

GISMARI MIRANDA DA SILVA

**ADESÃO, PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS, SENSIBILIDADE
A TOXINAS “KILLER” E A ANTIFÚNGICOS DE CEPAS
DE *CANDIDA DUBLINIENSIS* ISOLADAS DE
PACIENTES HIV POSITIVOS**

São Paulo

2006

Gismari Miranda da Silva

**Adesão, produção de exoenzimas, sensibilidade a toxinas
“killer” e a antifúngicos de cepas de *Candida dubliniensis*
isoladas de pacientes HIV positivos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Diagnóstico Bucal

Sub-área: Semiologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da
Silveira

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva GM. Adesão, produção de exoenzimas, sensibilidade a toxinas “Killer” e a antifúngicos de cepas de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes HIV positivos [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____/____/ 2006.

Banca Examinadora

1) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof (a). Dr (a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Aldo** que, com sua sabedoria me ensinou a sonhar e a acreditar sempre.

Um exemplo de vitória.

À minha mãe **Mary** pelo seu amor, incentivo, conselhos e ensinamentos em minha vida.

Ao meu irmão **Henrique** pela sua alegria contagiante, sinceridade e apoio em todos os momentos.

À minha avó **Ida** pelo seu carinho.

Às minhas grandes amigas **Ana Carolina Caldas Alves, Solange Marinho Oliveira e Thais Gebrim Costa** pela lealdade, sinceridade e amor. Sempre presente nas minhas alegrias e dificuldades.

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Fernando
Ricardo Xavier da Silveira** pela dedicação,
apoio, confiança e amizade.*

*À Prof. Dra. **Maria de Fátima Costa Pires**
pelo carinho, paciência, estímulo, ternura e
compreensão. Minha eterna gratidão.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Instituto Adolfo Lutz e a todos os funcionários da Secção de Microscopia Eletrônica e em especial a pós graduanda Raquel Cristina da Silva pela amizade, atenção e colaboração em todos os momentos.

À Escola Paulista de Medicina, Laboratório Especial de Micologia na pessoa do Prof. Dr. Arnaldo Colombo, pelas cepas de Candida dubliniensis e tornar possível à realização deste estudo.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo na pessoa da Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula pelas amostras de Candida albicans e Candida dubliniensis e pelas amostras produtoras de Toxinas “Killer” procedentes da Universidade de Parma –Itália.

Ao Departamento de Dentística da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Miriam Turbino pelos ensinamentos transmitidos.

À amiga Profa. Dra. Andréa dos Santos Lusvarghi Witzel pelo carinho e colaboração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial a Maria Angela Mimura, Wilson Afonso Junior que sempre me incentivaram a continuar neste aprendizado.

A Iracema Mascarenhas (Nina) pelo companheirismo, paciência e ternura comigo durante estes anos.

A todos os Professores da Disciplina de Semiologia do Departamento de Estomatologia da Universidade de São Paulo que tanto me transmitiram ensinamentos e conselhos para a vida.

À funcionária Cida pelo apoio e carinho durante toda esta jornada.

*Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Bolsa de Mestrado - Processo 03/10149-0*

Silva GM. Adesão, produção de exoenzimas, sensibilidade a toxinas “Killer” e a antifúngicos de cepas de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes HIV positivos [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

Candida dubliniensis é uma espécie descrita como fenotipicamente semelhante a *Candida albicans*. Desde sua descrição, em 1995, em Dublin, Irlanda, por Sullivan et al, inúmeros relatos sobre esta levedura são encontrados com o objetivo de se conhecer a origem desta espécie, bem como distinguir as semelhanças e diferenças que existem entre elas. Alguns autores têm observado que esta levedura apresenta resistência a alguns antifúngicos, mais utilizados na prática médica, principalmente sob o ponto de vista imunológico, caso dos portadores de HIV. A gênese do processo de infecção se mostra pouco conhecida. A capacidade de adesão a superfície celular e a produção de exoenzimas são fatores determinantes para o desencadeamento da infecção. A susceptibilidade a toxinas “Killer” necessita ser estudada, pois permite determinar um significativo número de tipos sensíveis de cepas de leveduras. Frente ao exposto, buscamos avaliar o comportamento desta espécie por meio da pesquisa de capacidade de adesão, produção de proteinase e fosfolipase, susceptibilidade a toxinas Killer e resistência a antifúngicos. O ensaio de adesão foi fortemente aderente para a amostra padrão ATCC 777, e aderente para os demais isolados. A atividade enzimática para produção de proteinase mostrou-se se fortemente positiva para a amostra padrão ATCC 777, amostra ATCC 778, CD 07 e CD 14 de *C dubliniensis*. Entre os isolados presuntivos de *C dubliniensis* 1 (038), positivo e nos demais 013, 058, 096 e 107, não se observou atividade enzimática. Para a produção de fosfolipase não houve um comportamento

distinto entre as amostras de *C dubliniensis* e os isolados presuntivos. Nenhuma amostra deixou de produzir esta enzima. Os testes de sensibilidade das amostras frente às cepas padrão produtoras de toxinas “Killer” mostraram dois biótipos diferentes. Os mais freqüentes foram 888 e 688 do total dos 9 isolados estudados. O isolado biótipo 688 (ATCC- 777) de *C dubliniensis* foi sensível a toxina K2. As demais amostras de *C dubliniensis*, bem como os isolados presuntivos apesar de serem provenientes de indivíduos HIV+ foram resistentes a K2 e à todas as demais toxinas. Em relação à pesquisa de resistência a antifúngicos, as amostras e isolados presuntivos de *C. dubliniensis* utilizando se o E-test, foram sensíveis a família dos azóis com valores de CIM de $\leq 0.002 - 1.0$ mg/ml e para Anfotericina B os valores de CMI estavam entre $\geq 0.002- 0.032$. As condições desse estudo permitimo-nos comentar que excetuando a amostra padrão ATCC 777 que teve comportamento distinto em relação às demais amostras, identificadas por genotipagem, como *C. dubliniensis* e isolados presuntivos, todas apresentaram um comportamento semelhante entre si. Estudos com um maior número de amostras de *C. dubliniensis* e utilizando-se esses testes ainda são necessários para elucidar se realmente existe um comportamento fenotípico diferencial dessa levedura em relação a *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida dubliniensis*; Exoenzimas; Adesão; Toxinas Killer; HIV positivo; AIDS

Silva GM. Adhesion, exoenzymes activity, susceptibility to Killer toxins and sensibility to antifungal agents of *Candida dubliniensis* strains isolates from HIV+ individuals [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Candida dubliniensis is a newly described specie which is closely related phylogenetically to *Candida albicans*. It was first identified as a new specie by Sullivan et al., in Dublin, Ireland, 1995. Numerous researches are attempting to identify more detailed characteristics of *C. dubliniensis* and similitudes and differences between the two related species. The resistance of *C. dubliniensis* to the usual drugs employed to treat candidosis, particularly in human immunodeficiency virus (HIV) infected individuals has been emphazely described. The susceptibility to killer toxins may also contribute to explain some aspects of the resistance process in Candidal infection. Other characteristics such as adhesion capability and exoenzymes activity have been studied in comparision with this newer specie. The aim of this study was to evaluate adhesion capability, exoenzymes activity (proteinase and phospholipase), susceptibility to Killer toxins and sensibility to antifungal agents (azoles and amphotericin – B) through E-test of 9 *Candida dubliniensis* isolates from HIV+ individuals. The adhesion test was strongly positive for the strain ATCC 777 and positive for the other strains. Proteinase activity was strongly positive for the strains ATCC 777, ATCC 778, CD 07, and CD 14, positive for the strain 038 and negative for the other. Phospholipase activity revealed strongly positive results for the strains ATCC 777, CD14, 038, 107. The strains ATCC 778, CD 07, 013, 058, and 096 had positive activity and activity was no absent. The Susceptibility to killer toxin showed to different biotypes: 888 and 688. Only the ATCC

777 strain was susceptible to K2 toxin. No strains presented resistance to azoles or amphotericin-B. The results showed MICs ranged between ≤ 0.002 – 1.0 mg/ml e ≥ 0.002 - 0.032 respectively.

Key words: *Candida dublinensis*; Exoenzymes; Adhesion; Killer toxins; HIV-seropositive; SIDA

LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

Tabela 4.1 - Classificação da produção de proteinase segundo Price.....	36
Tabela 4.2 - Formação dos biotipos “killer”	39
Tabela 5.1 - Média e desvio padrão de adesão de amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos a células pré-estabelecidas HeLa.....	43
Tabela 5.2 - Níveis de produção de proteinase nas amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos	44
Tabela 5.3 - Níveis de produção de fosfolipase nas amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos	45
Tabela 5.4 - Sensibilidade a antifúngicos de amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos, utilizando o E- test	46
Tabela 5.5 - Índice de correlação de Pearson – Adesão X produção de proteinase das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	47
Tabela 5.6 - Índice de correlação de Pearson – Adesão X produção de fosfolipase das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	49
Tabela 5.7 - Índice de correlação de Pearson – Adesão X produção de Toxinas Killer das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	51

Quadro 4.1 - Diferenciação de <i>Candida sp</i> utilizando o meio CHROMagar™ <i>Cândida</i>	31
Quadro 4.2 - Crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i> a 37°C e 42°C	32
Quadro 4.3 - Cepas padrão para o teste de sensibilidade a toxinas “Killer”	38
Gráfico 5.1 - Teste de correlação entre os valores de adesão e de produção de proteinase das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	48
Gráfico 5.2 - Teste de correlação entre os valores de adesão e de produção de fosfolipase das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	50
Gráfico 5.3 - Teste de correlação entre os valores de adesão e sensibilidade às Toxinas “Killer” das amostras de <i>C. dubliniensis</i> e isolados presuntivos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
°C	Graus Celsius
g	Gramma
h	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV+	Paciente portador do vírus da imunodeficiência humana sem sinais clínicos da AIDS
HIV-	Paciente não portador do vírus da imunodeficiência humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
M	Molar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogênico
q.s.p.	quantidade suficiente para

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Fatores relacionados ao microrganismo	20
2.1.1 Adesão	20
2.1.2 Proteinase	21
2.1.3 Fosfolipase	22
2.1.4 Sensibilidade às toxinas “Killer”	23
2.1.5 Resistência a antifúngicos.....	24
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAS E MÉTODOS	27
4.1 Cepas de leveduras	27
4.1.1 Pesquisa de Tubos Germinativos (Teste de Reynolds-Braude).....	27
4.1.2 Microcultivo em lâminas	28
4.1.2.1 <i>Teste para fermentação de açúcares</i>	29
4.1.2.2 <i>Teste para assimilação de carbono e de nitrogênio</i>	29
4.1.3 Pesquisa de <i>Candida dubliniensis</i> em meio cromogênico	31
4.1.4 Termo – Tolerância	31
4.3 Ensaio de adesão	32
4.3.1 Preparação da monocamada da linhagem de células pré-estabelecidas (Hela)	32
4.3.2 Preparação da suspensão de <i>C. dubliniensis</i> para os ensaios de adesão	32
4.3.3 Ensaio de adesão	33
4.3.4 Microscopia ótica comum.....	34
4.4 Produção de exoenzimas.....	34

4.4.1	Produção de proteinase	34
4.4.2	Produção de fosfolipase.....	36
4.5	Sensibilidade às toxinas Killer	37
4.6	Sensibilidade a antifúngicos.....	39
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Leveduras	43
5.2	Ensaio de Adesão	43
5.3	Produção de Exoenzimas.....	44
5.3.1	Proteinase	44
5.3.2	Fosfolipase.....	44
5.4	Sensibilidade às toxinas “Kille”	45
5.5	Sensibilidade a antifúngicos	46
5.6	Correlação entre Adesão e produção de Proteinase	46
5.7	Correlação entre Adesão e produção de Fosfolipase.....	48
5.8	Correlação entre Adesão e sensibilidade as Toxinas “Killer”	50
6	DISCUSSÃO	53
6.1	Adesão	53
6.2	Produção de exoenzimas	55
6.3	Sensibilidade às toxinas “Killer”	56
6.4	Sensibilidade a antifúngicos	57
7	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE	72
	ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Candida dubliniensis é uma espécie que vem sendo descrita nos últimos 10 anos e fenotipicamente semelhante a *Candida albicans*. Foi identificada pela primeira vez por Sullivan et al., 1995. Desde então, inúmeros relatos sobre esta levedura, são encontrados com o objetivo de se conhecer a origem desta nova espécie, bem como distinguir as semelhanças e diferenças que existem entre elas. (ALVES et al., 2005; BIKANDI et al., 1998; GRAF et al., 2003; KURZAI et al., 1999; MAROT-LEBLOND et al., 2004; MCCULLOUGH et al., 2004; MORAN et al., 1997; PINJON et al., 1998; SULLIVAN et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001).

C. dubliniensis pode ser isolada de vários sítios anatômicos, mas tem sido encontrada com mais freqüência na cavidade bucal de pacientes portadores do vírus HIV, (COLEMAN et al., 1997; JABRA-RISK et al., 2000; MAXWELL et al., 2003; MOSAID et al., 2001; MOSCA et al., 2005; PINCUS et al., 1999).

C. albicans é reconhecida como o agente oportunista mais freqüente nas infecções em pacientes imunocomprometidos (GUILHERMETTI, 2004). Na maioria dos pacientes a infecção por esta levedura é decorrente principalmente do reservatório endógeno (DELGADO; AGUIRRE, 1997).

A gênese do processo de infecção de *C.dubliniensis* se mostra pouco conhecida. A capacidade de adesão à superfície celular e a produção de exoenzimas são fatores determinantes para o desencadeamento da infecção (GHANNOUM; RADWAN, 1990). *C. albicans* e *C. dubliniensis*, têm capacidade de produzir blastoconídios, pseudohifa, hifa e clamidoconídeos. Porém quando comparadas entre si, *C. dubliniensis* parece ter menor capacidade de formar hifas,

mas uma maior capacidade de adesão à superfície celular da mucosa bucal (GILFILLAN et al., 1998).

Estudos empregando métodos laboratoriais tentam distinguir as diferenças entre as espécies e suas relações morfogenéticas (MAROT-LEBLOND et al., 2004; MAXWELL et al., 2003; MOSAID et al., 2001; MOSCA et al., 2005; PINCUS et al., 1999; PINJON et al., 1998; SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al., 1997). O crescimento comparativo a 42 °C para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* mostrou que nesta temperatura o crescimento de *C. dubliniensis* é inexpressivo em relação ao crescimento de *C. albicans* (ALVES et al., 2000; PINJON et al., 1998).

Outro método presuntivo para identificação de *C. dubliniensis* é a pigmentação em CHROMagar, no qual *C. dubliniensis* apresenta uma coloração verde escuro em relação a *C. albicans* (MARIANO et al., 2003; SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 1999).

No que tange à produção de exoenzimas, proteinase e fosfolipase, fator de expressão relacionado à virulência, estas leveduras parecem não apresentar diferenças estatisticamente significativas entre si (HANNULA et al., 2000). McCullough, Ross e Reade (1995) relataram que *C. dubliniensis* pode ser mais virulenta, desde que tenha uma maior produção dos níveis de proteinase e uma maior aderência à superfície celular da mucosa bucal quando comparada com *C. albicans*.

A sensibilidade a toxinas “Killer” permite determinar um significativo número de tipos sensíveis de cepas de *C. albicans*. A literatura científica não relata o comportamento de *C. dubliniensis* frente a estas toxinas.

Ressalta-se que a pesquisa da capacidade de adesão dessas leveduras a células pre-estabelecidas, a sensibilidade a toxinas “Killer” é pioneira e poderá

contribuir para o esclarecimento do comportamento diferencial que *C. dubliniensis* vem apresentando, desde a sua descrição em 1995.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fatores relacionados ao microrganismo

Os fatores de virulência estão relacionados com a capacidade de *Candida* em produzir doença. Nenhum deles parece ser responsável individualmente pela patogenicidade, mas há uma combinação de diferentes fatores que atuam em determinadas fases da infecção (BIASOLI; TOSELLO; MAGARÓ, 2002; CUTLER, 1991; ODDS, 1998).

2.1.1 Adesão

A presença de *Candida* na cavidade bucal não é suficiente para a colonização; o primeiro passo é a adesão da levedura às células do epitélio do hospedeiro (SAMARANAYAKE; MCFARLANE, 1982). A adesão da levedura à superfície celular é decorrente das adesinas de superfície do agente infectante que reconhecem a matriz extracelular de proteínas tais como laminina, colágeno, fibronectina e fibrina, presentes nas superfícies celulares do hospedeiro (GREENFIELD, 1992; KLOTZ; SMITH, 1991; KLOTZ et al., 1993).

A adesão pode ser influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro como pH, temperatura, dieta alimentar, IgA secretora e quantidade de saliva e com fatores

relacionados às leveduras como a formação de tubo germinativo, a variabilidade fenotípica, a produção de toxinas e enzimas extracelulares, para o desencadeamento de infecção por *Candida* (DELGADO; AGUIRRE, 1997; SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1982).

Foi observada, *in vitro*, uma correlação entre adesão e produção de proteinase. Diversos trabalhos verificam que a inibição da proteinase reduzia a capacidade de adesão de *Candida* a células epiteliais, (BORG; RÜCHEL, 1998; EL-MAGHRABI; DIXON; BURNETT, 1990; OLLERT et al., 1993).

2.1.2 Proteinase

A proteinase produzida por *C. albicans* é considerada um fator de virulência (KWONG-CHUNG et al., 1985, MACDONALD; ODDS, 1993; RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982). Esta é capaz de aderir diretamente à superfície epitelial bem como promover a quebra de vários substratos do hospedeiro como Imunoglobulina A, albumina, queratina, colágeno e hemoglobina (BEKTIC et al., 2001; HATTORI et al., 1984; KWONG-CHUNG et al., 1985; RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982).

A proteinase isolada de *C. albicans* é uma aspartato proteinase de peso molecular entre 42 e 45 KDa, com ação em pH ácido de 3.5-4.0 (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1982). Ela é secretada *in vivo* pela levedura durante a fase de colonização, aderência e invasão (BEKTIC et al., 2001; HOEGL; OLLERT; KORTING, 1996; OLLERT et al., 1993). Esta exoenzima consiste de uma família de isoenzimas produzida por um grupo de genes denominados secreted aspartyl

proteínase (SAP). Até o presente momento já foram identificados 10 genes SAP (HUBE et al., 1994, HUBE; NAGLIK, 2001; MONOD et al., 1998; NAGLIK et al., 2003). Este último autor e seus colaboradores analisaram a expressão in vivo dos diferentes SAP na saliva de pacientes e verificaram que SAP 1 e SAP 3 foram observadas somente em pacientes com candidose bucal enquanto SAP 4, SAP 5 e SAP 6 foram detectados em todos os pacientes.

Cassone et al. (1987) estudaram a produção de proteínase de cepas isoladas de pacientes com vulvovaginites e verificaram que o isolamento de cepas produtoras de proteínase não está limitado a pacientes com candidose, mas há uma correlação direta entre cepas mais proteolíticas e o aumento de sinais clínicos de infecção. Moreira, 2005, encontrou em *C. albicans* isoladas de vulvovaginites, produção de proteínase em 95,1% das amostras.

Cutfield et al. (1995) Abad-Zapatero et al. (1996) relatam que a inibição da produção de proteínase pode diminuir a virulência de *C. albicans* e está associada com a redução de sinais clínicos de candidose bucal.

2.1.3 Fosfolipase

A primeira citação de fosfolipase em *C.albicans* foi descrita por Werner, 1996. A função desta enzima está no metabolismo de fosfolipídeos, que são os maiores componentes da membrana celular (IBRAIHM et al., 1995). Vários estudos confirmam que a alta produção de fosfolipase está relacionada a um alto grau de

patogenicidade (LANE; GARCIA, 1991; MITROVIC et al., 1995; SHIMIZU et al., 1996).

A fosfolipase está concentrada na extremidade dos filamentos da levedura, apontando uma virulência maior das células filamentadas em relação às células arredondadas (PUGH; CAWSON, 1977).

Samaranayake, Raeside e MacFarlane, 1984 estudando 41 isolados de *Candida* observaram que 79% dos isolados de *C. albicans* produziam fosfolipase, no entanto nenhum dos isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* produziram a enzima. Dado semelhante foi encontrado por Elias, 2005 em *C. glabrata* e *C. parapsilosis* isolados de pacientes com periodontite.

Cepas de *C. albicans* isoladas do sangue possuem maior atividade de fosfolipase quando comparadas com isolados da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (IBRAHIM et al., 1995).

Silveira, Paula e Birman, 1993, correlacionaram à atividade intermediária (positiva) de produção de fosfolipase com o estado de boa saúde dos portadores, indicando estado de saprofitismo da levedura.

2.1.4 Sensibilidade às toxinas “Killer”

As toxinas “Killer” são produzidas por nove leveduras dos gêneros *Hansenula* e *Pichia* São compostos glicoproteicos, de baixo peso molecular, que atuam formando poros na membrana citoplasmática alterando assim a permeabilidade

celular. A formação de poros resulta na morte de isolados sensíveis (BENDOVIÁ, 1986; KOGAN, 1983).

De acordo com a sensibilidade exibida pela amostra forma-se um código de três dígitos capaz de distinguir 512 tipos “Killer” para isolados de *C.albicans* (POLLONELLI et al., 1983). Pires et al. (1996), observaram em isolados de *C.albicans* da mucosa bucal de pacientes com AIDS, uma frequência de 62% do biótipo 221.

Silva (1999), comparou isolado de pacientes portadores do vírus HIV e não portadores do vírus, observando que isolados de pacientes com AIDS são resistentes às toxinas K2 e K3, enquanto os isolados de indivíduos controle são sensíveis a todas as toxinas, verificando uma tendência à resistência dos isolados de pacientes com AIDS.

Lusvarghi (2002) observou que 75,82% dos isolados de candidose bucal apresentaram resistência à no mínimo 7 toxinas. O biótipo 111 (sensível a todas as toxinas) foi encontrado em 8 (12,90%) dos pacientes sem lesão e em apenas 1 (3,75%) paciente portador de candidose eritematosa. O biótipo 888 ocorreu em 25% dos isolados de pacientes portadores de candidose bucal; no grupo sem lesão e o biótipo 587 em 24,19%.

2.1.5 Resistência a antifúngicos

A candidose é a infecção mais comum nos pacientes HIV positivos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada. As infecções bucais são as de

maior incidência, seguidas das esofágicas e vaginais (CANTON et al., 2005; FREITAS; LOPES; FRADE, 2000).

Embora a candidose bucal reflita primeiro a todas as alterações específicas da resposta imunológica do hospedeiro provocadas pelo HIV, também a profilaxia e os tratamentos prolongados com antifúngicos são fatores condicionantes das espécies de *Candida* isoladas destes pacientes (WHITE, 1966).

A eficácia do fluconazol na prevenção e tratamento da candidose orofaríngea, assim como a sua fraca toxicidade tornou o antifúngico de eleição nestas infecções (COLEMAN et al., 1997; COSTA et al., 2004).

Se for verdade que a candidose orofaríngea responde bem ao fluconazol, também é verdade que a erradicação completa da infecção não é fácil, dado o reaparecimento da infecção após a conclusão do tratamento. Nas recidivas, verifica-se que os isolados de *Candida* apresentam-se com sensibilidade diminuída ao fluconazol, *in vivo* e *in vitro*; e a substituição desta levedura sensível por outra resistente; e ainda, a substituição de uma espécie *C. albicans* por não *albicans* tem se tornado cada vez mais usual (BARCHIESI et al., 2002; COLOMBO et al., 2002; SULLIVAN et al., 1997; TAYLOR et al., 2000)

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo pesquisar a capacidade de adesão, a produção de exoenzimas, a sensibilidade a toxinas Killer e resistência a antifúngicos de cepas de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes HIV positivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de leveduras

Foram utilizadas 4 isolados de *Candida dubliniensis* ATCC 777 (amostra padrão) e ATCC 778 cedidas pela Seção de Micologia do ICB-USP e CD 07 e CD 14 (Amostras cedidas pela UNIFESP) e 5 isolados presuntivos da cavidade bucal de pacientes portadores do vírus HIV (013, 038, 058, 096 e 107).

As amostras e os isolados de *Candida dubliniensis* foram mantidos em ágar Sabouraud-dextrose (Difco) com 200µg/ml de cloranfenicol.

Todos os isolados foram reavaliados de acordo com a metodologia proposta por Kurtzman e Fell (1998) e segundo o protocolo da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (anexo B) e os testes de desenvolvimento de coloração no “CHROM – Agar”, utilizando as cepas padrões ICB 12 A *C. albicans* e ATTC 777 *C. dubliniensis* (Micoteca do Instituto de Ciências Biomédicas – USP) (MARIANO et al., 2003) e crescimento a 42°C no meio de ágar Sabouraud (termo- tolerância).

4.1.1 Pesquisa de Tubos Germinativos (Teste de Reynolds-Braude)

Leveduras com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud-dextrose (Difco) acrescido de 200µg/ml de cloranfenicol foram colocadas em tubos de ensaio

contendo 1ml de soro fetal bovino (Gibco) e incubados a 37°C por até 3 horas. A pesquisa da formação de tubo germinativo foi observada a cada hora por até 3 horas no microscópio ótico comum.

4.1.2 Microcultivo em Lâmina

Meio de cultura (Agar “Corn-meal”acrescido de tween 80) (LACAZ; PORTO; MARTIN, 1984)

Agar “Corn-meal” (Difco)	17,0g
Tween 80 (BBL)	2,8g
Água destilada	1000ml

O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. E no momento do uso, volume de 3 ml foi distribuído em lâminas de microscopia. As leveduras cultivadas anteriormente em ágar Saubouraud-dextrose (Difco) por 24 a 48 horas foram semeadas em estrias nesta lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi colocada em câmara úmida por até 5 dias, mantidas a 25°C, para a verificação de produção de filamentação e de clamidoconídeos, sendo as leituras realizadas diariamente.

4.1.2.1 Teste para fermentação de açúcares

Meio Básico

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Peptona (Difco)	7,5 g
Água destilada	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos e distribuído em tubos de ensaio em alíquotas de 6 mL contendo tubos de Durhan invertidos.

Açúcares empregados a 2%: dextrose, maltose, sacarose e lactose.

Cada açúcar foi distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos e o meio básico. Em seguida foram inoculados com 0,1 mL da suspensão da levedura, com turvação correspondente à escala 03 de MacFarland.

*4.1.2.2 Teste para assimilação de carbono e de nitrogênio***Meio para a prova de assimilação de carbono (Meio C)**

Sulfato de amônio (Merck)	5,0 g
Fosfato de potássio monobásico (Merck)	1,0 g
Sulfato de Magnésio 7 H ₂ O (Merck)	0,5 g
Ágar (Difco)	20,0 g
Água destilada	1000 mL

Meio para a prova de assimilação de Nitrogênio (Meio N)

Dextrose (Synth)	20,0 g
Fosfato de potássio monobásico (Merck)	1,0 g
Sulfato de Magnésio 7 H ₂ O (Merck)	0,5 g
Ágar (Difco)	20,0 g
Água destilada	1000mL

Os meios foram esterilizados a 120°C por 15 minutos e distribuídos com assepsia em tubos de ensaio estéreis.

Açúcares empregados (Difco) a 2%: dextrose, maltose, galactose, sacarose, rafinose, celobiose, eritritol, manitol, ribitol, ramnose, melibiose, trealose, dulcitol e inositol.

Fontes de nitrogênio: peptona e nitrato de potássio.

Para a realização dos testes de assimilação de carbono ou de nitrogênio foi preparada 2 mL de suspensão de levedura, com turvação correspondente à escala 03 de MacFarland, vertidas em placas de Petri e em seguida adicionados 20 mL de meio básico (Meio N ou C), fundido e resfriado a 50°C. Após solidificação do meio básico colocaram-se em pontos eqüidistantes dos meios C, as fontes de carbono, e do meio N, as fontes de nitrogênio, incubando-se a 25°C por 96 horas. A assimilação foi verificada pela formação de halos opacos ao redor da fonte.

4.1.3 Pesquisa de *Candida dubliniensis* em meio cromogênico

Para a identificação de *Candida dubliniensis* foram utilizadas placas com meio cromogênico — Chromagar *Candida*[®], (PROBAC do Brasil[®], São Paulo). Nesse meio há alteração da coloração da colônia semeada dependendo da espécie de *Candida* isolada. Após 48 horas de incubação a 37°C, é possível a identificação de *Candida albicans* verde claro e *Candida dubliniensis*, verde escura, *Candida krusei*, rósea, *Candida tropicalis*, azul-acinzentada, e as demais espécies, róseo-esbranquiçadas.

Microorganismo	Coloração típica da colônia
<i>Candida dubliniensis</i> ,	Verde escura
<i>Candida tropicalis</i>	Azul-acinzentado
<i>Candida krusei</i>	Pink
<i>Candida sp</i>	Branco para o rosa

Quadro 4.1 - Diferenciação de *Candida sp* utilizando o meio CHROMagar™ *Candida*

4.1.4 Termo - Tolerância

As colônias que exibiram cor verde no meio CHROMagar™ *Candida* foram novamente repicadas em duplicatas em tubos de ensaio contendo o meio Agar Sabouraud-Dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas a 37°C e 42°C nos

períodos de 48 e 72 horas. O seu crescimento foi comparado com cepas padrão de *Candida dubliniensis* (ATCC 777) e *Candida albicans* (ICB 12A). O quadro a seguir mostra a ausência de crescimento a 42°C de *C. dubliniensis*.

Espécie	Crescimento a 37°C	Crescimento a 42°C
<i>Candida albicans</i>	+	+
<i>Candida dubliniensis</i>	+	-

Quadro 4.2 - Crescimento de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* a 37°C e 42°C

4.3 Ensaio de Adesão

4.3.1 Preparação da monocamada da linhagem de célula pré-estabelecida (HeLa)

A monocamada foi preparada e fornecida pela Seção de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Imediatamente antes da realização do ensaio de adesão, o meio nutriente foi descartado e a monocamada lavada uma vez com PBS, pH 7,2.

4.3.2 Preparação da suspensão de *C. dubliniensis* para os ensaios de adesão

As amostras e isolados presuntivos de *C. dubliniensis* foram mantidas em ágar Sabouraud-dextrose (Difco), à temperatura ambiente e semeadas mensalmente.

O inóculo da levedura para o teste foi preparado a partir da cultura estoque, incubada por 18 horas, a 37° C. A cultura foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos e o sedimento lavado uma vez em PBS pH 7,2.

A suspensão final, 1 a 2 x 10⁵ leveduras/ml, foi preparada adicionando-se volumes adequados de PBS, pH 7,2 ao depósito celular. O número de células por mL foi monitorado em todo o experimento pela microscopia em câmara de Neubauer.

4.3.3 Ensaio de adesão

Cada cultura celular contendo a monocamada de células HeLa foi previamente lavada em PBS Ph 7,2. Foi adicionado asepticamente 2,5 ml da suspensão final de levedura incubada à 37° C por 1 hora e trinta minutos, em estufa com agitação constante (160 rev./minuto).

As lamínulas foram lavadas em PBS pH 7,2 e posteriormente fixadas em formalina a 5% por 30 minutos, e secas ao ar. As células foram coradas pelo método de Gram, e montadas em lâminas de Bálsamo do Canadá. Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.3.4 Microscopia ótica comum

Para a microscopia ótica comum foi utilizado o seguinte critério para a contagem de leveduras (SAMARANAYAKE; MACFARLANE ,1981).

- leveduras com brotos menores que a célula mãe foram consideradas uma célula
- uma hifa foi contada com uma célula
- áreas com monocamadas descontínuas foram “desprezadas” durante a contagem.

As contagens das leveduras aderidas foram realizadas em cinco campos de 100 células para cada lamínula.

Para facilitar a avaliação dos resultados encontrados no ensaio de adesão, foi feita a média aritmética das médias encontradas. As cepas que apresentaram média acima de 40 leveduras em 100 células HeLa foram consideradas fortemente aderentes, aquelas que apresentaram entre 10 e 40 leveduras aderidas por 100 células HeLa foram consideradas aderentes e foram consideradas fracamente aderentes aquelas com menos de 10 leveduras aderidas por 100 células HeLa.

4.4 Produção de exoenzimas

4.4.1 Produção de Proteinase

Pesquisa de protease (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982)

Meio básico 1:

Ágar (Difco)	18,0 g
Água destilada	900,0 ml

Este meio será esterilizado por meio de autoclavação a 120°C por 15 minutos.

Meio de albumina para pesquisa de proteinase:

<i>Yeast Carbon base</i> (Difco)	11,70g
Albumina bovina fração V (Sigma)	2,0 g
Protovit (Roche)	2,5 ml
Água destilada	100,0 ml

O meio foi esterilizado por filtração (filtros Millipore de 0,22 μ m), misturado a 900 ml do MB1, resfriado a 55-56° C e distribuído em placas de Petri, e em volumes de 20 ml.

Preparação dos inóculos das leveduras

As amostras foram repicadas 48 horas antes de sua utilização. Um inóculo de cada isolado de levedura foi semeado em ponto, perfazendo cinco inóculos por placa. Estas foram incubadas a 37° C e as leituras levadas a efeito depois de completadas 72 horas. Os testes foram efetuados em duplicata e a amostra padrão ICB 12-A foi utilizada como controle positivo.

As amostras produtoras de protease devem produzir uma zona de precipitação, opaca, ao redor do ponto de inoculação. A atividade enzimática Prz foi obtida pelo quociente entre o diâmetro da colônia pela soma do diâmetro da colônia com o diâmetro do halo de precipitação. Os resultados foram classificados de acordo com Price, Wilkinson e Gentry (1982), Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Classificação da produção de proteinase segundo Price

Valor do Pz	Atividade enzimática
1,00	0 (ausente)
= > 0,64	1 (positiva)
< 0,64	2 (fortemente positiva)

4.4.2 Produção de Fosfolipase

A produção foi medida segundo a técnica descrita por Price et al. 1982.

Meio de emulsão de ovo

Gema de ovo 80,0 g

Solução fisiológica 80,0 ml

Os ovos foram deixados em álcool a 70% durante 1 hora para serem desinfetados. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em um recipiente esterilizado contendo pérolas de vidro, pesadas e adicionadas de solução fisiológica, agitando-se vigorosamente.

Meio Ágar fosfolipase

Peptona (Difco) 10,00 g

Glicose (Synth) 20,00 g

Cloreto de Sódio (Reagen) 57,30 g

Cloreto de cálcio (Reagen) 0,55 g

Ágar (Difco) 20,00 g

Água destilada 1000,00 ml

O meio foi esterilizado por autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

Ao ágar resfriado a 50° C foi adicionada a emulsão de ovo. Volume de 20 ml foi distribuído em placas de Petri sendo que em cada uma foram semeados 4 inóculos de *C. dubliniensis*. Estas, foram incubadas a 37° C e as leituras levadas a efeito após 4 dias. A leitura foi realizada da mesma forma que para proteinase, conforme descrito anteriormente.

4.5 Sensibilidade às toxinas “Killer”

Foi utilizada a técnica preconizada por Polonelli et al. (1983), na qual as cepas em estudo e as leveduras “padrão” crescem em ágar Sabouraud modificado, mas sem adição de azul de metileno.

O meio foi ajustado para pH $4,7 \pm 0,2$, distribuído em tubos de ensaio em volume de 20 ml e esterilizados a 120°C por 15 minutos.

As amostras e os isolados presuntivos de *C. dubliniensis* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose modificado e incubadas a 25° C por 48 horas. As leveduras foram suspensas em 1ml de água destilada estéril, obtendo-se turvação correspondente à escala 05 de McFarlane e misturadas em placas de Petri com 20 ml de ágar Sabouraud modificado contendo azul de metileno. Após solidificação da mistura, foi feita a inoculação das cepas “padrão” com alça de platina na superfície do meio. As cepas “padrão” produtoras de toxinas “killer” utilizadas são procedentes

da Universidade de Parma-Itália, cedidas pelo Departamento de Microbiologia do ICB-USP, denominadas K1 a K9 de acordo com a cepa de origem Quadro 4.3.

Cepas Padrão	Coleção Original	Prof. Polonelli
<i>Hansenula sp</i>	Stumm-1034	K1
<i>Pichia sp</i>	Stumm-1035	K2
<i>Hansenula anomala</i>	Un-Milano	K3
<i>Hansenula anomala</i>	CBS-5759	K4
<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn-UN866	K5
<i>Hansenula californica</i>	Ahearn-WC40	K6
<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn-WC41	K7
<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn-WC44	K8
<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn-WC51	K9

Quadro 4.3 -Cepas padrão para o teste de sensibilidade a toxinas “Killer” (PONELLI et al., 1983)

Foram considerados sensíveis, os cultivos que apresentaram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis ao redor das cepas “padrão”, e como resistentes, os cultivos que apresentaram crescimento ao redor destas cepas.

Os resultados foram tabulados segundo o esquema proposto por Polonelli et al. (1983).

Tabela 4.2 - Formação dos biotipos "killer" (POLONELLI et al., 1983)

Atividade do 1°. tripleteo				Atividade do 2°. tripleteo				Atividade do 2°. tripleteo			
k1	K2	k3	Código	K3	K4	K5	Código	K7	K8	K9	Código
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

4.6 E-test

4.6.1 Meios de cultivo

O meio RPMI-ágar (20,8g de RPMI-ágar-1640 (Gibco) e 500 ml de Água deionizada) foi ajustado para pH 7,0 com tampão fosfato para os testes com derivados azólicos e com MOPS para anfotericina B. Após esterilização por filtração, o meio foi distribuído em tubos, em volume de 25 ml.

4.6.2 Ágar dextrose

Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Glicose (Synth).....	20 g
Água deionizada.....	500ml

Este meio foi esterilizado em autoclave a 120° C durante 15 minutos e guardado em volume de 25 ml a 4° C até o momento do uso.

4.6.3 Fitas E-test

As fitas E-test foram adquiridas da AB BIODISK, cada qual contendo gradiente de concentrações correspondendo a 0,016 a 256 µg/ml para fluconazol e de 0,002 a 32 µg/ml para cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, sendo este gradiente identificado no verso da tira. As tira E-test foram armazenadas em freezer a – 20° C até serem utilizadas.

4.6.4 Preparo do inóculo

As leveduras isoladas foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) por 24 horas a 35° C e subcultivadas por duas vezes para assegurar sua pureza e

viabilidade. A suspensão foi preparada em 5 ml de água deionizada esterilizada, e a densidade celular foi ajustada em um espectrofotômetro para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm.

4.6.5 Determinação da concentração inibitória mínima

Os frascos contendo 25 ml de ágar dextrose foram fundidos, resfriados a 50° C e adicionados de 25 ml do meio de ágar RPMI-1640. A mistura homogeneizada, contendo 50 mL, foi vertida em placa de Petri esterilizada (15 mm X 15 mm), e após solidificação do meio, as placas foram estocadas a 4° C. Antes da inoculação, as placas de ágar RPMI-1640 e as fitas de Etest foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 0,6 mL, referente a cada inóculo, foi distribuído homogeneamente com auxílio de “swab” sobre a superfície do ágar e as placas deixadas a temperatura ambiente por 15 minutos para completa absorção da suspensão pelo ágar. Decorrido este tempo, as fitas de E-test foram cuidadosamente colocadas sobre a superfície do ágar. As placas foram mantidas a 35° C durante 24 horas e a ICM foi lida como sendo o ponto em que o limite da área de inibição de crescimento do organismo na superfície do ágar interceptou a fita de Etest. Conforme orientação técnica fornecida pelo fabricante, em casos de crescimento de colônias pequenas no interior da área de inibição, o limite desta área foi considerado a linha em que as colônias iniciam a mudança de seu tamanho.

4.6.6 Análise dos resultados dos testes de suscetibilidade

Os resultados de concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidos foram analisados segundo 4 características:

- a. Variação de valores de CIM de cada droga, representando os limites inferior e superior de CIM.
- b. CIM-50, que representa a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- c. CIM-90, que representa a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.
- d. Valores obtidos comparados aos níveis séricos atingidos por essas drogas, segundo Thornsberry e Sabath (1985). Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram $CIM \geq 8 \mu\text{g/ml}$ para os derivados azólicos e $CIM \geq 2 \mu\text{g/ml}$ para anfotericina B.

4.6.7 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi realizada em todas as variáveis do estudo.

Na tentativa de avaliar estes dados foi realizada uma correlação entre os valores de adesão obtidos em cada amostra com a sua produção de proteinase, fosfolipase e toxinas Killer.

Estes valores foram correlacionados por meio do teste de Correlação de Pearson com auxílio do software Biostat[®] 3.0.

5 RESULTADOS

5.1 Leveduras

As 4 amostras de *C. dubliniensis* (ATCC 777, ATCC 778, CD 07 e CD 14) e os 5 isolados presuntivos (013, 038, 058, 096, 107) apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos bem como padrão de cor verde-escuro e ausência de crescimento a 42° C.

5.2 Ensaio de adesão

No ensaio de adesão a amostra de *C. dubliniensis* ATCC 777 foi fortemente aderente enquanto as amostras ATCC 778, CD 07, CD 14 e os isolados presuntivos 013, 038, 058, 096, 107 foram aderentes. Nenhum isolado apresentou-se fracamente aderente, Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão de adesão de amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos a células pré-estabelecidas HeLa

Amostras/ Isolados	ATCC777	ATCC 778	CD 07	CD14	096	058	107	038	013
MÉDIA DE ADESÃO*	53,53	26,93	26,53	14,13	32,27	19,20	27,93	13,93	21,20
DESVIO PADRÃO	+/- 5,15	+/- 8,25	+/- 6,46	+/- 3,87	+/- 5,65	+/- 15,55	+/- 4,30	+/- 2,54	+/- 1,44

* Média de Adesão

Fortemente aderentes - 40 leveduras em 100 células HeLa

Aderentes -10 e 40 leveduras em 100 células HeLa

Fracamente aderentes - menos de 10 leveduras em 100 células HeLa

5.3 Produção de exoenzimas

5.3.1 Proteinase

A produção de proteinase foi fortemente positiva (índice 3) nas amostras de *C. dubliniensis*, (ATCC 777, ATCC 778, CD 07, CD 14) enquanto nos isolados presuntivos somente um (038) foi positivo (índice 2) Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Níveis de produção de proteinase nas amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

Isolados	Produção de PROTEINASE	Índice de Produção de PROTEINASE*
ATCC 777	0,20	3
ATCC 778	0,27	3
CD 07	0,22	3
CD 14	0,25	3
013	1,0	1
038	0,80	2
058	1,0	1
096	1,0	1
107	1,0	1

* Índice PZ – índice de produção de exoenzimas (proteínase e fosfolipase)
 Índice 1: Pz = 1,0 Ausência de atividade enzimática.
 Índice 2: $1,0 < Pz > 0,64$ Atividade enzimática positiva.
 Índice 3: $Pz < 0,64$ Atividade enzimática fortemente positiva.

5.3.2 Fosfolipase

A produção de fosfolipase foi fortemente positiva nas amostras de *C. dubliniensis* ATCC 778, CD 14, (índice 3), positivos para as amostras ATCC 777 e CD 07 (índice 2) enquanto nos isolados presuntivos foi fortemente positivo para 038, 107 (índice 3), e positivo para 013, 058, 096 (índice 2) , (Tabela 5.3)

Tabela 5.3 -Níveis de produção de fosfolipase nas amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

Isolados	Produção de FOSFOLIPASE	Índice de Produção de FOSFOLIPASE*
ATCC 777	0,80	2
ATCC 778	0,42	3
CD 07	0,73	2
CD 14	0,36	3
013	0,70	2
038	0,50	3
058	0,77	2
096	0,77	2
107	0,46	3

* Índice PZ – índice de produção de exoenzimas (proteínase e fosfolipase)
 Índice 1: Pz = 1,0 Ausência de atividade enzimática.
 Índice 2: $1,0 < Pz > 0,64$ Atividade enzimática positiva.
 Índice 3: $Pz < 0,64$ Atividade enzimática fortemente positiva.

5.4 Sensibilidade às Toxinas Killer

Os testes de sensibilidade a toxinas “Killer” mostraram dois biótipos diferentes, 688 e 888, sendo 3 amostras de *C. dubliniensis* e 5 isolados presuntivos biótipo 888 e uma amostra biótipo 688 (ATCC 777), sensível a toxina K2.

5.5 Sensibilidade a antifúngicos

Utilizando o E- test. as amostras e os isolados presuntivos de *C. dubliniensis* foram avaliados para os antifúngicos anfotericina, fluconazol, flucitosine, itraconazol, ketoconazol, voriconazol

De acordo com os valores mostrados na Tabela 5.4, nenhuma amostra ou isolado presuntivo mostrou-se resistente à família dos azóis ou à anfotericina B.

Tabela 5.4 - Sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos, utilizando o E- test

Amostras/Isolados	Anfotericina	Fluconazol	Flucitosine	Itraconazol	Ketoconazol	Voriconazol
CD 07	< 0.002*	0.008	0.047	0.002	< 0.002	< 0.002
CD 14	0.004	0.002	0.047	0.004	< 0.002	< 0.002
ATCC 777	< 0.002	< 0,002	0.125	0.002	< 0.002	< 0.002
ATCC 778	0.016	0.008	1.0	0.25	0.012	0.012
107	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002
038	0.032	0.016	0.25	0.047	0.008	0.006
013	< 0.002	0.003	0.125	0.003	< 0.002	< 0.002
058	.0023	0.016	0.50	0.047	0.016	0.012
096	0.016	0.016	0.25	0.016	0.002	0.023

* Valores obtidos comparados aos níveis séricos atingidos por essas drogas, segundo Thornsberry & Sabath, 1985. Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ para os derivados azólicos e CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para anfotericina B.

5.6 Correlação entre Adesão e produção de Proteinase

O teste de correlação mostrou um valor de $r = -0,3002$, que caracteriza não haver correlação estatística significativa, ($p=0,4325$) entre os valores de adesão e de produção de proteinase nas amostras de *C. dubliniensis* e nos isolados presuntivos. (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Índice de correlação de Pearson para Adesão e produção de proteinase das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

Amostras/ Isolados	Média e desvio padrão da Adesão*	Produção de Proteinase**
ATCC 777	53,53 +/- 5,15	0,20
ATCC 778	26,93 +/- 8,25	0,27
CD 07	26,53 +/- 6,46	0,22
CD 14	14,13 +/- 3,87	0,25
096	32,27 +/- 5,65	1,0
058	19,20 +/- 15,55	1,0
107	27,93 +/- 4,30	1,0
038	13,93 +/- 2,54	0,80
013	21,20 +/- 1,44	1,0

* Média e do número de células de leveduras aderidas por 100 células HeLa
 Fortemente aderentes - 40 leveduras em 100 células HeLa
 Aderentes - 10 e 40 leveduras em 100 células HeLa
 Fracamente aderentes - menos de 10 leveduras em 100 células HeLa

** Índice PZ – índice de produção de exoenzimas (proteinase e fosfolipase)
 Índice 1: Pz = 1,0 Ausência de atividade enzimática.
 Índice 2: $1,0 < Pz < 0,64$ Atividade enzimática positiva.
 Índice 3: $Pz < 0,64$ Atividade enzimática fortemente positiva.

O Gráfico 5.1 mostra ausência de correlação das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos avaliados segundo as variáveis adesão e produção de proteinase.

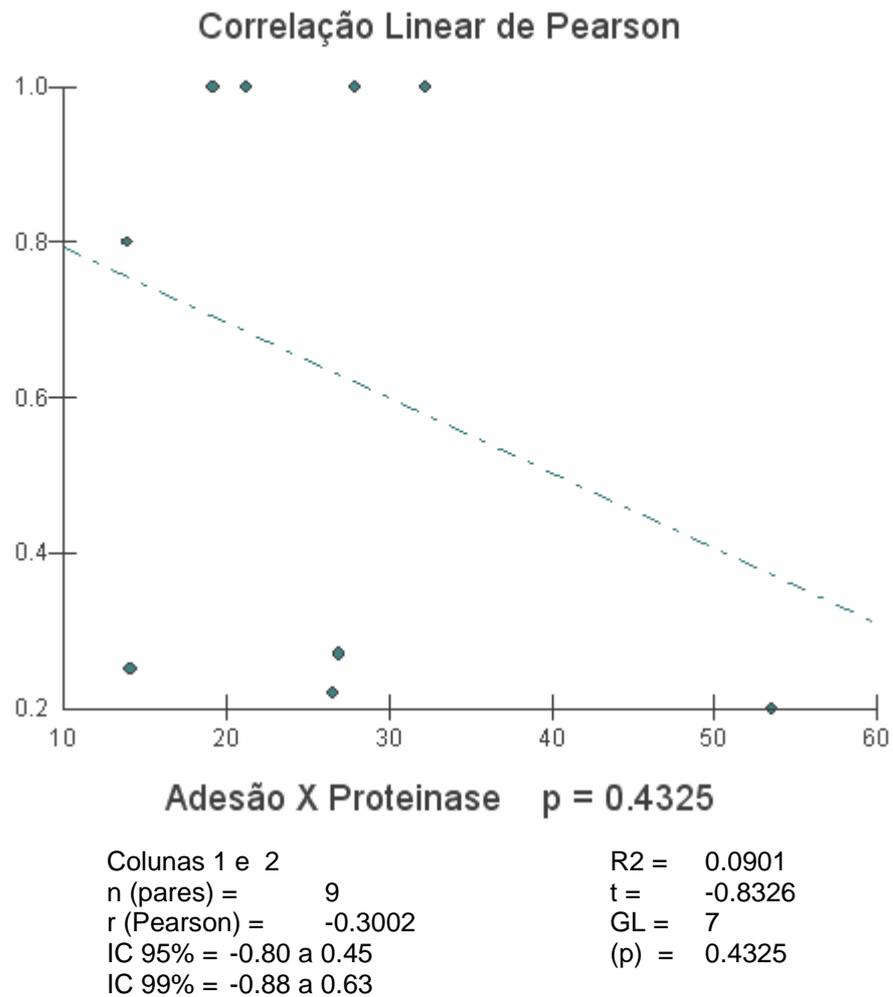


Grafico 5.1 - Teste de correlação entre os valores de adesão e de produção de proteinase das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

5.7 Correlação entre Adesão e produção de Fosfolipase

O teste de correlação mostrou um valor de $r = 0,5130$ que caracteriza não haver correlação estatística significativa, ($p=0,1578$) entre os valores de adesão e de produção de fosfolipase nas amostras de *C. dubliniensis* e nos isolados presuntivos. (Tabela 5.6).

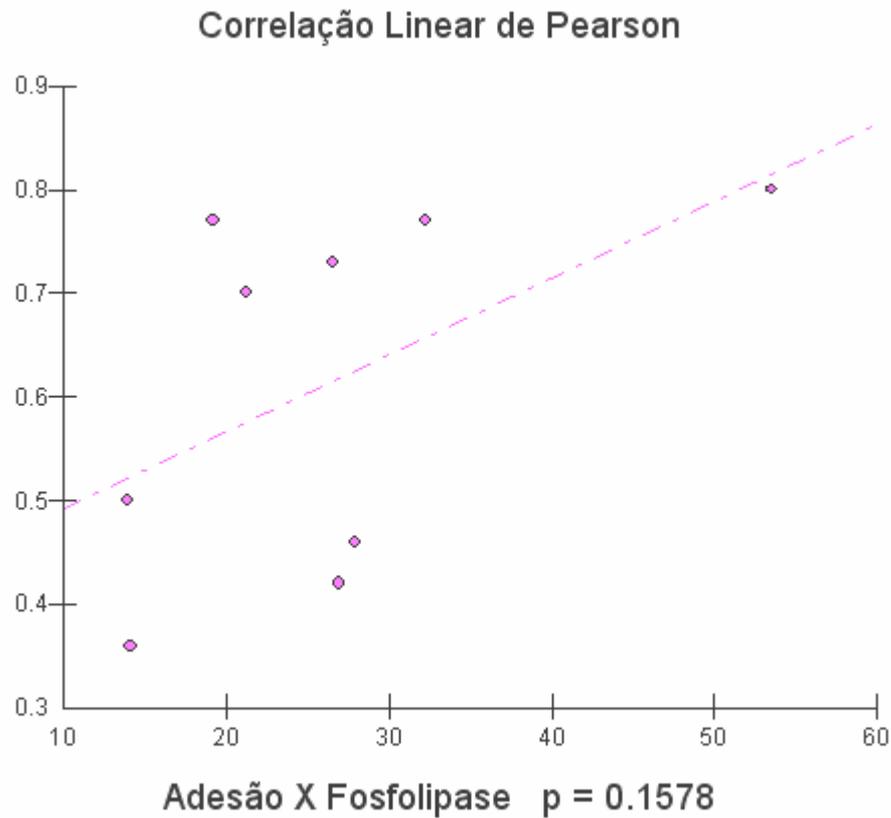
Tabela 5.6 Índice de correlação de Pearson – Adesão e produção de fosfolipase das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

Isolados	Média e desvio padrão da Adesão*		**Produção de Fosfolipase
ATCC 777	53,53	+/- 5,15	0,80
ATCC 778	26,93	+/- 8,25	0,42
CD 07	26,53	+/- 6,46	0,73
CD 14	14,13	+/- 3,87	0,36
096	32,27	+/- 5,65	0,77
058	19,20	+/-15,55	0,77
107	27,93	+/- 4,30	0,46
038	13,93	+/- 2,54	0,50
013	21,20	+/- 1,44	0,70

* Média e do número de células de leveduras aderidas por 100 células HeLa
 Fortemente aderentes - 40 leveduras em 100 células HeLa
 Aderentes -10 e 40 leveduras em 100 células HeLa
 Fracamente aderentes - menos de 10 leveduras em 100 células HeLa

** Índice PZ – índice de produção de exoenzimas (proteínase e fosfolipase)
 Índice 1: Pz = 1,0 Ausência de atividade enzimática.
 Índice 2: 1,0 < Pz > 0,64 Atividade enzimática positiva.
 Índice 3: Pz < 0,64 Atividade enzimática fortemente positiva.

O Gráfico 5.2 mostra ausência de correlação das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos avaliados segundo as variáveis adesão e produção de fosfolipase.



Colunas 1 e 3	R2 = 0.2631
n (pares) = 9	t = 1.5811
r (Pearson) = 0.5130	GL = 7
IC 95% = -0.23 a 0.88	(p) = 0.157
IC 99% = -0.45 a 0.92	

Grafico 5.2 - Teste de correlação entre os valores de adesão e de produção de fosfolipase das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

5.8 Correlação entre Adesão e sensibilidade as Toxinas “Killer”

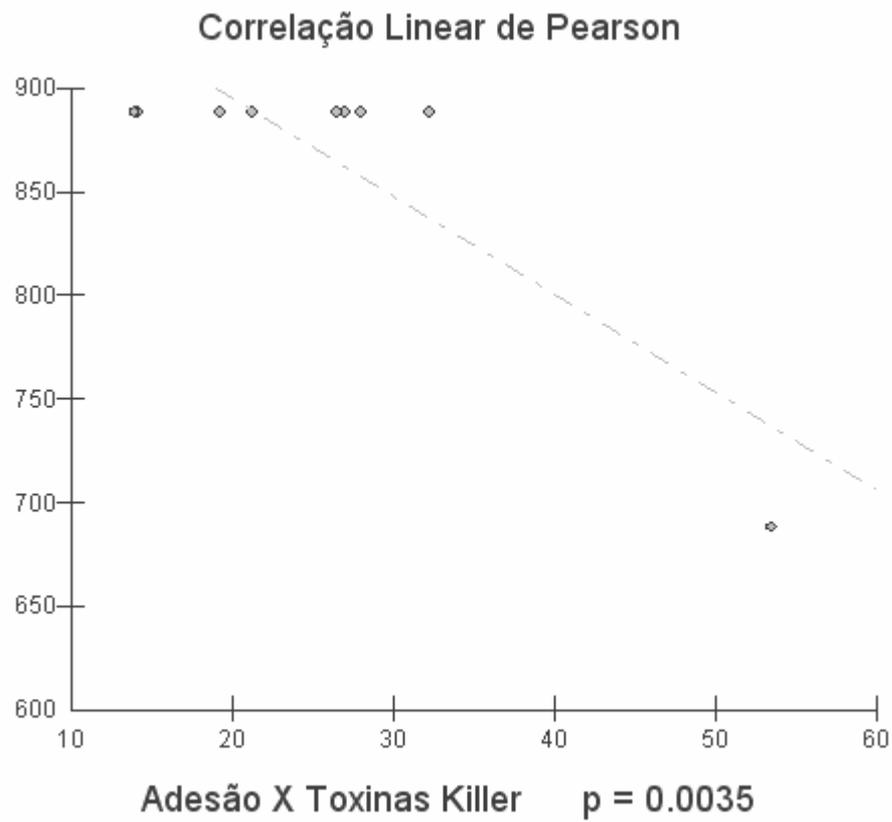
Com relação a sensibilidade às toxinas killer, verificou-se pelo teste de correlação de Pearson um valor de $r = -0,8525$ que caracteriza haver correlação inversa significativa ($p = 0,0035$), ou seja, para os maiores valores de adesão, mais sensível a toxinas Killer nas das amostras de *C. dubliniensis* e nos isolados presuntivos.

Tabela 5.7 -Índice de correlação de Pearson – Adesão e sensibilidade às Toxinas killer de amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

Isolados	Média e desvio padrão da Adesão*		**Biotipo killer
ATCC 777	53,53	+/- 5,15	688
ATCC 778	26,93	+/- 8,25	888
CD 07	26,53	+/- 6,46	888
CD 14	14,13	+/- 3,87	888
096	32,27	+/- 5,65	888
058	19,20	+/-15,55	888
107	27,93	+/- 4,30	888
038	13,93	+/- 2,54	888
013	21,20	+/- 1,44	888

* Média e do número de células de leveduras aderidas por 100 células HeLa
 Fortemente aderentes - 40 leveduras em 100 células HeLa
 Aderentes -10 e 40 leveduras em 100 células HeLa
 Fracamente aderentes - menos de 10 leveduras em 100 células HeLa

O Gráfico 5.3 mostra os resultados obtidos dos 9 isolados avaliados, segundo as variáveis adesão e sensibilidade às Toxinas Killer.



Colunas 1 e 4

n (pares) = 9

r (Pearson) = -0.8525

IC 95% = -0.97 a -0.43

IC 99% = -0.98 a -0.21

R2 = 0.7268

t = -4.3148

GL = 7

(p) = 0.0035

Grafico 5.3 - Teste de correlação entre os valores de adesão e sensibilidade às Toxinas "Killer" das amostras de *C. dubliniensis* e isolados presuntivos

6 DISCUSSÃO

A importância da candidose de mucosa bucal em pacientes HIV positivos reside na repetição de episódios, caracterizando uma morbidade significativa (SAMARANAYAKE; MACFARLANE, 1984, SAMARANAYAKE et al., 2006).

A literatura é bastante controversa sobre as razões da alta incidência de candidose em pacientes portadores de AIDS. Alguns acreditam que a deficiência do sistema imune deflagrada durante a doença seria responsável pela severidade e cronicidade da candidose bucal e não graças a uma alta patogenicidade da levedura, já que os estudos não comprovaram diferenças marcantes entre os isolados de indivíduos portadores do vírus e de pacientes HIV negativos (ELIAS, 2005; LUSVARGHI, 2002; MOREIRA, 2005; PIRES et al., 1996; PIRES et al., 2001; PONGSIRIWET et al., 2004; SAMARANAYAKE; HOLMSTRUP, 1989; SAMARANAYAKE et al., 2006; SILVA 2005). À luz do que pudemos verificar até o presente, somos concordes com a primeira hipótese.

6.1 Adesão

A caracterização de *C. albicans* e outras leveduras desse gênero isoladas de pacientes com AIDS com relação aos fatores de virulência, adesão e produção de exoenzimas começou a aumentar a partir de trabalhos publicados na década de 90 (BUGNI, 2003; De BERNARDIS et al., 1996; LUSVARGHI, 2002; MELO, 2000; PIRES et al., 1996; SILVA, 1999; WU et al., 1996).

Alguns autores relatam que, *in vitro*, a inibição da proteinase reduzia a capacidade de adesão de *C. albicans* a células epiteliais (BORG ; RÜCHEL, 1998; EI-MAGHRABI; DIXON; BURNET, 1990; McCULLOUGH; ROSS; READE, 1995; OLLERT et al., 1993; SULLIVAN et al., 1999). Em nosso trabalho observou-se que a amostra padrão de *C. dubliniensis* ATCC 777 fortemente aderente foi altamente produtora de proteinase o que não ocorreu em relação as demais amostras de *C. dubliniensis* altamente produtores de proteinase e apenas aderentes. Mesmo os isolados presuntivos dessa levedura não produtores de proteinase foram aderentes. Nenhuma amostra ou isolado presuntivo apresentou-se fracamente aderente. Resultados semelhantes foram observados por Melo (2000). Pires et al., (2001), estudando *C. albicans*.

Com relação a produção de fosfolipase não se observou diferença na média de aderência de amostras e isolados presuntivos de *C. dubliniensis*.

Vale ressaltar que a pesquisa de adesão com *C. dubliniensis*, em células pré-estabelecidas é pioneira não havendo trabalhos para discutir esses dados. Muito do que se pesquisa em relação a *C. dubliniensis* é comparado a resultados obtidos com *C. albicans*, sendo essas extrapolações perfeitamente explicáveis, até que se conheça melhor o perfil comportamental da nova espécie, principalmente em relação aos seus mecanismos de virulência e interação com o organismo do ser humano.

6.2 Produção de exoenzimas

A produção de enzimas extracelulares como proteinase e fosfolipase estão entre os fatores de virulência do gênero *Candida* mais estudados. Pires et al., 1996 estudando 50 cepas de *C. albicans*, isoladas de lesões bucais de pacientes portadores de HIV, observaram que 96% dessas cepas eram produtoras de proteinase e 90% produziam também fosfolipase.

A produção de exoenzimas em *C. dubliniensis* parece não apresentar diferenças estatisticamente significativas com a espécie *C. albicans* (HANNULA et al., 2000). McCullough, Ross e Reade (1995), ao contrário, relataram que *C. dubliniensis* pode ser mais virulenta, desde que tenha uma maior produção dos níveis de proteinase e uma maior aderência a superfície celular da mucosa bucal quando comparada com *C. albicans*. Neste estudo pesquisou-se a produção dessas enzimas com o objetivo de se conhecer melhor o comportamento de patogenicidade dessas cepas. Os resultados permitiram observar a produção de proteinase e fosfolipase das amostras de leveduras assim distribuídas:

- Das 09 amostras de leveduras a atividade enzimática para proteinase mostrou-se se fortemente positiva para a amostra padrão de *C dubliniensis* ATCC 777, e amostras ATCC 778 CD 07 e CD 14. Entre os isolados presuntivos de *C dubliniensis* 1 (038), positivo e nos demais 013, 058, 096 e 107, não se observou atividade enzimática.
- Para a produção de fosfolipase não houve um comportamento distinto entre as amostras de *C dubliniensis* e os isolados presuntivos. Nenhuma amostra deixou de produzir esta enzima.

6.3 Sensibilidade às Toxinas “Killer”

A sensibilidade a toxinas “Killer” permite determinar um significativo número de tipos sensíveis de cepas de *Candida*. Lusvarghi, 2002, estudando *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos tratados com antiretrovirais associados a inibidores de protease encontrou o biótipo 111 (sensível a todas as toxinas) em 8 (12,90%) dos pacientes sem lesão e em apenas 1 (3,75%) paciente portador de candidose eritematosa. Também encontrou o biótipo 888 em 25% dos isolados de pacientes portadores de candidose bucal; no grupo sem lesão e o biótipo 587 em 24,19%. Bugni, 2003 estudando *C.albicans* isolados da mucosa bucal de pacientes HIV positivos encontrou o biótipo 888 em 21,5 % (14/65 amostras) sendo 10 em pacientes com candidíase do tipo eritematosa .

Em nosso estudo foram dois os biotipos encontrados: 888 (88,88%) e 688 (11,11%) do total de 9 amostras estudadas.

Silva (1999) comparou isolados de *C. albicans* de pacientes portadores do vírus HIV e não portadores do vírus, observando que isolados de pacientes com AIDS são resistentes às toxinas K2 e K3, enquanto que os isolados de indivíduos HIV negativos são sensíveis a todas as toxinas, verificando uma tendência a resistência nos isolados de pacientes com AIDS. Neste estudo a amostra biótipo 688 (ATCC 777) de *C dubliniensis* foi sensível a toxina K2. As demais amostras de *C dubliniensis*, bem como os isolados presuntivos apesar de serem provenientes de indivíduos HIV+ foram resistentes, verificando se uma diferença de comportamento entre os resultados com as amostras de *C. albicans* de pacientes portadores do vírus HIV.

6.4 Sensibilidade a antifúngicos

A severidade dos casos de candidose fez com que os protocolos preventivos com drogas antifúngicas, principalmente o fluconazol, fossem adotados; o que é apontado por alguns autores como responsável pela seleção de cepas resistentes a derivados azólicos (AGRESTI; DE BERNARDIS; MONDELO, 1994, COSTA; PASSOS; MIRANDA, 2004; COSTA, 2005; GEORGOPAPADAKU; WALSH, 1994; SAMARANAYAKE et al., 2006). Outro dado que colabora com esta hipótese é que a resistência apresentada por *Candida* a antifúngicos azólicos não é evidenciada como um problema em pacientes não HIV positivos (MOREIRA, 2005; ODDS, 1988, SILVA 2005).

Sendo os azóis, em especial o fluconazol, o antifúngico mais empregado no tratamento da candidose bucal, interessa reconhecer o comportamento dessas amostras de *C. dubliniensis* frente a esta família de azóis. O reconhecimento tem importância porque a presença dessa levedura está relacionada a candidíases recorrentes da cavidade bucal de pacientes HIV positivos. Estudos de Pfaller et al. (1999) e Martinez et al. (2002), realizados em pacientes submetidos ao tratamento com fluconazol, mostraram *C. albicans* sensíveis ao fluconazol no início do estudo, mas durante todos os episódios subsequentes de candidoses orofaríngeas, cerca de 30% das amostras desenvolveram resistência. Coleman et al. (1998), Ruhnke et al. (2000) e Jabra-Risk et al. (2000), estudando candidíase orofaríngea observaram que os primeiros isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, (cerca de 27%) foram substituídos por isolados de *C. dubliniensis*, confirmados genotipicamente, durante o tratamento com este antifúngico.

São cada vez mais freqüentes os trabalhos que evidenciam o surgimento de espécies de leveduras não *albicans* nas candidoses orofaríngeas, cuja presença é entendida, por uns, como cúmplice na infecção, por outros, como vítima da mesma. Vilela et al. (2002) relatam que *C. dubliniensis* é menos virulenta do que *C. albicans*. O estudo foi desenvolvido *in vivo* utilizando camundongos, que reagiram melhor à infecção causada por *C. dubliniensis* do que por *C. albicans*. Kim et al., (2003) relatam que a espécie *C. dubliniensis* quando isolada parece ser mais sensível ao efeito fungicida do neutrófilo humano que *C. albicans*.

Em nosso estudo amostras e isolados presuntivos de *C. dubliniensis* testadas utilizando se o E-test foram sensíveis à família dos azóis com valores de CIM de $\leq 0.002 - 1.0$ mg/ml e para Anfotericina B os valores de CMI estavam entre $\geq 0.002- 0.032$.

É de nosso conhecimento que o número de amostras utilizadas nesta pesquisa é pequeno para conclusões sem ressalvas que possamos vir a ter. Mas nas condições desse estudo permitimo-nos comentar que excetuando a amostra padrão ATCC 777 que teve comportamento distinto em relação às demais amostras, identificadas por genotipagem, como *C. dubliniensis* e isolados presuntivos, todas apresentaram um comportamento semelhante entre si com relação a adesão à células pré estabelecidas, produção de fosfolipase, biótipo “Killer” e sensibilidade a antifúngicos possibilitando indicar a viabilidade dos testes presuntivos de pigmento em Chromagar e crescimento a 42° como diferenciadores de *C. albicans* e *C. dubliniensis* nos casos onde não exista a possibilidade de genotipar os isolados identificados como *C. albicans* em recidivas de infecção bucal em pacientes HIV positivos.

Estudos com um maior número de amostras de *C. dubliniensis* e utilizando-se esses testes ainda são necessários para elucidar se realmente existe um comportamento fenotípico diferencial dessa levedura em relação a *C. albicans*.

7 CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo podemos concluir que:

- 7.1 A amostra padrão de *C. dubliniensis* ATCC 777 fortemente aderente foi altamente produtora de proteinase o que não ocorreu em relação as demais amostras de *C. dubliniensis* altamente produtores de proteinase e apenas aderentes. Mesmo os isolados presuntivos dessa levedura não produtores de proteinase foram aderentes. Nenhuma amostra apresentou-se fracamente aderente.
- 7.2 A atividade enzimática para proteinase mostrou-se se fortemente positiva para a amostra padrão ATCC 777, amostra ATCC 778 e dois isolados de *C dubliniensis* CD 07 e CD 14. Entre os isolados presuntivos de *C dubliniensis* 1 (038), positivo e nos demais 013, 058, 096 e 107, não se observou atividade enzimática.
- 7.3 Para a produção de fosfolipase não houve um comportamento distinto entre as amostras de *C dubliniensis* e os isolados presuntivos. Nenhuma amostra deixou de produzir esta enzima.

- 7.4 Na pesquisa de sensibilidade às toxinas Killer, a amostra ATCC 777 de *C dubliniensis* foi sensível à toxina K2. As demais amostras de *C dubliniensis*, bem como os isolados presuntivos apesar de serem provenientes de indivíduos HIV+ foram resistentes a K2, bem como, às demais toxinas, verificando se uma diferença de comportamento entre os resultados com as amostras de *C. albicans* de pacientes portadores do vírus HIV.
- 7.5 Amostras e isolados presuntivos de *C. dubliniensis* testadas utilizando se o E-test, foram sensíveis a família dos azóis com valores de CIM de $\leq 0.002 - 1.0$ mg/ml e para Anfotericina B os valores de CMI estavam entre $\geq 0.002 - 0.032$.
- 7.6 Exceto a amostra padrão ATCC 777 que teve comportamento distinto em relação às demais amostras, identificadas por genotipagem, como *C. dubliniensis* e isolados presuntivos, todas apresentaram um comportamento semelhante entre si, possibilitando indicar a viabilidade dos testes de pigmento em Chromagar e crescimento a 42° como diferenciadores de *C. albicans* e *C. dubliniensis* nos casos de impossibilidade de se genotipar os isolados identificados como *C. albicans* em recidivas de infecção bucal em pacientes HIV positivos.

REFERÊNCIAS¹

- Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the desing of antifungal agents. *Protein Sci* 1996;5(4):640-52.
- Agresti MG, De Bernardis F, Mondello F. Clinical and mycological evaluation of fluconazole in the secondary prophylaxis of esophageal candidiasis in AIDS patientes. *Eur J Epidemiol* 1994;10:17-22.
- Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid ferric citrate agar. *J Clin Microbiol* 2001;39(1):323-7.
- Alves SH, Horta JA, Milan EV, Scheid LA, Vainstein MH, Santurio J et al. Carbohydrate assimilation profiles of brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005;47(2):109-11.
- Barchiesi F, Maracci M, Radi B, Arzeni D, Baldassarri I, Giacometti A, et al. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns os yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV- infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:999-1002.
- Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Florl C, et al. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *Immunol and Med Microbiol* 2001;31:65-71.
- Bendova O. The killer phenomenon in yeasts. *Folia Microbiol* 1986;31(5):422-33.
- Biasoli MS, Tosello ME, Magaró HM. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 2002;45:465-9.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo as bases Medline.

Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, Cebas G, Clarke DC, Coleman DC, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastopores and *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol* 1998;36:2428-33.

Borg M, Rùchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp* during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 1998;56(3):626-31.

Bugni E. Candidíase oral e AIDS na era dos antiretrovirais: frequência de *Cândida albicans*, resposta a micocinas “killer” e índice enzimático [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Canton E, Peman J, Bosch M, Viudes A, Gobernado M. Activity of voriconazole against yeasts isolated from blood culture determined by two methods. *Rev Esp Quimioter* 2005;18(4):308-12.

Cassoni A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 1987;156(5):777-83.

Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997;11:557-67.

Colombo AL, Da Matta D, De Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *J Infect Dis* 2002;6:118-23.

Costa CR. Identificação e susceptibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* isoladas de pacientes HIV positivos [Dissertação de Mestrado]. Goiás: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás; 2005.

Costa M, Passos XS, Miranda ATB, De Araujo RSC, Paula CR, Silva MRR. Correlation of *in vitro* itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycophatol* 2004;157:43-7.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol* 1991;45:187-218.

Cultfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, Moody PCE, Marshall CJ, Sullivan PA. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. *Structure* 1995;3(11):1261-71.

De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'óffizzi G, et al. Elevated Aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996;64:466-71.

Delgado W, Aguirre, JM. Las micosis orales en la era del sida. *Rev Iberoamer Micol* 1997;14:14-22.

Elias JC. Investigação de leveduras, pseudomonas aeruginosas e bactérias heterotróficas nas águas dos reservatórios nos equipos odontológicos que possam pelas seringas tríplices e utilizadas em pacientes sob tratamento periodontal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo; 2005.

El-Maghrabi EA, Dixon DM, Burnett JW. Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteinase and their role in yeast cell adherence to keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* 1990;15(3):183-91.

Freitas G, Lopes MM, Frade JP. VIH e infecções fúngicas. *Rev Amrigs* 2000;44(3-4):185-7.

Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 1994;264(5157):371-3.

Ghannoum MA, Radwan JJ. *Candida* adherence to epithelial cells. Boca Raton: CR Press; 1990.

Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 1998;144:829-38.

Graf B, Trost A, Eucker J, Gobel UB, Adam T. Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003;48:149-51.

Greenfield RA. Host defense system interactions with *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 1992;30(2):89-104.

Guilhermetti E. Micologia médica: uma área das análises clínicas que está em expansão. RBAC 2004;36(1):51-3.

Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kähkölä P, Pirinen, S, et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. Oral Microbiol Immunol 2000;15(4):238-44.

Hattori M, Yoshiura K, Negi M, Ogawa H. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. Sabouraudia 1984;22(3):175-83.

Hoegl L, Ollert M, Korting HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. J Mol Med 1996;74(3):135-42.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 2001;147(8):1997-2005.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans*. Mol Microbiol 1994;14(1):87-99.

Ibrahim AS, Mirbod F, Filler S, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun 1995;63(5):1993-8.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, JR Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV): infected and non- HIV-infected individuals. J Clin Microbiol 2000;38:2423-6.

Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 1999;37:1035-44.

Kim JO, Garofalo L, Shelly BD, McGowan, KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003;41(7):3354-7.

Klotz SA, Smith RL. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of fungus to extracellular matrix. J Infect Dis 1991;163:604-10.

Klotz SA, Rutten MJ, Smith RL, Babcock SR, Cunningham MD. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. Microb Pathog 1993;14(2):133-47.

Kogan BL. Mode of action of yeast "killer" toxin: channel formation in lipid membranes. Nature 1983;320:709-11.

Kurtzman CP, Fell JW. The yeast: a taxonomic study. Illinois: Elsevier; 1998.

Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan D, Coleman DC, Frosch M, Muhlschlegel FA. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. J Clin Microbiol 1999;37(5):1587-90.

Kwong Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. Infect Immun 1985;49(3):571-5.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1984.

Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. Mycoses 1991;38(5-6):217-20.

Lusvarghi AS. Estudo in vitro da atividade de exoenzimas, sensibilidade às toxinas "killer" e morfotipagem de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV+ sob tratamento com drogas inibidoras de proteinase [Tese de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 2002.

MacDonald F, Odds FC. Virulence for mice of a proteinase secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase deficient mutant. J Gen Microbiol 1983;129(2):431-8.

- Mariano PLS, Milan EP, Da Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brasil yeast stock collection. *Men Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(4):533-8.
- Marot-Leblond A, Grimaud L, David S, Sullivan DJ, Coleman DC, Ponton J. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):4956-60.
- Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* human immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002;40:3135-9.
- Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ, et al. Evaluation of etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolates from blood. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):1087-90.
- McCulloug M, Ross B, Reade P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1995;33:696-700.
- McCulloug MJ, Jorge JJ, Lejbkowitz F, Lefler E, Nassar F, Clemons KV, et al. Genotypic differences os *Candida albicans* and *C. dubliniensis* isolates related to ethnic/racial differences within the same geographic area. *Mycopathol* 2004;153(1):39-41.
- Melo TA. Polimorfismo dos fragmentos de DNA, aderência, produção de exoenzimas e virulência in “vivo” de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com AIDS [Tese de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.
- Mitrovic S, Kranjcic-Zec I, Arsic V, Dzamic A. In vitro proteinase and phospholipase activity and pathogenicity of *Candida* species. *J Chemother* 1995;9(Supl 4):43-5.
- Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 1998;144(Pt10):2731-7.

Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:617-23.

Moreira D. Candidíase vulvovaginal: abordagem dos aspectos epidemiológicos, fatores predisponentes, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2005.

Mosca CO, Morague MD, Brena S, Rosa AC, Ponton J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Pathol* 2005;10:25-31.

Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral vaginal infections. *J Infect Dis* 2003;188:569-79.

Odds FC. *Candida* and candidosis. 2^a ed. London: Bllière Tyndall- London; 1988.

Oliveira K, Haase G, Kurzman J, Nielsen JH, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):4138-41.

Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W. Mechanism of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 1993;61(11):4560-8.

Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ, et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999;37:870-2.

Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3533-9.

Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;24:2093-5.

Pires MFC, Birman EG, Costa CR, Gambale W, Paula CR. *Candida albicans* byotypes isolated from the oral cavity of HIV positive patients. Rev Microbiol 1996;27:46-51.

Pires MFC, Corrêa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. Braz J Microbiol 2001;32:163-9.

Pollonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. "Killer" system: a simple method off differentiating *Candida albicans* strains. J Clin Microbiol 1983;17:774-80.

Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sribuee P, Pattanaporn K, Krisanaprakornkit S. Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV- infected children in northern Thailand. J Oral Science 2004;46:101-5.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982;20:7-14.

Pugh D, Cawson R. The cytochemical localization of phospholipase-A and lisophospholipase in *Candida albicans*. Sabouraudia 1977;13(1):110-5.

Rüchel R, Tegeler R, Trost MA. comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia 1982;20(3):233-44.

Ruhn M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and in *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. J Antimicrob Chemother 2000;46:291-5.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. Factors affecting the in vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. Arch Oral Biol 1982;27(10):869-73.

Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia 1984;22(3):201-7.

Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. J Oral Pathol Med 1989;18(10):554-64.

Samaranayake LP, Meurman JH, Kari K, Waltimo T, Kotiranta A, Inkeri J. *In vitro* antifungal effect of amine fluoride-stannous fluoride combination on oral *Candida* species. *Oral Dis* 2006;12(1):45-50.

Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E, Rodriguez J. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):489-91.

Shimizu MT, Almeida Q, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hialuronidase, chondroitin sulfatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* 1996;39(5-6):161-6.

Silva EH. Candidúria em hospital público infantil de São Paulo, sp: identificação, fatores relacionados à virulência, biotipagem, “killer” e sensibilidade aos antifúngicos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2005.

Silva MRR. Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1999.

Silveira FRX, Paula CR, Birman EG. Proteinase and phospholipase of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers). *Rev Iberoam Micol* 1993;10(4):105-8.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individual. *Microbiology* 1995;141:1507-21.

Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, Henman M, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus- infected individuals. *J Clin Microbiol* 1997;35:960-4.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;35:960-4.

Sullivan DJ, Moran G, Donnelly G, Pinjon E, McCartan B, Shanley DB, et al. *Candida dubliniensis*: an update. *Rev Iberoamer Micol* 1999;6:72-6.

Taylor BN, Fichtenbaum C, Saavedra M, Slavinski J, Swoboda R, Wozniak K, et al. In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infection in people infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000;182:955-9.

Thornsberry C, Sabath LD. Aproximate concentration of antimicrobial agents achieved in blood. *Manual of clinical microbiology*. 4^a ed. Washington: American Society for Microbiology; 1985.

Vilela MMS, Kamei K, Sano A, Tanaka R, Uno J, Takahashi I, et al. Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. *Med Mycol* 2002;40:549-57.

Werner H. Studies on the lipase activity in yeast and yeast like fungi. *Zentralbl Bakteriol* 1966;200(1):113-24.

White MH. Is vulvovaginal candidiasis an AIDS related illness? *Clin Infect Dis* 1996;22:124-7.

Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 1996;44(4):311-6.

APÊNDICE A – Ficha de identificação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA – SEÇÃO DE MICOLOGIA
LABORATÓRIO DE LEVEDURAS

Procedência: _____ **Registro:** _____

Observações _____

1. Exame direto _____

2. Crescimento em meios usuais _____

Crescimento em meio ácidos graxos _____

3. Microcultivo e tubo germinativo _____

PM: BL: AR: TG: MV: CL: Outros: _____

4. Ascos e Ascósporos

Positivo _____ Negativo _____ Forma _____ Número _____ Local. _____

5. Outras provas:

Síntese de amido _____ Prod. Melanina _____ TTC _____

6. Auxanograma:

KNO³: _____ Peptona: _____ Glicose: _____ Inositol: _____ Sacarose: _____ Lactose: _____

Dulcitol: _____ Xilose: _____ Rafinose: _____ Celobiose: _____ Melibiose: _____

Trealose: _____ Ramnose: _____ Maltose: _____

7. Zimograma:

Glicose: _____ Maltose: _____ Lactose: _____ Sacarose: _____

Diagnóstico: _____

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 15 de outubro de 2004

Ilmo(a) Sr(a): **FERNANDO RICARDO XAVIER DA SILVEIRA**
MARIA DE FÁTIMA COSTA PIRES

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa: **PESQUISA DE MICOVÍRUS, ADESÃO, PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS, SUSCEPTIBILIDADE A TOXINAS “KILLER” E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE CEPAS DE *Cândida dubliniensis* ISOLADAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente

Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da USP

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo



PARECER nº 212/03
Protocolo 189/03

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Pesquisa de micovirus, adesão, produção de exoenzimas, susceptibilidade a toxinas killer e resistência a antifúngicos de cepas de Candida dubliniensis isoladas de pacientes HIV positivos**", de responsabilidade da pesquisadora **Gismari Miranda da Silva**, sob orientação do Professor Doutor Fernando Ricardo Xavier da Silveira.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 02 de dezembro de 2003.


Profª Drª ~~ROSA HELENA~~ MIRANDA GRANDE
Coordenadora do CEP-FOUSP

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.