

KAREN REGINA CARIM DA COSTA

**Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de
Candida sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Celia Candido

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Karen Regina Carim da.

Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral. Ribeirão Preto, 2009.

122 f.: il.; 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Candido, Regina Celia.

Co-orientador: Baruffi, Marcelo Dias

1. *Candida*. 2. adesão. 3. protease. 4. genes de virulência.
5. variabilidade genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karen Regina Carim da Costa

Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Aprovado em: ___/___/2009

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus queridos pais, Regina Carim (*in memoriam*) e Sérgio Costa, por todo amor, carinho e dedicação. Seus princípios me guiaram nesta caminhada. Amo vocês!

Ao meu amado Igor, companheiro de todas as horas e que partilhou comigo as vitórias e frustrações durante a realização deste trabalho. A certeza do nosso amor me fez chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Celia Candido, pela orientação e amizade compartilhada durante estes anos de convivência. Obrigada por acreditar em mim! Sempre serei grata pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, co-orientador do presente trabalho, pela atenção, disponibilidade e oportunidade de ampliar meu horizontes.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Sicchiroli Lavrador pelo auxílio na análise estatística.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) pela oportunidade de aprendizado.

À Joseane Cristina Ferreira, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pela amizade e apoio técnico na execução de alguns experimentos.

À Ludmilla Tonani, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Solange Aparecida Bocardo, funcionária do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pela amizade, carinho e auxílio laboratorial.

À Marlise Montes, técnica do Laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP, pelo apoio técnico na execução dos experimentos de adesão.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Henrique Theodoro, Rosana Florêncio, Ana Turatti e Rossana Ribeiro, pela atenção em todos os momentos.

Aos amigos, Reginaldo dos Santos Pedroso, Kátia Leston Bacelo e Manuela Luiza Toti Rodrigues que estiveram comigo no laboratório durante esta jornada.

À Thalita Riul, pela disponibilidade e dicas com a técnica de ELISA.

À Zita Gregório, pela amizade, carinho e incentivo durante a pós-graduação.

À família Taveira (Tia Irecê, Andréa e Adriana), a qual constituiu nossa família amazonense em Ribeirão Preto, pelo amor, carinho e atenção.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de doutorado.

“Ama e faz o que quiseres. Se calares, calarás com amor; se gritares, gritarás com amor; se corrigires, corrigirás com amor; se perdoares, perdoarás com amor. Se tiveres o amor enraizado em ti, nenhuma coisa senão o amor serão os teus frutos”

Santo Agostinho

RESUMO

COSTA, K. R. C. **Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral.** 2009. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O amplo espectro da candidíase e respectiva importância clínica da infecção impulsionam as pesquisas que visam esclarecer os mecanismos de patogenicidade e identificação dos fatores de virulência de *Candida* sp. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar através de testes fenotípicos e moleculares a capacidade de adesão, atividade de proteases e variabilidade genética de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A capacidade de adesão às glicoproteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina foi avaliada utilizando-se a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). A pesquisa de proteases foi realizada pelos métodos semiquantitativo, em placa de ágar com albumina bovina, e quantitativo, em solução-tampão com hemoglobina. A presença dos genes ALS2, ALS3, SAP1, SAP3 e PLB1 foi verificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os polimorfismos intra e interespecies pela técnica do DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD). Todos os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram ligação a laminina e a fibronectina imobilizadas. Os isolados Ca33 e Ct13 apresentaram índice de adesão relativa significativamente maiores em relação aos demais isolados para as duas glicoproteínas ($p < 0,001$). A atividade de proteases foi observada em todos os isolados de *C. albicans* tanto pelo método semiquantitativo quanto pelo método quantitativo. A atividade de proteases dos isolados de *C. tropicalis* foi melhor evidenciada através do método quantitativo. A amplificação de fragmentos dos genes relacionados à adesão (ALS2 e

ALS3), atividade de proteases (SAP1 e SAP3) e fosfolipase (PLB1) foi observada em todos os isolados de *C. albicans*. Os isolados de *C. tropicalis* não apresentaram produtos de amplificação para os genes pesquisados. A variabilidade genética avaliada pela técnica do RAPD revelou uma população heterogênea em ambas as espécies. No entanto, *C. tropicalis* apresentou maior diversidade genética que *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida*, adesão, protease, genes de virulência, variabilidade genética.

ABSTRACT

COSTA, K. R. C. **Phenotypic and molecular aspects of adhesion and enzymatic activity of *Candida* sp recovered from patients with clinical signs of oral candidiasis.** 2009. 122 f. Thesis (Doctoral Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The wide spectrum of candidiasis and its clinical importance encourage the research with the purpose of clarifying the mechanisms of pathogenicity and identification of virulence factors of *Candida* sp. Therefore, the aim of this study was to verify through phenotypic and molecular assays the adhesion, enzymatic activity e genetic variability of clinical *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates. The adhesion ability to the extracellular matrix glycoproteins laminin and fibronectin was evaluated using the ELISA technique (Enzyme-linked immunosorbent assay). The research of proteases was carried out in agar plate containing bovine albumin and through a quantitative method in buffer solution containing hemoglobin. The presence of ALS2, ALS3, SAP1, SAP3 and PLB1 was verified using polymerase chain reaction (PCR) and intra and interspecies polymorphisms through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. All *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates binded to immobilized laminin and fibronectin. Ca33 and Ct13 isolates had relative adhesion index significantly higher than the other isolates for both glycoproteins ($p < 0,001$). Protease activity was observed in all isolates of *C. albicans* using either the semi-quantitative or quantitative assay. The protease activity of *C. tropicalis* was better detected through the quantitative assay. The amplification of genes related to adhesion (ALS2 and ALS3), proteases (SAP1 and SAP3) and phospholipase (PLB1) activity using PCR was observed in all *C. albicans* strains. PCR amplification products were not observed in *C. tropicalis* isolates

for the researched genes. The genetic variability by RAPD revealed an heterogeneous population in both species. Nevertheless, *C. tropicalis* presented higher genetic variability than *C. albicans* strains.

Keywords: *Candida*, adhesion, protease, virulence genes, genetic variability.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ALS	genes da sequência tipo-aglutinina
ASD	ágar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEC	célula do epitélio bucal
BECs	células do epitélio bucal
BHI	infusão cérebro-coração
BSA	albumina bovina
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dntp	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GPI	proteínas glicosilfosfatidilinositol
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HWP1p	proteína de parede da hida 1
IAR	índice de adesão relativa
IR-PCR	<i>inter repeat-PCR</i>
ITS	regiões intergênicas espaçadoras
MVSP	<i>Multi Variate Statistical Package</i>
OPD	dicloreto de o-fenilenodiamina
pb	pares de base
PBS	solução-tampão salina fosfato

PCR	reação em cadeia da polimerase
PFGE	eletroforese em campo pulsado
PIR	proteínas com repetições internas
PLB	gene da fosfolipase B
Prz	atividade enzimática de proteinase
PZ	zona de precipitação
q.s.p.	quantidade suficiente para
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
SAP	gene das aspartil proteases
SDS	dodecil sulfato de sódio
Sj	coeficiente de <i>Jaccard</i>
UPGMA	média aritmética não ponderada
YCB	yeast carbon base
YPD	caldo extrato de levedura

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Candida* e microbiota oral

A colonização das superfícies externa e interna dos seres humanos tem início ao nascimento pela exposição a uma variedade de microrganismos presentes no ambiente e nos outros seres humanos. No entanto, cada superfície possui propriedades físicas e biológicas próprias, levando a aquisição e desenvolvimento natural de uma microflora diversificada e ao mesmo tempo característica de cada sítio anatômico, que normalmente convive em harmonia com o hospedeiro (MARSH; MARTIN, 1992). Entre os sítios anatômicos, a cavidade bucal é um dos mais populosos e, com o uso de métodos moleculares, mais de 500 espécies de microrganismos já foram identificadas colonizando a superfície oral (TAKAHASHI, 2005). Os fungos constituem uma pequena parte desta microbiota, da qual a maior proporção é formada por leveduras do gênero *Candida* (MARSH; MARTIN, 1992; SIQUEIRA; BILGE, 2004). Dentre as aproximadamente 200 espécies do gênero *Candida*, várias já foram isoladas da cavidade bucal e oito delas são reconhecidas como agentes de processos patológicos: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* (CANNON et al., 1995; SEGAL, 2005).

A partir de observações sobre a variação individual e populacional na prevalência de *Candida* sp e do fato de que nem todos os indivíduos possuem essas leveduras na boca, Kleinegger et al. (1996) concluíram que, possivelmente, barreiras naturais existentes nas superfícies mucosas e nos fluidos orgânicos, impedem a colonização nos indivíduos não portadores. Estas

barreiras são relativamente eficazes na dependência de fatores relacionados à idade, sexo, tabagismo, dieta, uso de medicamentos, condições sistêmicas e estado imune do hospedeiro (HÖFLING et al., 2004).

A complexidade de interações entre *Candida* e o hospedeiro sugerem inúmeros mecanismos de adaptação deste fungo a diversos sítios e, em muitos casos, o microrganismo convive com o hospedeiro sem provocar doença (HOYER et al., 2001). No entanto, as leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas e a existência dos mesmos como comensal ou patógeno depende da habilidade em modular a expressão dos fatores de virulência em resposta a alterações locais associadas à competência do sistema imune do hospedeiro (SOLL, 2002).

1.2 Fatores de virulência

A virulência de leveduras é uma propriedade dependente de vários fatores como: adesão às células do hospedeiro, formação de hifas, plasticidade fenotípica e produção de enzimas hidrolíticas, principalmente fosfolipases e proteases (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005). Dentre as espécies do gênero, *C. albicans* é considerada a mais virulenta (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Os patógenos fúngicos são capazes de aderir a diferentes tipos celulares e de interagir com componentes da matriz extracelular do hospedeiro. A aderência é o primeiro passo no estabelecimento da infecção e parece ser modulada por uma ampla variedade de adesinas que são expressas na

superfície da parede celular (MENDES-GIANNINI et al., 2005; TRONCHIN et al., 2008).

A parede celular de *C. albicans* é organizada em várias camadas compostas principalmente de polissacarídeos constituídos dos carboidratos D-glicose, N-acetil-D-glicosamina e D-manose (KLIS; DE GROOT; HELLINGWERF, 2001; MASUOKA, 2004). Qualquer camada pode ser considerada como uma zona de enriquecimento, uma vez que esta estrutura é altamente dinâmica e capaz de modular a própria composição e organização de acordo com as condições do ambiente (CHAFFIN et al., 1998). A maioria das proteínas presentes na parede celular da levedura são manoproteínas que representam entre 30 a 50% do peso seco (BOWMAN; FREE, 2006; KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KIL, 1999). Duas classes principais de proteínas da parede celular são descritas: as proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) representadas pelas adesinas Als1p e Als3p, que estão localizadas na camada externa e ligadas principalmente a β -glucanas por sua âncora. A outra classe são as proteínas codificadas pelos membros da família de genes PIR, proteínas com repetições internas, que estão uniformemente distribuídas através da camada interna da parede celular e ligadas as β -1,3-glucanas (TRONCHIN et al., 2008).

Vários estudos clínicos têm sugerido um elo entre adesão e colonização *in vivo* e subsequente invasão, indicando que o potencial invasivo de *Candida* sp parece refletir a habilidade relativa de cada espécie em aderir ao tecido hospedeiro (HOSTETTER, 1994). Recentemente, verificou-se uma associação positiva entre o grau de virulência e a habilidade de formar biofilmes (YANG, 2003). *C. albicans* adere a vários biomateriais, como cateteres, próteses ou

implantes médicos, onde a levedura forma biofilmes que contribuem para a colonização dos tecidos (COSTA; CANDIDO, 2009; HAWSER; DOUGLAS, 1994).

Os mecanismos de aderência a diversos tipos ou superfícies celulares nas espécies de *Candida* são complexos e ainda não foram completamente elucidados. Segundo Manfredi et al. (2006), a aderência é obtida pela combinação de mecanismos específicos representados pela interação ligante receptor e não específicos pela agregação, hidrofobicidade da superfície celular e interações eletrostáticas. De maneira geral, adesinas são biomoléculas que promovem a aderência de *C. albicans* às células ou ligantes do hospedeiro.

As proteínas de sequência tipo-aglutinina (Als) são adesinas amplamente expressas em *C. albicans* (SUNDSTRÖM, 2002; FILLER, 2006). Estas adesinas são codificadas por uma família de genes ALS composta de nove integrantes distintos no genoma de *C. albicans*. Dentre todas as proteínas Als, Als1p, Als3p e Als5p têm sido extensivamente caracterizadas e trabalhos recentes sugerem que estas proteínas exercem um papel principal na aderência de *C. albicans* às células do hospedeiro. Als1p e Als3p foram descritas em ligações ao endotélio e células epiteliais (LOZA et al., 2004), enquanto Als5p liga-se às proteínas de matriz extracelular (GAUR; KLOTZ, 1997). Cheng et al. (2005) observaram que a expressão de genes ALS em isolados clínicos e oriundos de candidíase experimental é dependente do local da infecção. Durante o primeiro estágio da infecção na mucosa oral, a proteína Als1p é fundamental para a aderência de *C. albicans* (KAMAI et al., 2002).

Outra importante adesina de *C. albicans* é a Hwp1p, proteína de parede da hifa 1, encontrada exclusivamente na superfície do tubo germinativo e que regula ligações fortes as células do epitélio bucal (CHAFFIN et al., 1998). Em um modelo *in vivo* utilizando cateter venoso, os mutantes nulos do gene HWP1 foram incapazes de formar biofilme, produzindo apenas microcolônias de leveduras no lúmen do cateter (NOBILE et al., 2006). Segundo Tronchin et al. (2008), Hwp1 é a primeira proteína de superfície celular de *C. albicans* reconhecida como essencial para a formação do biofilme *in vivo*.

As proteínas de matriz extracelular (ECM) formam uma rede complexa que fornece múltiplos sítios para a fixação de microrganismos. Nos mamíferos, as moléculas envolvidas na aderência às proteínas ECM são receptores altamente conservados, geralmente membros da família das integrinas que regulam interações matriz-célula e célula-célula. Entre as proteínas ECM, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, entactina e vitronectina parecem estar envolvidos na aderência de *C. albicans* (TRONCHIN et al., 2008).

Lamininas são glicoproteínas da membrana basal que regulam diferentes funções celulares, como a integridade estrutural, aderência, motilidade, crescimento, diferenciação e apoptose (PÄRNÄNEN et al., 2008). Estudos *in vitro* mostraram que as lamininas contribuem na patogênese da infecção retendo o fungo no tecido hospedeiro e mediando a aderência aos ligantes do hospedeiro (CHAFFIN et al., 1998). Bouchara et al. (1990) relataram a ligação do tubo germinativo de *C. albicans* a laminina. No mesmo ano, a capacidade de células leveduriformes em aderir a laminina imobilizada foi demonstrada (KLOTZ, 1990).

Fibronectina é uma glicoproteína dimérica multifuncional de alto peso molecular que pode ser encontrada no plasma na forma solúvel e na forma insolúvel como parte dos componentes de matriz extracelular (SKERL; CALDERONE, 1984). Esta glicoproteína pode mediar a aderência de *C. albicans* as células do epitélio vaginal (KALO et al., 1988), porém a hidrofobicidade da superfície celular e a composição do meio de cultura afetam a capacidade de ligação (YAN et al., 1996). Os receptores de fibronectina detectados na parede celular tanto da levedura quanto do tubo germinativo são antigenicamente e funcionalmente relacionados ao receptor integrina $\alpha 5\beta 1$ humano para fibronectina (SANTONI et al., 1994). *C. glabrata* e *C. tropicalis* também exibem atividade com anticorpos anti- $\alpha 5$ (SANTONI et al., 1995).

A adesão dos conídios da fase leveduriforme e filamentosa do fungo patogênico *Sporothrix schenckii* a laminina, fibronectina, colágeno tipo II e fibrinogênio imobilizados foi avaliada por Lima et al. (1999) pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Os resultados indicaram que ambas as formas deste fungo podem aderir significativamente ($p < 0,05$) à estas proteínas ECM quando comparados aos resultados da adesão à albumina bovina, utilizada como agente de bloqueio.

Manfredi et al. (2006) avaliaram a capacidade de isolados clínicos de *Candida* oriundos de pacientes diabéticos e não diabéticos de aderir *in vitro* a fibronectina. Neste estudo, pérolas paramagnéticas foram recobertas com a proteína ECM e os sítios não específicos de ligação foram bloqueados com albumina bovina. O inóculo utilizado foi de 10^8 células/mL e o resultado expresso pelo número de células de *Candida* aderidas por pérola recoberta com fibronectina. Foram observadas diferenças significativas na capacidade de

adesão *in vitro* a fibronectina entre os isolados de pacientes diabéticos e não-diabéticos.

Recentemente, Caro et al. (2008) observaram que a laminina presente na superfície de células epiteliais pulmonares funciona como mediador na adesão dos conídios de *Paracoccidioides brasiliensis*. Houve significativa redução na aderência fúngica quando as células epiteliais foram pré-tratadas com anticorpo anti-laminina ou os conídios pré-incubados com laminina solúvel. A adesão dos conídios à laminina imobilizada foi observada e mostrou-se específica.

A capacidade de adesão às células do epitélio bucal (BEC) de 23 isolados de *Candida*, dos quais 12 *C. albicans* e 2 *C. tropicalis*, oriundos das fezes de pacientes com desordens digestivas foi avaliada por Biasoli, Tosello e Magaró (2002). Os resultados evidenciaram diferenças significativas na adesão dos isolados de *C. albicans* em relação aos de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, a capacidade de adesão entre estas espécies foi semelhante e discretamente menor que o observado em *C. albicans*.

A ação de determinados antifúngicos na capacidade de adesão de *Candida* também foi avaliada em alguns estudos descritos. Ellepola, Panagoda, Samaranayake (1999) conduziram um estudo para verificar a adesão diferentes espécies de *Candida* às BEC após exposição a nistatina. Após 1 h de exposição ao fármaco foi observada redução de 53% para *C. albicans*, 64% para *C. krusei* e *C. parapsilosis*, 65% para *C. guilliermondii* e 67% para *C. tropicalis* e *C. glabrata* em relação aos controles não expostos. A influência dos antifúngicos poliênicos na adesão de *C. albicans* e *C. glabrata* às células

HeLa *in vitro* foi avaliada por Dorocka-Bobkowska, Konopka e Düzgünes (2003). A anfotericina B, fármaco padrão ouro no tratamento de infecções fúngicas disseminadas, foi o mais eficaz contra as duas espécies, reduzindo a capacidade de adesão em 50 e 60%, respectivamente.

Lyon e Resende (2006a) avaliaram a capacidade de adesão de 20 isolados de *C. tropicalis*, 14 de *C. glabrata* e 8 de *C. parapsilosis* obtidas da cavidade bucal de pacientes usuários de prótese dental com e sem sinais de candidíase, antes e após exposição ao fluconazol. A metodologia que empregou BECs revelou que os isolados dos pacientes com sinais clínicos de candidíase aderiram intensamente à estas células em relação aos isolados dos pacientes sem sinais da doença. *C. albicans*, utilizada para comparação foi à espécie com maior capacidade de adesão, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. A exposição ao fluconazol reduziu a capacidade de adesão às BECs de todas as espécies de *Candida* avaliadas.

Okawa, Miyaguchi e Kobayashi (2008) avaliaram a adesão de 5 isolados de *C. tropicalis* a células HeLa juntamente com outros fatores de virulência para determinar o grau de patogenicidade destes isolados. Os resultados demonstraram que todas as *C. tropicalis* aderiram as células HeLa e, dentre os isolados avaliados, um apresentou capacidade de adesão significativamente maior que *C. albicans*, utilizada como controle.

Zeng et al. (2008) investigaram a capacidade de adesão às BECs e outros fatores de virulência de 112 isolados de *C. albicans* provenientes de pacientes com líquen plano oral (subtipos erosivo e não-erosivo) e de carreadores saudáveis. A capacidade de adesão dos isolados foi

significativamente maior no grupo com lesão. Neste grupo, as amostras do subtipo erosivo aderiram mais que as do não erosivo.

A capacidade de diferenciação entre as formas leveduriforme e filamentosa de maneira reversível é observada em muitos patógenos fúngicos humanos e a transição morfogênica entre estas formas é frequentemente estimulada pelo crescimento no hospedeiro e correlacionada com a invasão tecidual (GOW; BROWN; ODDS, 2002). De todas as espécies de *Candida*, somente *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam a capacidade de diferenciação reversível entre a forma leveduriforme e a filamentosa (CALDERONI; FONZI, 2001). Embora geralmente seja aceito que a forma leveduriforme é predominante no comensalismo (carreadores) e a forma filamentosa na penetração tecidual, ambas estão relacionadas ao comensalismo e a infecção (SOLL, 2002). Um exemplo típico é *C. glabrata*, que apesar da capacidade limitada de formar pseudohifas (CSANK; HAYNES, 2000), está frequentemente envolvida em infecções disseminadas por *Candida* (SANGLARD; ODDS, 2002; COLOMBO et al., 2007), indicando que a habilidade de formar filamentos não é essencial para a patogênese (GOW; BROWN; ODDS, 2002).

Dentre os vários genes envolvidos no processo de diferenciação das fases leveduriforme e filamentosa destacam-se EFG1, CPH1 e NRG1. No entanto, estes genes são co-regulados por outros genes que codificam fatores de virulência, como as proteases e as adesinas, garantindo então que a conversão morfológica ocorra quando atividades de degradação e adesinas forem detectadas (KUMAMOTO; VINCES, 2005).

A plasticidade fenotípica refere-se à alta capacidade que as colônias de *C. albicans* possuem de mudar o próprio fenótipo. Entretanto, a base do mecanismo da plasticidade fenotípica bem como o envolvimento deste fenômeno na virulência de *C. albicans* ainda não estão claros (YANG, 2003). Esta característica tem sido relacionada à virulência visto que recém isolados clínicos a apresentam em maior frequência que os isolados de micoteca. *C. albicans* pode em caráter reversível e em alta frequência mudar o seu fenótipo (HAYNES, 2001). Segundo alguns autores, a plasticidade fenotípica pode modular vários fatores de virulência, incluindo a transição levedura – hifa, aderência, sensibilidade a neutrófilos e oxidantes, secreção de proteases e sensibilidade a fármacos (SOLL, 2002).

O sistema de plasticidade fenotípica denominado “branco a opaco” de *C. albicans* foi descoberto em 1985, e é definido pela capacidade de células com mesmo genótipo em adotar diferentes morfologias celulares e coloniais (HULL; HEITMAN, 2002). Colônias brancas e lisas com células redondas a ovais podem mudar para colônias cinzas, opacas e planas com células alongadas ou reniformes. Células opacas possuem alta capacidade para colonizar a pele em modelos cutâneos, ao mesmo tempo essas células são menos virulentas que as células brancas em modelos animais de infecção sistêmica (KVAAL et al., 1999; MILLER; JOHNSON, 2002; SOLL, 1997; YANG, 2003).

Em 1965, Staib demonstrou a presença de uma protease em *C. albicans*. Posteriormente, Remold, Fasold e Staib (1968) purificaram essa enzima e demonstraram maior virulência das cepas proteolíticas em relação às

não-proteolíticas, em experimentos com cobaias, relatando a associação entre atividade enzimática e virulência de *C. albicans* pela primeira vez.

Com base no mecanismo catalítico, as proteases são classificadas em quatro classes: serinas, cisteínas, aspárticas e metalo proteases (MONOD et al., 2002; NAGLIK et al., 2004). As proteases aspárticas são isoladas de várias espécies fúngicas, entretanto alguns microrganismos, como *C. albicans*, adaptaram esta propriedade bioquímica para realizar funções especializadas durante o processo de infecção em humanos, animais e plantas (NAGLIK et al., 2004).

As aspartil proteases (Sap) de *C. albicans* são codificadas por dez genes. Após a descoberta do gene SAP1, mais 9 genes foram identificados e sequenciados. A família de genes SAP fornece um eficiente sistema proteolítico vital para o sucesso tanto no comensalismo quanto no desenvolvimento de infecções. Desse modo, tais enzimas podem permitir a aquisição de nutrientes pela proteólise de substratos do hospedeiro (HUBE; NAGLIK, 2001; ZAUGG et al., 2001).

A expressão das proteases é rigidamente controlada (NAGLIK et al., 1999). Desta forma, esses genes são expressos diferencialmente *in vivo*, de acordo com o tipo e o estágio do processo infeccioso, pois diferentes proteases são requeridas para agir sobre proteínas e tecidos específicos do hospedeiro (OLLERT et al., 1995; HUBE; NAGLIK, 2001; PICHOVÁ et al., 2001). Segundo Naglik et al. (2003), determinados genes SAP parecem ser essenciais durante as infecções mucosas (SAP1 a SAP3) e sistêmicas (SAP4 a SAP6). Tal fato também foi observado por Kalkanci et al. (2005) quando investigaram a

distribuição dos genes SAP entre diferentes isolados de *C. albicans* utilizando pares de *primers* específicos para cada SAP.

Estudos demonstram que as células leveduriformes de *C. albicans* expressam predominantemente os genes SAP1 a SAP3 enquanto na fase filamentosa predominam SAP4 a SAP6. A análise da expressão *in vitro* dos genes SAP revelou que em *C. albicans* o gene SAP2 é o mais expresso (NAGLIK et al., 2003; SCHALLER et al., 2005).

A regulação dos genes SAP resulta de mudanças no ambiente de crescimento, na transição morfológica de levedura para hifa e na presença de fenótipos alternativos. A expressão destes genes é um processo altamente regulado e interligado a uma complexa co-regulação da transcrição com outros fatores de virulência de *Candida* e com as múltiplas funções das proteases *in vivo*, conforme visto na Figura 1 (NAGLIK et al., 2004; SCHALLER et al., 2005).

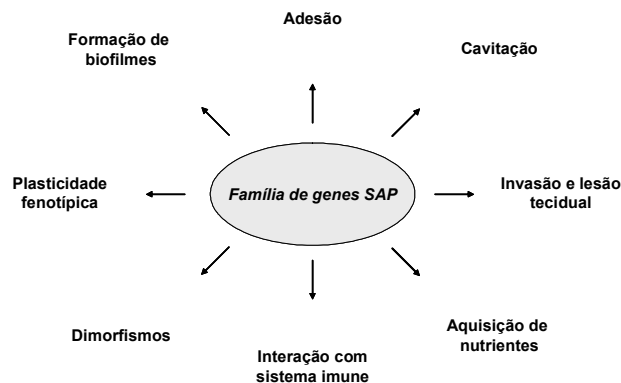


Figura 1. Expressão dos genes SAP e possíveis ações relacionadas a patogenicidade (adaptado de Naglik et al., 2004).

No gênero *Candida*, as proteases aspárticas são secretadas predominantemente por *C. albicans* embora genes homólogos tenham sido

identificados em outras espécies (HAYNES, 2001). Além de *C. albicans* e *C. tropicalis*, alguns isolados de *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* e *C. lipolytica* produzem proteases *in vitro*, embora a secreção *in vivo* seja questionável (HOEGL; OLLERT; KORTING, 1996). Estas proteases são capazes de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular (OLIVEIRA et al., 1998; PICHOVÁ et al., 2001). A degradação das proteínas de matriz extracelular, como laminina, fibronectina e mucina, é realizada em particular pelos produtos do gene SAP2, auxiliando na aderência da levedura às células do epitélio bucal (MANFREDI et al., 2006). A produção de proteases aspárticas está associada à habilidade para aderir e colonizar tecidos do hospedeiro (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999) e parece estar envolvida na invasão e destruição tecidual (YANG, 2003). Com relação a candidíase bucal, o papel destas proteases no processo da doença permanece pouco conhecido (KURIYAMA; WILLIAMS; LEWIS, 2003).

In vitro, a produção de proteases é observada em meios de cultura contendo proteína exógena como única fonte de nitrogênio. A albumina bovina (BSA) é mais utilizada, porém as proteases podem ser estimuladas por outras proteínas ou misturas de peptídeos como, por exemplo, peptona e triptona (LERNER; GOLDMAN, 1993; DÓSTAL et al., 2003). A técnica clássica para a pesquisa de proteases em leveduras do gênero *Candida* foi descrita por Rüchel, Tegeller, Trost (1982), a qual utiliza BSA como fonte de nitrogênio e a produção de proteases é revelada pela formação de um halo de hidrólise translúcido ao redor da colônia.

O nível de atividade das exoenzimas no laboratório geralmente é avaliado através de uma unidade denominada de zona de precipitação (PZ) que é razão entre o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $PZ = dc / dcp$. A amostra produtora da enzima forma um halo ao redor do inóculo. De acordo com esse sistema a atividade enzimática é considerada alta quando PZ é $\leq 0,63$, moderada no intervalo $0,64 \leq PZ \leq 0,99$ e quando PZ é igual a 1, a amostra não apresentou atividade da enzima pesquisada (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

Silva (1999) analisando amostras de leveduras isoladas da mucosa bucal de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e de um grupo de indivíduos clinicamente saudáveis, observou que todas as amostras estudadas, independentemente do grupo, apresentaram forte atividade proteolítica, com PZ variando de 0,11 a 0,60, sem diferença estatística entre os grupos. A alta atividade da enzima proteinase também foi observada por Penha et al. (2000) em isolados bucais de *C. albicans* de pacientes totalmente desdentados e com estomatite protética. Costa et al. (2009) não observaram diferenças significativas no nível de atividade da enzima proteinase entre isolados orais de *C. albicans* e *C. tropicalis* quando avaliaram o comportamento das duas espécies utilizando meio sólido contendo BSA como única fonte de nitrogênio.

Com o propósito de ampliar a detecção da atividade enzimática de outras espécies de *Candida* utilizando um método semiquantitativo, Dóstal et al. (2003) avaliaram um ágar suplementado com *yeast carbon base* (YCB), hemoglobina bovina e azul de bromofenol. Neste meio os isolados proteolíticos formaram halo amarelado ao redor da colônia. Todas as amostras de

C. albicans, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* cresceram no meio de cultura proposto. A atividade proteolítica foi detectada somente nos isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Hamal et al. (2004) avaliaram a atividade de proteases de espécies *Candida* isoladas de diferentes sítios anatômicos. O ensaio foi realizado no meio descrito por Dóstal et al. (2003) e considerado positivo na presença de uma zona de clarificação ao redor da colônia. Todas as 250 amostras de *C. albicans*, 146 de *C. parapsilosis* e a maioria (97%) das *C. tropicalis* apresentaram atividade proteolítica. Os isolados de *C. albicans* foram mais proteolíticos em pH 3,5 enquanto os de *C. parapsilosis* em pH 4,5. Com *C. tropicalis*, a produção de proteases foi observada nos dois valores de pH avaliados sem diferenças significativas.

Kuriyama, Williams e Lewis (2003) verificaram *in vitro* a atividade de proteases de 164 *C. albicans* recuperadas de indivíduos com diferentes tipos de lesão bucal e de carreadores saudáveis por método quantitativo. As amostras do grupo com lesão foram significativamente mais proteolíticas que as do grupo de carreadores. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade proteolítica das três formas de candidíase bucal avaliadas.

Lyon e Resende (2006b) determinaram a atividade de proteases de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de usuários de prótese com e sem lesão empregando duas metodologias. O método quantitativo verificou a diferença nos valores de absorvância/mL (OD/mL) de 100 µL de sobrenadante de cultura em caldo extrato de levedura (YPD) acrescidos de 900 µL de solução-tampão citrato de sódio e 0,2% de BSA na presença e ausência de

pepstatina A, um inibidor de proteases. Na ocasião foram observadas diferenças significativas na média de OD/mL entre os grupos avaliados.

A atividade proteolítica de 18 isolados de *Candida* sp, incluindo 2 de *C. albicans* e 6 de *C. tropicalis*, obtidos da cavidade bucal de indivíduos senis foi avaliada através de método semiquantitativo e quantitativo por Furlaneto-Maia et al. (2008). Os autores relataram apenas que ocorreram variações na atividade proteolítica dos isolados entre as metodologias utilizadas.

O termo fosfolipases refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que possuem a habilidade de hidrolisar um ou mais ésteres ligados a glicerofosfolipídios. Embora o substrato de todas as fosfolipases sejam os fosfolipídios, cada enzima tem a capacidade de quebrar uma ligação éster específica. Desta maneira, a classificação por letras A, B, C e D é utilizada para diferenciação das enzimas e indicar a ligação éster alvo na molécula de fosfolipídio. Muitos estudos têm considerado as fosfolipases como um importante fator de virulência em protozoários, bactérias e fungos (GHANNOUM, 2000). A produção de fosfolipases em grandes quantidades está relacionada a um alto grau de patogenicidade, aumento da aderência às células do hospedeiro e elevado percentual de mortalidade em modelos animais (IVANOVSKA, 2003).

Banno, Yamada e Nozawa (1985) detectaram a presença da fosfolipase B em filtrados de cultura de *C. albicans* e relataram que a faixa de pH 4,0 – 5,0 é ótima para a atividade enzimática. Para os autores, esta é a principal classe de fosfolipases secretada pelas linhagens patogênicas de *C. albicans*. A fosfolipase B é codificada por dois genes PLB1 e PLB2. O gene PLB1 parece ser o mais importante para atividade de fosfolipase (LEIDICH et al., 1998;

SUGIYAMA et al., 1999). No entanto, Ghannoum (2000) relatou que cepas deficientes de PLB1 produzem quantidades residuais da enzima.

A enzima fosfolipase B1 de *C. albicans* é secretada durante a invasão do trato gastrointestinal de camundongos e, portanto, mutantes deficientes do gene PLB1 apresentam virulência significativamente atenuada tanto em modelo intragástrico de camundongos jovens quanto no modelo intravenoso de candidíase murina (GHANNOUM, 2000; LEIDICH et al., 1998). A reintrodução do gene PLB1 funcional em mutantes nulos restabelece a virulência a níveis similares aos observados na cepa parental (MUKHERJEE et al., 2001). Amostras de soro de pacientes com infecções sistêmicas por espécies de *Candida* reagiram com fosfolipase B purificada, indicando que a mesma é produzida em humanos (IBRAHIM et al., 1995).

Em 1982, Price, Wilkinson e Gentry descreveram um método prático para a detecção de fosfolipases de *C. albicans*. Os autores sugeriram a incorporação da gema do ovo, substrato com grande quantidade de fosfolipídeos, ao meio ágar Sabouraud dextrose (ASD). Os isolados de *Candida* produtores de fosfolipases apresentaram um halo opaco em torno das colônias, o qual seria originado provavelmente pela formação de complexos entre o cálcio e os ácidos graxos provenientes da ação das fosfolipases nos fosfolipídeos da gema de ovo. O método tornou-se tradicional para a determinação da atividade enzimática de fosfolipases em isolados de *C. albicans* (GHANNOUM, 2000). Segundo Ibrahim et al. (1995), a fosfolipase B é a principal classe de fosfolipase detectada pelo método da placa contendo a gema de ovo como substrato. Entretanto, para alguns pesquisadores, devido à gema de ovo conter substratos também para as enzimas lipases, que

degradam triglicerídeos, o método não é específico, devendo ser utilizado apenas para um rastreamento inicial dos isolados de *Candida* (GHANNOUM, 2000).

A triagem de 41 isolados de *Candida* para a produção de fosfolipase utilizando o ensaio em placa com ágar gema de ovo, demonstrou que 79% dos isolados de *C. albicans* apresentaram atividade enzimática, enquanto que nenhum dos isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* mostraram atividade da enzima fosfolipase (SAMARANAYAKE; RAESIDE; MACFARLANE, 1984). Recentemente, Fotedar e Al-Hedaithy (2005) realizaram pesquisa de fosfolipase em 87 isolados clínicos de *C. dubliniensis*, após 7 dias de incubação no meio ágar fosfolipase e relataram ausência do halo opaco ao redor das colônias, ou seja, os isolados não apresentaram a atividade da enzima.

Em amostras de *C. albicans* isoladas a partir do biofilme de próteses dentais, Candido (2000) observou que em 77% delas a enzima fosfolipase foi produzida em diferentes níveis de atividade. Kurnatowska (1998) verificou que todos os isolados de *C. albicans* de pacientes com estomatite protética apresentaram alta atividade da enzima fosfolipase ($PZ \leq 0,63$). A atividade desta enzima foi maior entre as amostras de *C. albicans* isoladas da boca de pacientes com AIDS do que daquelas isoladas de pacientes clinicamente saudáveis (SILVA, 1999). Todos os 239 isolados de *C. albicans* da cavidade bucal e vaginal de mulheres portadoras ou não do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram produtores de fosfolipase, no entanto o nível da atividade nos isolados das mulheres HIV positivo foi maior que nos isolados das mulheres HIV negativo (RIBEIRO et al., 2004).

1.3 Caracterização molecular

Procedimentos laboratoriais específicos e adequados são necessários para avaliar o relacionamento genético de microrganismos de interesse médico. Tais procedimentos têm sido essenciais para compreender a dinâmica dos organismos infecciosos na população humana, decifrar o complexo relacionamento entre infecção e comensalismo, identificar a origem de uma infecção ou monitorar a emergência de linhagens resistentes a fármacos (SOLL, 2000). Métodos que empregam sistemas *fingerprinting* têm sido empregados para avaliar a variabilidade genética de isolados de *C. albicans*, tais como Cariotipagem Eletroforética (*Electrophoretic Karyotype* - EK), Eletroforese de Enzima Multiloco (*Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* - MLEE), DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) e Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) com e sem hibridação (SOLL, 2000).

Vários métodos de tipagem molecular são usados para caracterizar leveduras e delinear a similaridade genética (PUJOL et al. 1997; SOLL, 2000; REISS et al. 1998). Dentre as técnicas disponíveis, o RAPD é considerado uma ferramenta valiosa para o estudo epidemiológico genético das infecções por *Candida* (CLEMONS et al., 1997; DASSANAYAKE, SAMARANAYAKE, 2003; PINTO et al., 2004). Desenvolvido por Williams et al. (1990), o RAPD permite a análise de uma grande diversidade de organismos, detectando polimorfismos intra e interespecies, sem necessidade de prévio conhecimento sobre as seqüências-alvo a serem amplificadas no ácido desoxirribonucléico (DNA) de

interesse. Esta técnica utiliza um único *primer*, composto por uma curta seqüência de nucleotídeos, que hibridiza de forma aleatória na fita molde (*template*) de DNA, enquanto na reação em cadeia da polimerase (PCR) clássica é empregado um par de *primers* espécie específico, para amplificar uma seqüência-alvo conhecida no genoma estudado (WELSH; McCLELLAND, 1990).

Com o intuito de realizar a vigilância epidemiológica de *C. albicans* isoladas de vários sítios anatômicos em uma unidade de queimados, Robert et al. (1995) utilizaram a técnica de RAPD e reportaram que a infecção cruzada ocorria em poucos casos e que os genótipos mais frequentes correspondiam às cepas epidêmicas.

Sanz et al. (1996) verificaram o genótipo de 16 isolados de *C. albicans*, provenientes de diferentes sítios anatômicos, utilizando 4 *primers* arbitrários e relataram que o *primer* AP-03 apresentou maior poder discriminatório, gerando 8 padrões distintos de DNA entre estes isolados.

A caracterização da diversidade genética de 15 isolados clínicos de *C. parapsilosis* obtidos de infecções bucais, cutâneas e sistêmicas foi avaliada por Dassanayake e Samaranayake (2000). As amostras foram caracterizadas por RAPD utilizando 4 diferentes *primers*. RSD6 e RSD9 geraram 7 perfis de RAPD enquanto RSD7 e RSD12 revelaram 6 e 10 perfis respectivamente. Quando os dados foram correlacionados, um alto grau de heterogeneidade genômica foi observado nos isolados sistêmicos em relação aos isolados bucais e cutâneos.

Pinto et al. (2004) analisaram a variabilidade genética de 37 isolados de *Candida* sp de diferentes sítios anatômicos de 11 pacientes infectados com o

vírus HIV por RAPD utilizando 9 *primers*. Estes pesquisadores observaram a produção de um perfil de bandas que permitiu a identificação de polimorfismos intra e interespecíficos entre os isolados obtidos do mesmo paciente, além da diferenciação das cepas de *C. albicans* isoladas de diferentes pacientes.

A epidemiologia molecular pelo RAPD de 38 isolados de *C. albicans*, 15 de *C. tropicalis* e 12 de *C. glabrata* recuperados da urina de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva foi avaliada por RAPD com os *primers* Cnd3 e Cnd4. Os *primers* foram apropriados na caracterização isolados de *C. albicans*, porém produziram poucos perfis de RAPD para *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os resultados demonstraram que diferentes genótipos foram dominantes em intervalos de tempo variados em um mesmo paciente (ERGON; GÜLAY, 2005).

A variabilidade genética de 46 isolados clínicos de *C. pelliculosa* foi avaliada por diferentes métodos moleculares por Barchiesi et al. (2005). Entretanto, os *primers* RP2, RP4, SOY e M13 não foram adequados para a análise desta espécie por RAPD. Na ocasião, a técnica IR-PCR (*inter-repeat* PCR) apresentou maior poder discriminatório e foi selecionada para a avaliação das amostras.

A tipagem molecular por RAPD de isolados nosocomiais de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Trichosporon* spp. foi avaliada por Silva (2005). Os *primers* 6 e M13 evidenciaram heterogeneidade tanto dos isolados de *C. albicans* quanto de *C. tropicalis* e a tipagem por RAPD foi considerada eficiente para monitorar genótipos circulantes no ambiente hospitalar.

Song et al. (2005) avaliaram a relação genética de leveduras do gênero *Candida* isoladas da mucosa bucal e palatina e da bolsa periodontal de

pacientes com periodontite. As amostras foram caracterizadas por RAPD utilizando o *primer* GC10/1. As leveduras oriundas de pacientes com periodontite foram geneticamente mais diversas que as de carreadores saudáveis. No ano seguinte, estes pesquisadores utilizaram a mesma metodologia para avaliar a relação genética de *Candida sp* recuperadas de pacientes com candidíase pseudomembranosa e estomatite protética. As leveduras dos grupos avaliados foram heterogêneas (SONG et al., 2006).

Em 2006, Valério, Weikert-Oliveira e Resende avaliaram a similaridade genética de 10 isolados de *C. albicans*, 2 de *C. glabrata* e 1 de *C. parapsilosis* pela técnica de RAPD utilizando 15 *primers*. Pouco polimorfismo intraespécie foi observado nos isolados de *C. albicans*. No entanto, os perfis obtidos com os *primers* OPA, SOY, RP, ITS E NS permitiram a caracterização de polimorfismos interespecíficos.

Marol e Yücesoy (2007) avaliaram a epidemiologia molecular de 42 *C. albicans*, 16 *C. glabrata* e 12 *C. tropicalis* recuperadas de vários sítios de infecção de pacientes internados em unidade de terapia intensiva. O RAPD foi realizado com os *primers* AP50-1, OPE-03, OPE-18 e RP4. O *primer* AP50-1 gerou perfis de RAPD somente para *C. glabrata*. OPE-03 apresentou maior número de perfis para *C. albicans* e OPE-18 para *C. tropicalis*. A maioria dos isolados apresentou perfis de RAPD diferentes indicando que as infecções foram ocasionadas por cepas endógenas.

Barros et al. (2008) investigaram a diversidade genética de 156 *C. albicans* e 3 *C. dubliniensis* isoladas de diferentes áreas da cavidade bucal de pacientes com periodontite pelo método do RAPD utilizando os *primers* AP-03 e OPA-03. Os *primers* geraram 11 e 5 perfis de RAPD para *C. albicans*,

respectivamente. A análise combinada dos *primers* gerou 16 perfis de RAPD para *C. albicans* e apenas um para *C. dubliniensis*. Os autores encontraram uma população de *C. albicans* homogênea neste grupo de pacientes.

Com o objetivo de verificar a associação entre sensibilidade ao fluconazol e similaridade genética, Wang et al. (2007) analisaram 23 isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol oriundos do Programa de Vigilância Antimicrobiana de Taiwan. A similaridade foi avaliada por RAPD e revelou que isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol parecem ser geneticamente relacionados. Os pesquisadores também observaram que os isolados resistentes e os isolados sensíveis, apresentaram pela eletroforese em campo pulsado (PFGE) dois pulsotipos distintos, respectivamente.

As seqüências ribossomais, como as regiões intergênicas espaçadoras (ITS) do DNA ribossomal fúngico, mostram-se úteis para tipagem genética e têm sido amplamente utilizadas na identificação de espécies fúngicas por PCR (TAMURA et al., 2001). McCullough, Clemons e Stevens (1999) relataram o desenvolvimento de um *primer* para amplificar a região do 25S rRNA (rDNA) que permite agrupar os isolados de *C. albicans* em 4 genótipos (A, B, C e D) baseando-se no tamanho do produto amplificado na PCR. Estes autores sugerem ainda que a distribuição dos genótipos de *C. albicans* varia geograficamente. Tamura et al. (2001) descreveram a presença de um novo genótipo (genótipo E) de *C. albicans* também com base na região intron 25S rRNA, este foi caracterizado por um produto de PCR com cerca de 1400 pares de base.

Diante do exposto, não observamos registros na literatura acerca da capacidade de adesão, caracterização molecular e detecção de genes

relacionados à adesão e atividade proteolítica em isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis* oriundos de pacientes imunocompetentes com candidíase bucal em nossa população. Considerando-se que a caracterização molecular é clinicamente significativa, pois pode ser utilizada como uma ferramenta epidemiológica para elucidação da diversidade genotípica deste microrganismo; que diferentes genes estão relacionados com o potencial de virulência de acordo com o sítio anatômico acometido; que a detecção da atividade enzimática através de um método com melhor reprodutibilidade contribuirá de forma significativa na avaliação dos isolados clínicos favorecendo uma análise segura entre os resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa; assim como a padronização de um ensaio para verificar a capacidade de adesão, pois segundo Hostetter (1994), o tipo de ensaio empregado é crucial para a avaliação dos estudos de adesão, sendo responsável pelas discrepâncias vistas na literatura, surgiram os objetivos dessa investigação.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- ✓ O método padronizado empregando ELISA foi apropriado para analisar a capacidade de adesão de *C. albicans* e *C. tropicalis*.
- ✓ Todos os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* aderiram a laminina e a fibronectina.
- ✓ Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram índice de adesão relativa significativamente maior que os de *C. albicans* ($p < 0,05$).
- ✓ O método semiquantitativo e o método quantitativo detectaram atividade proteolítica em todos os isolados de *C. albicans*.
- ✓ A detecção da atividade proteolítica dos isolados de *C. tropicalis* foi maior pelo método quantitativo.
- ✓ A correlação entre as metodologias empregadas para avaliar a atividade proteolítica foi baixa.
- ✓ Os genes de virulência ALS2, ALS3, SAP1, SAP3 e PLB1 foram amplificados somente nos isolados de *C. albicans*.

✓ Polimorfismos intraespecíficos foram observados nos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

✓ Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram maior diversidade genética que os isolados de *C. albicans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACELO, K. L.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, Berlin, 2009, doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01741.x

BANNO, Y.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of these enzymes and some biological properties. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v. 23, p. 148-53, 1985.

BARCHIESI, F.; TORTORANO, A. M.; DI FRANCESCO FALCONI, L.; RIGONI, A.; GIACOMETTI, A.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; VIVIANI, M. A. Genotypic variation and antifungal susceptibilities of *Candida pelliculosa* clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 54, p. 279-85, 2005.

BARROS, L. M.; BORIOLLO, M. F.; ALVES, A. C.; KLEIN, M. I.; GONÇALVES R. B.; HÖFLING, J. F. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Arch. Oral. Biol.**, Elmsford, v. 53, n. 12, p. 1172-8, 2008.

BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**, Berlin, v. 45, p. 465-69, 2002.

BOSCO, V. L.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E.; PAULA, C. R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 217-22, 2003.

BOUCHARA, J. P.; TRONCHIN, G.; ANNAIX, V.; ROBERT, R.; SENET, J. M. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 58, n. 1, p. 48-54, 1990.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, Cambridge, v. 28, p. 799-808, 2006.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS Microbiol.**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 327-35, 2001.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, Oxford, v. 16, p. 137-57R, 2006.

CANDIDO, R. C. **Biofilme dentadura: Caracterização fenotípica de amostras de leveduras isoladas em cinco ocasiões no período de um ano.** Ribeirão Preto, 2000. 148p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 74, n. 5, p. 1152-61, 1995.

CARO, E.; GONZALEZ, A.; MUÑOZ, C.; URÁN, M. E.; RESTREPO, A.; JOHN HAMILTON, A.; ELENA CANO, L. Recognition of laminin by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: a possible mechanism of adherence to human type II alveolar cells. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 795-804, 2008.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 156, n. 5, p. 777-83, 1987.

CHAFFIN, W. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTINEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 62, n. 1, p. 130-80, 1998.

CHAI, Y. A. L.; WANG, Y.; KHOO, A. L.; CHAN, F. Y.; CHOW, C.; GAMINI, K.; SINGH, K.; TAMBYAH, P. A. Predominance of *Candida tropicalis* bloodstream infections in Singapore teaching hospital. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 45, p. 435-9, 2007.

CHENG, G.; WOZNIAK, K.; WALLIG, M. A.; FIDEL JR., P. L.; TRUPIN, S. R.; HOYER, L. L. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 73, n. 3, p. 1656-63, 2005.

CLEMONS, K. V.; FERROZE, F.; HOLMBERG, K.; STEVENS, D.A. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 1332-6, 1997.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A., CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology and predictors of mortality. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 28, n. 5, 570-6, 2007.

COSTA, K. R. C. **Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal.** Ribeirão Preto, 2006. 113 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

COSTA, K. R. C.; CANDIDO, R. C. O papel do biofilme de *Candida* na infecção. **Newslab**, São Paulo, v. 94, p.124-8, 2009.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: Quantitative analysis, exoenzyme activity and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 167, p. 73-9, 2009.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 189, n.1, p. 115-20, 2000.

DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Characterization of the genetic diversity in superficial and systemic human isolates of *Candida parapsilosis* by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **APMIS: Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand**, Kobenhavn, v. 108, p. 153-60, 2000.

DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 29, p. 1-24, 2003.

DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, Y. H.; YAU, J. J. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. DNA fingerprinting elicited evolutionary trend of oral *Candida tropicalis* isolates from diverse geographic locales. **Indian J. Med. Microbiol.**, New Delhi, v. 24, n. 3, p.186-94, 2006.

DAVISON, A. C.; HINKLEY, D. V. **Bootstrap methods and their application**. New York: Cambridge University Press, 1997.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278, n. 42, p. 41282-93, 2003.

DOROCCA-BOBKOWSKA, B.; KONOPKA, K.; DÜZGÜNES, N. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v. 48, p. 805-14, 2003.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍCKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUMIL, T.; PICHOVÁ, I.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 2, p. 712-16, 2003.

ELLEPOLA, A. N. B.; PANAGODA, G. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, p. 358-63, 1999.

ERGON, M. C.; GÜLAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, Berlin, v. 48, p. 126-31, 2005.

FILLER, S. G. *Candida*–host cell receptor–ligand interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 333-9, 2006.

FOTEDAR R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, Berlin, v. 48, p. 62-7, 2005.

FURLANETO-MAIA, L., SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; DE OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. In Vitro Evaluation of Putative Virulence Attributes of Oral Isolates of *Candida* spp. Obtained from Elderly Healthy Individuals. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 166, p. 209-17, 2008.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5289-94, 1997.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 13, n. 1, p. 122-43, 2000.

GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 366-71, 2002.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, L.; AZORIN, L.; RENAUI-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J. P.; GIL, M. L. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding proteins. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, p. 2052-9, 1998.

GRUBER, A.; LELL, C. P.; SPRUTH, M.; LASS-FLORL, C.; SPETH, C.; STOIBER, H.; HUBE, B.; COLEMAN, D. C.; POLONELLI, L.; DIERICH, M. P.; WURZNER, R. HIV-1 and its transmembrane protein gp41 bind to different *Candida* species modulating adhesion. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v. 37, p. 77-83, 2003.

HAMAL, P.; DOSTÁL, J.; RAČLAVSKÝ, V.; KRYLOVÁ, M.; PICHOVÁ, I.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. **Folia Microbiol.**, Praga, v. 49, n. 4, p. 491-96, 2004.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 3, p. 915-21, 1994.

HAWSER, S. P.; ISLAM, K. Binding of *Candida albicans* to immobilized amino acids and bovine serum albumin. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 1, p. 140-4, 1998.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS Microbiol.**, Cambridge, v. 9, n. 12, p. 591-6, 2001.

HAZEN, K. C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, p. 1894-900, 1989.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 32, p. 217-26, 2006.

HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 74, p. 135-42, 1996.

HÖFLING, J. F.; BARROS, L. M.; ALVES, A. C. B. A.; MARIANO, P. L. S.; GONÇALVES, R. B. Oral colonization by *Candida* species. A Review. Part I: Prevalence and colonization. **Rev. Odontol. Passo Fundo**, Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 16-21, 2004.

HOSTETTER, M. K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 7, n. 1, p. 29-42, 1994.

HOYER, L. L.; FUNDYGA, R.; HECHT, J. E.; KAPTEYN, J. C.; FRANS, F. M.; ARNOLD, J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, Austin, v. 157, p. 1555-67, 2001.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiol.**, Reading, v. 147, p. 1997-2005, 2001.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Fungal mating: *Candida albicans* flips a switch to get in the mood. **Curr. Biol.**, London, v. 12, p. 782-84, 2002.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS JR, J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor in *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 63, p. 1996-8, 1995.

IVANOVSKA, N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. **J. Mol. Catal. B. Enzym.**, Amsterdam, v. 22, p. 357-61, 2003.

JAIN, P.; KHAN, Z.K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE, S.A. Variation in random amplified polymorphic DNA(RAPD) profiles specific to fluconazole resistant and sensitive strains of *Candida albicans*. **Diagn. Microbiol Infect. Dis.**, New York, v. 41, p. 113-9, 2001.

KALKANCI, A.; BOZDAYI, G.; BIRI, A.; KUSTIMUR, S. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates. **Folia Microbiol.**, Prague, v. 50, n. 5, p. 409-13, 2005.

KALO, A.; SEGAL, E.; SAHAR, E.; DAYAN, D. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 157, n. 6, p. 1253-6, 1988.

KAMAI, Y.; KUBOTA, M.; KAMAI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKUOKA, T.; FILLER, S. G. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the Pathogenesis of Experimental Oropharyngeal Candidiasis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5256-8, 2002.

KAPTEYN J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 373-83, 1999.

KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells.** London: Academic Press, 1991.

KLEINEGGER, C. L.; LOCKHART, S. R.; VARGAS, K.; SOLL, D. R. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 2246-54, 1996.

KLIS, F. M.; De GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 39, suppl. 1, p. 1-8, 2001.

KLOTZ, S. A. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 68, p. 249-54, 1990.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; VIDOTTO, V.; RESENDE, M. A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, p. 219-23, 2006.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n.11, p. 1546-54, 2005.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. O. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, p. 405-7, 2003.

KURNATOWSKA, A. J. Activity of hydrolytic enzymes of *Candida albicans* strains isolated from patients with periodontal and membrane mucosae of oral cavity diseases. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 141, p.105-9, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts – a taxonomic study**. 4^a ed., Amsterdam: Elsevier, 1998.

KVAAL, C.; LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; DANIELS, K.; McCOY, J.; SOLL, D. R. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. **Infect. Immun.**, Washington, v. 167, n. 12, p. 6652-62, 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8^a Ed., São Paulo: Sarvier, 1991.

LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconj. J.**, Hampshire, v. 19, n. 7, p. 433-90, 2004.

LEIDICH, S. D.; IBRAHIM, A. S.; FU, Y.; KOUL, A.; JESSU, P. C.; VITULLO, J.; FONZI, W.; MIRBORD, F.; NAKASHIMA, S.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 273, n. 40, p. 26078-86, 1998.

LERNER, C. G.; GOLDMAN, R. C. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 139, n.7, p. 1643-51, 1993.

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PEREIRA, B. A. S.; COELHO, M. G. P.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 5, p. 651-7, 1999.

LIN, D.; LEHMANN, P. F. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v. 33, p. 241-6, 1995.

LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1572, n. 2, p. 263-73, 2002.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; MONTEAGUDO, C.; SEPÚLVEDA, P.; MARTÍNEZ, J. P. Evidence for the presence of high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, p. 742-6, 1994.

LOZA, L.; FU, Y.; IBRAHIM, A. S.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; EDWARDS JR, J. E. Functional analysis of the *Candida albicans* *ALS1* gene product. **Yeast**, Chichester, v. 21, p. 473-82, 2004.

LYON, J. P.; RESENDE, M. A. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. **Mycoses**, Berlin, v. 50, p. 21-4, 2006a.

LYON, J. P.; RESENDE, M. A. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. **Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 102, p. 632-8, 2006b.

MANFREDI, M.; McCULLOUGH, M. J.; AL-KARAAWI, Z. M.; VESCOVI, P.; PORTER, S. R. *In vitro* evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. isolated from patients affected by diabetes mellitus. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 21, p. 183-9, 2006.

MAROL, S.; YÜCESOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, Berlin, v. 51, p. 40-9, 2007.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral Microbiology**. 3^{ed}. London: Chapman e Hall, 1992.

MASUOKA, J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: Physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 17, n. 2, p. 281-310, 2004.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 2, p. 417-21, 1999.

MCMULLAN-VOGEL, C. G.; JÜDE, H. D.; OLLERT, M. W., VOGEL, C. W. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 14, p. 183-9, 1999.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SOARES, C. P.; SILVA, J. L. M.; ANDREOTTI, P. F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v. 45, p. 383-94, 2005.

MILLER, M. G.; JOHNSON, A. D. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 3., p. 293-302, 2002.

MOISEEVA, E.P.; SPRING, E. L.; BARON, J. H.; DE BONO, D. P. Galectin 1 modulates attachment spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interaction with cellular receptors and components of extracellular matrix. **J. Vasc. Res.**, Basel, v. 36, p. 47-58, 1999.

MONOD, M.; CALOCCÍA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi, **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v. 292, p. 405-19, 2002.

MUÑOZ,C.B.; BOLDO, X.M.; TANACA, L.V.; RODRÍGUEZ, C.H. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 1, p. 414-20, 2003.

MUKHERJEE, P. K.; SESHAN, K. R.; LEIDICH, S. D.; CHANDRA, J.; COLE, G. T.; GHANNOUM, M. A. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. **Microbiol.**, Reading, v. 147, p. 2585-97, 2001.

NAGLIK, J.R.; NEWPORT, G.; WHITE, T. C.; FERNANDES-NAGLIK, L. L.; GREENSPAN, J. S.; GREENSPAN, D.; SWEET, S. P.; CHALLACOMBE, S. J.; AGABIAN, N. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. **Infect Immun.**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2482-90, 1999.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 67, n. 3, p. 400-28, 2003.

NAGLIK, J. R.; RODGERS, C. A.; SHIRLAW, P. J.; DOBBIE, J. L.; FERNANDES-NAGLIK, L. L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N.; CHALLACOMBE, S. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in Human correlates with active oral and vaginal infections. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 188, p. 469-79, 2003.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cel. Microbiol.**, Oxford, v. 6, n. 10, p. 915-26, 2004.

NAIR, R. G.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of oral commensal bacteria on *candidal* adhesion to human buccal epithelial cells *in vitro*. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 45, p. 179-85, 1996.

NATARAJAN, S.; REMICK, D. G. The ELISA standard save: calculation of sample concentrations in assays with a failed standard curve. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 336, p. 242-45, 2008.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. **Eukaryot. Cell**, Washington, v. 5, n. 10, p. 1604-10, 2006.

ODDS, F. C.; ABBOTT, A. B. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v. 18, p. 301-17, 1980.

ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. 2^a ed. London: Ballière Tindall, 1988.

OKAWA, Y., MIYAUCHI, M.; KOBAYASHI, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 31, n. 8, p. 1507-10, 2008.

OLLERT, M. W.; WENDE, C.; GORLICH, M.; MCMULLAN-VOGEL, C. G.; ZEPELIN, M. B.; VOGEL, C. W.; KORTING, H. C. Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2543-9, 1995.

OLIVEIRA, E. E.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M. R. R. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 523-7, 1998.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; YAMAMOTO, Y.; FUNAHASHI, M.; HAMAKO, J.; TITANI, K. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. **Glycobiology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 255-61, 1995.

PÄRNÄNEN, P.; KARI, K.; VIRTANEN, I.; SORSA, T.; MEURMAN, J. H. Human laminin-332 degradation by *Candida* proteinases. **J. Oral. Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 37, p. 329-335, 2008.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X.; PAULA, C. R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 14, p. 119-22, 2000.

PERILLO, N. L.; PACE, K. E.; SEILHAMER, J. J.; BAUM, L. G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, London, v. 378, p. 736-9, 1995.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 22, S89-94, 1996.

PICHOVÁ, I.; PAVLICKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJSI, E.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUMML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 268, p. 2669-77, 2001.

PINTO, P. M.; RESENDE, M. A.; KOGA-ITO, C. Y.; TENDLER, M. Genetic variability analysis among *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 147-52, 2004.

PIRES-GONÇALVES, R. H.; MIRANDA, E. T.; BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; ZAIA, J. E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genetic relatedness of commensal strains of *Candida albicans* carried in the oral cavity of patients' dental prosthesis users in Brazil. **Mycopathologia**, Denn Haag, v. 164, p. 255-63, 2007.

PIZZO, G.; GIULIANA, G.; MILICI, M. E.; GIANGRECO, R. Effect of dietary carbohydrates on the *in vitro* epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. **New Microbiol.**, Pavia, v. 23, p. 63-71, 1999.

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

PUJOL, C.; JOLY, S.; LOCKHART, S. R.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.; SOLL, D. R. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 2348-58, 1997.

REMOLD, H.; FASOLD, H.; STAIB, F.; Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochem Biophys Acta.**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 399-406, 1968.

REISS, E.; TANAKA, K.; BRUKER, G.; CHAZALET, V.; COLEMAN, D.; DEBEAUPUIS, J. P.; HANAZAWA, R.; LATGÉ, J. P.; LORTHOLARY, J.; MAKIMURA, K.; MORRISON, C. J.; MURAYAMA, S. Y.; NAOE, S.; PARIS, S.; SARFATI, J.; SHIBUYA, K.; SULLIVAN, D.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 36, p. 249-57, 1998.

RIBEIRO, M. A.; MIRANDA, A. E.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosas of HIV-infected women. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 157, p. 255-61, 2004.

RIEDERER, K.M.; RAMANATHAN, J.; BARCZAK, J.; BARAN, J.KHATIB, R. Utility of a pre-optimized kit for random amplified polymorphic DNA in typing *Candida albicans*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 48, p. 369-73, 2002.

RIPEAU, J. S.; FIORILLO, M.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; DE REPENTIGNY, L. Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 185, n. 8, p. 1094-102, 2002.

ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M. E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAFFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a Burn Unit. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, p. 2366-71, 1995.

RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 64, p. 1-12, 2004.

RÜCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v. 20, n. 3, p. 233-44, 1982.

RÜCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zentbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A**, Stuttgart, v. 255, n. 4, p. 537-48, 1983.

SAMARANAYAKE, L. P.; GEDDES, D. A. M.; WEETMAN, D. A.; MACFARLANE, T. W. Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. **Microbios**, Cambridge, v. 37, p. 105-15, 1983.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, n. 22, p. 201-7, 1984.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 54, p. 583-93, 2005.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **J. Lancet**, Minneapolis, v. 2, n. 2, p. 73-84, 2002.

SANTONI, G.; GISMONDI, A.; LIU, J. H.; PUNTURIERI, A.; SANTONI, A.; FRATI, L.; PICCOLI, M.; DJEU, J. Y. *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to alpha 5 beta 1 integrin. **Microbiol.**, New York, v. 140, p. 2971-9, 1994.

SANTONI, G.; BIRARELLI, P.; HONG, L. J.; GAMERO, A.; DJEU, J. Y.; PICCOLI, M. An alpha 5 beta 1-like integrin receptor mediates the binding of less pathogenic *Candida* species to fibronectin. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 43, n. 5, p. 360-7, 1995.

SANZ, P.; GALLEG0, L.; ARRESE, E.; PUJANA, I.; LÓPEZ, F.; CISTERNA, R. Random amplified DNA as a typing method to differentiate *Candida albicans* strains. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v. 27, p. 107, 1996.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 48, p. 365-77, 2005.

SEGAL, E. *Candida* still number one – What do we know and where are we from there? **Mycoses**, Berlin, v. 48, p. 3-11, 2005.

SHERMAN, F. Getting started with yeasts. **Methods Enzymol.**, New York, v. 194, p. 3-21, 1991.

SILVA, M. R. R. **Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS**. São Paulo, 1999. 158 p. Tese (Doutoramento) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

SILVA, R. B. O. **Investigação de leveduras no âmbito hospitalar por diferentes técnicas moleculares**. Araraquara, 2005. 153 p. Tese (Doutoramento) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SIQUEIRA, J. F.; BILGE, H. S. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, p. 632-41, 2004.

SKERL, K. G.; CALDERONE, R. A. *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 30, p. 221-27, 1984.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D. R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, Washington, v. 230, p. 666-9, 1985.

SOLL, D. R. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. **Microbiol.**, Nova York, v. 142, n. 2, p. 279-88, 1997.

SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 13, p. 322-70, 2000.

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 81, p. 101-10, 2002.

SONG, X.; ERIBE, E. R. K.; SUN, J.; HANSEN, B. F.; OLSEN, I. Genetic relatedness of oral yeasts within and between patients with marginal periodontitis and subjects with oral health. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 40, p. 446-52, 2005.

SONG, X.; SUN, J.; ERIBE, E. R. K.; HANSEN, B. F.; OLSEN, I. Genotypic relatedness of yeasts in trush and denture stomatitis. **Oral Microl. Immunol.**, Copenhagen, v. 21, p. 301-8, 2006.

STAIB, F. Serum protein as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v. 4, p. 187-93, 1965.

STOWELL, S. R.; KARMAKAR, S.; STOWELL, C. J.; DIAS-BARUFFI, M.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, New York, v. 109, p. 219-27, 2007.

SUGIYAMA, Y.; NAKASHIMA, S.; MIRBOD, F.; KANO, H.; KITAJIMA, Y.; GHANNOUM, M. A.; NOZAWA, Y. Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPLB2 from *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 37, p. 61-7, 1999.

SUNDSTRÖM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 4, n. 8, p. 461-69, 2002.

SYMERSKY, J.; MONOD, M.; FOUNDLING, S. I. High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. **Biochemistry**, New York, v. 36, p. 12700-10, 1997.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **Int. Congr. Ser.**, Amsterdam, v. 1284, p. 103-12, 2005.

TAMURA, M.; WATANABE, K.; MIKAMI, Y.; YAZAWA, K.; NISHIMURA, K. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: Analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4309-15, 2001.

TRONCHIN, G.; PIHET, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BOUCHARA, J. P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 46, p. 749-72, 2008.

TSANG, C. S. P.; CHU, F. C. S.; LEUNG, W. K.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P.; SIU, S. C. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 56, p. 1393-8, 2007.

VALÉRIO, H. M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 174-8, 2006.

WANG, J. S.; LI, S. Y.; YANG, Y. L.; CHOU, H. H.; LO, H. J. Association between fluconazole susceptibility and genetic relatedness among *Candida tropicalis* isolates in Taiwan. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 56, p. 650-3, 2007.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v. 18, p. 7213-8, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAC, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v. 18, p. 6531-5, 1990.

WU, T.; SAMARANAYAKE, L. P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 48, p. 711-20, 1999.

YAMADA, Y.; MAKIMURA, K.; MIRHENDI, H.; UEDA, K.; NISHIYAMA, Y.; YAMAGUCHI, H.; OSUMI, M. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 55, p. 122-5, 2002.

YAN, S.; NÈGRE, E.; CASHEL, J. A.; GUO, N.; LYMAN, C. A.; WALSH, T. J.; ROBERTS, D. D. Specific induction of fibronectin binding activity by hemoglobin in *Candida albicans* grown in defined media. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2930-5, 1996.

YANG, Y. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, Hong Kong, v.36, p. 223-8, 2003.

ZAUGG, C.; BORG-VON ZEPELIN, M.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, p. 405-12, 2001.

ZENG, X.; HOU, X.; WANG, Z.; JIANG, L.; XIONG, C.; ZHOU, M.; CHEN, Q. Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic chinese cohort. **Mycoses**, Berlin, v. 52, p. 161-5, 2008.