimento de *C. parapsilosis* está associado à má higienização da prótese e das mãos aquando da sua manipulação. Em doentes imunocomprometidos, principalmente em doentes com cancro, o risco de infecção causada por *C. parapsilosis*

é elevado, já que estes pacientes possuem permanentemente um cateter venoso central. Outro grupo de risco que necessita de cuidados permanentes dos profissionais de saúde são os recém-nascidos de baixo peso, pois geralmente estes recém-nascidos necessitam durante um longo período de tempo de um cateter venoso central e entubação endotraqueal, sendo mais vulneráveis a infecções causadas por *C. parapsilosis* (Benjamin *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2004).

Tem sido referido que *C. parapsilosis* é responsável por causar 17-50% das infecções em crianças comparativamente com 2,5-12% de infecções em adultos, ambos hospitalizados em UCI. A incidência de *C. parapsilosis* em doentes com cancro varia entre 6-38% nos Estados Unidos da América e 12-15% na Europa Central (Krcmery and Barnes, 2002). Em termos de infecções causadas pela má higienização das mãos dos profissionais de saúde, estudos realizados nos Estados Unidos da América entre 1993 em 1995 revelaram que das 2989 culturas feitas a partir das mãos dos profissionais de saúde, 19% dos isolados eram de *C. parapsilosis* (Trofa *et al.*, 2008). Contudo, apesar dos valores de incidência, *C. parapsilosis* tem uma menor taxa de mortalidade, 4%, comparativamente à *C. albicans* (Kossoff *et al.*, 1998).

Dado o aumento da incidência de *C. parapsilosis* tornou-se necessário a compreensão dos factores de virulência desta espécie, apesar de estes ainda serem pouco conhecidos. Relativamente à morfologia, *C. parapsilosis* é uma espécie que não produz hifas verdadeiras, no entanto pode formar pseudo-hifas que são caracteristicamente grandes e curvadas (Trofa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011b; Nosek *et al.*, 2009). Macroscopicamente, em SDA, *C. parapsilosis* forma colónias brancas, cremosas, brilhantes e lisas (Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009) e em CHROMagar, esta espécie forma colónias branco-rosadas (Figura I.2b), dependendo da estirpe (Ellepola and Morrison, 2005; Furlaneto-Maia *et al.*, 2008; Trofa *et al.*, 2008).

A capacidade de adesão e formação de biofilmes de *C. parapsilosis* é importante uma vez que esta espécie coloniza dispositivos médicos que permanecem no organismo durante um longo período de tempo, sendo deste modo uma das vias predominantes de infecção (Kuhn *et al.*, 2004). No entanto, comparativamente aos biofilmes de *C. albicans*, os biofilmes formados por *C. parapsilosis* são estruturalmente mais simples e menos espessos, mas igualmente resistentes aos antifúngicos convencionais (Trofa *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2004).

1.3. CULTURA MISTA

Na cavidade oral co-habitam diferentes microrganismos, incluindo leveduras e bactérias, devido à existência de diversos micro-ambientes contendo uma variedade de superfícies em que os microrganismos podem aderir, como foi mencionado anteriormente (Shirliff *et al.*, 2009). As infecções polimicrobianas são um problema significativo no uso de próteses dentárias, pois a presença de biofilmes mistos induzem a falha das próteses (Thein *et al.*, 2009). Em cultura mista, um microrganismo adere à superfície revestida com saliva artificial e posteriormente outro microrganismo pode ligar-se ao microrganismo aderido à superfície (Figura I.1). Esta capacidade dos microrganismos co-aderirem é vantajosa nas situações em que um microrganismo não está em número suficientemente elevado ou não tenha uma elevada afinidade para a superfície de adesão ou ainda porque não tem capacidade para competir com os colonizadores primários (Shirliff *et al.*, 2009). Por exemplo como foi descrito por Silva *et al.* (2011a), em co-infecção *C. albicans* promove a invasão de *C. glabrata* no epitélio oral, pois *C. albicans* na forma de hifa causa danos na integridade da superfície epitelial promovendo assim a penetração de *C. glabrata*. Neste contexto, El-Azizi *et al* (2004) mostraram a adesão de *C. albicans* a um biofilme pré-formado de *C. glabrata*, sugerindo a possibilidade de co-agregação dessas duas espécies *in vivo*. Estudos de co-agregação mostraram que hifas de *C. albicans* têm afinidade para estabelecer ligação com bactérias. A natureza dessas interações é ainda desconhecida, mas aparentemente as diferenças da expressão de proteínas de superfície como adesinas microbianas poderá explicar esta interação (Adam *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2010).

Por outro lado, a interação de duas espécies de *Candida*, pode inibir o crescimento das espécies por causa da competição pelos nutrientes e /ou metabolitos tóxicos produzidos por uma das espécies. Esta inibição competitiva pode ocorrer durante a fase inicial de adesão e até mesmo durante o desenvolvimento do biofilme. Por exemplo, um estudo realizado por Thein *et al.* (2007) sobre biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei* em próteses de acrílico, revelou que existia uma interação antagónica nos biofilmes mistos estudados, dado que existia uma baixa abundância de formação de hifas de *C. albicans* em biofilme misto comparativamente com o biofilme simples, tendo verificado que em biofilme misto ambas as espécies apresentavam uma morfologia de blastosporos. Embora os mecanismos exactos das interações envolvidas

em biofilmes mistos de *Candida* ainda sejam desconhecidos, alguns autores especulam que a competição pelos locais de adesão, nutrientes, espaço e o fenómeno de *quorum sensing* (QS) poderão ser factores importantes. Tem sido descrita a capacidade de *C. krusei* produzir mensageiros moleculares e produtos químicos resultantes do seu metabolismo que inibem *C. albicans* (Thein *et al.*, 2007; Thein *et al.*, 2009) e demonstraram em biofilme misto, a *P. aeruginosa* é capaz de matar hifas de *C. albicans* através de um processo envolvendo uma molécula de QS, 3-oxo-C12 (Hogan *et al.*, 2004).

Quando *C. albicans* é co-incubada com a *Escherichia coli*, a população bacteriana ocupa o maior espaço da superfície e impede a colonização por *Candida*, todavia, a competição não ocorre só pelo espaço mas também pelos nutrientes (Makrides and MacFarlane, 1983). De facto, a quantidade de nutrientes dissolvidos no meio é importante, pois o desenvolvimento de biofilmes mistos é influenciado pelo gradiente de nutrientes. (Thein *et al.*, 2009).

1.4. FACTORES DE VIRULÊNCIA

Os factores de virulência são definidos como características específicas que induzem lesões nos tecidos. Para que a infecção ocorra, os agentes patogénicos oportunistas têm que conseguir evadir o sistema imunitário, colonizar superfícies e tecidos, sobreviver e crescer no meio de acolhimento e infectar novos tecidos ou órgãos. Como já foi referido, as espécies de *Candida* têm capacidade de colonizar e infectar vários locais anatomicamente distintos, como a pele, cavidade oral, tracto gastrointestinal, vagina e sistema vascular, provocando assim infecções sistémicas (Silva *et al.*, 2011b; Romani *et al.*, 2002).

Dada a elevada prevalência de *Candida* como agente comensal em humanos, é difícil identificar um único factor de virulência como sendo o principal responsável pela infecção no organismo. Deste modo, alguns estudos propuseram uma série de factores de virulência que contribuem para a lesão tecidual e persistência do microrganismo no hospedeiro (Williams and Lewis, 2011).

Alguns modelos de infecção de candidíase em animais têm revelado que *C. albicans* é a espécie mais patogénica, e estudos *in vitro* demonstraram que esta é a espécie que

mais factores de virulência expressa comparativamente às outras espécies de *Candida* (Williams *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011b). Deste modo, tornou-se necessário identificar os vários factores de virulência das espécies de *Candida* que podem ser alvo dos antifúngicos, por forma a controlar a disseminação da infecção. (Trofa *et al.*, 2008).

Os organismos do género *Candida* podem apresentar diversos factores de virulência, como a adesão a superfícies e células hospedeiras, formação de biofilmes, morfologia distintas, secreção de enzimas hidrolíticas e produção e secreção de proteínas e polissacáridos da matriz extracelular (Tabela I.1) (Eggimann *et al.*, 2003; Trofa *et al.*, 2008; Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011). A tabela 1 descreve sucintamente os factores de virulência de espécies de *Candida* e os seus efeitos no hospedeiro.

Tabela I.1. Factores de virulência das espécies de *Candida* na cavidade oral (adaptado de Williams *et al* (2011))

Factor de virulência	Efeito
Adesão à superfície <ul style="list-style-type: none">• Hidrofobicidade célula - superfície• Adesinas da superfície celular	Promove a retenção na cavidade oral <ul style="list-style-type: none">• Mecanismos de adesão não específicos• Mecanismos de adesão específicos
Evasão dos mecanismos de defesa <ul style="list-style-type: none">• Elevada frequência fenotípica• Desenvolvimento de hifas• Secreção de enzimas hidrolíticas, nomeadamente produção de proteinases	Promove a retenção na cavidade oral <ul style="list-style-type: none">• Modificação antigénica devido a alterações na superfície da célula• Prejudica a fagocitose• IgA é destruída
Invasão e destruição de tecidos do hospedeiro <ul style="list-style-type: none">• Desenvolvimento de hifas• Produção de enzimas hidrolíticas, principalmente proteinases e fosfolipases	Melhora a patogenicidade <ul style="list-style-type: none">• Promove a invasão no tecido epitelial oral• Provoca danos na matriz extracelular e nas células hospedeiras

1.4.1. ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES

A adesão é a primeira etapa para *Candida* colonizar e invadir as células hospedeiras, causando infecção. Esta etapa é fundamental para formação de biofilmes e a persistência do agente patogénico dentro do hospedeiro (Williams *et al.*, 2011).

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas caracterizadas por células que formam microcolónias que estão fortemente ligadas a uma superfície e umas às outras, encapsuladas numa matriz extracelular (Blankenship and Mitchell, 2006; Donlan and Costerton, 2002; Trofa *et al.*, 2008; Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011). A formação de biofilmes é um importante factor de virulência visto que os biofilmes de *Candida* são um problema clínico emergente, já que se desenvolvem em superfícies naturais, como nos dentes, ou em superfícies artificiais, como dispositivos médicos, por exemplo, próteses dentárias.

Na cavidade oral, antes da fase inicial de adesão das espécies de *Candida*, já existe uma camada de proteínas salivares adsorvida à superfície a colonizar, como por exemplo o esmalte dos dentes e/ou das próteses dentárias (Figura I.4a). De seguida, as células planctónicas aderem à superfície revestida com saliva, decorrendo assim a fase primária que pode durar 2-11h (Figura I.4b) (Ramage *et al.*, 2006; Douglas, 2003). Nesta fase de adesão existem vários factores que possibilitam o sucesso do processo de adesão. Os factores que influenciam a adesão das espécies de *Candida* são as proteínas da parede celular e as propriedades físico-químicas entre célula e superfície e/ou outras células, como a hidrofobicidade e as forças electrostáticas ou de *van der Waals* (Anil *et al.*, 2001; Chaffin, 2008).

Em superfícies bióticas, as interacções físicas entre as espécies de *Candida* e as células hospedeiras são mediadas por radicais activos na membrana celular com a superfície de *Candida*. Estas interacções podem envolver proteínas como proteínas da matriz extracelular, ou qualquer célula ou órgão do hospedeiro que poderá ser infectado pelo fungo. Os componentes da parede celular que intervêm na adesão são quitina, glucano ou moléculas lipídicas, sendo as proteínas e as manoproteínas os principais mediadores da adesão de *Candida* no hospedeiro (Mishra *et al.*, 2007). Uma das principais famílias de proteínas envolvidas na adesão de *C. albicans* são as adesinas.

C. albicans apresenta adesinas na parede celular que permitem a ligação a diferentes proteínas das células hospedeiras, como fibronectina, laminina, colagénio e fibrinogénio (Calderone and Fonzi, 2001; Dranginis *et al.*, 2007; Gozalbo *et al.*, 1998; Klotz *et al.*,

2001). De entre muitas adesinas expressas por *C. albicans*, as proteínas glicosiladas *agglutinin-like sequence* (Als) são descritas como as responsáveis pela adesão e consequente formação de biofilmes, assim como a *hyphal wall protein 1* (Hwp1) que é uma glicoproteína expressa na superfície das hifas e promove a adesão de *C. albicans* às células epiteliais (Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011; Henriques *et al.*, 2006b; Zhu and Filler, 2010; Sundstrom, 2002). Para *C. albicans*, a Als1p e Als5p são responsáveis pela adesão, nomeadamente às células epiteliais bucais humanas e à fibronectina (Henriques *et al.*, 2006b).

Relativamente à *C. parapsilosis*, existem poucos estudos desenvolvidos sobre o papel das adesinas na adesão. Todavia, alguns autores realizaram uma pesquisa bioinformática de algumas famílias de genes específicos de espécies de *Candida* e este estudo revelou a existência de alguns genes da parede das células de *C. parapsilosis* que codificam cinco proteínas Als (Butler *et al.*, 2009; Zhu and Filler, 2010).

Além das interações específicas existem outros tipos de interações, chamadas não específicas que podem estar associadas à adesão das espécies de *Candida*. Estas interações estão directamente relacionadas com as propriedades da superfície celular mas também da superfície dos materiais dos dispositivos médicos.

A hidrofobicidade da superfície celular das espécies de *Candida* tem um papel importante na adesão não específica de *Candida* a células humanas e a superfícies inertes como é o caso de dentaduras e cateteres (Henriques *et al.*, 2006b). Alguns autores referem que a diminuição da hidrofobicidade pode contribuir parcialmente para a diminuição na ligação às células ou à superfície (Jones *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 2006b). Além disso, a adesão de *C. albicans* à superfície dos dispositivos médicos parece ser mediada pela hidrofobicidade da superfície celular dos fungos por intermédio de ligações hidrofóbicas entre a superfície do dispositivo médico e as manoproteínas (Mishra *et al.*, 2007; Henriques *et al.*, 2006b).

Relativamente ao papel das forças electrostáticas na adesão de espécies de *Candida* a dispositivos médicos ou a células, embora estas forças estejam presentes no processo de adesão, as forças electrostáticas são fracas, tendo assim uma reduzida contribuição na adesão (Klotz, 1994; Henriques *et al.*, 2006b).

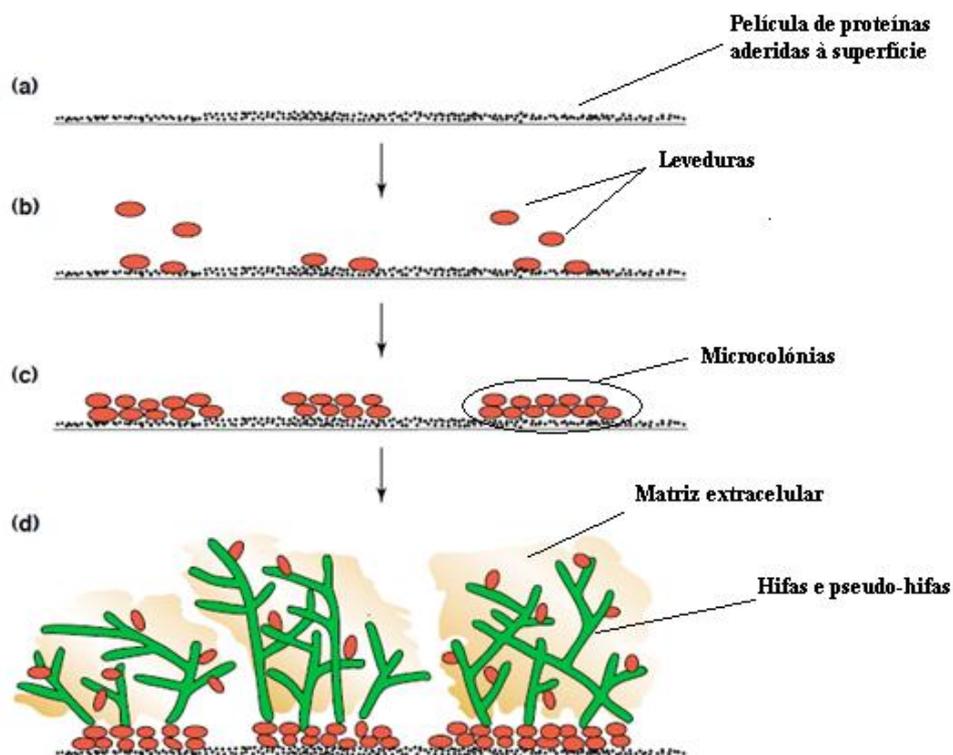


Figura I. 4. Etapas da formação de um biofilme de *C. albicans* na superfície de um dispositivo médico, adaptado de Douglas (2003). **(a)** Superfície revestida com proteínas, por exemplo com uma película de saliva. **(b)** Fase de adesão: adesão primária de *C. albicans* à superfície. **(c)** Fase intermédia: formação das camadas basais das microcolónias de leveduras, ficando cada microcolónia aderida à superfície. **(d)** Fase de maturação do biofilme: formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz extracelular que envolve as células.

Numa fase mais avançada do processo de adesão (12- 20 h), estabelece-se um conjunto de fenómenos que caracterizam a adesão secundária, na qual os microrganismos fracamente aderidos consolidam o processo de adesão, seguida pela divisão e proliferação celular com formação de microcolónias (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2009; Douglas, 2003; Costerton *et al.*, 1995; Hawser and Douglas, 1994). Após 18 – 24 h, o biofilme começa a apresentar uma estrutura em bicamada constituída por uma mistura de morfologias: leveduras e tubos germinativos (Figura I.4c).

O biofilme atinge a fase de maturação (Figura I.4d) quando contém muitas microcolónias, numa rede densa de células sob a forma de leveduras, hifas e pseudo-hifas, envolvidas numa matriz extracelular, constituída essencialmente por proteínas e polissacáridos (Hawser and Douglas, 1994; Ramage *et al.*, 2005). Esta fase de

maturação caracteriza-se pelo aumento na quantidade de matriz extracelular que envolve as microcolónias, formando assim uma comunidade microbiana estruturada (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2009), com um arranjo espacial óptimo que facilita o influxo de nutrientes, a eliminação de produtos de degradação e formação de novas microcolónias por todo o biofilme (Ramage *et al.*, 2005). O desenvolvimento de biofilmes maduros, produção de matriz extracelular e complexidade estrutural do biofilme depende de vários factores nomeadamente da espécie, estirpe, número de células, material da prótese, bem como das condições ambientais como pH, composição, oxigénio dissolvido e libertação de produtos metabólicos para o meio (Douglas, 2003; Jain *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2007; Ramage *et al.*, 2006; Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011).

Na fase final do processo de maturação são libertadas células planctónicas que estão disponíveis para colonizar outras superfícies.

Os biofilmes possuem propriedades que são consideradas essenciais para o seu desenvolvimento e impacto clínico (Blankenship and Mitchell, 2006).

A matriz extracelular é uma propriedade importante dos biofilmes, pois esta favorece a interacção com o ambiente, permite capturar substâncias e partículas dissolvidas no meio, fornecendo assim os nutrientes às células que constituem o biofilme. Além disso, a matriz extracelular tem como função o suporte físico para o crescimento do biofilme, defesa contra as células fagocíticas e também limita a difusão de fármacos (Flemming *et al.*, 2007; Blankenship and Mitchell, 2006). Geralmente, a matriz extracelular é composta por polissacáridos, proteínas, glucose, hexosaminas e ADN (Blankenship and Mitchell, 2006).

Para além da matriz extracelular, especula-se que o *quorum sensing* (QS) desempenha um papel importante no desenvolvimento e maturação do biofilme, potenciando uma maior disseminação da infecção. O QS é uma forma de comunicação celular química, que depende da densidade celular, interacção célula-célula, e usa pequenas moléculas como sinais de comunicação, com o objectivo de evitar a superpopulação, controlar a competição pelos nutrientes e espaço, e promover a dispersão de células mais jovens para colonizarem novas superfícies (Williams *et al.*, 2011; Kruppa, 2009; Decho *et al.*, 2010; Ramage *et al.*, 2005; Blankenship and Mitchell, 2006; Han *et al.*, 2011). O fenómeno de QS é muitas vezes associado à auto-indução, um processo

pelo qual as células individuais libertam pequenas moléculas que se difundem no meio e essas mesmas moléculas são sentidas por todas as células na comunidade microbiana (Decho *et al.*, 2010). Quando a densidade celular é elevada, as moléculas de auto-indução podem atingir um determinado limiar, activando e/ou inibindo determinados genes, que por sua vez, vão induzir comportamentos celulares, como secreção de enzimas extracelulares, desenvolvimento dos biofilmes e alterações morfológicas (Han *et al.*, 2011).

1.4.2. SECREÇÃO DE ENZIMAS

A secreção de enzimas hidrolíticas durante a infecção foi identificada como um factor de virulência importante. As espécies de *Candida* secretam diversas enzimas hidrolíticas que aumentam a sua patogenicidade, já que a libertação de enzimas para o meio promove a destruição de tecidos do hospedeiro. As enzimas mais estudadas associadas às espécies de *Candida* são as proteinases (Figura I.5a), fosfolipases (Figura I.5b) e hemolisina (Figura I.5.c) (Silva *et al.*, 2011b; Williams *et al.*, 2011; Noumi *et al.*, 2010). A expressão e distribuição intracelular das enzimas depende das condições ambientais (Mishra *et al.*, 2007).

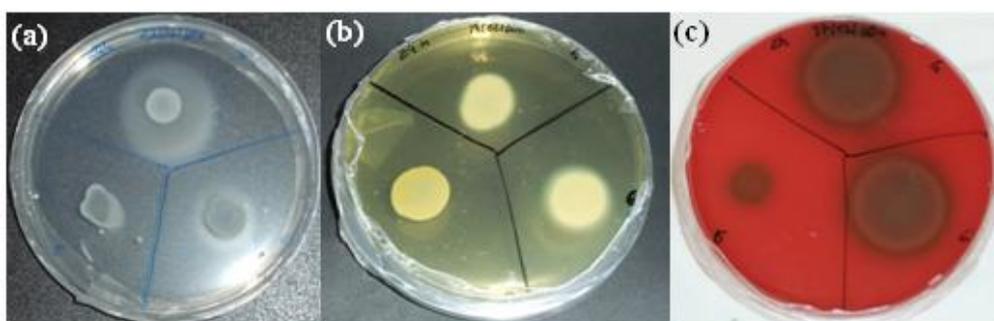


Figura I. 5. As fotografias mostram a secreção de enzimas hidrolíticas por espécies de *Candida*. O halo opaco de degradação em torno da colónia de *Candida* cultivada em placa de agar com meio específico para identificar cada enzima indica a presença de actividade enzimática. Só a colónia de *Candida* cultivada no meio sólido específico para cada enzima indica ausência de actividade enzimática. (a) Actividade das proteinases identificada em meio sólido suplementado com BSA; (b) Actividade das fosfolipases identificada em meio sólido suplementado com gema de ovo; (c) Actividade hemolítica identificada em meio sólido suplementado com glucose e sangue desfibrinado de carneiro.

O grupo de enzimas mais estudado são as proteinases (Figura I.5a), nomeadamente as *secretory aspartyl proteinases* (Sap) (Noumi *et al.*, 2010). As Saps constituem uma família de enzimas responsáveis pela degradação de várias proteínas humanas no local da infecção, como a albumina, a hemoglobina, a queratina e a imunoglobulina secretora A (Yang, 2003). Além disso, a função das Saps inclui a ajuda na digestão da membrana celular do hospedeiro a fim de assegurar a nutrição, facilitar a adesão (Noumi *et al.*, 2010) e invasão pela exposição dos locais dos receptores evitando o sistema imunitário do hospedeiro (Naglik *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2007; Williams and Lewis, 2011; Bhat *et al.*, 2011). Em geral, as proteinases promovem a hidrólise das ligações peptídicas (CO-NH) das proteínas (Bhat *et al.*, 2011).

C. albicans possui pelo menos 10 genes diferentes que codificam Saps, com pesos moleculares entre 35 e 50 KDa (Gauwerky *et al.*, 2009; Naglik *et al.*, 2004), sendo as SAPs1-8 libertadas para o meio extracelular e as SAPs9 e 10 permanecem ligadas à membrana celular (Williams and Lewis, 2011).

As Saps de *Candida* têm actividade a pH ácido e neutro, compreendido entre 2 e 7. No entanto, existem diferenças de pH óptimo para cada Sap codificada, sendo que as SAPs1-3 têm actividade óptima a pH ácido, pH 3-5, e a actividade óptima das SAPs4-6 é no intervalo de pH 5-7 (Naglik *et al.*, 2004; Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011). Este aspecto é importante na ocorrência de uma infecção oral e na presença de uma prótese dentária, em que o pH do meio é ácido, proporcionando deste modo as condições adequadas para a actividade das Saps (Williams *et al.*, 2011). Além disso, esta heterogeneidade da actividade proteolítica em diferentes pH permite às espécies de *Candida* sobreviverem em diferentes condições ambientais (Williams and Lewis, 2011).

As Saps de *Candida* mais estudadas e caracterizadas são as SAPs 1-6. As SAPs1 e 3 são especialmente expressas durante a mudança de fenótipo de *C. albicans*, por sua vez, as SAPs4- 6 estão envolvidas na promoção do crescimento de hifas. A SAP2 é produzida quando *C. albicans* cresce num meio contendo albumina de soro de bovino como única fonte de azoto (Naglik *et al.*, 2004; Negri *et al.*, 2010; Williams and Lewis, 2011; Zaugg *et al.*, 2001).

Para *C. parapsilosis* foram identificados 3 genes que codificam Saps (SAPP 1-3), dois dos quais ainda não foram caracterizados. Segundo alguns estudos, a expressão dos genes das SAPP1-3 variam de acordo com diferentes isolados clínicos de *C.*

parapsilosis, quando estes crescem em contacto com o epitélio oral. Além disso, *C. parapsilosis* revelou-se pouco invasiva no epitélio oral, porque *C. parapsilosis* não forma hifas e nem todas as estirpes formam pseudo-hifas. No entanto pode causar danos significativos no epitélio associados à expressão de genes específicos das Saps (Jayatilake *et al.*, 2006; Malic *et al.*, 2007; Schaller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009b; Trofa *et al.*, 2008).

Além das Saps, as fosfolipases (PL- *phospholipases*) são enzimas que estão associadas à patogenicidade das espécies de *Candida*. As fosfolipases são enzimas que hidrolisam os fosfolípidos em ácidos gordos, dada a sua capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster dos fosfolípidos. É através da hidrólise das ligações ésteres que as fosfolipases degradam a membrana das células hospedeiras levando à sua lise e morte celular (Ghannoum, 2000; Noumi *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011a; Williams and Lewis, 2011; Williams *et al.*, 2011).

Cada fosfolipase tem a capacidade de hidrolisar uma ligação éster específica. Deste modo, as fosfolipases podem diferenciar-se de acordo com a letra terminal (A, B, C e D), identificando assim a especificidade de cada enzima para clivar uma ligação (Ghannoum, 2000).

A secreção de fosfolipases extracelulares por *C. albicans* foi relatada pela primeira vez nos anos 60 por Costa *et al.* (1968) e Werner (1966) quando analisaram o crescimento de *Candida* em meio sólido contendo gema de ovo (Figura I.5b) (Bhat *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 1968; Ghannoum, 2000; Werner, 1966). Mais tarde Price *et al.* (1982) descreveram um método para determinar a actividade das fosfolipases produzidas por *C. albicans*. Uma vez que a gema de ovo contém grandes quantidades de fosfolípidos. Estes autores incorporaram num meio base de SDA a gema de ovo e quando *C. albicans* foi cultivada nesse meio, a actividade fosfolipídica foi identificada pela zona de precipitação branca e densa (zona com um halo opaco) em torno da colónia de *C. albicans* (Ghannoum, 2000; Price *et al.*, 1982). Esta zona branca é o resultado da formação de complexos de cálcio que foram libertados com os ácidos gordos por acção da fosfolipase sobre os fosfolípidos presentes na gema de ovo. Este método revelou-se muito prático e fácil de executar para determinar a actividade das fosfolipases produzidas pelas espécies de *Candida*, mas também pode ser aplicado para outros fungos. Contudo, este método apresenta limitações, dado que não é adequado para fungos que produzam baixas quantidades de fosfolipases (Ghannoum, 2000). Além disso, a quantidade de fosfolipases produzidas por *Candida* varia de acordo com as

espécies, estirpe e local de infecção. Geralmente, os isolados clínicos de *C. albicans* do sangue produzem maiores quantidades de fosfolipases do que isolados do tracto urinário ou na cavidade oral. Alguns estudos demonstram que na presença de hifas, a penetração de *C. albicans* no tecido danificado é facilitada pela acção das fosfolipases (Ghannoum, 2000; Williams *et al.*, 2011).

O papel das fosfolipases em *C. parapsilosis* é pouco compreendido pois experiências realizadas com esta espécie de *Candida* apresentaram resultados contraditórios, no geral relatam que *C. parapsilosis* não produz fosfolipases, no entanto alguns estudos descrevem que algumas estirpes de *C. parapsilosis* apresentam actividade fosfolipídica (Bhat *et al.*, 2011; Trofa *et al.*, 2008).

A hemolisina é uma enzima que tem a capacidade de lisar os eritrócitos do sangue (Figura I.5c). A sua produção pelas espécies de *Candida* é um factor importante porque a hemolisina facilita o crescimento de *Candida* dentro do hospedeiro visto que utiliza a hemoglobina como fonte de ferro (Akpan and Morgan, 2002; Luo *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011a; Silva *et al.*, 2011b; Tsang *et al.*, 2007; Williams and Lewis, 2011). Deste modo, a hemolisina garante a sobrevivência do agente patogénico e sua persistência no hospedeiro (Luo *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1999). Além das espécies de *Candida* terem a capacidade de utilizar o ferro dos eritrócitos para produzirem hemolisina, esta produção ocorre especialmente em meios contendo uma elevada concentração de glucose, sendo este um factor importante na candidíase em diabéticos não controlados, em que a concentração de glucose no sangue e na saliva é muito elevada (Manns *et al.*, 1994; Williams and Lewis, 2011). Neste sentido, a produção de hemolisina pode ser regulada pela presença de glucose no meio de crescimento das espécies de *Candida*. No entanto, a actividade da hemolisina também depende da espécie e estirpe de *Candida*.

C. albicans apresenta actividade hemolítica quando o meio de crescimento é enriquecido com glucose e particularmente em células na forma de hifa (Mishra *et al.*, 2007). Por sua vez *C. parapsilosis* também é capaz de produzir *in vitro* hemolisina total após 48h de incubação (Luo *et al.*, 2001). No entanto, embora a actividade hemolítica seja conhecida como um factor de virulência que contribuiu para a patogenicidade das espécies de *Candida*, a expressão genética da actividade hemolítica de *Candida* ainda é mal compreendida (Silva *et al.*, 2011b).

II

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ISOLADOS CLÍNICOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Neste estudo utilizaram-se quatro isolados clínicos da cavidade oral de pacientes com candidíase, duas estirpes de *C. albicans* e duas estirpes de *C. parapsilosis*. Estes isolados clínicos têm diferentes origens: *C. albicans* AC e *C. parapsilosis* AD foram isolados em mono-infecção, enquanto que *C. albicans* AM e *C. parapsilosis* AM2 foram isolados em co-infecção. Todos os quatro isolados foram obtidos de pacientes que usavam prótese dentária. Os isolados orais neste estudo foram obtidos numa Clínica Dentária, Congregados (Braga, Portugal) e pertence à colecção do Grupo Biofilmes do Centro de Engenharia Biológica, da Universidade do Minho (Braga, Portugal), como foi descrito na literatura (Martins *et al.*, 2010b). As espécies de *Candida* foram armazenadas a -80°C e repicadas em meio sólido de *Sabouraud dextrose agar* (SDA, Liofilchem) e incubadas a 37°C durante 24 h.

Para cada ensaio, as espécies de *Candida* foram inoculadas em meio líquido de *Sabouraud dextrose broth* (SDB, Liofilchem) e incubadas durante 18h a 37°C, com agitação orbital a 120 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 8000 rpm, durante 5 min, a 4°C e lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS, 0,1M, pH 7).

2.2. ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Todos os ensaios foram realizados usando saliva artificial contendo 2 g ml⁻¹ de extracto de levedura (Liofilchem), 5 g ml⁻¹ de peptona (Liofilchem), 2 g ml⁻¹ de glucose (Applichem), 1 g ml⁻¹ de mucina (Sigma), 0,35 g ml⁻¹ de NaCl (Applichem), 0,2 g ml⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (Riedel-de-Häen) e 0,2 g ml⁻¹ de KCl (Pronalab) (pH 6,8-7) como descrito na literatura (Lamfon *et al.*, 2003).

As placas de 6 poços de poliestireno foram revestidas com saliva artificial durante 4h a 37°C, no agitador orbital a 120 rpm, utilizando um protocolo utilizado num estudo semelhante descrito na literatura (Guggenheim *et al.*, 2001). Após as 4 h, lavaram-se os poços com PBS, e as placas foram armazenadas em PBS a 4°C durante uma semana.

2.2.1. ADESÃO E BIOFILME SIMPLES

Após lavagem, as células foram contadas num hemocitómetro de Neubauer para ajustar a concentração celular a 1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1} em saliva artificial. De seguida, as células foram colocadas nos poços revestidos com saliva artificial e colocadas a 37°C , com agitação orbital de 120 rpm, por um período de 2h e 24h.

2.2.2. ADESÃO E BIOFILME MISTO

Como foi descrito para a adesão e biofilme simples, após lavagem das células estas foram contadas num hemocitómetro de Neubauer, ajustando a concentração celular em saliva artificial. Seguidamente, retirou-se o PBS das placas revestidas com saliva artificial e sobre a película de saliva artificial adicionou-se 1 ml de *C. albicans* na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} e 1 ml de *C. parapsilosis* na mesma concentração, homogeneizou-se e incubou-se a 37°C , com agitação orbital a 120 rpm. Para avaliar a influência de cada estirpe de *C. albicans* no desenvolvimento e na função das estirpes de *C. parapsilosis*, foram estudadas diferentes co-associações de duas-espécies, de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Inicialmente, foram estudadas as co-associações: *C. albicans* AM – *C. parapsilosis* AM2 (isolados em co-infecção) e *C. albicans* AC – *C. parapsilosis* AD (isolados em mono-infecção). Depois, a fim de determinar se o comportamento das espécies de *Candida* isoladas em co-infecção se alterava na presença de espécies de *Candida* isoladas em mono-infecção, foi estudado um novo conjunto de duas-espécies em adesão e biofilme misto: *C. albicans* AC – *C. parapsilosis* AM2 e *C. albicans* AM – *C. parapsilosis* AD.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS ADERIDAS E VIÁVEIS NO BIOFILME

O número de células de levedura aderidas e viáveis nos ensaios de adesão inicial (2h) e de formação de biofilme (24h) foi determinado por contagem das unidades formadoras de colónias (UFC).

Sucintamente, após 2h e 24h (37°C, 120 rpm), os poços foram lavados com PBS para remover as células não aderidas, de seguida as células aderidas foram removidas dos poços por raspagem e ressuspensas em PBS. As suspensões celulares foram sonicadas durante 45s com uma potência de 30W (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer), com uma sonda de diâmetro de 0,3 cm, seguida por uma homogeneização vigorosa durante 30s usando um vórtex. O número de colónias contáveis foi obtido através de diluições decimais sucessivas em PBS e de seguida uma alíquota de 25µL da suspensão celular foi colocada numa placa contendo CHROMagar® *Candida* (Candida CHROMagar™). As placas de CHROMagar foram incubadas a 37°C durante 48h e o número total de UFC por mililitro (UFC/ml) foram contados nas diluições 1×10^{-4} e 1×10^{-5} para as células aderidas e células viáveis no biofilme, respectivamente.

Os ensaios foram realizados em triplicado, em três ensaios independentes.

2.4. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL DO BIOFILME

Após 24h (120 rpm a 37°C), os poços foram lavados com PBS para remover as leveduras que não aderiram. A biomassa total produzida foi determinada pelo método de coloração cristal violeta (CV). Resumidamente, o biofilme foi fixado com 2 ml de metanol a 100% (v/v) durante 15 min. De seguida o metanol foi removido e só após as placas estarem secas (à temperatura ambiente) o biofilme foi corado e fixado com 2 ml de cristal violeta (CV) a 1%. Após 5 min, lavaram-se os poços duas vezes com água ultrapura estéril e adicionou-se 2 ml de ácido acético a 33% (v/v) para dissolver o corante. Como controlo foi usado um poço sem leveduras. A absorvância da solução obtida foi lida em triplicado utilizando um leitor de placas de microtitulação, num comprimento de onda de 570 nm. Os resultados de absorvância obtidos da solução de CV foram normalizados por UFCs [(Abs CV/UFCs) $\times 10^8$], a fim de comparar o efeito causado pelo mesmo número de células de cada estirpe.

Foram realizados três ensaios independentes, em triplicado.

2.5. MATRIZ EXTRACELULAR: QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E POLISSACÁRIDOS

A matriz extracelular do biofilme formado foi extraída seguindo um protocolo descrito na literatura (Azeredo *et al.*, 2003). Sucintamente, os biofilmes foram lavados com PBS, raspados e sonicados como descrito anteriormente. Em seguida centrifugou-se a suspensão durante 5 min, a 8000 rpm, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante resultante foi filtrado com filtros de acetato de celulose (diâmetro do poro de 0,2 µm) e armazenado a -20°C.

O teor de proteínas extraídas da matriz extracelular do biofilme foi determinado pelo método colorimétrico *Bicinchoninc Acid Protein Assay Kit* (BCA Kit, Sigma-Aldrich), utilizando a albumina de soro de bovino como padrão para a construção da curva de calibração.

Para quantificar o teor de polissacáridos extraídos da matriz extracelular utilizou-se o método fenol-ácido sulfúrico descrito na literatura (DuBois *et al.*, 1956) usando a glucose como padrão para a construção da curva de calibração.

A absorvância da solução obtida foi lida em triplicado, com recurso a um leitor de placas de microtitulação no comprimento de onda de 562 nm e 490 nm, para proteínas e polissacáridos, respectivamente.

Uma vez mais, a experiência foi repetida em três ensaios independentes, com amostras individuais e os resultados foram normalizados por UFCs [$(\mu\text{g}/\text{UFCs}) \times 10^6$], a fim de comparar o efeito causado pelo mesmo número de células de cada estirpe.

2.6. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA: HEMOLISINA, FOSFOLIPASE E PROTEINASE

Para avaliar a actividade da hemolisina preparou-se o meio sólido com sangue como é descrito na literatura (Luo *et al.*, 2001). Sucintamente, depois das células terem sido raspadas, ressuspendidas, sonicadas e agitadas, uma alíquota de 25 µl de suspensão celular de células aderidas foi colocada sobre o meio sólido de sangue contendo 18,75 g l⁻¹ de agar (Applichem), 12,5 g l⁻¹ de peptona (Liofilchem), 350 g l⁻¹ de glucose

(Applichem) e 7% v/v de sangue desfibrinado de carneiro (Probiológica) (pH 6,8-7). A placa foi incubada durante 48h a 37°C.

Para determinar a actividade das fosfolipases e proteinases utilizou-se os protocolos descritos na literatura (Price *et al.*, 1982; Ruchel, 1999), respectivamente. Resumidamente, como foi descrito para a determinação da actividade da hemolisina, colocou-se uma alíquota de 25µl de suspensão celular sobre uma placa de Petri com meio sólido específico para a determinação da actividade em fosfolipases contendo 43 g l⁻¹ de peptona (Liofilchem), 12,85 g l⁻¹ de glucose (Applichem), 36,84 g l⁻¹ de NaCl (Applichem), 0,354 g l⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (Riedel-de-Häen), 12,86 g l⁻¹ de agar (Applichem) e 4% v/v de gema de ovo de galinha (pH 6,8-7). A placa foi incubada por 96h a 37°C.

A actividade das proteinases pelos isolados de *Candida* foi determinada utilizando meio sólido contendo 20 g l⁻¹ de agar (Applichem), 13 g l⁻¹ de *yeast carbon base* (Sigma) e 25 g l⁻¹ de albumina de soro de bovino (Sigma) (pH 6,8-7). Como foi descrito para a determinação da actividade das fosfolipases, foi adicionada uma alíquota de 25 µl de suspensão celular sobre o meio sólido e a placa foi incubada a 37°C durante 96h.

A actividade (Pz) de todas as enzimas estudadas (hemolisina, fosfolipase e proteinase) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colónia de *Candida* e o diâmetro da colónia mais a zona de halo, como foi descrito por (Price *et al.*, 1982). Cada ensaio foi realizado em triplicado, num total de três ensaios independentes. Os resultados obtidos foram normalizados por UFCs [(%/UFCs)×10⁶].

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi efectuada a análise estatística de todos os ensaios utilizando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago), aplicando o teste *one-way analysis of variance* (ANOVA) com o teste Bonferroni como um teste *Post Hoc*.

Todos os testes foram realizados no intervalo de confiança de 95%.

III

RESULTADOS

3. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados da expressão de factores de virulência nomeadamente adesão, formação de biofilmes (biomassa total e matriz extracelular) e secreção de enzimas de duas estirpes de *C. albicans* e duas estirpes de *C. parapsilosis* num sistema de mono-espécie e de duas-espécies.

3.1. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ADERIDAS E DAS CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME

A Figura III.1A apresenta o perfil de adesão simples para todas as estirpes cultivadas numa placa revestida com saliva artificial com diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}). Destaca-se que ambas as estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* aderiram à superfície, mas em diferente número.

Verificou-se que na fase inicial de adesão, com a concentração de suspensão celular maior (2×10^7 células ml^{-1}), as espécies de *Candida* apresentaram maior número de células aderidas, excepto *C. parapsilosis* AM2.

Após 2h de adesão observou-se que o número de células aderidas de *C. albicans* AM (isolada em co-infecção) foi semelhante ao número de células aderidas de *C. albicans* AC (isolada em mono-infecção), na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} . Relativamente à adesão simples das estirpes de *C. parapsilosis*, *C. parapsilosis* AM2 (isolada em co-infecção) revelou menor número de células aderidas do que a estirpe AD (isolada em mono-infecção), em ambas as concentrações ($p < 0,05$).

Para comparar os resultados obtidos em adesão mista com os da adesão simples é necessário comparar com número de células aderidas na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} , sendo esta a concentração de cada uma das espécies em adesão mista.

Os resultados da Figura III.1B permitem verificar que na adesão mista *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AD, *C. albicans* AC aderiu em maior número do que em adesão simples ($p < 0,05$). Por outro lado, o número de células aderidas de *C. parapsilosis* AD em adesão mista com *C. albicans* AC foi inferior ao número de células aderidas em adesão simples ($p < 0,05$).

Na adesão mista *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AM2 verificou-se que *C. parapsilosis* AM2 aderiu em menor número do que em adesão mista com *C. albicans* AM.

O número de células aderidas de *C. albicans* AM foi maior na presença de *C. parapsilosis* AD do que na presença de *C. parapsilosis* AM2 e do que na adesão simples ($p < 0,05$).

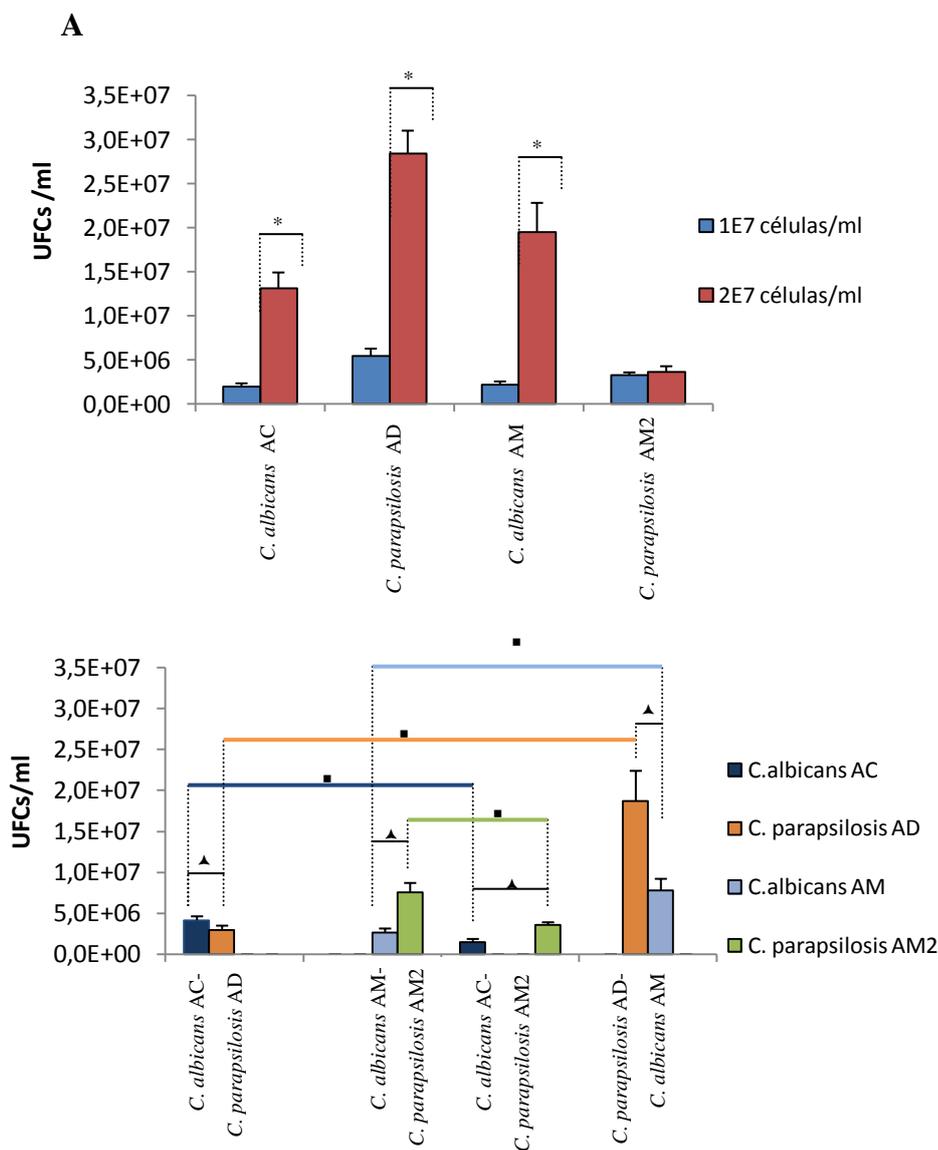


Figura III. 1. Concentração celular das espécies de *Candida* em (A) adesão simples e (B) adesão mista. As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$, * comparando entre diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}); ^ comparando as espécies no sistema de duas-espécies; ■ comparando a mesma estirpe entre sistemas de duas-espécies.

Em biofilmes simples (Figura III.2A), *C. parapsilosis* AM2 apresentou um maior número de células viáveis do que *C. parapsilosis* AD na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} ($p < 0,05$), enquanto que o número de células viáveis de *C. albicans* AM foi semelhante ao número de células viáveis de *C. albicans* AC em ambas as concentrações de suspensão célula

Em biofilme misto (Figura III.2B), o número de células viáveis de *C. albicans* AC na presença de *C. parapsilosis* AD foi maior do que o número de células de *C. albicans* AC em biofilme simples ($p < 0,05$). Contudo o número de células viáveis de *C. parapsilosis* AD neste biofilme misto foi inferior ao número de células viáveis em biofilme simples ($p < 0,05$). No biofilme misto *C. albicans* AM-*C. parapsilosis* AM2, *C. parapsilosis* AM2 apresentou menor número de células viáveis do que *C. albicans* AM e do que em biofilme simples ($p < 0,05$). Quando comparado o biofilme misto *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2 com *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AM2, verificou-se que *C. parapsilosis* AM2 apresentou maior número de células viáveis em biofilme misto com *C. albicans* AC do que na presença de *C. albicans* AM com a qual tinha sido co-isolada ($p < 0,05$).

Estudo de factores de virulência de culturas mistas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* após adesão a uma superfície abiótica

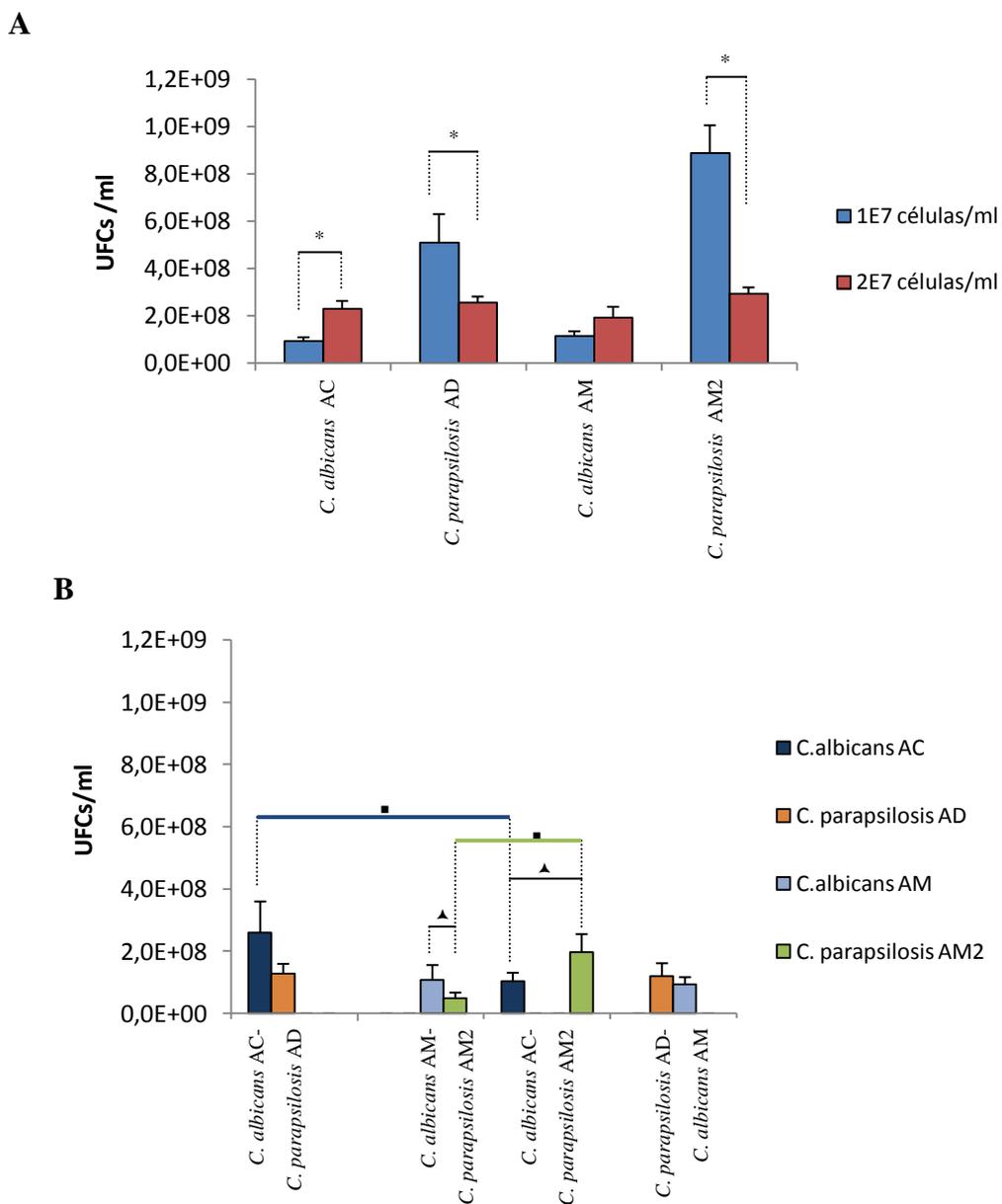


Figura III. 2. Concentração celular das espécies de *Candida* em (A) biofilmes simples e (B) biofilmes mistos. As barras representam o erro padrão. $p < 0,05$, * comparando entre diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}); ^ comparando as espécies no sistema de duas-espécies; ■ comparando a mesma estirpe entre sistemas de duas-espécies.

3.2. QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL DOS BIOFILMES

A quantificação da biomassa total produzida pelo biofilme foi determinada recorrendo ao método de coloração cristal violeta (CV).

Em biofilme simples (Figura III.3A) observou-se que todas as espécies de *Candida* formaram biofilme na superfície de poliestireno revestida com saliva artificial (Figura III.3A). Observou-se que na concentração de suspensão celular de 1×10^7 células ml^{-1} , as estirpes de *C. albicans* produziram mais biomassa total do que as estirpes de *C. parapsilosis*. Por sua vez, *C. parapsilosis* teve um comportamento oposto, quando esta espécie foi incubada na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} produziu menos biomassa total comparativamente ao biofilme simples cultivado no dobro da concentração de suspensão celular (2×10^7 células ml^{-1}) ($p < 0,05$). É igualmente importante mencionar que todas as espécies de *Candida* incubadas na concentração inicial de 2×10^7 células ml^{-1} produziram uma quantidade de biomassa total semelhante entre si.

É importante realçar que para comparar a biomassa total produzida no biofilme misto de *C. albicans* e *C. parapsilosis* com os resultados da biomassa total produzida no biofilme simples é necessário comparar na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} , porque em biofilmes mistos a biomassa total produzida é o resultado da contribuição das duas espécies em conjunto.

Na Figura III.3B estão apresentados os resultados relativos à quantificação da biomassa total produzida pelas espécies de *Candida* em biofilme misto.

Comparando os biofilmes mistos em termos da origem dos isolados clínicos, o biofilme misto formado pelas espécies de *Candida* isoladas em mono-infecção (*C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AD) apresentou menos biomassa total do que o biofilme misto formado pelas duas espécies isoladas em co-infecção (*C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2) ($p < 0,05$).

Nos biofilmes *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AD, *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AM2 e *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AD verificou-se que a produção de biomassa total foi semelhante entre si.

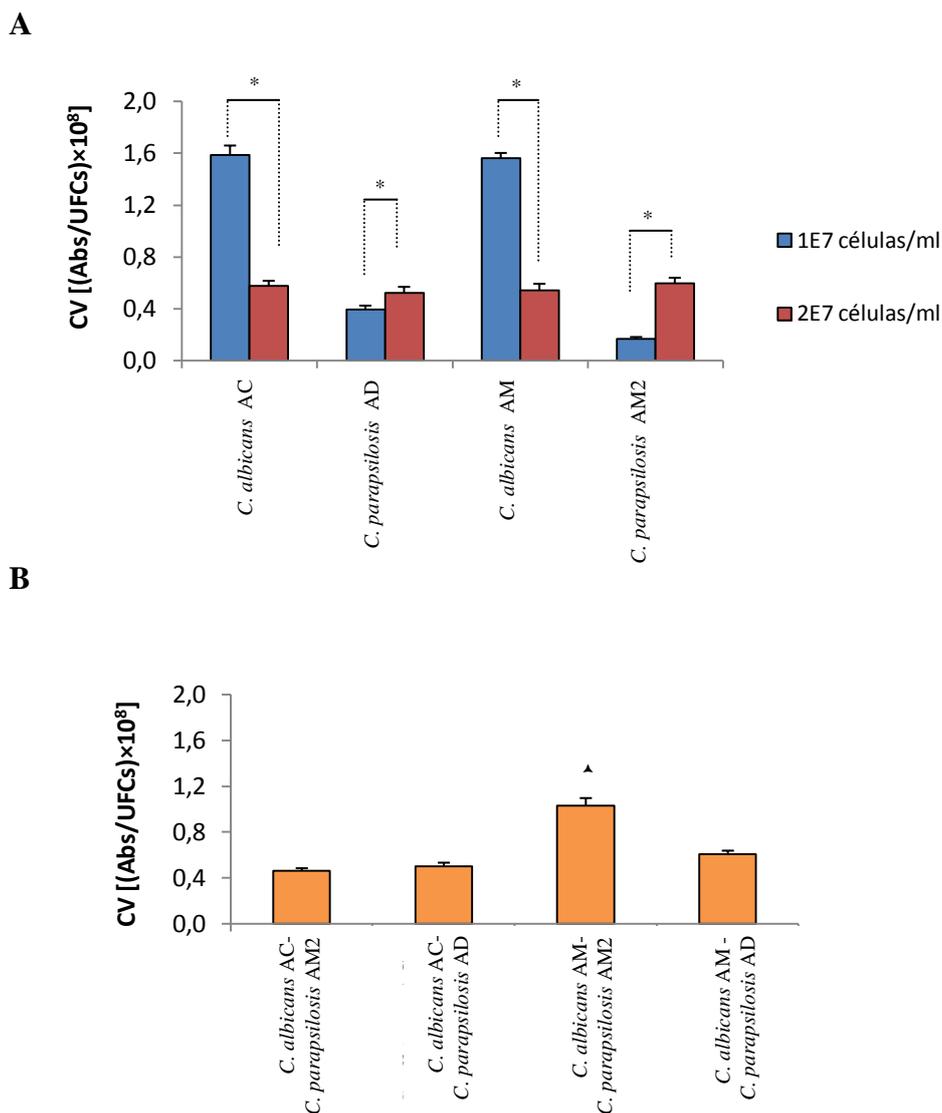


Figura III. 3. Valores de absorvância da solução obtida após aplicação do método de cristal violeta [(Abs CV / UFCs)×10⁸], de **(A)** biofilmes simples formados a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1×10⁷células ml⁻¹ e 2×10⁷células ml⁻¹) e **(B)** biofilmes mistos formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10⁷células ml⁻¹. As barras representam o erro padrão. p<0,05,* comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre biofilmes mistos.

3.3. COMPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME

Os resultados apresentados na Figura III.4A mostram a quantidade de proteínas e polissacáridos extraídos da matriz extracelular do biofilme simples formado pelas estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em diferentes concentrações de suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}). No geral, a matriz do biofilme simples de *C. albicans* AC apresentou maior quantidade de proteínas e polissacáridos na concentração de suspensão celular de 1×10^7 células ml^{-1} , enquanto que para a mesma concentração *C. parapsilosis* AM2 produziu menor quantidade de proteínas e polissacáridos ($p < 0,05$). Além disso, na concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} , a quantidade de proteínas e polissacáridos produzidos em biofilmes simples de *Candida* foi semelhante entre as espécies e estirpes. Observou-se também que *C. albicans* AC na concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} produziu menos proteínas e polissacáridos comparativamente na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} . No entanto, as outras estirpes produziram mais proteínas e polissacáridos quando cultivadas na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} do que na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} ($p < 0,05$).

Para comparar os resultados obtidos nos biofilmes mistos com os dos biofilmes simples é necessário comparar com os resultados obtidos nos biofilmes simples formados a partir da suspensão celular com concentração de 2×10^7 células ml^{-1} , porque no biofilme misto a quantificação da matriz extracelular é o resultado da contribuição das duas espécies em conjunto.

Na Figura III.4B apresentam-se os resultados da quantificação de proteínas e polissacáridos extraídos dos biofilmes mistos. A composição da matriz dos biofilmes varia significativamente com a composição do sistema de duas-espécies. O biofilme *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2 tem maior quantidade de proteínas e polissacáridos em comparação com todos os outros biofilmes mistos estudados ($p < 0,05$). No entanto, quando *C. albicans* AM foi cultivada com *C. parapsilosis* AD, não se detectou a presença de polissacáridos, apesar de para o mesmo número de células, na matriz extracelular dos biofilmes simples de *C. albicans* AM e de *C. parapsilosis* AD ter sido detectada a presença de polissacáridos. Verificou-se que no biofilme *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AM2 a matriz extracelular apresenta reduzida quantidade de polissacáridos contra o verificado para os respectivos biofilmes simples ($p < 0,05$).

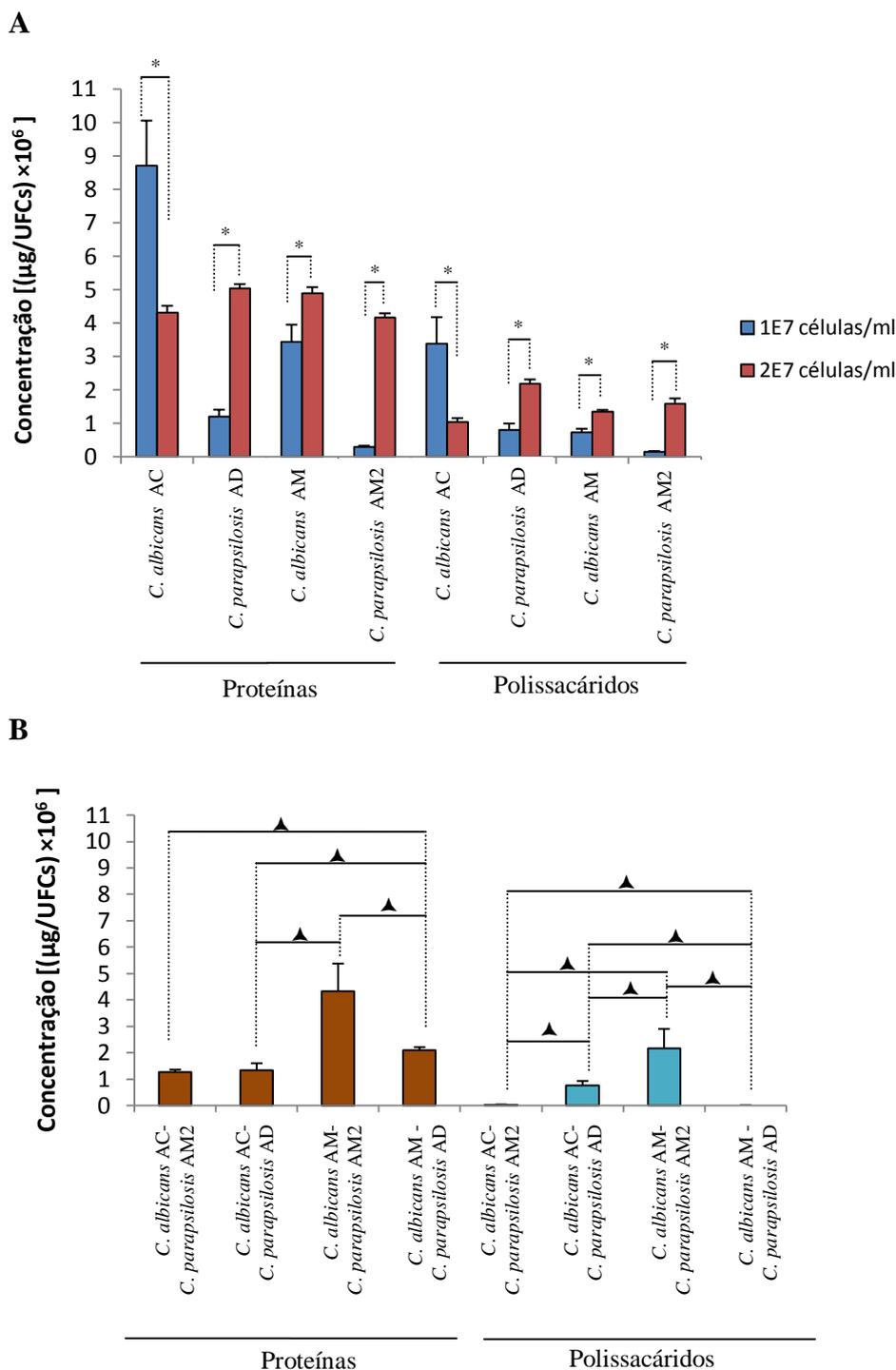


Figura III. 4. Concentração [(µg/UFCs) × 10⁶] de proteínas e polissacáridos da matriz extracelular de (A) biofilmes simples formados a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1×10⁷ células ml⁻¹ e 2×10⁷ células ml⁻¹) e (B) biofilmes mistos formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10⁷ células ml⁻¹. As barras representam o erro padrão. p<0,05,* comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre biofilmes mistos.

3.4. SECREÇÃO DE ENZIMAS

A Figura III.5A apresenta os valores obtidos para a actividade enzimática das espécies de *Candida* em adesão simples. Nestas condições, as estirpes de *C. albicans* expressam todas as enzimas avaliadas neste estudo. No entanto, a actividade enzimática de *C. parapsilosis* depende da estirpe e da concentração inicial da suspensão celular (1×10^7 células ml^{-1} e 2×10^7 células ml^{-1}). No geral, a actividade enzimática foi menor para as estirpes cultivadas na maior concentração de suspensão celular (2×10^7 células ml^{-1}), excepto *C. parapsilosis* AM2 que apresentou maior actividade hemolítica e de proteinase na concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} ($p < 0,05$). Verificou-se que as estirpes de *C. parapsilosis* não apresentaram actividade da enzima fosfolipase. A actividade enzimática dos biofilmes simples diminuiu cerca de 89 a $99(\%/\text{UFCs}) \times 10^6$ comparativamente à actividade enzimática detectada para as células após 2h de adesão.

Mais uma vez para comparar os resultados obtidos em adesão mista com os resultados em adesão simples, é necessário comparar a actividade enzimática obtida em adesão simples na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} , porque em adesão mista a actividade enzimática é o resultado da contribuição das duas espécies em conjunto.

Como se pode observar pela Figura III.5B, todos os sistemas de duas-espécies apresentaram actividade enzimática para todas as enzimas estudadas após 2h de adesão, tendo sido observadas diferenças significativas entre os sistemas de duas-espécies estudadas. Comparando os sistemas de duas-espécies que possuem a mesma estirpe de *C. albicans* verificou-se que na presença de *C. parapsilosis* AD, a actividade enzimática foi menor do que na presença de *C. parapsilosis* AM2 ($p < 0,05$). A adesão mista *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AM2 apresentou maior actividade enzimática para todas as enzimas estudadas, comparativamente aos restantes sistemas de duas-espécies estudados ($p < 0,05$).

Em biofilme misto verificou-se que a actividade enzimática diminuiu cerca de 88 a $99(\%/\text{UFCs}) \times 10^6$, comparativamente em adesão mista.

Estudo de factores de virulência de culturas mistas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* após adesão a uma superfície abiótica

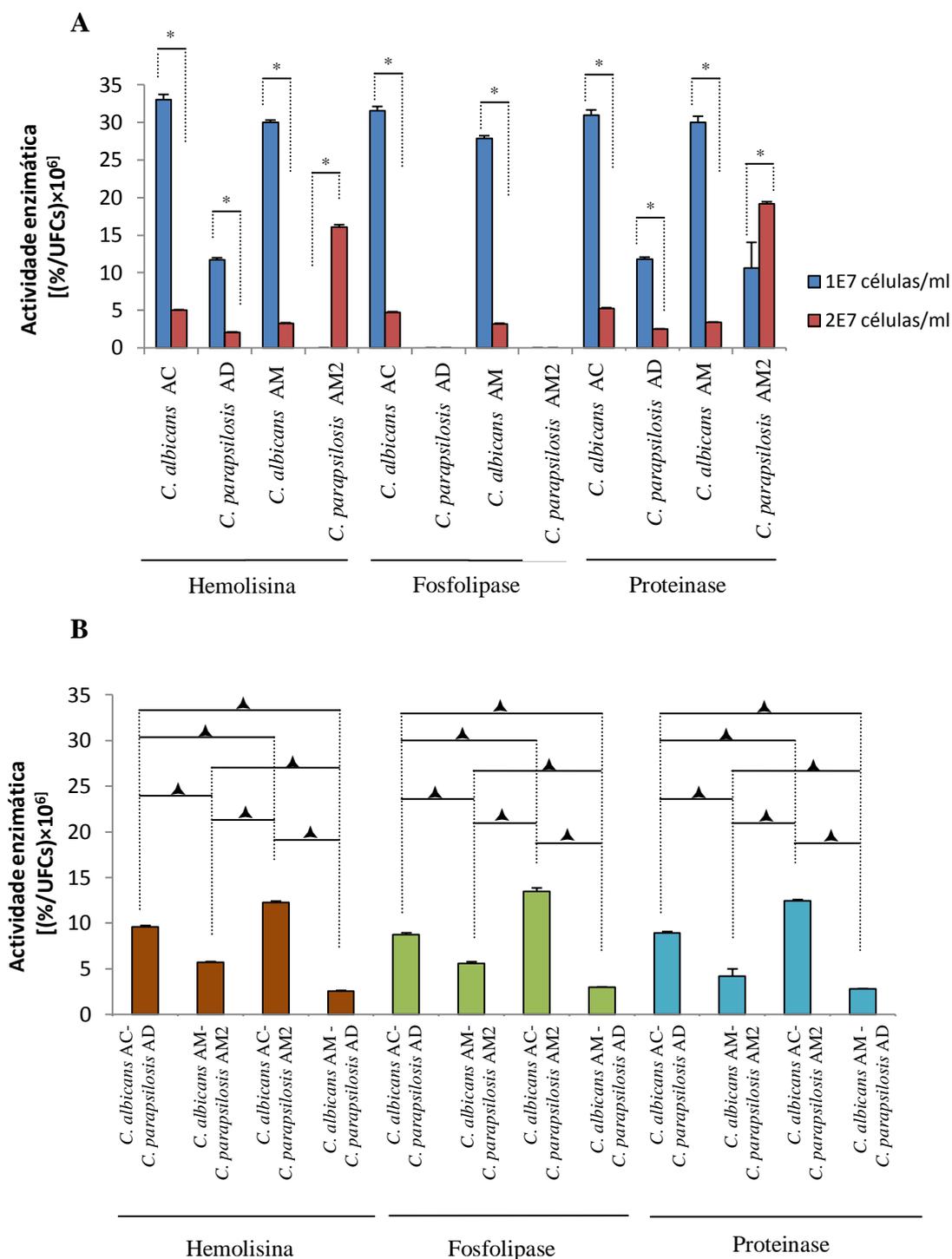


Figura III. 5. Actividade enzimática [(%/UFCs) × 10⁶] das leveduras estudadas em (A) adesão simples formada a partir de diferentes concentrações de suspensão celular (1 × 10⁷ células ml⁻¹ e 2 × 10⁷ células ml⁻¹) e (B) adesão mista formada a partir da concentração de suspensão celular de 2 × 10⁷ células ml⁻¹. As barras representam o erro padrão. p < 0,05, * comparando entre concentração de suspensão celular; ^ comparando entre sistemas de duas espécies.

IV

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Na natureza, a maioria dos microrganismos não existe em culturas puras de células livres, mas estão associados a superfícies e a culturas multi-espécies, onde mais de 200 espécies microbianas podem coexistir num único habitat. Na boca, as proteínas da saliva adsorvem selectivamente às superfícies orais, formando uma fina película de saliva sobre a superfície (Cannon and Chaffin, 2001; Hoffman and Haidaris, 1993; Cannon and Chaffin, 1999; O'Sullivan *et al.*, 2000). As espécies de *Candida* ligam-se selectivamente às moléculas salivares presentes nas superfícies orais, nomeadamente ao esmalte dos dentes, a próteses dentárias (quando presentes na cavidade oral) ou a outros microrganismos já aderidos à superfície (Cannon and Chaffin, 2001; Cannon *et al.*, 1995b).

Tendo em consideração que nos últimos anos *C. parapsilosis* tem emergido como agente patogénico na cavidade oral e em co-infecção com *C. albicans* (Martins *et al.*, 2010b), desenvolveu-se este trabalho com objectivo de avaliar os factores de virulência dos isolados clínicos orais de estirpes de *C. parapsilosis* e *C. albicans* num sistema de mono-espécie e de duas-espécies.

Os resultados dos ensaios de adesão (Figura III.1) mostram que todas as estirpes de *Candida* em adesão simples e em adesão mista têm capacidade de aderir à superfície de poliestireno revestida com saliva artificial e que o número de células aderidas varia dependendo das espécies e das estirpes. A adesão à película de saliva pode ter sido mediada pelas interacções hidrofóbicas entre a película de saliva e a superfície das células. Segundo alguns estudos, durante a formação da película de saliva, as proteínas adsorvidas na superfície podem alterar a sua conformação aumentando a exposição dos terminais hidrofílicos, tornando assim a superfície hidrofílica. Deste modo, a adesão das espécies hidrofóbicas é condicionada, enquanto que a adesão das espécies mais hidrofílicas como *C. albicans*, não é afectada (Busscher *et al.*, 1995; Miyake *et al.*, 1986). Outros autores descrevem que os iões presentes na saliva também podem alterar a hidrofobicidade das superfícies presentes na cavidade oral (Panagoda *et al.*, 2001; Panagoda *et al.*, 1998). Neste sentido, para melhor compreensão das interacções existentes entre as espécies de *Candida* e a película de saliva artificial seria importante determinar a hidrofobicidade da película de saliva artificial.

Na adesão mista *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2 (Figura III.1B), *C. parapsilosis* AM2 apresentou um maior número de células aderidas do que *C. albicans* AM. Quando estas espécies (*C. albicans* AM e *C. parapsilosis* AM2) foram separadas e cultivadas em adesão simples (Figura III.1A) observou-se que a adesão de *C. parapsilosis* AM2 parece ser influenciada pela ausência de *C. albicans* AM. Este facto é corroborado pelos resultados representados na Figura III.1B na qual se observou que *C. parapsilosis* AM2 apresentou um número de células aderidas semelhante em adesão simples e em adesão mista com *C. albicans* AC. Este fenómeno pode ser explicado pela literatura que descreve que em sistemas de multiespécies existe uma variedade de sinais moleculares presentes no meio aos quais as células respondem selectivamente (Alberts *et al.*, 2003). Na ausência de determinados sinais moleculares, o comportamento e metabolismo das células é afectado (Alberts *et al.*, 2003). Outro factor importante que poderá mediar a adesão das estirpes de *Candida* à película de saliva poderá ser as interacções hidrofóbicas (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002). Segundo a literatura, a hidrofobicidade de isolados orais de *C. parapsilosis* depende da estirpe, podendo ser hidrofóbica ou hidrofílica (Panagoda *et al.*, 1998; Panagoda *et al.*, 2001). Neste trabalho verificou-se que em adesão simples, *C. parapsilosis* AM2 aderiu menos que *C. parapsilosis* AD, levantando a hipótese de que *C. parapsilosis* AM2 poderá ser mais hidrofóbica do que a estirpe AD. Todavia, seria importante estudar a hidrofobicidade da superfície e os receptores de membrana das estirpes de *C. parapsilosis*, a fim de compreender melhor o seu comportamento durante a adesão.

Contrariamente ao comportamento de *C. parapsilosis* AM2, em adesão simples *C. albicans* AM apresentou um número de células aderidas semelhante à *C. albicans* AC (isolada em mono-infecção). Enquanto que em adesão mista com *C. parapsilosis* AD, *C. albicans* AM apresentou maior número de células aderidas do que em adesão mista com *C. parapsilosis* AM2. Estes resultados sugerem que *C. albicans* AM parece não ser afectada pela ausência dos sinais moleculares de *C. parapsilosis* AM2 e que as interacções hidrofóbicas sejam o principal mecanismo da adesão de *C. albicans* AM, dado que é descrito na literatura que isolados orais de *C. albicans* são hidrofílicos (Minagi *et al.*, 1985; Miyake *et al.*, 1986; Panagoda *et al.*, 1998; Panagoda *et al.*, 2001).

Quando se juntaram as espécies isoladas em mono-infecção, na adesão mista *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AD verificou-se uma inibição da adesão de *C. parapsilosis* AD e aumento da adesão de *C. albicans* AC comparativamente em adesão

simples. Este resultado é corroborado pela literatura que refere que quando se formam sistemas de duas-espécies com espécies isoladas em mono-infecção, *C. parapsilosis* tem tendência a aderir menos do que *C. albicans* (El-Azizi *et al.*, 2004), possivelmente devido à necessidade de estas espécies se adaptarem a co-habitarem num ambiente onde existem os metabolitos produzidos por ambas as espécies (Alberts *et al.*, 2003).

A estrutura em biofilme permite a sobrevivência das espécies comensais, bem como dos agentes patogénicos, protegendo-os dos mecanismos de defesa do sistema imunitário do hospedeiro, das terapias antifúngicas e facilitando a colonização de dispositivos médicos, nomeadamente próteses dentárias (Silva *et al.*, 2009a).

No biofilme misto (Figura III.2B) formado pelas espécies isoladas em mono-infecção verificou-se que *C. albicans* AC parece inibir *C. parapsilosis* AD, visto que o número de células viáveis da estirpe AD foi menor em biofilme misto do que em biofilme simples, sugerindo que poderá haver uma competição pelo espaço e pelos nutrientes, como descreve Thein *et al.* (2007).

No biofilme *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2, *C. parapsilosis* AM2 apresentou menor número de células viáveis do que em biofilme misto com *C. albicans* AC e do que em biofilme simples. Tendo ainda apresentado maior número de células viáveis do que *C. parapsilosis* AD em biofilme simples. Neste sentido e contrariamente ao verificado na adesão, *C. parapsilosis* AM2 em biofilme parece ter-se adaptado ao novo ambiente sem a presença das moléculas sinalizadoras produzidas por *C. albicans* AM. Segundo a literatura este fenómeno é possível porque na ausência de determinados sinais moleculares o metabolismo das células é afectado, criando a necessidade de sintetizar novos receptores, que pode levar horas até que as células se adaptem e respondam em pleno aos sinais moleculares existentes no meio (Alberts *et al.*, 2003). Assim, 2h parece não ser suficiente para *C. parapsilosis* AM2 se adaptar aos sinais moleculares existentes no meio, mas ao fim de 24h esta parece estar adaptada. Todavia, para melhor compreensão deste fenómeno será necessário estudar a metabolómica e os receptores da parede celular desta estirpe.

Nos biofilmes mistos *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2 e *C. albicans* AC- *C. parapsilosis* AD, as estirpes de *C. parapsilosis* apresentaram menor número de células comparativamente as estirpes de *C. albicans*. Este resultados poderá estar relacionado com o facto das duas espécies que constituem o biofilme misto terem sido isoladas nas mesmas condições, *C. albicans* AM e *C. parapsilosis* AM2 foram isoladas em co-infecção e *C. albicans* AC e *C. parapsilosis* AD foram isoladas em mono-infecção.

Além disso, como é descrito na literatura para biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei*, a presença de determinadas moléculas sinalizadoras, induzem alterações morfológicas nas espécies de *Candida* que poderão influenciar o número de células viáveis no biofilme, assim como as trocas de nutrientes e de oxigénio (Thein *et al.*, 2007; Thein *et al.*, 2009). Porém, segundo alguns estudos, a secreção para o meio de diferentes álcoois e em diferentes concentrações pode influenciar a morfologia das espécies de *Candida* (Martins *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010a). Segundo a literatura, a presença de farnesol no meio não inibe o crescimento de *C. albicans*, mas induz alterações morfológicas, inibindo a formação de hifas. Contrariamente, a presença deste álcool inibe o crescimento de *C. parapsilosis* e não tem efeito sobre a sua morfologia (Rossignol *et al.*, 2007). De acordo com alguns estudos, apesar do farnesol não ser produzido por *C. parapsilosis*, esta espécie possuiu todos os genes necessários para a síntese deste álcool (Navarathna *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2007). Portanto, parece que *C. parapsilosis* simplesmente responde à presença do farnesol em biofilme misto com outros fungos e/ou bactérias, podendo inibir o crescimento de *C. parapsilosis* ou o farnesol poderá ser utilizado na comunicação entre espécies (Federle and Bassler, 2003; Hogan, 2006; Rossignol *et al.*, 2007).

Nos biofilmes, a produção de biomassa, presença e composição da matriz extracelular são importantes factores de virulência.

A biomassa de um biofilme é definida como sendo a massa total de microrganismos vivos e a massa da matriz extracelular (Butterfield *et al.*, 2002; Henriques *et al.*, 2006a).

Relativamente à produção de biomassa total em biofilme simples (Figura III.3A), nos biofilmes formados a partir da concentração de suspensão celular de 1×10^7 células ml^{-1} as estirpes de *C. albicans* produzem mais biomassa total do que as estirpes de *C. parapsilosis*, estando de acordo com a literatura que afirma que a maioria das estirpes de *C. parapsilosis* produzem menor quantidade de biofilme do que as estirpes de *C. albicans* (Silva *et al.*, 2009a; Trofa *et al.*, 2008; Hawser and Douglas, 1994).

Com o aumento da concentração da suspensão celular (2×10^7 células ml^{-1}) verificou-se que as estirpes de *C. albicans* em biofilme simples produziram menos biomassa total do que as estirpes de *C. parapsilosis* porque segundo a literatura os biofilmes de *C. albicans* são mais estruturados e mais compactos, limitando a difusão de nutrientes e oxigénio dissolvido no meio dentro do biofilme e a libertação de metabolitos tóxicos para fora do biofilme, podendo conseqüentemente algumas células

das camadas inferiores morrem por falta de nutrientes e/ou oxigénio e/ou excesso de metabolitos tóxicos (Chandra *et al.*, 2001; Nett and Andes, 2006). Contrariamente, a produção de biomassa total das estirpes de *C. parapsilosis* foi maior nos biofilmes simples formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} , sendo corroborado por Trofa *et al.* (2008) que descreve que os biofilmes de *C. parapsilosis* são menos estruturados e menos compactos, facilitando a difusão de nutrientes e oxigénio para dentro do biofilme e permitindo a libertação dos metabolitos tóxicos para fora do biofilme.

Em biofilmes mistos (Figura III.3B) não se verificou o efeito aditivo da produção de biomassa total, pois esta foi inferior ao somatório da produção de biomassa total de cada espécie em biofilme simples. Levantando assim a hipótese de que a limitação de espaço, nutrientes e alterações morfológicas poderão ter influenciado a produção de biomassa total (Chandra *et al.*, 2001; Nett and Andes, 2006; Trofa *et al.*, 2008). A maior produção de biomassa total foi observada pelo biofilme misto *C. albicans* AM- *C. parapsilosis* AM2, dado que estas estirpes foram isoladas em co-infecção, havendo uma maior adaptabilidade do seu metabolismo para produzir biomassa total e matriz extracelular. Relativamente aos restantes biofilmes mistos, a produção de biomassa total e matriz extracelular foi menor do que o biofilme misto *C. albicans* AM -*C. parapsilosis* AM2, podendo estar associado à adaptabilidade do metabolismo das espécies e às moléculas sinalizadoras e disponibilidade de espaço e nutrientes no meio.

Relativamente à matriz extracelular, em biofilme simples (Figura III.4A) verificou-se que quanto maior a concentração de suspensão celular inicial, maior a quantidade de proteínas e polissacáridos presentes na matriz extracelular dos biofilmes, com excepção da matriz do biofilme simples de *C. albicans* AC. O biofilme simples de *C. albicans* AC formado a partir da concentração de suspensão celular de 1×10^7 células ml^{-1} contém mais polissacáridos na sua matriz extracelular do que o biofilme formado a partir da concentração de 2×10^7 células ml^{-1} . Isto sugere que nos biofilmes formados a partir da maior concentração de suspensão celular (2×10^7 células ml^{-1}) parece existir uma competição pelos nutrientes, não havendo disponibilidade para produzir polissacáridos. Este resultado é corroborado pela literatura que descreve que a quantidade de polissacáridos na matriz depende do equilíbrio entre a disponibilidade de substratos de carbono, como açúcares e a limitação de outros nutrientes como azoto, potássio e outros iões, que promovem a síntese de polissacáridos (Sutherland, 2001). Isto sugere que a matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* AC formado a partir da concentração de

2×10^7 células ml^{-1} poderá ser mais estruturada e compacta do que as restantes estirpes, dificultando a difusão de nutrientes e oxigénio para dentro do biofilme (Chandra *et al.*, 2001), condicionando assim a produção de polissacáridos. Os biofilmes simples de *C. parapsilosis* formados a partir da concentração de suspensão celular de 2×10^7 células ml^{-1} produziram mais polissacáridos do que os biofilmes formados a partir da concentração de 1×10^7 células ml^{-1} . De acordo com a literatura, os biofilmes de *C. parapsilosis* são menos estruturados e menos compactos (Trofa *et al.*, 2008), possibilitando uma maior difusão de nutrientes para dentro do biofilme (Chandra *et al.*, 2001) e consequentemente disponibilizando nutrientes para a síntese de polissacáridos (Sutherland, 2001).

Tal como na produção de biomassa total, não se verificou o efeito aditivo na produção de proteínas e polissacáridos pelos biofilmes mistos (Figura III.4B). Nos biofilmes mistos *C. albicans* AC-*C. parapsilosis* AM2 e *C. albicans* AM-*C. parapsilosis* AD, a quantidade de proteínas e polissacáridos na matriz extracelular foi menor do que no biofilme *C. albicans* AM-*C. parapsilosis* AM2, porque como se referiu anteriormente, nestes novos biofilmes mistos as espécies têm que adaptar o seu metabolismo à presença de outra espécie de *Candida* e às moléculas sinalizadores existentes no novo ambiente (Alberts *et al.*, 2003). Esta menor produção de polissacáridos pelos biofilmes mistos influencia a sua estrutura, nomeadamente a viscosidade da matriz extracelular e consequentemente a susceptibilidade destes biofilmes aos antifúngicos (Skillman *et al.*, 1998). Na matriz extracelular do biofilme misto *C. albicans* AC-*C. parapsilosis* AM2 detectou-se uma reduzida quantidade de polissacáridos e no biofilme misto *C. albicans* AM-*C. parapsilosis* AD não se detectou a presença de polissacáridos, apesar de cada uma das espécies em biofilme simples produzirem polissacáridos extracelulares. Assim confirma-se a inexistência do efeito aditivo e a possibilidade de existir uma competição pelos nutrientes (Sutherland, 2001).

A secreção de enzimas hidrolíticas é um factor de virulência que tem um papel importante na adesão e penetração nos tecidos e invasão no hospedeiro (Bhat *et al.*, 2011; Borst and Fluit, 2003; Chauhan *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2001; Noumi *et al.*, 2010; Trofa *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2007).

Neste trabalho verificou-se uma maior expressão de enzimas hidrolíticas em adesão simples e mista do que em biofilme simples e misto, uma vez que é durante a fase de adesão que as espécies de *Candida* necessitam de uma maior quantidade de enzimas

para garantir a colonização, invasão e destruição dos tecidos, como descrito por Bhat *et al.* (2011) e Naglik *et al.* (2003).

Nos estudos de adesão simples, a actividade de enzimas hidrolíticas parece ser influenciada pela concentração da suspensão celular, já que a produção de enzimas foi maior na concentração de 1×10^7 células ml^{-1} do que na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} , com a excepção de *C. parapsilosis* AM2, sendo este mecanismo ainda desconhecido.

C. parapsilosis AM2 na concentração de suspensão celular de 1×10^7 células ml^{-1} não apresentou actividade hemolítica, enquanto que na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} foi detectada a actividade da hemolisina. Provavelmente na concentração de 2×10^7 células ml^{-1} , a transmissão e recepção de moléculas sinalizadoras é facilitada pela proximidade das células e os mecanismos de produção de hemolisina poderão ser induzidos (Alberts *et al.*, 2003).

Em adesão simples, as estirpes de *C. parapsilosis* não apresentam actividade das fosfolipases, mas as estirpes de *C. albicans* apresentam actividade desta enzima, sendo este resultado corroborado pela literatura (Bhat *et al.*, 2011; Trofa *et al.*, 2008).

Mais uma vez, em adesão mista (Figura III.5B) não se verificou o efeito aditivo da expressão dos factores de virulência nomeadamente a actividade de enzimas hidrolíticas. Apesar de *C. parapsilosis* (em adesão simples) não apresentar actividade das fosfolipases, em adesão mista (*C. albicans* - *C. parapsilosis*) a actividade desta enzima foi superior à actividade detectada por *C. albicans* em adesão simples. Sugerindo a existência de um sinergismo entre as duas espécies que promove a actividade das fosfolipases, sendo este mecanismo ainda desconhecido.

Comparando as adesões mistas que possuem a mesma estirpe de *C. albicans*, verificou-se que na presença de *C. parapsilosis* AD a actividade enzimática é menor do que na presença de *C. parapsilosis* AM2. Sugerindo que *C. parapsilosis* AM2 poderá produzir algum metabolito que induza a actividade enzimática de uma ou das duas espécies. Uma vez mais, os resultados sugerem que a actividade enzimática num sistema de duas-espécies depende das estirpes e do sinergismo entre as espécies.

Apesar dos resultados obtidos neste estudo permitirem elucidar um pouco mais o comportamento destas estirpes quando associadas, os mecanismos de interacção ainda não são totalmente conhecidos. É de realçar a importância de conhecer os factores de virulência associados às infecções orais devidos a biofilmes mistos, já que possibilitará dar um passo importante no desenvolvimento de novas estratégias para o seu controlo.

V

**CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE
TRABALHO FUTURO**

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

5.1. CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido teve como objectivo principal avaliar a expressão de factores de virulência de isolados clínicos orais de *C. albicans* e *C. parapsilosis* num sistema de mono-espécie e duas-espécies aderidos a uma superfície de poliestireno revestida com saliva artificial. Este trabalho demonstrou que a expressão dos factores de virulência depende das espécies, estirpes e do tipo de sistema (mono-espécie ou de duas espécies). É importante salientar que quando as espécies que foram isoladas em co-infecção foram separadas, a estirpe de *C. parapsilosis* necessita de mais tempo para adaptar o seu metabolismo a um ambiente sem *C. albicans*. Por outro lado, a estirpe de *C. albicans* tem capacidade de se adaptar a novos ambientes, mesmo quando se combinada com outras estirpes de *C. parapsilosis*.

Em biofilme, as estirpes de *C. parapsilosis* apresentaram maior expressão de factores de virulência do que as estirpes de *C. albicans*. Constatou-se ainda que o sistema de duas-espécies formado pelas espécies isoladas em co-infecção apresentou maior expressão de factores de virulência nomeadamente formação de biofilme (biomassa total e matriz extracelular). Quando se combinaram as estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* isoladas em mono-infecção com as estirpes isoladas em co-infecção não se detectou a produção de polissacáridos da matriz extracelular, apesar de em biofilme simples cada uma das estirpes produzirem polissacáridos, tendo-se assim verificado a inexistência do efeito aditivo.

Neste trabalho verificou-se que durante a fase de adesão, as espécies de *Candida* apresentam maior actividade enzimática, tendo-se observado que a estirpe de *C. parapsilosis* isolada em co-infecção apresentou maior actividade hemolítica e das proteinases. Ambas as estirpes de *C. parapsilosis* não apresentaram actividade das fosfolipases. Em sistemas de duas-espécies, quando presente a estirpe de *C. parapsilosis* isolada em co-infecção verificou-se maior actividade enzimática comparativamente aos restantes sistemas de duas-espécies.

Deste modo, com este trabalho constatou-se que os mecanismos de interacção entre as espécies de *Candida* em adesão e biofilmes mistos ainda são mal compreendidos. Assim, com este trabalho levantaram-se várias hipóteses, nomeadamente a produção de

metabolitos s por uma ou pelas duas espécies influenciarem a expressão dos factores de virulência, as alterações morfológicas, a hidrofobicidade da superfície das células e da película de saliva artificial. Existe assim uma necessidade fulcral de serem desenvolvidos estudos futuros que permitam verificar a veracidade das hipóteses levantadas neste estudo.

5.2. SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

O trabalho desenvolvido nesta dissertação forneceu uma perspectiva sobre os vários factores de virulência expressos por estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em biofilme simples e misto. Tendo em consideração os resultados obtidos é fundamental aprofundar o conhecimento nesta área, propondo-se assim estudos adicionais, para avaliar:

- o perfil metabolómico das estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em biofilme simples e misto (a decorrer);
- a influência de metabolitos específicos na morfologia das estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*;
- a morfologia dos biofilmes mistos recorrendo a microscopia confocal;
- a hidrofobicidade da superfície das espécies de *Candida* e da película de saliva artificial;
- *in vitro* a extensão da capacidade de colonização/infecção das mesmas espécies de *Candida* em adesão e biofilme simples e misto no epitélio oral;
- o processo de co-infecção, não só combinando com diferentes *Candida* não *albicans*, mas também usando bactérias responsáveis pela maioria das infecções orais;
- a presença e caracterizar as proteínas da parede celular e outras proteínas localizadas na superfície das células das espécies *Candida* não *albicans*;
- o papel desempenhado pelas proteínas da parede celular na adesão inicial e interacções entre o agente patogénico e a superfície revestida com saliva artificial ou as células hospedeiras.

Todas estas propostas de trabalho futuro tem como objectivo elucidar os mecanismos envolvidos na interacção entre diferentes espécies em cultura mista, compreender a complexidade associada à expressão de factores de virulências dos biofilmes mistos dentro da cavidade oral e conhecer novos alvos, para o posterior desenvolvimento de terapêuticas contra agentes patogénicos clinicamente relevantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, B.;Baillie, G.S. and Douglas, L.J. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* **51**, 344-349.
- Akpan, A. and Morgan, R. (2002). Oral candidiasis. *Postgrad Med J* **78**, 455-459.
- Alberts, B.;Bray, D.;Hopkin, K.;Johnson, D.;Lewis, J.;Raff, M., *et al.* (2003) Cell communication. In *Essencial cell biology*, G. Science (ed.) 2nd edn. New York, pp. 533-571.
- Anil, S.;Ellepola, A.N. and Samaranayake, L.P. (2001). The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* **7**, 119-122.
- Azeredo, J.;Henriques, M.;Sillankorva, S. and Oliveira, R. (2003). Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci Technol* **47**, 175-179.
- Benjamin, D.K., Jr.;Ross, K.;McKinney, R.E., Jr.;Benjamin, D.K.;Auten, R. and Fisher, R.G. (2000). When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics* **106**, 712-718.
- Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 595-601.
- Bhat, V.;2, S.S.;Shetlya, V.;4, S.C. and Raos, V. (2011). Extracellular enzymes of *Candida albicans* and their role in development of denture stomatitis - a Review. *JIADS*, 26-30.
- Blankenship, J.R. and Mitchell, A.P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* **9**, 588-594.
- Bokor-Bratić, M.B. (2008). Oral Candidiases- adhesion of non- albicans *Candida* species. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke* **2008**, 69-78.

- Bonassoli, L.A.;Bertoli, M. and Svidzinski, T.I. (2005). High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* **59**, 159-162.
- Borst, A. and Fluit, A.C. (2003). High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol* **52**, 971-974.
- Budtz-jørgensen, E. (2000). Ecology of *Candida*-associated Denture Stomatitis. *Microbial Ecology in Health and Disease* **12**, 170-185.
- Busscher, H.J.;Bos, R. and van der Mei, H.C. (1995). Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* **128**, 229-234.
- Butler, G.;Rasmussen, M.D.;Lin, M.F.;Santos, M.A.;Sakthikumar, S.;Munro, C.A., *et al.* (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657-662.
- Butterfield, P.W.;Bargmeyer, A.M.;Camper, A.K. and Biederman, J.A. (2002). Modified enzyme activity assay to determine biofilm biomass. *Journal of Microbiological Methods* **50**, 23-31.
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.
- Cannon, R.D. and Chaffin, W.L. (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* **10**, 359-383.
- Cannon, R.D. and Chaffin, W.L. (2001). Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ* **65**, 785-787.
- Cannon, R.D.;Holmes, A.R.;Mason, A.B. and Monk, B.C. (1995a). Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* **74**, 1152-1161.
- Cannon, R.D.;Nand, A.K. and Jenkinson, H.F. (1995b). Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology* **141** (Pt 1), 213-219.

- Carlisle, P.L.;Banerjee, M.;Lazzell, A.;Monteagudo, C.;Lopez-Ribot, J.L. and Kadosh, D. (2009). Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 599-604.
- Chaffin, W.L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495-544.
- Chandra, J.;Kuhn, D.M.;Mukherjee, P.K.;Hoyer, L.L.;McCormick, T. and Ghannoum, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* **183**, 5385-5394.
- Chauhan, N.;Latge, J.P. and Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* **4**, 435-444.
- Costa, A.;Costa, C.;Misefari, A. and Amato, A. (1968). On the enzymatic activity of certain fungi. VII. Phosphatidase activity on media containing sheep's blood of pathogenic strains of *Candida albicans*. *Atti Soc. Sci. Fis. Mat. Nat.* **XIV**, 93–101.
- Costerton, J.W.;Lewandowski, Z.;Caldwell, D.E.;Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Decho, A.W.;Norman, R.S. and Visscher, P.T. (2010). Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol* **18**, 73-80.
- Dodds, M.W.;Johnson, D.A. and Yeh, C.K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent* **33**, 223-233.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.
- Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**, 30-36.

- Dranginis, A.M.;Rauceo, J.M.;Coronado, J.E. and Lipke, P.N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 282-294.
- DuBois, M.;Gilles, K.A.;Hamilton, J.K.;Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Eggimann, P.;Garbino, J. and Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**, 685-702.
- El-Azizi, M.A.;Starks, S.E. and Khardori, N. (2004). Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol* **96**, 1067-1073.
- Ellepola, A.N. and Morrison, C.J. (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* **43 Spec No**, 65-84.
- Federle, M.J. and Bassler, B.L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**, 1291-1299.
- Flemming, H.C.;Neu, T.R. and Wozniak, D.J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**, 7945-7947.
- Furlaneto-Maia, L.;Specian, A.F.;Bizerra, F.C.;de Oliveira, M.T. and Furlaneto, M.C. (2008). In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* **166**, 209-217.
- Gallardo-Moreno, A.M.;Méndez-Vilas, A.;González-Martín, M.L.;Nuevo, M.J.;Bruque, J.M.;Garduño, E. and Pérez-Giraldo, C. (2002). Comparative Study of the Hydrophobicity of *Candida parapsilosis* 294 through Macroscopic and Microscopic Analysis. *Langmuir* **18**, 3639-3644.
- Gauwerky, K.;Borelli, C. and Korting, H.C. (2009). Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today* **14**, 214-222.

- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**, 122-143, table of contents.
- Gozalbo, D.;Gil-Navarro, I.;Azorin, I.;Renau-Piqueras, J.;Martinez, J.P. and Gil, M.L. (1998). The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* **66**, 2052-2059.
- Guggenheim, B.;Giertsen, E.;Schupbach, P. and Shapiro, S. (2001). Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* **80**, 363-370.
- Han, T.L.;Cannon, R.D. and Villas-Boas, S.G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* **48**, 747-763.
- Hawser, S.P. and Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* **62**, 915-921.
- Hazen, K.C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* **8**, 462-478.
- Hennen, C.R. (2009). Pharmacoeconomic evaluations of antifungal therapies. *Curr Med Res Opin* **25**, 1751-1758.
- Henriques, M.;Azeredo, J. and Oliveira, R. (2006a). *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci* **63**, 5-11.
- Henriques, M.;Azeredo, J. and Oliveira, R. (2006b). *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol* **32**, 217-226.
- Hoffman, M.P. and Haidaris, C.G. (1993). Analysis of *Candida albicans* adhesion to salivary mucin. *Infect Immun* **61**, 1940-1949.
- Hogan, D.A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* **5**, 613-619.

- Hogan, D.A.;Vik, A. and Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* **54**, 1212-1223.
- Humphrey, S.P. and Williamson, R.T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* **85**, 162-169.
- Jain, N.;Kohli, R.;Cook, E.;Gialanella, P.;Chang, T. and Fries, B.C. (2007). Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1697-1703.
- Jayatilake, J.A.;Samaranayake, Y.H.;Cheung, L.K. and Samaranayake, L.P. (2006). Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* **35**, 484-491.
- Joachim, H. and Polayes, S. (1940). Subculture endocarditis and systemic mycosis (monilia). *JAMA* **115**, 205-208.
- Jones, D.S.;Schep, L.J. and Shepherd, M.G. (1995). The effect of cetylpyridinium chloride (CPC) on the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in vitro. *Pharm Res* **12**, 1896-1900.
- Klotz, S.A. (1994). The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol Lett* **120**, 257-262.
- Klotz, S.A.;Pendrak, M.L. and Hein, R.C. (2001). Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. *Microbiology* **147**, 3159-3164.
- Kossoff, E.H.;Buescher, E.S. and Karlowicz, M.G. (1998). Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J* **17**, 504-508.
- Krcmery, V. and Barnes, A.J. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**, 243-260.

- Kruppa, M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**, 1-10.
- Kuhn, D.M.;Mikherjee, P.K.;Clark, T.A.;Pujol, C.;Chandra, J.;Hajjeh, R.A., *et al.* (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* **10**, 1074-1081.
- Kumar, V.G.;Latha, R.;Vedhagiri, K.;Sathiamoorthi, T.;Jayarani, G.;Sasikala, R., *et al.* (2009). Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* **19**, 3-10.
- Lamfon, H.;Porter, S.R.;McCullough, M. and Pratten, J. (2003). Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* **111**, 465-471.
- Larone, D. (2002) *Medically Important Fungi; A Guide to Identification* Washington, ASM Press.
- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **52**, 197-205.
- Luo, G.;Samaranayake, L.P. and Yau, J.Y. (2001). *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* **39**, 2971-2974.
- Makrides, H.C. and MacFarlane, T.W. (1983). An investigation of the factors involved in increased adherence of *C. albicans* to epithelial cells mediated by *E. coli*. *Microbios* **38**, 177-185.
- Malic, S.;Hill, K.E.;Ralphs, J.R.;Hayes, A.;Thomas, D.W.;Potts, A.J. and Williams, D.W. (2007). Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 188-194.
- Manns, J.M.;Mosser, D.M. and Buckley, H.R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**, 5154-5156.
- Marsh, P.D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* **38**, 204-211.

- Marsh, P.D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6 Suppl 1**, S14.
- Marsh, P.D. (2009). Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent* **30**, 76-78, 80, 83-77; quiz 88, 90.
- Martins, M.;Henriques, M.;Azeredo, J.;Rocha, S.M.;Coimbra, M.A. and Oliveira, R. (2007). Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell* **6**, 2429-2436.
- Martins, M.;Henriques, M.;Azeredo, J.;Rocha, S.M.;Coimbra, M.A. and Oliveira, R. (2010a). *Candida* species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells. *J Basic Microbiol* **50 Suppl 1**, S89-97.
- Martins, M.;Henriques, M.;Ribeiro, A.P.;Fernandes, R.;Goncalves, V.;Seabra, A., *et al.* (2010b). Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol* **27**, 119-124.
- Messer, S.A.;Jones, R.N. and Fritsche, T.R. (2006). International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol* **44**, 1782-1787.
- Meurman, J.;Siikala, E.;Richardson, M. and Rautemaa, R. (2007) Non-*Candida albicans* *Candida* yeasts of the oral cavity. In *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, A. Méndez-Vilas (ed.). Badajoz, Formatex, pp. 719-731.
- Minagi, S.;Miyake, Y.;Inagaki, K.;Tsuru, H. and Suginaka, H. (1985). Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* **47**, 11-14.
- Mishra, N.N.;Prasad, T.;Sharma, N.;Payasi, A.;Prasad, R.;Gupta, D.K. and Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**, 201-235.

- Miyake, Y.;Fujita, Y.;Minagi, S. and Suginaka, H. (1986). Surface hydrophobicity and adherence of *Candida* to acrylic surfaces. *Microbios* **46**, 7-14.
- Naglik, J.;Albrecht, A.;Bader, O. and Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**, 915-926.
- Navarathna, D.H.;Hornby, J.M.;Krishnan, N.;Parkhurst, A.;Duhamel, G.E. and Nickerson, K.W. (2007). Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**, 1609-1618.
- Negri, M.;Martins, M.;Henriques, M.;Svidzinski, T.I.;Azeredo, J. and Oliveira, R. (2010). Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* **169**, 175-182.
- Nett, J. and Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* **9**, 340-345.
- Nosek, J.;Holesova, Z.;Kosa, P.;Gacser, A. and Tomaska, L. (2009). Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* **55**, 497-509.
- Noumi, E.;Snoussi, M.;Hentati, H.;Mahdouani, K.;del Castillo, L.;Valentin, E., *et al.* (2010). Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia* **169**, 269-278.
- O'Sullivan, J.M.;Cannon, R.D.;Sullivan, P.A. and Jenkinson, H.F. (1997). Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiology* **143** (Pt 2), 341-348.
- O'Sullivan, J.M.;Jenkinson, H.F. and Cannon, R.D. (2000). Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology* **146** (Pt 1), 41-48.
- Panagoda, G.J.;Ellepola, A.N. and Samaranayake, L.P. (1998). Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* **106**, 736-742.

- Panagoda, G.J.;Ellepola, A.N. and Samaranayake, L.P. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* **44**, 29-35.
- Peters, B.M.;Jabra-Rizk, M.A.;Scheper, M.A.;Leid, J.G.;Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 493-503.
- Pfaller, M.A.;Diekema, D.J.;Jones, R.N.;Messer, S.A.;Hollis, R.J. and Group, S.P. (2002). Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *Journal of clinical microbiology* **40**, 852-856.
- Price, M.F.;Wilkinson, I.D. and Gentry, L.O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **20**, 7-14.
- Ramage, G.;Martinez, J.P. and Lopez-Ribot, J.L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**, 979-986.
- Ramage, G.;Mowat, E.;Jones, B.;Williams, C. and Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol* **35**, 340-355.
- Ramage, G.;Saville, S.P.;Thomas, D.P. and Lopez-Ribot, J.L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* **4**, 633-638.
- Ramage, G.;Tomsett, K.;Wickes, B.L.;Lopez-Ribot, J.L. and Redding, S.W. (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**, 53-59.
- Romani, L.;Bistoni, F. and Puccetti, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* **10**, 508-514.
- Rosan, B. and Lamont, R.J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes Infect* **2**, 1599-1607.

- Rossignol, T.;Logue, M.E.;Reynolds, K.;Grenon, M.;Lowndes, N.F. and Butler, G. (2007). Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2304-2312.
- Ruchel, R. (1999). [Proteinases of pathogenic fungi]. *Mycoses* **42 Suppl 1**, 48-52.
- Schaller, M.;Mailhammer, R.;Grassl, G.;Sander, C.A.;Hube, B. and Korting, H.C. (2002). Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* **118**, 652-657.
- Schenkels, L.C.;Veerman, E.C. and Nieuw Amerongen, A.V. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* **6**, 161-175.
- Schmid, J.;Hunter, P.R.;White, G.C.;Nand, A.K. and Cannon, R.D. (1995). Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens. *J Clin Microbiol* **33**, 2920-2926.
- Shirtliff, M.E.;Peters, B.M. and Jabra-Rizk, M.A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **299**, 1-8.
- Silva, S.;Henriques, M.;Martins, A.;Oliveira, R.;Williams, D. and Azeredo, J. (2009a). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* **47**, 681-689.
- Silva, S.;Henriques, M.;Oliveira, R.;Azeredo, J.;Malic, S.;Hooper, S.J. and Williams, D.W. (2009b). Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* **117**, 669-675.
- Silva, S.;Negri, M.;Henriques, M.;Oliveira, R.;Williams, D.W. and Azeredo, J. (2011a). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* **19**, 241-247.
- Silva, S.;Negri, M.;Henriques, M.;Oliveira, R.;Williams, D.W. and Azeredo, J. (2011b). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*.

- Skillman, L.C.;Sutherland, I.W. and Jones, M.V. (1998). The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J Appl Microbiol* **85 Suppl 1**, 13S-18S.
- Sudbery, P.;Gow, N. and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**, 317-324.
- Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461-469.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.
- Thein, Z.M.;Samaranayake, Y.H. and Samaranayake, L.P. (2007). Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* **52**, 1200-1208.
- Thein, Z.M.;Seneviratne, C.J.;Samaranayake, Y.H. and Samaranayake, L.P. (2009). Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses* **52**, 467-475.
- Trofa, D.;Gacser, A. and Nosanchuk, J.D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 606-625.
- Tsang, C.S.;Chu, F.C.;Leung, W.K.;Jin, L.J.;Samaranayake, L.P. and Siu, S.C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol* **56**, 1393-1398.
- Watanabe, T.;Takano, M.;Murakami, M.;Tanaka, H.;Matsuhisa, A.;Nakao, N., *et al.* (1999). Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* **145 (Pt 3)**, 689-694.
- Werner, H. (1966). Untersuchungen uber die Lipase-Aktivitat bei Hefen und Hefeahnlichen Pilzen. *Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1 Abt Orig. A* **200**, 113.
- Williams, D. and Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* **3**.

- Williams, D.W.;Kuriyama, T.;Silva, S.;Malic, S. and Lewis, M.A. (2011). Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000* **55**, 250-265.
- Wyk, C.v. and Steenkamp, V. (2011). Host factors affecting oral candidiasis. *South Afr J Epidemiol Infect* **26**, 18-21.
- Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of Candida species. *J Microbiol Immunol Infect* **36**, 223-228.
- Yao, Y.;Berg, E.A.;Costello, C.E.;Troxler, R.F. and Oppenheim, F.G. (2003). Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* **278**, 5300-5308.
- Zaugg, C.;Borg-Von Zepelin, M.;Reichard, U.;Sanglard, D. and Monod, M. (2001). Secreted aspartic proteinase family of Candida tropicalis. *Infect Immun* **69**, 405-412.
- Zhu, W. and Filler, S.G. (2010). Interactions of Candida albicans with epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**, 273-282.

ANEXOS

ANEXOS

A.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA O DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS E POLISSACÁRIDOS

Para extrapolar o valor de concentração de proteínas e polissacáridos presentes na matriz extracelular dos biofilmes simples e mistos, foi necessário construir uma curva de calibração. Assim, a Figura A.1.1. e Figura A.1.2. apresentam os valores de absorvância a 562 nm e 490 nm, em função dos valores da albumina de soro de bovino (ASB) e glucose em $\mu\text{g/ml}$, para determinar proteínas e polissacáridos, respectivamente.

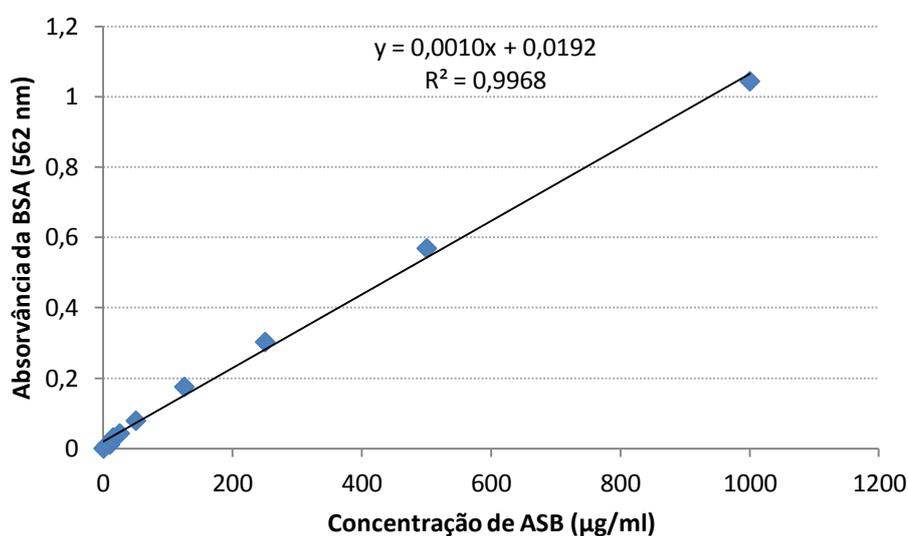


Figura A.1. 1. Curva de calibração para determinar proteínas na matriz extracelular de biofilmes (ASB como standard)

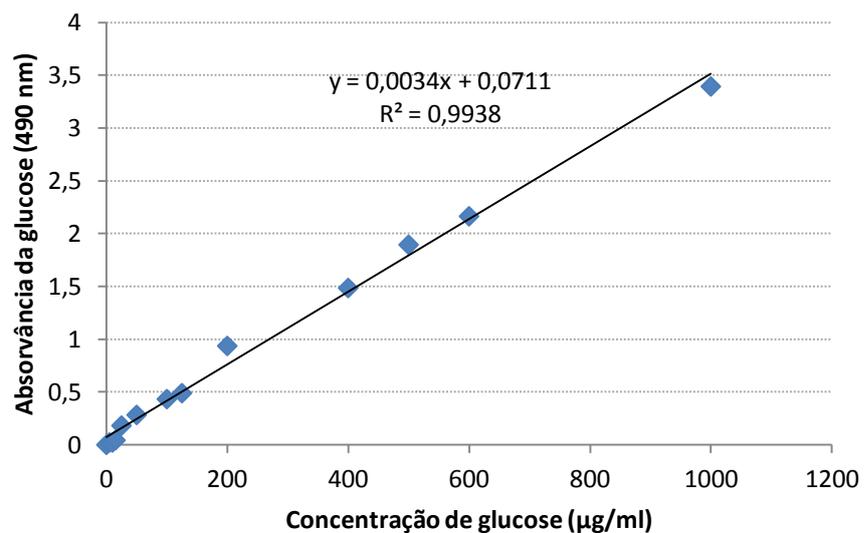


Figura A.1. 2. Curva de calibração para determinar polissacáridos na matriz extracelular de biofilmes (glucose como standard)
