

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

JANINE DE AQUINO LEMOS

**EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS NA ATIVIDADE DE PROTEINASE DE ISOLADOS
DE *Candida albicans* OBTIDOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES HIV
POSITIVOS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Tese de Doutorado

GOIÂNIA – GO, 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

JANINE DE AQUINO LEMOS

**EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS NA ATIVIDADE DE PROTEINASE DE ISOLADOS
DE *Candida albicans* OBTIDOS DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES HIV
POSITIVOS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de Microbiologia.

Trabalho realizado com o auxílio financeiro do CNPq.

GOIÂNIA – GO, 2008

Pedi e recebereis, buscai e encontrareis, batei e abrir-se-vos-á, porque aquele que pede recebe; o que busca encontra; e ao que bate se abre! (“Mat.7:7-8”)

À Deus por ter me dado a vida, me guiado e iluminado nesse caminho de lutas em busca da vitória!!!

À minha mãe, que é, foi e sempre será o meu espelho, exemplo de força, coragem e dedicação, sempre me apoiando e incentivando, nas horas difíceis para superar os obstáculos e continuar lutando para atingir meus objetivos. Soube se fazer ternamente presente mesmo quando o silêncio se fazia inevitável. À você meu amor incondicional e o meu “muito obrigado”

*À minha querida irmã Aline, a minha Avó, meu Tio,
a Selma e aos meus amigos pelo apoio e carinho em
todos os momentos.*

À minha querida orientadora e amiga Prof^{ta} Dra. Maria do Rosário (Zaia), pelo carinho, amizade, incentivo, ensinamentos e confiança, sem a qual nada disso seria possível! Toda a minha admiração, gratidão, respeito e o meu carinho, pela perseverança, coragem paciência e competência incontestável por fazer tudo isso se tornar realidade pra mim. Muito obrigada Zaia!!

AGRADECIMENTOS

”Quero ser teu amigo, nem demais e nem de menos, nem tão longe nem tão perto. Na medida mais precisa que eu puder! Mas amar-te, sem medida, e ficar na tua vida da maneira mais discreta que eu souber! Sem tirar-te a liberdade e sem jamais te sufocar! Sem falar quando for hora de calar, e sem calar, quando for hora de falar. Nem ausente nem presente por demais, simplesmente, calmamente, ser-te paz! É bonito ser amigo. Mas, confesso é tão difícil aprender! E por isso eu te suplico paciência. Vou encher este teu rosto de lembranças! Dá-me tempo de acertar nossas distâncias!”

Aos meus queridos amigos e colegas do laboratório de micologia do IPTSP, Orionalda, Lúcia, Xisto, Hildene, Carolina, Ana Cristina, Fábio, Flávio, Percília, Genebaldo, Davi, Núbia, Milton, na certeza de que esse longo convívio transformou-nos em companheiros e amigos para sempre. O meu **“muito obrigado”** por estarem sempre presentes e generosamente colaborando para a realização deste sonho! Essa vitória não teria sido possível sem vocês....

A todos os meus queridos amigos (as) que souberam entender e perdoar a minha ausência durante a minha jornada em busca de mais “saber”.

Aos funcionários técnico-administrativos da secretaria do IPTSP- UFG e do curso de pós-graduação pela atenção, apoio e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....</u>	<u>xi</u>
<u>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</u>	<u>xiii</u>
<u>1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</u>	<u>1..</u>
<u>2. INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA.....</u>	<u>2.</u>
<u>2.1 Microrganismo.....</u>	<u>2..</u>
<u>2.2 Candidíase Orofaríngea.....</u>	<u>2..</u>
<u>2.3 Fatores que influenciam a infecção por Candida.</u>	<u>4</u>
<u>2.3.1 Relacionados ao hospedeiro.....</u>	<u>4.</u>
<u>2.3.2 Relacionados ao microrganismo.....</u>	<u>5.</u>
<u>2.3.2.1 Proteinase</u>	<u>5..</u>
<u>2.3.2.2 Fosfolipase</u>	<u>7..</u>
<u>2.3.2.3 Aderência.....</u>	<u>8..</u>
<u>2.3.2.4 Dimorfismo.....</u>	<u>9..</u>
<u>2.3.2.5. Fenômeno "Switching"</u>	<u>9..</u>
<u>2.3.2.6 Resistência aos antifúngicos.....</u>	<u>10</u>
<u>3. OBJETIVOS.....</u>	<u>16.</u>
<u>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>17</u>
<u>4.1. Microrganismos.....</u>	<u>17.</u>
<u>4.2. Avaliação da atividade de Proteinase.....</u>	<u>17</u>
<u>4.3. Testes de Suscetibilidade in vitro com RPMI.....</u>	<u>18</u>
<u>4.3.1. Antifúngicos</u>	<u>18.</u>
<u>4.3.2. Meio de Cultura.....</u>	<u>19.</u>
<u>4.3.3. Preparo do Inóculo.....</u>	<u>19</u>
<u>4.3.4. Realização e leitura do teste</u>	<u>19</u>
<u>4.3.5 Interpretação dos resultados.....</u>	<u>20</u>

<u>4.4 Teste de suscetibilidade in vitro com o meio de Yeast Carbon Base contendo soro albumina bovina.....</u>	<u>20</u>
<u>4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....</u>	<u>21</u>
<u>4.6. Curva de morte de C. albicans na presença de anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.....</u>	<u>21</u>
<u>4.6.1 Preparação do inóculo.....</u>	<u>21</u>
<u>4.6.2 Diluição dos agentes antifúngicos.....</u>	<u>21</u>
<u>4.6.3 Execução do teste.....</u>	<u>22</u>
<u>4.7. Avaliação quantitativa da atividade de aspartil proteinase</u>	<u>23</u>
<u>5. RESULTADOS.....</u>	<u>24</u>
<u>5.1 Dosagem de proteinase.....</u>	<u>24</u>
<u>5.2 Teste de suscetibilidade in vitro com RPMI 1640.....</u>	<u>25</u>
<u>5.3 Teste de suscetibilidade in vitro com YCB.....</u>	<u>26</u>
<u>5.4 Determinação da Concentração fungicida mínima.....</u>	<u>26</u>
<u>5.5 Curva de morte de isolados de Candida.....</u>	<u>28</u>
<u>5.6 Avaliação quantitativa de atividade enzimática de Aspartil Proteinase Secretória (SAP).....</u>	<u>32</u>
<u>6. CONCLUSÕES.....</u>	<u>36</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>38</u>
<u>Artigo I: Susceptibility testing of Candida albicans isolated from oropharyngeal mucosa of HIV+ patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin. Killing kinetics of caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates.....</u>	<u>49</u>
<u>Artigo II Effects of antifungal agents in Sap activity of Candida albicans isolates.....</u>	<u>63</u>
<u>Normas para publicação na revista Brazilian Journal of Microbiology.....</u>	<u>77</u>
<u>Normas para publicação na revista Journal of Medical Microbiology.....</u>	<u>83</u>

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm - Micrômetro

nm - Nanômetro

α – Alfa

β – Beta

Dc – Diâmetro da colônia

Dcp – Diâmetro da colônia + zona de precipitação

Pz – Zona de precipitação

M – Molar

RPM– Rotações por minutos

A - Absorbância

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*

ATCC – *American type culture collection*

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – *Bovine serum albumine*

CFM – Concentração fungicida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DMSO – Dimetilsulfóxido

HC – Hospital das Clínicas

HDT – Hospital de Doenças Tropicais

HIV - *Human immunodeficiency virus*

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MFC – *Minimal fungicidal concentration*

MIC – *Minimal inhibitory concentration*

MOPS – Ácido morfolinopropanosulfônico

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

pH – Potencial hidrogeniônico

RPMI – *Meio Roswell Park Memorial Institute*

SAP – *Aspartil secretory proteinase*

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

TCA – *Trichloroacetic acid*

UFG – Universidade Federal de Goiás

YCB – *Yeast Carbon Base*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 Possíveis correlações entre frações de Sap e <i>Candida albicans</i>	07
Figura 2 Sítio de ação de diferentes antifúngicos sobre a célula fúngica	15
Figura 3 Placa de microtitulação esquematizando a metodologia do teste de suscetibilidade de microdiluição em caldo.	20
Figura 4 Etapas da execução do teste de curva de morte de <i>C. albicans</i> sob a ação de agentes antifúngicos.	22
Figura 5 Esquema da dosagem de proteinase segundo Crandall & Edwards (1987).	24
Figura 6 Porcentagem de isolados de <i>C. albicans</i> com relação a atividade de proteinase.	25
Figura 7 Concentração fungicida mínima do isolado 05 de <i>C. albicans</i> para anfotericina B e fluconazol	28
Figura 8 Curva de morte de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> frente a anfotericina B.	29
Figura 9 Curva de morte de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> frente à caspofungina.	30
Figura 10 Curva de morte de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> frente à fluconazol.	32
Figura 11 Curva de morte de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> frente à voriconazol.	33
Figura 12 Atividade de proteinase dos isolados 02 e 34 de <i>C. albicans</i> (resistentes ao fluconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do antifúngico.	34
Figura 13 Atividade de proteinase dos isolados 03 e 05 (suscetíveis ao fluconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do antifúngico	35
Figura 14 Atividade de proteinase dos isolados 08 e 36 de <i>C. albicans</i> (resistentes ao voriconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do antifúngico	36
Figura 15 Atividade de proteinase dos isolados 02 e 03 (suscetíveis ao voriconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do antifúngico	37

Tabela. 1	Suscetibilidade antifúngica de fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina para 31 isolados de <i>Candida albicans</i>	26
Tabela. 2	Suscetibilidade antifúngica para diferentes antifúngicos para 31 isolados de <i>Candida albicans</i> utilizando meio de YCB-BSA	26
Tabela. 3	Comparação dos valores de CFM e CIM encontrados para 4 agentes antifúngicos sobre 31 isolados de <i>C. albicans</i>	27

Artigo I

Table. 1	<i>In vitro</i> activities of three antifungal agents against 31 <i>C. albicans</i> isolates obtained from oral mucosa of HIV ⁺ patients	55
Table. 2	Distribution of MFC against 31 <i>C. albicans</i> isolates according to the MICs for three antifungal agents	56
Figure. 1	Time-kill curves for amphotericin B against clinical <i>C. albicans</i> isolates	57
Figure. 2	Time-kill curves for caspofungin against clinical <i>C. albicans</i> isolates	58

Artigo 2

Figure. 1	Proteinase activity of <i>C. albicans</i> isolates 02 and 34 (fluconazole resistant) on presence or absence of MICs of fluconazole	82
Figure. 2	Proteinase activity of <i>C. albicans</i> isolates 03 and 05 (fluconazole susceptible) on presence or absence of MICs of fluconazole	82
Figure. 3	Proteinase activity of <i>C. albicans</i> isolates 08 and 36 (voriconazole resistant) on presence or absence of MICs of voriconazole	83
Figure. 4	Proteinase activity of <i>C. albicans</i> isolates 02 and 03 (voriconazole susceptible) on presence or absence of MICs of voriconazole	83
Table. 1	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of fluconazole and voriconazole against <i>C. albicans</i> isolates by microdilution broth method using RPMI or YCB-BSA media	84

RESUMO

A secreção de enzimas como proteinases (SAP), e resistência a antifúngicos são fatores implicados no aumento da patogenicidade de *Candida*, sobretudo a espécie *albicans*. No presente estudo, 31 isolados de *Candida albicans* de mucosa bucal de pacientes HIV positivos, foram avaliados quanto a atividade de proteinase, à suscetibilidade *in vitro* e à concentração fungicida mínima para fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina. Para quatro destes isolados foi determinada a curva de morte sob a ação de diferentes concentrações de anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. A atividade de aspartil proteinase de *C. albicans* sob a ação de fluconazol e voriconazol foi determinada para quatro isolados, sendo dois resistentes e dois suscetíveis a cada um dos antifúngicos. Os resultados mostraram que 84% desses isolados apresentavam atividade fortemente proteolítica e todos os isolados foram suscetíveis à anfotericina B e caspofungina, dois foram resistentes ao voriconazol e dois ao fluconazol. A determinação da concentração fungicida mínima (CFM) mostrou uma similaridade com os valores de CFM e concentração inibitória mínima (CIM), para os antifúngicos fungicidas como anfotericina B e caspofungina, todavia para os fármacos fungistáticos, a CFM se mostrou de 2 a 4 vezes superiores à CIM. Essa relação entre CIM e CFM pôde ser confirmada através da curva de morte de quatro isolados de *Candida* onde a atividade fungicida máxima para anfotericina B ocorria após 6 horas de incubação e, após 24 horas para caspofungina. Para os derivados azólicos a atividade máxima de morte correspondia a concentrações pelo menos 4 X superiores a CIM em 24 horas de incubação. A atividade de aspartil proteinase independente da sua suscetibilidade ao fluconazol ou ao voriconazol. Os isolados resistentes a estes dois triazólicos evidenciaram um aumento da atividade proteinásica, sendo que a maior atividade foi observada quando em presença da CIM e 1/2CIM do antifúngico. Para os isolados suscetíveis aos triazólicos a atividade de proteinase foi variável em função da presença ou ausência daqueles agentes antifúngicos.. Para os isolado 05 e 02 suscetíveis ao fluconazol e voriconazol, respectivamente, a maior atividade de proteinase foi observada para o tratado com a concentração inibitória mínima, e para o isolado 03, também suscetível, aos azólicos, a maior atividade proteinásica foi observada na ausência destes antifúngicos Estudos posteriores envolvendo a família de 10 genes que codificam para a produção de Sap em *C. albicans* e o mecanismo de regulação dos antifúngicos são necessários para responder a respeito do comportamento de isolados suscetíveis.

ABSTRACT

Extracellular hydrolytic enzyme production, especially the secreted aspartyl proteinases (SAP) and the increase of resistance to antifungal agents can contribute to pathogenicity of *Candida species*, mainly *C. albicans*. In the present study, 31 *C. albicans* isolates of oral mucosal from HIV patients, were submitted to detection of proteinase, antifungal susceptibility testing *in vitro* and to minimal fungicidal concentration testing to fluconazole, voriconazole, amphotericin B and caspofungin. Killing kinetics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole against four *C. albicans* isolates under different antifungal concentrations were determined. The aspartyl proteinases activity for four *C. albicans* isolates under action of fluconazole (MIC, 1/2 MIC and 1/4 MIC) and voriconazole (MIC, 1/2 MIC and 1/4 MIC) was realized for two resistant and two susceptible isolates for each one antifungal agent. The results showed that 84% of these isolates presented high proteinase activity and all isolates were susceptible to amphotericin B and caspofungin, two isolates were resistant to fluconazole and two to voriconazole. The MFC testing showed relationship between MIC and MFC values for the fungicidal antifungal agents as amphotericin B and caspofungin, but the MFC for the fungistatic agents were 2 to 4 fold higher than MICs values. This relationship between MIC and MFC can be confirmed by killing kinetics for four *Candida* isolates for amphotericin B and caspofungin. For the *C. albicans* isolates, where the MIC was similar to MFC, it was verified that maximal fungicidal activity to amphotericin B occurred after 6 hours of incubation and, after 24 hours of incubation for caspofungin. However for azole derivatives, the maxim activity was of 4X folder to CIM values. The aspartyl proteinase activity varied between the isolates. The resistance or susceptibility expressed by microorganism does not seem to influence to activity. The resistant isolates to fluconazole and or to voriconazole had proteolytic activity increased, and the highest activity was verified to MIC and 1/2 MIC, but different patterns of SAP activity were observed to susceptible isolates for the two triazolics agents. For the susceptible isolates 05 and 02 to fluconazole and voriconazole respectively, the major proteolytic ctivity was observed to MIC, while for the isolate 03, susceptible to two antifungal agents, the control free of drug presented the major enzymatic activity. Further studies involved in the family of 10 *SAP* genes that encode aspartyl proteinase in *C. albicans* and the regulation mechanism of drugs are necessary to answer the question about difference in behavior of susceptible *C. albicans* isolates.

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O aumento de pacientes imunocomprometidos, detectado nos últimos anos fez com que as infecções fúngicas invasivas se tornassem mais prevalentes. Algumas doenças de base e condições crônicas como câncer, transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e administração prolongada de corticosteróides são considerados fatores importantes para a aquisição de infecções fúngicas oportunistas. Além disso, é conhecido que alguns procedimentos hospitalares como, dispositivos implantados, cirurgias de grande porte e o uso de antibióticos de amplo espectro por um longo período também podem contribuir para o aumento destas infecções (Komshian et al. 1989, Holzman 1995).

As leveduras do gênero *Candida* e alguns fungos filamentosos como *Aspergillus* e os zigomicetos são os principais fungos causadores de infecções oportunistas. As infecções por fungos do gênero *Candida* merecem um destaque especial porque representam maior índice destas infecções, sendo que pode se manifestar de forma superficial, mas algumas vezes atinge órgãos internos produzindo candidíase invasiva (Wingard et al. 1991). Esta micose pode se manifestar em diferentes formas clínicas, sendo que a candidíase de orofaringe é a mais comum. Em pacientes com o vírus HIV, é conhecido que 85 a 90% destes terão candidíase orofaríngea durante o curso de sua doença (Penzack & Gubbins 1998).

Candida albicans é o principal patógeno humano do gênero *Candida*, mas outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae*, têm sido frequentemente observadas como causadoras de infecções fúngicas (Pichová et al. 2001, Colombo & Guimarães 2003, Marchetti et al. 2004, Medrano et al. 2006)

Estas leveduras têm como habitat natural o próprio organismo do hospedeiro podendo produzir infecção em decorrência de fatores ligados ao hospedeiro, mas também ligados ao microrganismo. Assim sendo, múltiplos fatores, caracterizados como de virulência, como a produção de adesinas, formação de pseudomicélio, secreção de enzimas como proteinases e fosfolipases e resistência a antifúngicos têm sido implicados na patogenicidade das espécies de *Candida*, sobretudo *C. albicans* (Cutler 1991, Ibrahim et al. 1995, Johnson et al. 1995, Hube 1996, Odds 1996).

Desta forma, o estudo dos fatores de virulência de *Candida* provavelmente contribuirá para que se possam estabelecer estratégias para o controle e prevenção de candidíase. As características expressas pelo fungo, como ação sobre as proteinases, podem ainda servir como possível alvo para novas terapêuticas.

2. INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA

2.1 Microrganismo

Fungos do gênero *Candida* são cosmopolitas e fazem parte da microbiota do homem e animais, colonizando mucosas do trato gastrointestinal, bucal, vaginal e pele, podendo ser detectados em aproximadamente 50% da população (Silva et al. 2002). O gênero *Candida* está formado por aproximadamente 200 espécies, sendo que cerca de 20 são responsáveis por infecções no homem. Dentre as espécies de *Candida*, destaca-se *C. albicans*, que tem sido relatada como a de maior prevalência sendo de grande importância nas lesões orofaríngeas (Richet et al. 2002, Urizar 2002).

2.2 Candidíase Orofaríngea

Esta forma clínica é bastante comum entre os indivíduos imunocomprometidos, sendo que pacientes com a síndrome da imunodeficiência

adquirida (AIDS) são altamente acometidos, com dois terços destes com manifestação clínica como início da forma sintomática (Penzack & Gubbins 1998).

Os achados clínicos na candidíase bucal são bastante variáveis, podendo ser observado quadros que variam desde uma lesão localizada em uma determinada região da mucosa até a forma generalizada e grave em toda a mucosa bucal. A forma clínica mais comum é a pseudomembranosa que se inicia por pequenos pontos esbranquiçados, que se tornam confluentes, formando pseudomembranas de coloração esbranquiçadas, fortemente aderidas à mucosa, apresentando-se com um fundo eritematoso. Estas lesões estão presentes nas mucosas que revestem as bochechas, ponta de língua e palato mole, podendo ocorrer invasão maciça da cavidade com comprometimento generalizado, dificultando a deglutição (Sangeorzan et al. 1994, Ceballos 2001).

A candidíase eritematosa pode ser em alguns casos a primeira manifestação de uma alteração sistêmica, incluindo infecção pelo HIV. Caracteriza-se por apresentar uma área avermelhada com bordas mal definidas sem placas esbranquiçadas, que ocorre principalmente no dorso da língua. Essa forma clínica além de ser bastante comum nos pacientes HIV+, ocorre também em pacientes com xerostomia e em uso de antibioticoterapia de amplo espectro (Reichart et al. 2000, Williams & Lewis. 2000).

A queilite angular que se caracteriza por apresentar maceração, fissuras e crostas no ângulo de junção do lábio superior com o inferior pode também ser a primeira manifestação clínica em pacientes com AIDS, facilitando muitas vezes o diagnóstico da doença (Ceballos 2001). Esta forma pode ser encontrada concomitantemente à candidíase eritematosa.

A forma hiperplásica crônica também conhecida como forma leucoplásica caracteriza-se pelo aparecimento de placas ou nódulos pequenos de coloração branca fortemente aderida à cavidade bucal. Língua, bochechas e lábios são os locais freqüentemente acometidos (Williams et al. 1997).

2.3 Fatores que influenciam a infecção por *Candida*.

2.3.1 Relacionados ao hospedeiro

As leveduras do gênero *Candida* possuem a capacidade de produzir infecção na dependência de fatores relacionados ao hospedeiro e ao fungo. A candidíase ocorre devido a um desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro, que pode ser desencadeada por alterações das barreiras teciduais, da própria microbiota e da resposta imune (Drago et al. 2000, Calderone & Fronzi 2001).

Pacientes em uso de dispositivos implantados como cateteres e sondas e com extensas queimaduras são alvos para a implantação do fungo devido à modificação da superfície da pele e de mucosas (Pulcini et al. 2006).

A microbiota bacteriana quando sob a ação de antibióticos por longos períodos, pode ser alterada, e se verifica na maioria das vezes um crescimento exacerbado de leveduras do gênero *Candida* predispondo a infecção. Pacientes nosocomiais, sobretudo os de unidade de terapia intensiva são altamente propensos a produzirem esta infecção, devido ao uso abusivo de antibióticos (Safdar et al. 2002).

A imunidade celular do hospedeiro pode desempenhar um papel importante nas infecções por *Candida*. Células como neutrófilos e macrófagos participam na defesa do hospedeiro devido à sua atividade fagocítica, sendo que alterações de função ou do número destas células podem ser favoráveis a implantação de candidíase (Greenfield 1992). A imunidade humoral pode auxiliar na defesa do hospedeiro através

do sistema complemento que atua como opsonizante, facilitando a atividade de macrófagos e neutrófilos (Samaranayake & MacFarlane 1990).

2.3.2 Relacionados ao microrganismo

Entre os fatores correlacionados ao microrganismo, a atividade de proteinases e de fosfolipases, aderência ao tecido do hospedeiro, produção de pseudomicélio e resistência aos antifúngicos são os que se destacam como os mais importantes para que o fungo exerça o seu papel patogênico (Sweet 1997, Hube 2004, Naglik et al. 2004).

2.3.2.1 Proteinase

As três mais significantes enzimas hidrolíticas produzidas por *C. albicans* são a aspartil proteinase secretória (Sap), fosfolipase B e lipases. Dessas as Saps com pesos moleculares entre 35 e 50 kDa, codificadas pelos genes *SAP 1-10* (Monod et al. 1994 e 1998; Felk et al. 2000) tem sido a mais estudada como uma chave determinante da virulência de *C. albicans*.

C. albicans não é a única espécie capaz de produzir proteinase extracelular. Muitas espécies conhecidamente patogênicas como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (De Viragh et al. 1993; Gilfillan et al. 1998; Zaugg et al. 2001) possuem os genes que codificam a produção extracelular da proteinase (Sap) *in vitro* (Gilfillan et al. 1998). É importante salientar que todas as proteinases secretadas por *Candida* pertencem à mesma classe de enzima: a aspartil proteinase secretória. As principais funções das proteinases de *C. albicans* envolvem a nutrição das células, auxílio na penetração e invasão celular e tecidual e fuga da resposta imune (Naglik et al. 2003)

A complexidade do envolvimento de Sap na virulência de *C. albicans* está associada com vários outros atributos de virulência incluindo formação de hifa, adesão à célula do hospedeiro e fenômeno switching (Naglik et al. 2003). Correlação de

produção e atividade de Sap com virulência de *C. albicans* foi relatada por alguns pesquisadores, mostrando que cepas de *C. albicans* de pacientes HIV positivos mostram uma atividade aumentada de Sap comparada com indivíduos HIV negativos carreadores destas cepas. Da mesma forma, isolados de *C. albicans* de pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea produzem uma atividade de proteinase maior do que os isolados de *C. albicans* de carreadores assintomáticos de pacientes HIV negativos e do que de pacientes HIV negativos com candidíase bucal (De Bernardis et al. 1992; Ollert et al. 1995, Wu et al 1996). A produção de aspartil proteinase produzida por espécies de *Candida* varia de acordo com o isolado específico e com o sítio da infecção (Price et al. 1982; Voss A et al. 1996).

A produção de Sap pode ocorrer em diferentes intervalos de pH, permitindo com que as espécies de *Candida* consigam colonizar e promover infecção em diferentes tecidos. As frações 1, 2 e 3 da Sap estão associadas às células em forma de leveduras e têm atividade ótima em pH 3-5 e as Saps 4-6 associadas à formação de hifas têm atividade em pH 5-7. Portanto a Sap atua em um pH que varia de 2 a 7 o que é considerado de grande importância para manter a sobrevivência e multiplicação das espécies de *Candida* favorecendo a infecção no hospedeiro (Naglik 2004).

Por meio de estudos prévios foi criado um modelo hipotético para a correlação da expressão do gene *SAP* com a patogenicidade de espécies de *Candida*. A aderência dessas leveduras nas células epiteliais da mucosa bucal, o fenômeno denominado de switching, assim como a invasão e danos aos tecidos do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento de infecções sistêmicas, são promovidas pela secreção das Saps 1 e 3. A habilidade de formar lesões na pele está relacionada a síntese da Sap 1, já as interações com o sistema imune do hospedeiro, ocorre quando a Sap 2 é sintetizada, pois esta é a responsável pela hidrólise das proteínas que compõem o sistema imune. A

Sap 4 também é capaz de afetar o sistema imune, fazendo com que o microrganismo escape da fagocitose realizada pelos macrófagos. Além disso, a Sap 4, juntamente com a Sap 6 quando presentes contribuem para o desenvolvimento de infecção sistêmica (Naglik et al 2003). Na formação de biofilmes verifica-se que os isolados apresentam uma expressão dos genes que codificam para as Saps 5, 6 e 9 (Naglik 2003). As Saps 7, 8 e 10 são pouco conhecidas.

A correlação das frações de Sap e patogenicidade de espécies de *Candida* é mostrada na figura 1.

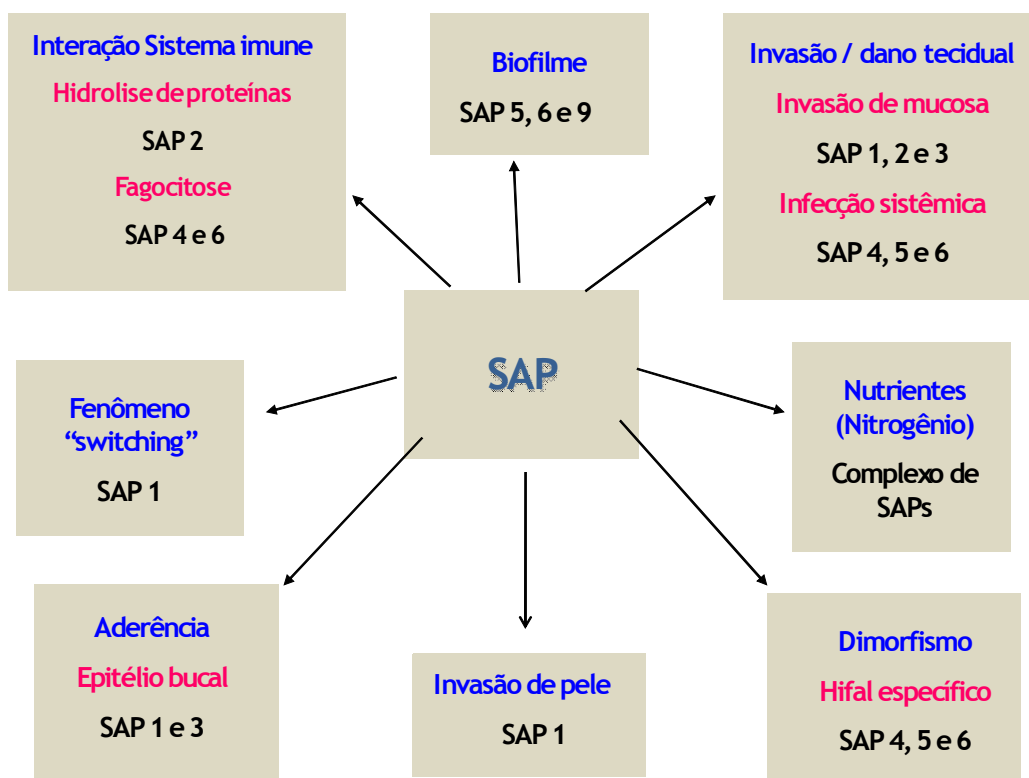


Fig 1. Possíveis correlações entre frações de Sap e *C. albicans*.

2.3.2.2 Fosfolipase

As fosfolipases constituídas por fosfolipases A, B, C, D, lisofosfolipases e lisofosfolipases transacilase, detectadas em diferentes espécies de *Candida* (Samaranayake et al. 1984, Banno et al. 1985, Ibrahim et al. 1995, Hube 1996, Ghannoum 1998, Ghannoum 2000) são enzimas capazes de degradar fosfolípidos,

componentes de membranas celulares que contribuem na sua função e estrutura. A presença desta enzima na superfície da levedura e na extremidade do pseudomicélio propicia a destruição dos fosfolípidios comprometendo atividades celulares. Os fosfolípidos são encontrados sob a forma natural de fosfatidilcolina (lecitina) que representa o substrato para as fosfolipases A, B, C e D. As fosfolipases A e B são as de maior relevância e as mais frequentemente estudadas. A fosfolipase A tem o potencial de destruir as membranas dos eritrócitos (hemólise) devido à presença de um produto tóxico a lisolecitina formado durante seu metabolismo. O encontro dessa enzima no sítio de formação do broto da levedura pode ter um papel importante no crescimento desta célula fúngica e na formação do tubo germinativo, que passa a ter maior ação de hidrólise dos fosfolípidos das células e das membranas intracelulares do organismo hospedeiro (Niewerth & Korting 2001). A fosfolipase B, apesar de durante seu metabolismo não formar a lisolecitina, também é capaz de remover ácidos graxos sendo que os produtos da reação são glicerilfosforilcolina e dois ácidos graxos livres (Ibrahim et al. 1995, Ghannoum 2000).

A atividade de fosfolipase pode variar entre diferentes isolados de *Candida* e a sua produção parece estar limitada a um intervalo de pH que varia entre 3,6 e 4,7 (Niewerth & Korting 2001). Há fortes indícios de que a fosfolipase esteja relacionada à patogenicidade, pois cepas altamente produtoras desta enzima possuem normalmente uma maior capacidade de aderência ao tecido do hospedeiro, processo que facilita a produção de lesões (Ibrahim et al. 1995, Shimizu et al. 1996).

2.3.2.3 Aderência

A capacidade que a levedura tem de aderir à superfície das células do hospedeiro representa provavelmente o primeiro mecanismo de patogenicidade

mostrado pelo fungo. As leveduras do gênero *Candida* se fixam em um alvo em particular (órgão, tecido) no hospedeiro e começa a interagir com esse ambiente através de proteínas denominadas de adesinas. Estas proteínas facilitam a adesão da levedura a receptores como fibrinogênio, fibronectina e laminina que estão presentes nos tecidos humanos. Desta forma, o fungo consegue aderir à célula do hospedeiro iniciando o processo de invasão (Calderone & Fronzi 2001).

2.3.2.4 Dimorfismo

C. albicans pode apresentar-se sob duas formas, a de levedura e a de filamento, caracterizando assim a sua natureza dimórfica (Ernst 2000). Essa capacidade de mudar de fase é importante para uma maior interação com o hospedeiro. A formação de hifas pode ser considerada um importante fator de virulência que facilita a invasão da célula e dificulta a fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Phan et al. 2000). Embora, a presença de hifas esteja correlacionada à virulência, tem sido verificado que as duas formas podem estar presentes tanto no processo de colonização quanto na infecção (Bartie et al. 2001). Esse processo de transição da forma de levedura para hifa pode sofrer influência da temperatura e do pH do ambiente no hospedeiro (Lan et al. 2002)

2.3.2.5. Fenômeno “Switching”

Mudanças na morfologia das colônias das espécies de *Candida*, sobretudo em *C. albicans*, são denominadas de fenômeno “switching”. Este envolve expressões diferentes de genes, assim é provável que variantes fenotípicas possuam distintas características fisiológicas, incluindo a sua virulência. É conhecido que fenótipos que diferem em suas formas “switch” também apresentam diferenças em adesão à célula epitelial e na secreção de aspartil proteinase (Jin et al. 2005, Laffey & Butler 2005).

Um sistema importante de alteração de morfologia da colônia envolve a sua transformação de característica como rugosa e brancas para lisas e acinzentadas. Esta mudança afeta a forma e o tamanho das células, a habilidade de formação de hifas, sua adesão às células epiteliais, a permeabilidade e composição de membrana, variação de produtos de secreção, sensibilidade à neutrófilos e oxidantes, antigenicidade e suscetibilidade à agentes antifúngicos (Soll 2001).

2.3.2.6 Resistência aos antifúngicos

Os agentes antifúngicos comumente utilizados para o tratamento de candidíase envolvem grupos de fármacos que atuam alterando a permeabilidade da membrana celular, inibindo a síntese de ergosterol, ou de β (1,3) glucana sintase presentes na célula fúngica (Vanden Bossche 1997).

A anfotericina B pertence à ampla família dos macrolídeos poliênicos atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, alterando sua permeabilidade o que acarreta desequilíbrio osmótico, pela perda de íons intracelulares e conseqüentemente lise e morte das células (Vanden Bossche 1997). Anfotericina B pode ser usada para o tratamento de doenças endêmicas causadas por diferentes agentes como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* que são causadores de lesões sistêmicas graves. Além disso, este fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento de candidíase invasiva. Embora poucos relatos tenham sido descritos na literatura tem sido verificado em isolados de *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* assim como de *Trichosporon sp* e *Fusarium sp* resistência aos poliênicos (Georgopadakow 1996, Vanden Bossche 1997, Boff et al 2008). O mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos

lipídios na membrana celular do fungo, sendo que o ergosterol dá lugar à formação de outros lipídios (Sanglard 2002).

Os antifúngicos azólicos são classificados em imidazólicos e em triazólicos, sendo que os primeiros contêm três átomos de carbono e dois de nitrogênio, enquanto os triazólicos possuem dois átomos de carbono e três de nitrogênio. Considerando os fármacos sistêmicos, os imidazólicos incluem miconazol e cetoconazol, enquanto os triazólicos incluem fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, isavuconazol (Hoesley & Dismukes 1997, Kauffman & Carver 1997, Terrel 1999; Tracz & Didomenico 2001, Guinea et. al 2008). Estes derivados azólicos atuam inibindo a C14 α - demetilase, uma enzima da citocromo P-450, atualmente denominado de Erg11p, que representa um produto do gene ERG11. Esta ação ocorre pela ligação do nitrogênio livre do anel azólico que se une ao ferro do grupo heme da Erg11p inibindo a reação enzimática. Desta forma há diminuição do ergosterol, principal constituinte da membrana celular do fungo com conseqüente inibição do crescimento celular (Koltin & Hitchcock 1997, Vanden Bossche 1997, Georgopapadakow 1998, Sanglard 2002).

Fluconazol, itraconazol e voriconazol são disponíveis no mercado e largamente usados no tratamento de candidíase. Estes fármacos apresentam facilidades de administração por via oral e com menor potencial de toxicidade do que outros derivados azólicos (Hoesley & Dismukes 1997, Kauffman & Carver 1997, Terrel 1999).

Fluconazol é um fungistático que possui dois núcleos triazólicos na molécula (bis-triazol), apresentando algumas características específicas como, boa absorção no trato gastrointestinal, baixa ligação com as proteínas plasmáticas e atinge excelente nível terapêutico em determinados fluidos orgânicos, como líquido e humor aquoso.

Alguns efeitos colaterais como náuseas e vômitos decorrentes do uso de fluconazol têm sido observados. Uma ausência de efeito deste antifúngico em determinadas infecções fúngicas, causadas por *C. krusei* e *C. glabrata* que são consideradas intrinsecamente resistentes a este fármaco tem sido relatada (Wingard et al. 1991, Nguyen et al. 1996, Maenza, et al. 1997, Pfaller et al. 1998, Terrel 1999).

O itraconazol é um antifúngico fungicida de ação sistêmica que possui alta afinidade pelas proteínas plasmáticas. É bem absorvido por via oral, porém não alcança níveis terapêuticos no líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva e humor aquoso sendo altamente dependente do pH gástrico (Terrel 1999). Foi evidenciado que este antifúngico diminui o clearance da ciclosporina e digoxina, podendo desta maneira, aumentar os efeitos tóxicos destas substâncias. Efeitos colaterais como náuseas, vômitos, hipocalcemia, hipertensão e cefaléia têm sido também observados (Terrel 1999). Os mecanismos de resistência ao itraconazol são pouco conhecidos, entretanto, sabe-se que algumas cepas de *C. glabrata* têm freqüentemente demonstrado resistência a essa substância (Canuto & Rodero 2002).

O voriconazol é um novo antifúngico triazólico obtido por modificação da estrutura do fluconazol. As modificações introduzidas na molécula de voriconazol resultaram em uma maior afinidade à enzima 14- α -lanosterol demetilase e no aumento do espectro de ação. Voriconazol tem ampla distribuição nos líquidos biológicos, incluindo o sistema nervoso central exibindo um amplo e potente espectro de ação contra *C. albicans*, *Aspergillus sp*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Scedosporium sp*, *Fusarium sp* e *Penicillium marneffei* (Wildfener et al. 1998, Sabo & Abdel-Rahman 2000). Este medicamento pode apresentar efeitos colaterais que incluem elevação das transaminases hepáticas, “rush”- cutâneo e distúrbios visuais transitórios. Características importantes correlacionadas ao voriconazol referem-se à

sua ação contra isolados que são fluconazol, itraconazol e anfotericina B resistentes e a sua similaridade a anfotericina B lipossomal na prevenção da doença fúngica, em pacientes neutropênicos com febre persistente. Takakura e colaboradores (2004) relataram que 100% dos isolados de *C. albicans* e 60% de outras espécies não *albicans*, com baixa suscetibilidade ao fluconazol, foram suscetíveis ao voriconazol. Entretanto, Wakiec et al (2006) encontraram isolados de *C. albicans* com reduzida sensibilidade ao voriconazol.

Diversos mecanismos de resistência dos microrganismos fúngicos aos derivados azólicos têm sido descritos. Um desses mecanismos envolve a bomba de efluxo e a expressão dos genes *CDRI* e *MDRI*. As bombas de efluxo pertencentes às famílias de transportadores de cassetes de ligação ao ATP (ABC) e dos principais facilitadores (FP) são responsáveis pelo baixo acúmulo dos antifúngicos azólicos nas cepas resistentes a esses fármacos. Alguns pesquisadores têm demonstrado que nas cepas resistentes existe uma super expressão do gene *CDRI*, (ligado aos transportadores ABC) e do gene *MDRI* (ligado ao FP) (Sanglard et al. 1995). Outro mecanismo de resistência aos azólicos ocorre através da alteração da sua afinidade a Erg11p (citocromo P450) das células fúngicas. Estas alterações da afinidade do antifúngico pela célula do microrganismo provavelmente ocorram devido a mutações no gene que codifica o Erg11p (*ERG11*), afetando a ligação destes agentes antifúngicos (Sanglard 2002). As mutações podem ocorrer em um ou em múltiplos locos do gene *ERG11*.

Um isolado resistente aos derivados azólicos pode apresentar associação de diferentes mecanismos de resistência (Perea et al. 2001). As alterações nos alvos das enzimas devido a diversas mutações simples ou múltiplas e a super expressão dos genes transportadores de diferentes fármacos favorecem uma grande flexibilidade para

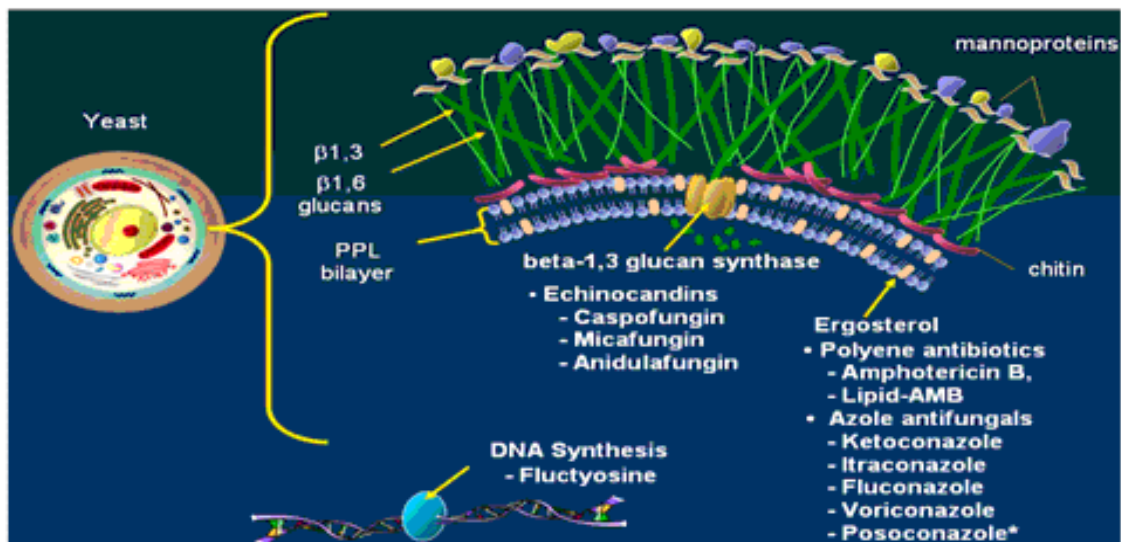
as combinações dos mecanismos de resistência (Sanglard 2002). Perea et al (2001) demonstraram que em 85% das cepas de *Candida* resistentes aos azólicos havia uma super expressão dos genes transportadores de múltiplos fármacos e em 65% existiam mutações do gene *ERG11*.

Além dos mecanismos de resistência acima descritos, os fungos podem formar uma capa protetora, ou seja, a produção de biofilme, uma densa rede de células diferenciadas com uma capa de matriz extracelular, que faz com que haja dificuldade de penetração do agente antifúngico nas células do microrganismo propiciando a diminuição da suscetibilidade do fungo (Ramage et al. 2002).

A caspofungina é um novo antifúngico da classe das equinocandinas. Seu mecanismo de ação se baseia na capacidade que estas substâncias têm de interferir com a síntese da parede celular pela inibição da β (1,3)-glucana sintase, impedindo a síntese de glucanas. O bloqueio da produção de glucanas resulta em desequilíbrio osmótico, o que pode interferir na viabilidade da célula fúngica (Martinez 2006). A inibição da síntese de glucanas também apresenta efeitos secundários sobre outros componentes da célula, como redução dos conteúdos de lanosterol e ergosterol e aumento das concentrações de quitina (Hector 1993, Douglas et al. 1997). Este agente antifúngico se liga bem às proteínas plasmáticas possuindo uma boa distribuição no organismo humano, apresentando poucos efeitos colaterais. A caspofungina assim como o voriconazol tem demonstrado uma atividade antifúngica *in vitro* contra *Aspergillus sp* e espécies de *Candida*, incluindo isolados resistentes ao fluconazol.

O mecanismo de resistência de microrganismos a este agente antifúngico pode ser decorrente de um aumento na síntese da proteína *Sbep* do complexo de Golgi, controlada pelo gene *GAL1*, que regula os mecanismos de transporte de componentes celulares para a parede da célula fúngica. Dados preliminares de um estudo *in vitro*

utilizando equinocandinas sugerem CIMs desse fármaco maiores para isolados de *C. parapsilosis* do que para outras espécies de *Candida* (Pfaller et al. 2002). Moudgal et al (2005) relataram o desenvolvimento de resistência de *Candida* a múltiplas equinocandinas durante a exposição a esses agentes antifúngicos. A figura 2 mostra os diferentes antifúngicos e os seus mecanismos de ação.



Fonte: Bouve College of Health Sciencis School of Pharmacy

Fig 2. Sítio de ação de diferentes antifúngicos sobre a célula fúngica

Com base nos dados apresentados, considerando o alto índice de morbidade e mortalidade causadas por espécies de *Candida*, torna-se necessário estudar as “características” de virulência como a produção de proteinase por este microrganismo, bem como o efeito de antifúngicos sobre esta atividade podendo servir de alvo para os fármacos no combate da infecção.

3. OBJETIVOS

1. Determinar a atividade de proteinase em amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de indivíduos HIV positivos.
2. Traçar o perfil de suscetibilidade de amostras de *C. albicans* isoladas de mucosa bucal de pacientes HIV positivos frente ao fluconazol, voriconazol; anfotericina B e caspofungina.
3. Comparar os resultados do teste de suscetibilidade antifúngica dos isolados de *C. albicans* utilizando os meios de RPMI 1640 e YCB-BSA.
4. Determinar a concentração fungicida mínima dos isolados de *C. albicans* para todos os antifúngicos estudados.
5. Avaliar a curva de morte de isolados de *C. albicans* na presença de fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina.
6. Comparar a atividade enzimática de aspartil proteinase (quantitativa) de isolados resistentes e suscetíveis ao voriconazol e fluconazol na presença de concentrações subinibitórias destes agentes antifúngicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Foram utilizadas 31 amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes HIV positivos, provenientes do Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT) com projeto aprovado pelo comitê de ética do HDT protocolo nº. (007/2004). As amostras foram coletadas e semeadas em meios de cultura contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) e incubados à temperatura ambiente e a 37°C. As colônias de leveduras foram submetidas a testes de identificação clássicos como formação de tubo germinativo, produção de clamidoconídio e assimilação de hidratos de carbono (auxanograma) segundo Kurtzman e Feels (1998). Concomitantemente estes isolados foram inoculados em meio de CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, France). Uma cepa ATCC 22019 de *C. parapsilosis* foi usada como controle.

4.2. Avaliação da atividade de Proteinase

A atividade de proteinase foi feita segundo o procedimento descrito por Ruchel et al (1982). Nesta técnica foram utilizados dois meios de cultura. Meio de albumina que foi preparado utilizando-se “yeast carbon base” (0,11%), albumina bovina fração V (0,2%), protovit, (0,25%) e água destilada, o qual foi filtrado através de membranas de Millipore de 0,22 µm. Meio de ágar base que foi preparado utilizando ágar-ágar (0,018%) e água destilada, o qual foi esterilizado através de autoclavação a 120°C por 15 min.

O meio básico esterilizado foi resfriado a 50°C, misturado com o meio de albumina e distribuídos em placas de *Petri*. Após a solidificação do meio, em cada placa foram semeados 4 isolados de levedura com alça de platina e incubada a 37°C durante 4 dias. A produção da proteinase foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia de levedura. A atividade enzimática foi medida de acordo com Price et al (1982), através da seguinte fórmula: $Pz = \frac{Dc}{Dc + Dcp}$, onde: Dc - diâmetro da colônia; Dc + Dcp é igual ao diâmetro da colônia mais a zona de precipitação total. Os resultados de Pz foram considerados da seguinte maneira: $Pz=1,0$ = ausência de atividade enzimática; $1,0 < Pz \leq 0,64$ = atividade enzimática positiva e $Pz < 0,64$ = atividade enzimática fortemente positiva

4.3. Testes de Suscetibilidade *in vitro* com RPMI

A suscetibilidade de todos os 31 isolados estudados frente ao fluconazol (Pfizer), voriconazol (Pfizer), anfotericina B (Squibb) e caspofungina (Merck) foi determinada de acordo com o teste de microdiluição em caldo padronizado pelo CLSI documento M27-A2 (2002).

4.3.1. Antifúngicos

Os agentes antifúngicos como voriconazol e anfotericina B foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), caspofungina e fluconazol foram diluídos em água destilada. As concentrações dos fármacos utilizados variaram de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL para fluconazol, de 0,031 µg/ml a 16 µg/mL para voriconazol e anfotericina B e de 0,0125 µg/mL a 16 µg/mL para caspofungina.

4.3.2. Meio de Cultura

RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 mol/l de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) para pH 7,0, e esterilizado por filtração foi utilizado.

4.3.3. Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado a partir colônias de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a 35°C. Uma suspensão foi preparada em salina a 0,85% estéril e a densidade celular medida em espectrofotometria para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm. Esta suspensão foi posteriormente diluída a 1:50 e a seguir a 1:20 em RPMI 1640 de modo a permitir uma concentração final do inóculo de 0,5 a 2,5 X 10³ células/mL.

4.3.4. Realização e leitura do teste

Foram adicionados 100 µl do inóculo em cada orifício contendo o antifúngico diluído na placa. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle padrão. A leitura foi realizada pela visualização de crescimento da levedura através da turvação no meio de cultura. Para os derivados azólicos a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento do microrganismo estudado, comparado ao controle (livre do agente antifúngico). Para anfotericina B e caspofungina a CIM foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento total do microrganismo. A figura 3 ilustra a execução do teste de suscetibilidade *in vitro*.

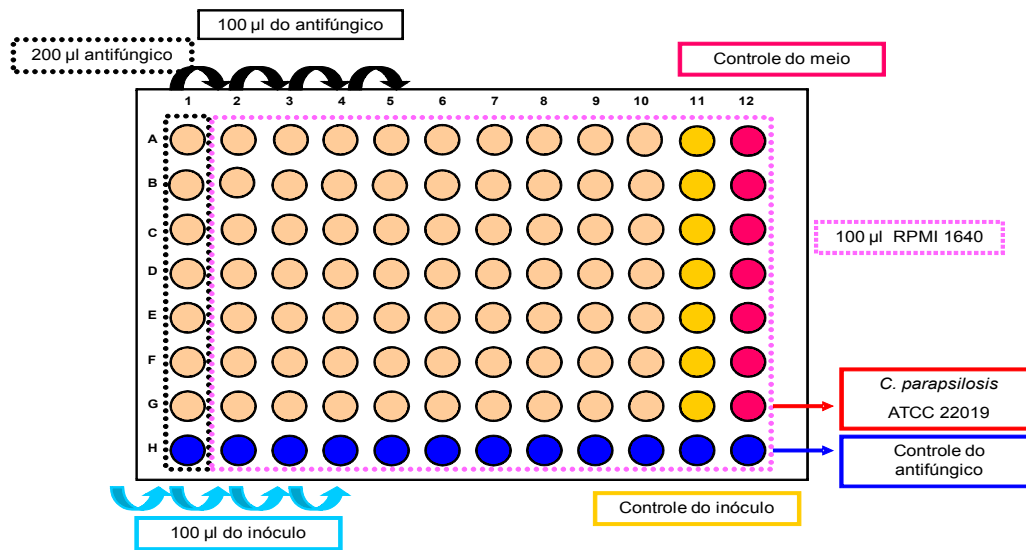


Fig 3. Placa de microtitulação esquematizando a metodologia do teste de suscetibilidade de microdiluição em caldo.

4.3.5 Interpretação dos resultados

Suscetibilidade dos isolados para fluconazol foram determinados segundo o CLSI, com valores de CIM $\leq 8,0$ $\mu\text{g/mL}$ considerados suscetíveis. Para anfotericina B, voriconazol e caspofungina não há valores propostos de resistência ou suscetibilidade pelo CLSI. Assim, foi considerado para estes três agentes antifúngicos CIM de ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ como suscetíveis (Pfaller et al. 2002, Antunes et al. 2004, Hernandez et al. 2004).

4.4 Teste de suscetibilidade *in vitro* com o meio de Yeast Carbon Base contendo soro albumina bovina

Este teste suscetibilidade *in vitro* usando o meio Yeast Carbon base (YCB) acrescido de soro albumina bovina foi realizado para os 31 isolados de *C. albicans*. A técnica usada foi a mesma descrita para o teste com RPMI de acordo com o CLSI

documento M27-A2, com algumas modificações como a temperatura de incubação de 25°C e leitura após 90 horas (Wu et al. 2000).

4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

A concentração fungicida mínima (CFM) dos 31 isolados de *C. albicans* para voriconazol, fluconazol, caspofungina e anfotericina B foi obtida pela transferência de 0,1 mL de cada concentração que inibiu o crescimento fúngico para a superfície de agar Sabouraud dextrose. Após incubação de 48 horas a 35°C a CFM foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de causar a morte de 99,9% das células.

4.6. Curva de morte de *C. albicans* na presença de anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol

4.6.1 Preparação do inóculo

Uma suspensão de colônias de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a 35°C foi preparada em salina a 0,85%, esterilizada e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer para obter uma concentração de 1×10^4 células/ mL. A viabilidade celular desse inóculo foi realizada através do plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose.

4.6.2 Diluição dos agentes antifúngicos

Anfotericina B, caspofungina, voriconazol e fluconazol foram diluídos em meio de RPMI 1640 de tal modo que se obtivessem concentrações equivalentes a 1/2 CIM, a CIM, 2 X CIM e 4 X CIM de cada isolado estudado. A curva de morte foi determinada para isolados suscetíveis e resistentes ao fluconazol e voriconazol. Para

anfotericina B e caspofungina foram estudados apenas isolados suscetíveis já que não foi verificada resistência a esses dois fármacos.

4.6.3 Execução do teste

Frascos de Erlenmeyer contendo 20 mL de caldo RPMI foram adicionados de cada agente antifúngico nas diferentes concentrações descritas acima, e do inóculo, e em seguida colocados em incubadora de bancada com uma agitação constante de 120 rpm a 37°C. Em um intervalo de tempo de 6 em 6 horas (até 24 horas) uma alíquota dessas soluções foram retiradas e plaqueadas em agar Sabouraud para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados em duplicata. A figura 4 ilustra a execução da curva de morte dos isolados de *C. albicans* para diferentes agentes antifúngicos.

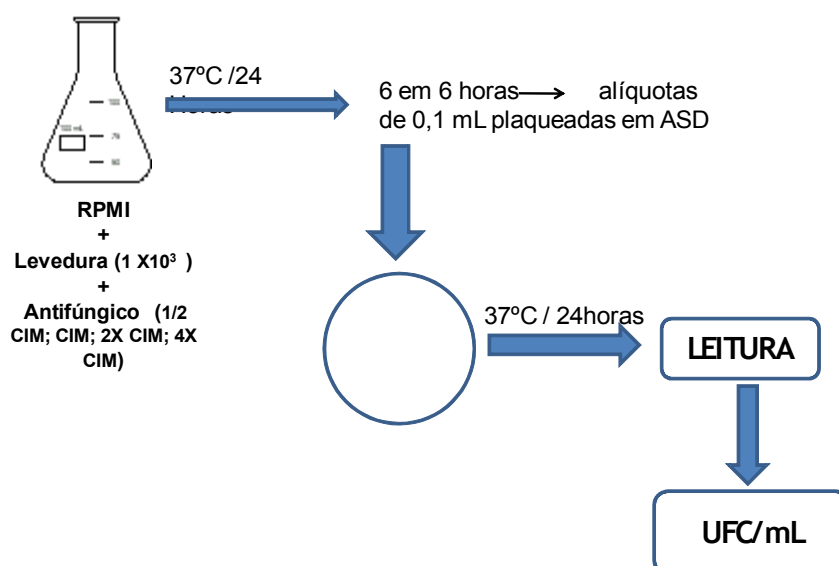


Fig. 4. Etapas da execução do teste de curva de morte de *C. albicans* sob a ação de agentes antifúngicos

4.7. Avaliação quantitativa da atividade de aspartil proteinase

A detecção de aspartil proteinase foi realizada para cinco isolados de *Candida* (dois resistentes e dois suscetíveis ao fluconazol e voriconazol e um isolado ATCC 22019 de *C. parapsilosis*). A atividade de proteinase foi determinada pela digestão de BSA de acordo com Crandall e Edwards (1987). Frascos de erlenmeyer contendo 30 mL de meio de YCB/BSA a 1% foi adicionado de suspensão de leveduras contendo 1×10^7 células/mL. A estes frascos foi adicionado cada um dos antifúngicos (voriconazol ou fluconazol) em concentrações equivalentes a 1 X CIM; 1/2 X CIM e 1/4 X CIM, conforme valores encontrados no teste de suscetibilidade *in vitro* onde se usou o meio de YCB. Os frascos foram incubados sob agitação constante de 160 rpm a 25°C durante 15 dias, sendo que alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante da cultura eram retiradas a cada dois dias de incubação até 14 dias. Esta alíquota foi adicionada a 2,0 mL de tampão citrato de sódio e ácido cítrico a 0,1M /BSA a 1%, pH 3,5, homogeneizada no vórtex e posteriormente incubada à 37°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 5,0 mL de TCA a 10% e o precipitado de proteína foi removido por centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de membrana Millipore 0,45 μ m de porosidade. A proteinase foi medida através da absorbância em comprimento de onda de 280 nm. Para o controle incubou-se 0,5 mL do sobrenadante da cultura a 37°C por 30 minutos adicionando-se 5,0 mL de TCA e 2,0 mL de BSA.

Os resultados da atividade enzimática de aspartil proteinase foram expressos pela alteração em absorbância da amostra analisada em relação ao controle (A_{280nm}) em 30 minutos à temperatura de 37°C em pH 3,5. A figura 5 mostra esquematicamente como foi realizada a dosagem de proteinase.

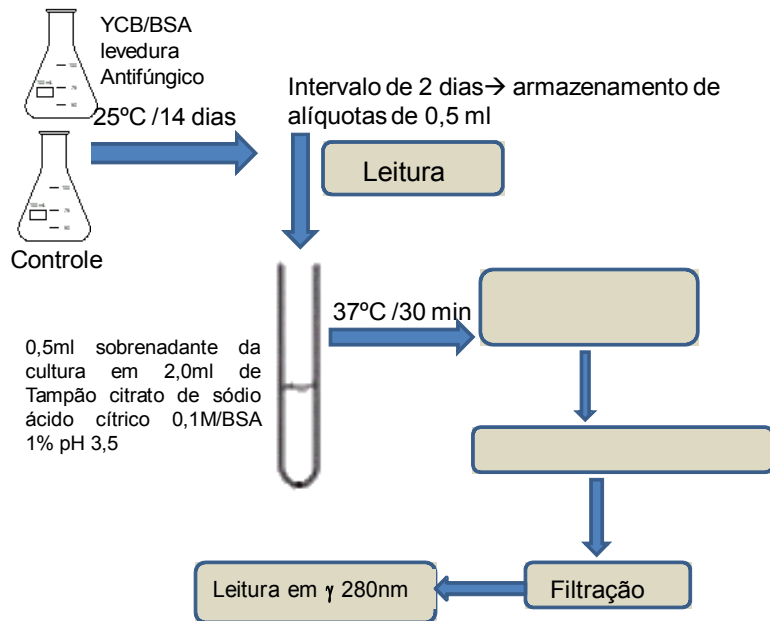


Fig. 5. Esquema da avaliação quantitativa de proteinases segundo Crandall & Edwards (1987).

5. RESULTADOS

5.1 Dosagem de proteinase

Dos 31 isolados de *C. albicans* submetidos ao teste da atividade de proteinase segundo a metodologia de Ruchel (1982), 26 (84%) evidenciaram elevada atividade desta enzima, três mostraram-se proteolíticos e dois não evidenciaram atividade de proteinase. Os valores de Pz variaram de 0,23 a 1,0. O percentual dos isolados classificados segundo Price et al 1982 é mostrado na figura 6.

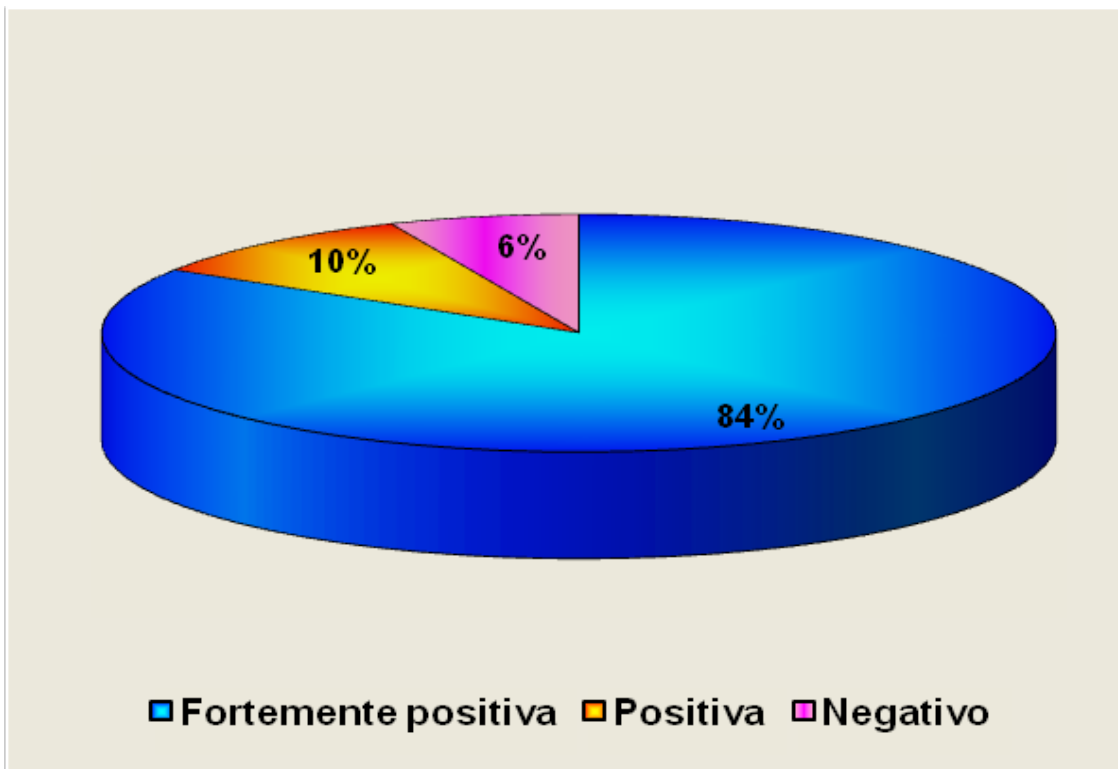


Fig. 6. Porcentagem de isolados de *C. albicans* com relação à atividade de proteinase.

5.2 Teste de suscetibilidade *in vitro* com RPMI 1640

Todos os 31 isolados de *Candida albicans* foram suscetíveis à anfotericina B e caspofungina com CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$. Para estes agentes antifúngicos os valores de CIM variaram de 0,06 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e de 0,015 – 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para caspofungina. Entretanto para fluconazol e voriconazol foram encontrados isolados de *C. albicans* resistentes a estes agentes antifúngicos. CIM > 64 $\mu\text{g/mL}$ foram detectados para dois isolados (02 e 34) enquanto CIM = 2,0 $\mu\text{g/mL}$ foi detectado para voriconazol também para dois isolados (08 e 36). Os resultados de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados de *Candida* frente à anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Suscetibilidade antifúngica de 31 isolados de *Candida albicans* ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina empregando-se o caldo RPMI 1640

Agentes antifúngicos	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
	Varição da CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Fluconazol	0,125 - > 64	0,5	2,0
Voriconazol	0,015- 2,0	0,06	1,0
Anfotericina B	0,06 – 1,0	0,25	1,0
Caspofungina	0,015 – 1,0	0,125	0,5

5.3 Teste de suscetibilidade *in vitro* com YCB

Os resultados encontrados para o teste de suscetibilidade *in vitro* usando o meio de YCB apresentaram valores de CIM semelhantes ao teste com RPMI. A tabela 2 mostra as CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidas para os quatro agentes antifúngicos sobre os isolados de *C. albicans*.

Tabela 2. Suscetibilidade antifúngica de 31 isolados de *Candida albicans* a diferentes antifúngicos utilizando meio de YCB-BSA

Agentes antifúngicos	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
	Varição da CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Fluconazol	0.125 – > 64	1,0	2,0
Voriconazol	0,03 – 2,0	0,125	1,0
Anfotericina B	0,03 – 0,5	0,25	0,5
Caspofungina	0,015 – 1	0,125	0,5

5.4 Determinação da Concentração fungicida mínima

Os valores de CFM apresentaram-se na maioria das vezes superiores aos de CIM para os agentes antifúngicos fungistáticos como fluconazol e voriconazol e com valores muito similares para os antifúngicos fungicidas como anfotericina B e caspofungina. A análise comparativa de CIM e CFM mostrou que fluconazol

apresentou uma concentração fungicida até 4 vezes superior ao valor da CIM para 41,9% dos isolados, enquanto para voriconazol observou-se que para 64,5% dos isolados a CFM foi 2 vezes superior ao valor da CIM. Para anfotericina B e caspofungina, valores de CIM iguais aos de CFM foram encontrados para 71% dos isolados de *C. albicans* (tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos valores de CFM e CIM encontrados para 4 agentes antifúngicos sobre 31 isolados de *C. albicans*

	Fluconazol		Voriconazol		Anfotericina B		Caspofungina	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CFM = CIM	5	16,1	9	29	22	71	22	71
CFM = 2X CIM	12	38,7	20	64,5	6	19,3	9	29
CFM = 4X CIM	13	41,9	2	6,4	3	9,6	-	-
CFM = 8X CIM	1	3,2	-	-	-	-	-	-

A leitura de interpretação de concentração fungicida mínima isolado sob a ação de anfotericina B e fluconazol para um determinado isolado é mostrado na figura 7

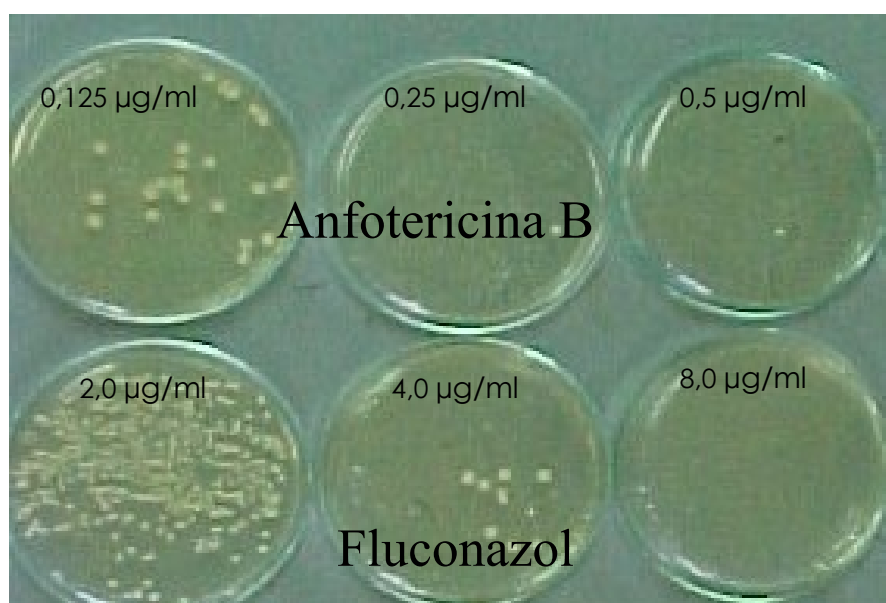


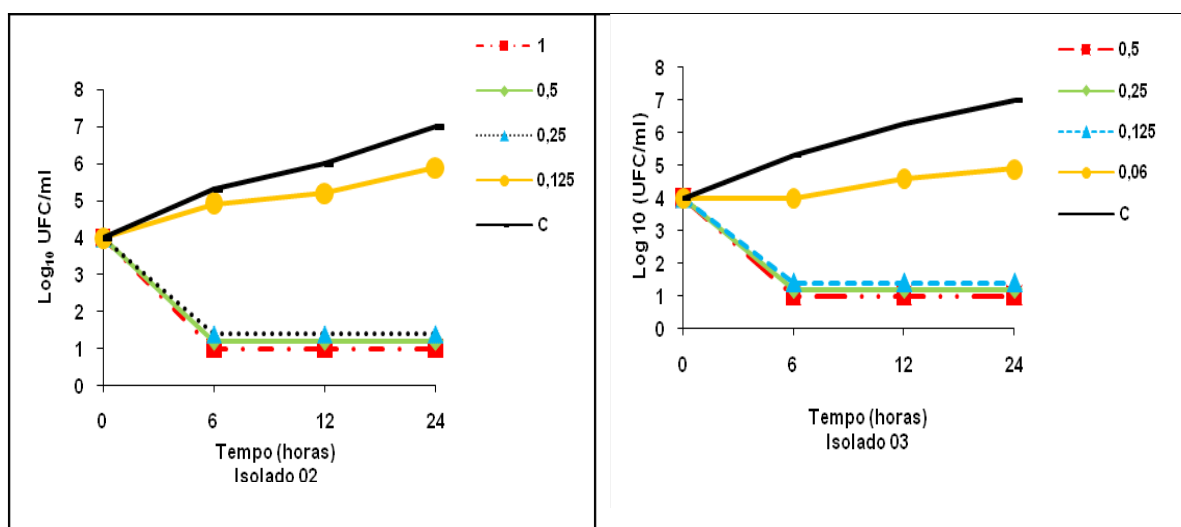
Fig. 7. Concentração fungicida mínima do isolado 05 de *C. albicans* para anfotericina B (0,5 µg/mL) e fluconazol (8 µg/mL).

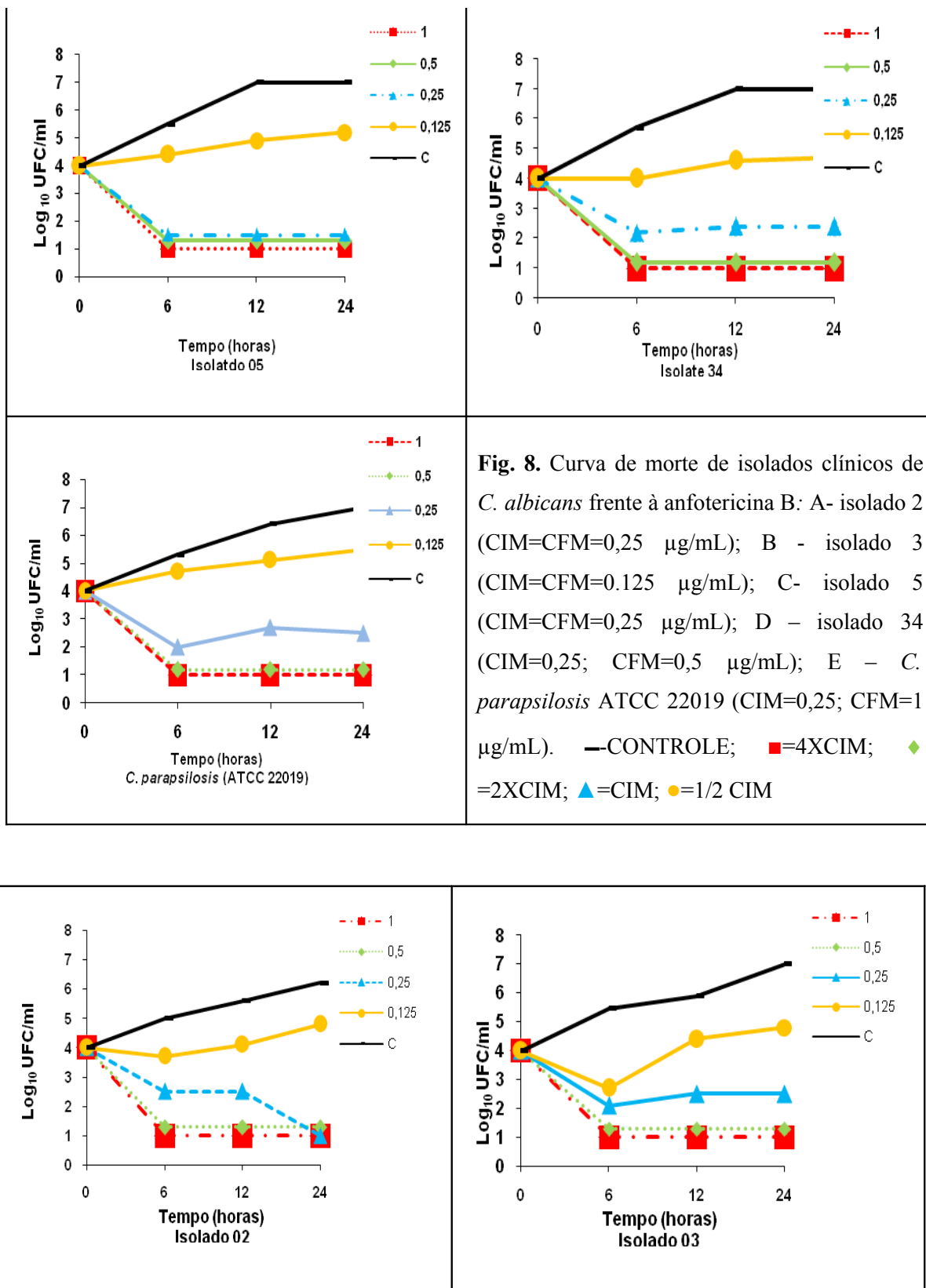
5.5 Curva de morte de isolados de *Candida*

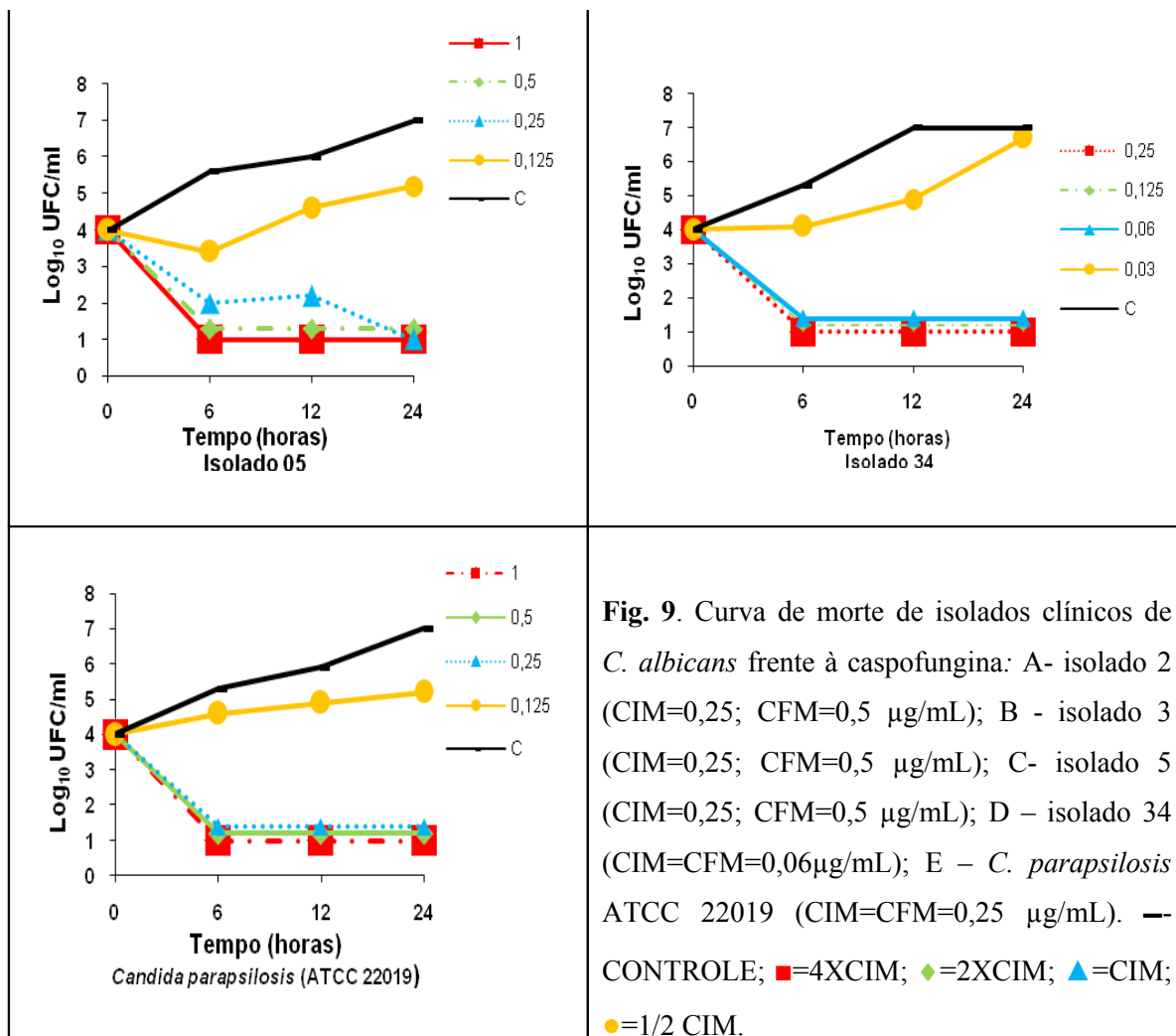
A curva de morte de *Candida* em diferentes concentrações de anfotericina B, e caspofungina permitiu observar que houve uma correlação com os valores de CIM e CFM (técnica de plaqueamento) obtidos para cada um dos isolados.

Anfotericina B apresentou sua atividade máxima fungicida com até 6 horas de incubação em concentrações equivalentes a CIM para 3 isolados de *Candida albicans* (02, 03, e 05), enquanto para o isolado 34 e a cepa controle, *C. parapsilosis* ATCC 22019, a atividade fungicida foi equivalente ao valor encontrado para a CFM.

A atividade fungicida máxima para caspofungina em 6 horas de incubação com concentração igual à CIM ocorreu para o isolado 34 de *C. albicans* e para a cepa controle *C. parapsilosis* ATCC 22019. Nestes isolados a concentração do antifúngico era equivalente a CFM previamente observada. Para os outros isolados (02, 03, 05) a atividade fungicida máxima em concentração equivalente à CIM foi verificada após 24 horas de incubação. As figuras 8 e 9 mostram a curva de morte dos isolados de *Candida* para anfotericina B e caspofungina, respectivamente.

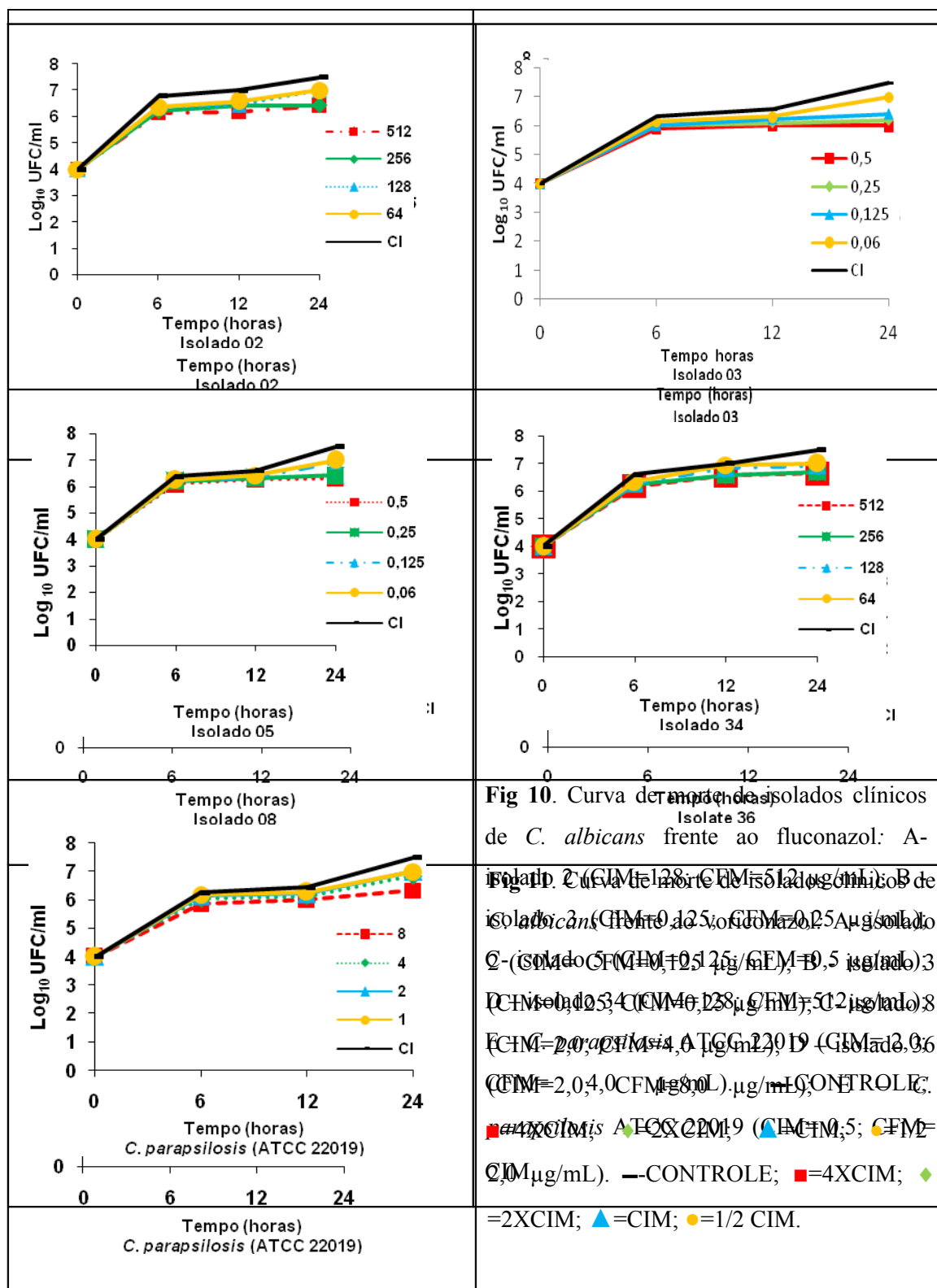






A curva de morte dos isolados de *Candida* para fluconazol e voriconazol em diferentes concentrações, exibiu uma atividade fungicida máxima com pelo menos 4 X os valores da CIM obtidos previamente no teste de suscetibilidade. Tanto para fluconazol quanto para voriconazol, a atividade máxima observada para todos os isolados estudados ocorreu em 24 horas de incubação em concentrações que eram similares aos valores da CFM obtidas para estes isolados na técnica de plaqueamento. .

Os resultados de curva de morte de isolados de *Candida* sob a ação de fluconazol e voriconazol são mostrados nas figuras 10 e 11.



5.6 Avaliação quantitativa de atividade enzimática de Aspartil Proteinase Secretória (SAP)

A atividade enzimática de proteinase sobre o substrato BSA de 4 isolados foi detectada em 48 horas de incubação com atividade máxima entre o 8º e 12º, com um decréscimo geralmente observado no 14º dia.

A análise feita com fluconazol (0; 1; 1/2 e 1/4 CIM) mostrou que dois isolados resistentes de *C. albicans* (CIM=128µg/mL) exibiram o mesmo padrão de atividade de proteinase, onde um gradativo aumento desta atividade estava relacionado ao tempo de incubação e concentração do antifúngico. Altos níveis de Sap foram detectados entre 8º e 12º dia e na presença de 1 X CIM apresentou maior atividade de proteinase do que quando em concentrações de 0, 1/4 ou 1/2 da CIM de fluconazol. Os resultados de aspartil proteinase de isolados resistentes ao fluconazol são apresentados na figura 12

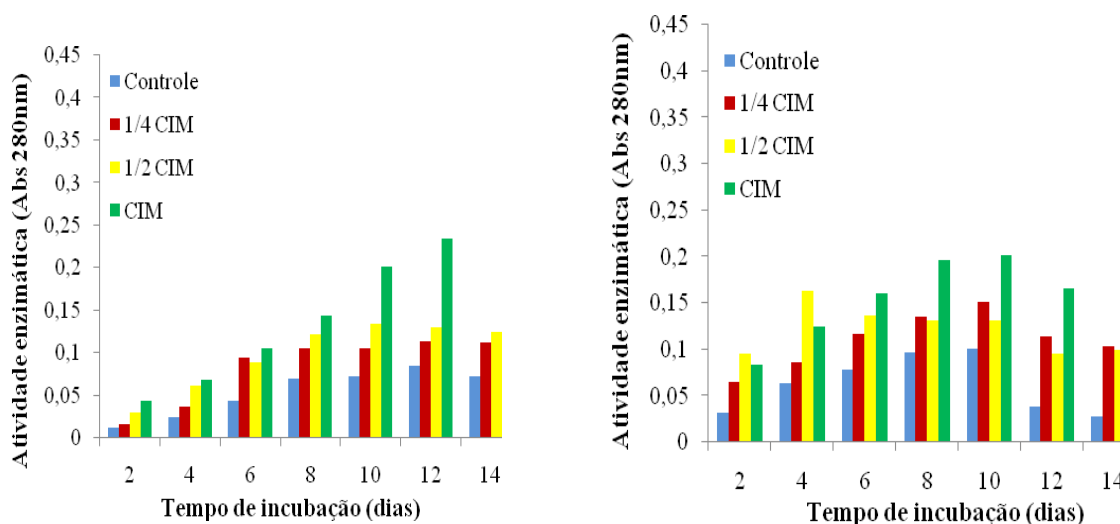


Fig.12. Atividade de proteinase dos isolados 02 e 34 de *C. albicans* (resistentes ao fluconazol) sob a ação de diferentes concentrações (µg/mL) do antifúngico (0 CIM=controle; 1/4CIM= 32; 1/2 CIM=64; CIM=128) em até 14 dias.

Semelhante ao que ocorreu com os isolados resistentes, dois isolados de *C. albicans* suscetíveis ao fluconazol mostraram aumento gradativo desta atividade relacionada ao tempo de incubação e à concentração do agente antifúngico. Altos

níveis de Sap foram detectados entre o 8º e 12º dia para os dois isolados, mas diferenças na atividade de proteinase destes dois 2, isolados foram detectadas. O isolado 03 exibiu maior atividade de Sap quando na ausência do antifúngico, enquanto o isolado 05 apresentou maior atividade quando na presença de 1 X CIM de fluconazol. A figura 13 mostra a atividade de Sap dos isolados suscetíveis ao fluconazol.

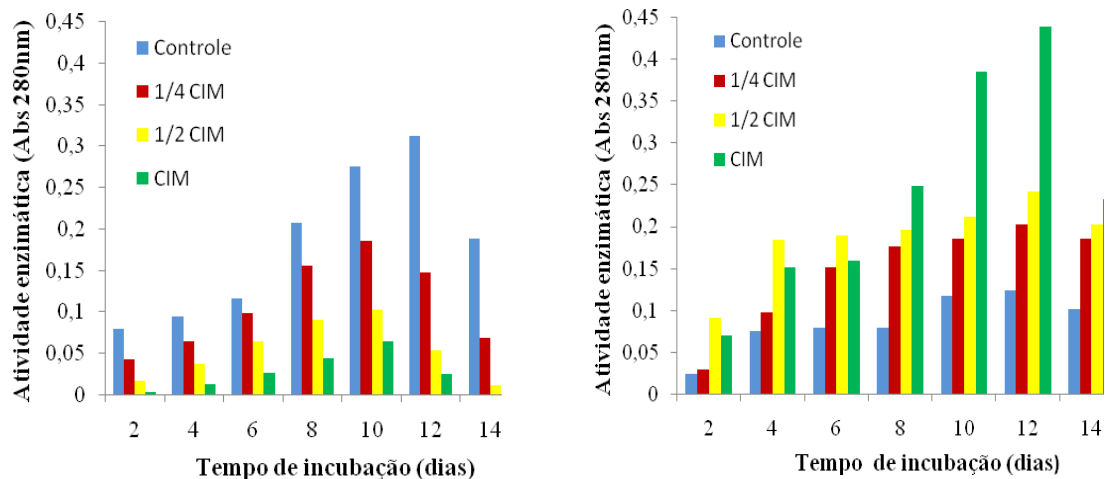


Fig 13. Atividade de proteinase dos isolados 03 e 05 (susceptíveis ao fluconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) do antifúngico (0 CIM=controle); 1/4CIM=0,125; 1/2 CIM=0,25; CIM=0,5) em até 14 dias.

Com relação à atividade de proteinase de isolados sob a ação de voriconazol, os resultados mostraram uma grande semelhança com os apresentados sob a ação de fluconazol.

Da mesma forma que para fluconazol, a atividade proteolítica para isolados resistentes ao voriconazol com CIM de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para ambos estava estreitamente relacionado com o tempo de incubação e com a concentração do antifúngico. Foi verificado que atividade máxima de proteinase ocorria entre o 8º e 12º e estes valores tornavam-se menores no 14º dia. Esta atividade máxima foi observada quando o voriconazol estava na CIM. A atividade de proteinase destes isolados é mostrada na figura 14 .

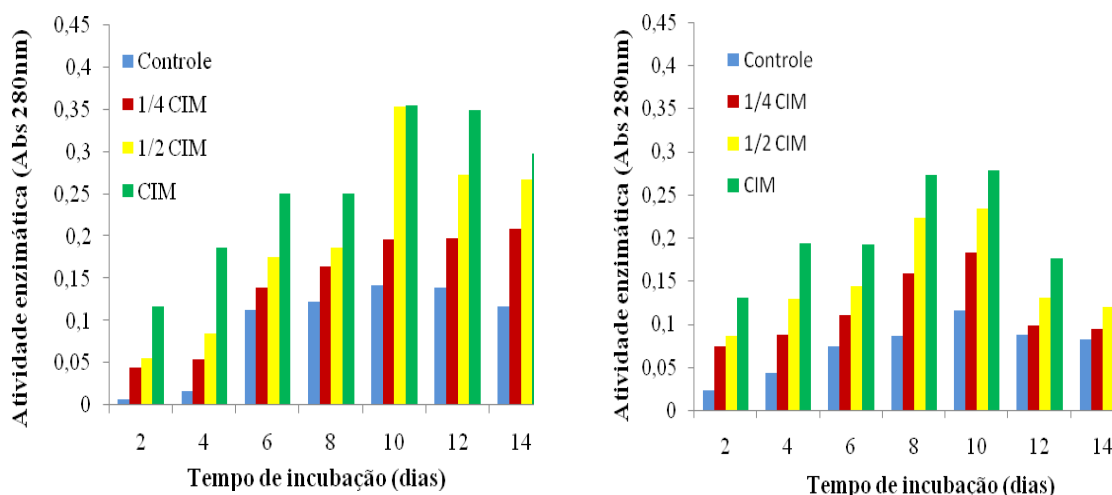


Fig 14. Atividade de proteinase dos isolados 08 e 36 de *C. albicans* (resistentes ao voriconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) do antifúngico (0 CIM=controle; 1/4CIM= 0,5 1/2 CIM=1,0; CIM=2,0) em até 14 dias.

Para os dois isolados suscetíveis ao voriconazol a produção de Sap observada foi semelhante aos resultados obtidos para as cepas resistentes. Verificou-se um aumento gradativo da atividade da enzima relacionado ao tempo de incubação e à concentração do agente antifúngico, com altas concentrações de Sap encontradas entre o 8º e o 12º dia para o isolado 02 e para o isolado 03 a maior atividade de Sap foi vista entre o 6º e o 10º dia. A atividade de proteinase entre esses isolados na presença ou ausência de voriconazol não foram similares. O isolado 02 apresentou mais Sap na presença de 1 X CIM do antifúngico, enquanto o isolado 03 exibiu mais Sap na ausência de voriconazol. A atividade proteolítica dos isolados suscetíveis ao voriconazol são mostrados na figura 15.

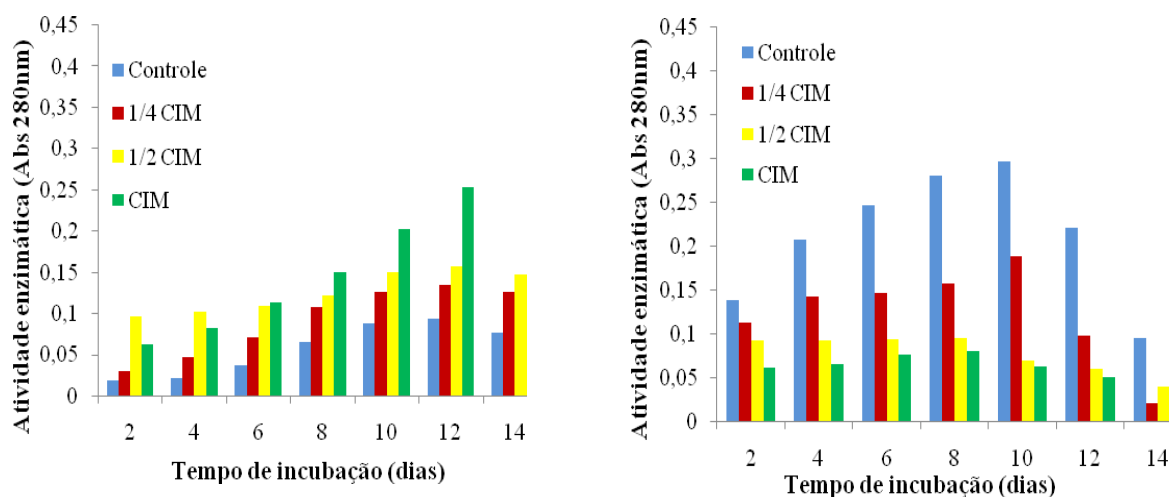


Fig 15. Atividade de proteinase dos isolados 02 e 03 (suscetíveis ao voriconazol) sob a ação de diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) do antifúngico (0 CIM=controle); 1/4CIM= 0,125; 1/2 CIM=0,25; CIM=0,5) em até 14 dias

O isolado padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019 mostrou um aumento gradativo de atividade de proteinase, sendo que o pico máximo de atividade da enzima foi alcançado no 10º dia de incubação. Interessantemente, a atividade de proteinase entre os tratamentos e o controle foi muito semelhante.

6. CONCLUSÕES

Esse estudo permitiu chegar as seguintes conclusões:

1. 84% dos isolados de *C. albicans* oriundos da mucosa bucal de pacientes HIV+ exibiram significativa atividade proteolítica.
2. Todos os isolados foram suscetíveis a anfotericina B e caspofungina, mostrando a alta eficácia destas substâncias fungicidas;
3. A detecção de isolados resistentes ao fluconazol e voriconazol, que podem ser utilizados para o tratamento de candidíase mostra a importância do uso dos testes de suscetibilidade *in vitro*;
4. A utilização de meio de YCB-BSA no teste de suscetibilidade *in vitro* com valores de CIM comparáveis a aquele quando se usa RPMI mostra que embora haja preconização do último, meios alternativos podem ser usados;
5. Os valores de CFM encontrados, comparados aos de CIM, comprova que os agentes fungicidas são capazes de destruir o microrganismo em concentrações inibitórias enquanto nos antifúngicos fungistáticos, há apenas inibição de crescimento nos valores determinados como CIM e, a morte do microrganismo provavelmente ocorra em concentrações superiores de até 8 vezes em determinados casos. Estudos de dosagens terapêuticas relacionadas às CIM e CFM devem ser questionados;
6. A atividade fungicida de anfotericina B e caspofungina determinados pela curva de morte para isolados de *Candida* permitiu observar uma equivalência com os valores

de CIM, no entanto para fluconazol e voriconazol a morte dos isolados estava diretamente relacionada a CFM;

7. Os resultados obtidos para atividade de Sap permitem sugerir que os isolados resistentes provavelmente não sofrem influência do antifúngico, isto é, são capazes de produzir proteinase na sua presença. Para os suscetíveis, entretanto tudo indica que a atividade de proteinase não sofre apenas influência de antifúngicos. Estudos posteriores realizados com genes envolvidos na família de Sap de *C. albicans* e o sistema que regula o mecanismo de ação e de resistência dos antifúngicos poderão responder a este questionamento sobre a diferença de comportamento de cepas suscetíveis e produção de Sap sob a ação de antifúngico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, Azevedo PA, Severo LC 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 46: 239-241.
- Banno Y, Yamada T, Nozawa Y 1985. Secreted phospholipase of the dimorphic fungus *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 47-54.
- Bartie LK, Williams DW, Wilson MJ, Potts JC, Lewis MAO 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidoses and other oral conditions. *J Clin Microbiol* 39: 4066-4075.
- Boff E, Lopes PGM, Spader T, Scheid LA, Loreto E, Dal Forno NF, Aquino V, Severo, LC, Santurio JM, Alves, SH 2008. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à Anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:36-40.
- Calderone RA, Fronzi WA 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microb* 9: 327-335.
- Canuto MM & Rodero FG 2002. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2: 550-563.
- CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A2, CLSI, Pennsylvania, 19087, vol.17, p.1-29.

Crandall M, Edwards JEJR 1987. Segregation of proteinase-negative mutants from heterozygous *Candida albicans*. *J of General Microbiol* 133: 2817-2824.

Ceballos A 2001. Las candidiasis orales en el paciente VHI(+): Ayer y hoy. *Gac Med Bilbao* 98: E16-E18.

Colombo AL, Guimarães T 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 599-607.

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

De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A 2001. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Medical Mycology* 39: 303-313.

De Viragh PA, Sanglard D, Togni G et al 1993. Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. *J Gen Microbiol* 139: 335-342.

Douglas CM, D'ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinam JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB 1997. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2471-2479.

Drago L, Mombelli B, DE Vecchi e, Bonaccorso C, Fassina MC, Gismondo MR 2000. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? *Int J Antimic Agents* 16: 545-547.

Ernst JF 2000. Transcription factors in *Candida albicans* environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774.

Felk A, Schäfer W, Hube B 2000. *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Accession N° AF146440.

Georgopapadakou N, Waslh TJ 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 279-291.

Georgopapadakou NH 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1: 547-557.

Ghannoum Ma 1998. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Jpn J Med Mycol* 39: 55-59.

Ghannoum Ma 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143.

Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K et al 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 144: 829-838.

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

Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E 2008. In vitro antifungal activities of Isavuconazole (BAL4815), Voriconazole, and Fluconazole against 1,007 isolates of Zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents. Chemother* 52: 1396-1400.

Hector RF 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 6: 1-21.

Hernandez S, López-Ribot JL, Najvar LK, McCarthy DI, Bocanegra R, Graybill JR 2004. Caspofungin Resistance in *Candida albicans*: Correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive candida esophagitis. *Antimicrob. Agents. Chemother* 48: 1382-1383.

Hoesley C, Dismukes WE 1997. Overview of oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *Semin Resp Crit Care Med* 18:301-309.

Holzman DC 1995. NIH grant for Candida and AIDS research. *Mol Med Today* 7:300

Hube B 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Trop Med Mycol* 7: 55-69.

Hube B 2004. From commensal to pathogen: stage and tissue specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 7: 1-6.

Ibrahim AS, Mirbord F, Filler SG et al 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 63: 1993-1998.

Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK, Samaranayake LP 2005. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 160:191-200.

Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C 1995. Emergence of azole drug resistance in *Candida species* from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother* 35: 103-114.

Kauffman CA, Carver PL 1997. Use of azoles for systemic antifungal therapy. *Advan Pharmacol* 39: 143-189.

Koltin Y, Hitchcock CA 1997. The search for new triazole antifungal agents. *Curr Opin Chem Biol* 1: 176-182.

Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR 1989. Fungemia caused by *Candida species* and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis* 11: 379-390.

Kurtzman, C.P; Fell, J.W 1998. The Yeast, A Taxonomic Study. Fourth edition, Elsevier.

Laffey SF, Butler G 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151: 1073-1081.

Lan CY, Newport G, Murillo LA, Jones T, Sherer S, Davis RW, Agabian N 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *PNAS* 99: 14907-14912.

Maenza JR, Merz WG, Romagnoli MJ, Keruly JC, Moore RD, Gallant JE 1997. Infection due to fluconazole resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clin Infect Dis* 24: 28-34.

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U 2004. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 38: 311-320.

Martinez R 2006. An update on the use of antifungal agents. *J Bras Pneumol* 32: 449-460.

Medrano DJA, Brilhante RSN, Cordeiro RS, Rocha MFG, Rabenhorst SHB, Sidrim JJC 2006. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 48: 17-20.

Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida species*. *Mol Microbiol* 13: 357-368.

Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D 1998. Differential regulation of SAP 8 e SAP 9, which encode two new members of secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiol* 144: 2731-2737.

Moudgal V, Little T, Boikov D, Vasquez JA 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 767-769.

Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes –Naglik LL, Greenspan D 2003b. Differential expression of *candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188: 469-479.

Naglik JR, Albrecht A, Bader O, Hube B 2004. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and host/pathogen interactions. *Cel Microbiol* 6: 915-926.

Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100: 617-623.

Niewerth N & Korting C 2001. Phospholipase from *Candida albicans*. *Mycoses* 361-367.

Odds FC 1996. Resistance of clinically important yeasts to antifungal agents. *Int J Antimicrob Agents* 6: 145-147.

Ollert MW, Wende C, Görtlich M et al 1995. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 33: 2543-2549.

Penzak SR, Gubbins PO 1998. Preventing and treating azole-resistant oropharyngeal candidiases in HIV-infected patients. *Am J Health Syst Pharm* 55: 279-283.

Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martínez M, et al 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2676-2684.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP 1998. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans* frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 121-129.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ 2002. Trends in antifungal susceptibility of *Candida spp* isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 40: 852-856.

Phan QT, Belanger PH, Filler SG 2000. Role of Hyphal formation in interactions of *C. albicans* with endothelial cells. *Infect and Immun* 68: 3485-3490.

Pichová I, Pavlíčková L, Dostal J, Dolejsi E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida*

tropicalis, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268: 2669-2677.

Price, M.F; Wilkinson, I.D.; Gentry, L.O 1982. Plate methods for detection of phospholipase in *Candida albicans Sabouraudia*, 20: 15-20.

Pulcine C, Pradier C, Samat-Long C, Hyvernats H, Bernardin G, Ichai C, Dellamonica P, Roger PM 2006. Factors associated with adherence to infectious diseases advice in two intensive care units. *J Antimicrobiol Chemoth* 57: 546-550.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49: 973-980.

Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP 2000. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis* 6: 85-91.

Richet H, Roux P, Des Champs C, Esmult Y, Andremont A and the French Candidemia Study Group 2002. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* 8: 405-412.

Ruchel R, Tegeller R, Trost M 1982. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 233-44.

Sabo JA & Abdel-Rahman SM 2000. Voriconazole a new triazole antifungal. *Ann Pharmacother* 34: 1032-1043.

Safdar A, Perlin DS, Armstrong D 2002. Hematogenous infections due to *C. parapsilosis*, changing trends in fungemia patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 11-16.

Samaranayake, L.P; Raeside, J.M, Macfarlane, T.W. 1984. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia*, 22: 201-7.

Samaranayake LP, MacFarlane TW 1990. Oral candidosis, Boston Wright p265.

Sangeorzan JA, Bradley SF, Zarins LT, Ridenour GL, Tibali RN, Kauffman CA 1994. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 97: 339-346.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents and Chemother* 39: 2378-2386.

Sanglard D, Bille J 2002. Current understanding of the mode of action and of resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. *Candida* and candidiasis. R. Calderone Washington: ASM Press, 2002 p. 349-383.

Sanglard D 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 225-234.

Shimizu MT, Almeida Q, Fantinato V, Unterkircher CS 1996. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulfates, proteinase and phospholipase secreted by *candida* species. *Mycoses* 39: 161-167.

Silva VM, Cristina Díaz J, Naldy Febré Y 2002. Red De Diagnóstico en micología médica. Vigilancia de la Resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infectol Santiago* V 19 Supl 2.

Soll DR 2001. In fungal pathogenesis: Principles and Clinical Applications, Eds Calderone, R A & Cihlar, R L (Dekker, New York), vol 14, PP 161-182.

Sweet SP 1997. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis* 3: S88-S95.

Takakura S, Fujihama N, Saito T, Kudo T, Linuma Y, Ichiyama S, and the Japan Invasive Mycosis Surveillance Study Group 2004. National surveillance of species distribution in blood isolated of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrobiol Chemother* 53: 283-289.

Terrel CL 1999. Antifungal agents. Part II. The azoles, *Mayo Clin Proc* 100: 74-78.

Tracz JS, Didomenico B 2001. Antifungals: what's in the pipeline. *Antimicrobials* 4: 540-545.

Urizar JMA 2002. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol* 19: 17-21.

Vanden Bossche H 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14: 44-49.

Voss A, Kluytmans JAJW, Koelman JGM et al 1996. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch University hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 909-912.

Wakiec R, Prasad R, Morschäuser J, Barchiesi F, Borowski E 2006. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*.

Wildfener A, Seidl HP, Paule I, Haberreiter A 1998. *In vitro* evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeast, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses* 41: 309-319.

Williams DW, Potts AJC, Wilson MJ et al 1997. Characterization of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidiasis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 26: 83-89.

Williams DW, Lewis MAO 2000. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis* 6: 3-11.

Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R 1991. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N England J Med* 325: 1274-1277.

Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J 1996. 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* 44: 311-316.

Wu T, Wright K, Hurst SF, Morrison CJ 2000. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1200-1208.

Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard D, Sanglard D, Monod M 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69: 405-412.

Artigo I: Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV⁺ patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin. Killing kinetics of caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates

Manuscrito aceito para publicação na revista Brazilian Journal of Microbiology

Pattern of susceptibility and killing of *Candida spp*

Janine de Aquino Lemos,¹ Carolina Rodrigues Costa,¹ Crystiane Rodrigues de Araújo¹,
Lúcia Kioko Hasimoto e Souza¹, Maria do Rosário Rodrigues Silva^{1*}

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Brasil.

ABSTRACT

A clear understanding of the pharmacodynamics properties of antifungal agents is important for the adequate treatment of the fungal infections, as the candididiasis. The determination of MFC and time kill curve could be more clinically relevant than the MIC for some antifungal agents. In this study we evaluated the MIC and MFC to fluconazole, amphotericin B and caspofungin against *C. albicans* isolates and the killing patterns obtained with caspofungin and amphotericin B against susceptible and resistant strains to fluconazole. The results of MICs showed that all *C. albicans* isolates were highly susceptible to amphotericin B, but two isolates were fluconazole resistant. The analysis comparative between MIC and MFC showed that fluconazole had MFC fourfold higher than MIC for 13 (41.9%) *C. albicans* isolates and the same values of MFC and MIC of amphotericin B and caspofungin were found for 22 (71%) isolates. Correlation between time kill curves and MFC of amphotericin B and caspofungin against all 4 isolates tested were observed. The caspofungin

*Corresponding author: Mailing address: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Av. Delenda resende de Melo S/N Goiânia, Goiás, Brasil. Phone: 55 62 2096127. Fax: 55 62 32611839. E-mail: rosario@iptsp.ufg.br.

killing effect was more evident at MFC in 6 hours of incubation than at MIC found to

this drug in this time suggesting dependence of concentration. The results of time-kill curve similar to MFC values become the determination of MFC an alternative choice for the detection of the fungicidal activity of these drugs.

Key words: Antifungal susceptibility; *Candida albicans*; Time kill curves

Teste de suscetibilidade de *Candida albicans* isoladas da mucosa orofaríngea de pacientes HIV+, ao fluconazol, anfotericina B e caspofungina. Cinética de morte de caspofungina e anfotericina B contra isolados fluconazol resistentes e suscetíveis

RESUMO

Um claro entendimento das propriedades farmacodinâmicas dos agentes antifúngicos é de grande importância para o adequado tratamento das infecções fúngicas como a candidíase. Em alguns casos de escolha do agente antifúngico, a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) e a curva do tempo de morte podem ser mais clinicamente relevantes do que a concentração inibitória mínima (CIM). Nesse estudo, foi avaliada a CIM e a CFM de fluconazol, anfotericina B e caspofungina de *Candida* e ainda os padrões de morte obtidos com caspofungina e anfotericina B de isolados suscetíveis e resistentes ao fluconazol. Os resultados de CIM mostraram que todos os isolados de *Candida albicans* foram altamente suscetíveis à anfotericina B, entretanto dois isolados foram fluconazol resistentes. A análise comparativa de CIM e da CFM mostrou que o fluconazol teve CFM 4x maiores que a CIM para 13 isolados (41,9%) de *Candida albicans* e os mesmos valores de CFM e CIM de anfotericina B e caspofungina foram descobertos para 22 (71%) dos isolados. Correlação entre a curva do tempo de morte e a CFM de anfotericina B e caspofungina contra 4 isolados testados foi observada. O efeito de morte de caspofungina foi mais evidente na CFM até 6 horas de incubação do que na CIM encontrada para este antifúngico nesse mesmo tempo sugerindo a dependência da concentração. Os resultados da curva do tempo de morte com valores semelhantes à CFM tornam a determinação da CFM uma escolha alternativa na detecção da atividade fungicida destes agentes antifúngicos.

Palavras Chave: Suscetibilidade antifúngica, *Candida albicans*, Curva do tempo de morte

INTRODUCTION

Candidiasis, the main opportunistic fungal infection has steadily increased over the past 30 years (15, 24). Many factors as well as over use of broad-spectrum antimicrobials agents, improved life-sustaining therapy, aggressive anticancer therapy and the AIDS epidemic can contribute to the increase of incidence of this infection (8, 33).

Oropharyngeal candidiasis is the most common clinical manifestation in human immunodeficiency virus patients (HIV) (16, 24, 34). Treatment of this fungal infection presents several problems. Besides of toxicity presented by amphotericin B, the widespread use of antifungal agents has induced to resistance to azoles (1, 18, 23). Therefore it is of great importance obtain a clearer understanding of the pharmacodynamics properties of antifungal agents to improve the treatment of oropharyngeal candidiasis (4). Amphotericin B deoxycholate considered gold standard for therapy of fungal infection that acts binding to fungal membrane sterols has been reported as of fungicidal action (6, 18, 33). The echinocandin caspofungin, that has shown be equivalent to amphotericin B for the treatment of candidiasis acting by inhibition of 1,3 β D glucan synthase, an enzyme essential for the formation fungal cell wall have been also described as fungicidal (12, 14, 30, 31). The azoles, as fluconazole that also has been used in the treatment of superficial and deep-seated candidiasis are described as fungistatic (19, 22, 32).

For the adequate treatment of the fungal infections, the determination of minimal fungicidal concentration (MFC) and time kill curve could be more clinically relevant than the minimal inhibitory concentration (MIC) of some antifungal agents. Previous reports have showed that the equal MIC of amphotericin B may correspond to different killing activities depending on the strain tested (6). In this study we evaluated the MIC and MFC to fluconazole, amphotericin B and caspofungin against *C. albicans* strains isolated from HIV⁺ patients and the killing patterns obtained with Caspofungin and amphotericin B against susceptible and resistant strains to fluconazole.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

A total of 31 *Candida albicans* isolates were used in this study. These isolates, previously identified according to Kurtzman and Fell (21), were obtained of oral mucosa from HIV⁺ patients. All patients gave written informed consent and the study was approved by the HC Bioethics Committee of Hospital de Doenças Tropicais de Goiás (007/2004) and Hospital das Clínicas da UFG (027/07). All isolates were stored in sterile distilled water at room temperature and subsequently inoculated onto Sabouraud dextrose agar (SDA- DIFCO) for 24 hours at 35°C before testing. *C. parapsilosis* ATCC 22019 was used as control.

Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility tests for amphotericin B (Bristol-Myers Squibb), fluconazole (Pfizer Pharmaceuticals Group) and caspofungin (Merck Sharpe & Dome) were performed using the broth microdilution method according to CLSI M27A2 (25). The antifungal agents were obtained as standard powders and stock solutions were dissolved in water (caspofungin and fluconazole) or 100% dimethyl sulfoxide (amphotericin B). The final concentrations of the antifungal agents were 0.03 to 16 µg/ml for caspofungin and amphotericin B and 0.125 to 64 µg/ml for fluconazole. MIC of amphotericin and caspofungin was defined as the concentration resulting in 100% growth inhibition (27) and of fluconazole was defined as the lowest concentration inhibiting at least 50% of the control tube growth (25). Isolates with caspofungin and amphotericin B MICs of > 1 µg/ml and a fluconazole MIC of ≥ 64 µg/ml were considered as resistant (17, 25, 28).

MFC Determination

Minimal fungicidal concentrations were determined according to Canton *et al.* (6). Briefly, MFCs were evaluated by transferring 0.1ml from all clear MIC wells (no growth seen in microdilution trays) onto SDA plates. The MFC was the lowest drug concentration that killed ≥ 99.9% of cells.

Time-Kill Curve Procedures

Time kill tests using the methodology of Klepser *et al.* (20), were conducted for 4 *C. albicans* isolates and one *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (control). These strains of *C. albicans* were selected according a prior susceptibility testing, including two fluconazole susceptible and 2 fluconazole resistant isolates. Briefly, three to five colonies of *Candida* isolates grown for 24 to 48h on SDA were suspended in 5ml of saline, and the fungal suspension was counted using a hemacytometer. An appropriate volume of fungal suspension to yield a starting inoculum of 10^4 cells/ml was then added to 30 ml of RPMI 1640 buffered with MOPS. Caspofungin and amphotericin B were added to individual cultures resulting concentrations equal to 0.5; 1; 2 and 4 times the MICs for the test isolates. Test solutions were placed on a shaker and incubated at 37°C. At predetermined time points (0, 6, 12 and 24 hours) after the incubation, 100µl volumes were removed from each test suspension, serially diluted in RPMI broth and plated on SDA (100 µl) for colony counting. All time-kill curve studies were conducted in duplicate and average colony counts (\log_{10} CFU/ml) versus time (h) was constructed.

RESULTS

Caspofungin and amphotericin B were highly active against *C. albicans* isolates. All isolates were inhibited by $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ for these two antifungal agents with range of 0.06 - 1.0 $\mu\text{g/ml}$ for amphotericin B and of 0.015 - 1.0 $\mu\text{g/ml}$ for caspofungin. For fluconazole it was verified that 2 isolates were resistant with $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/ml}$. The range of MIC and of MFC, MIC_{50} and MIC_{90} of these antifungal agents against *Candida albicans* isolates are showed in table 1.

Table 1.-In vitro activities of three antifungal agents against 31 *C. albicans* isolates obtained from oral mucosa of HIV+ patients.

Antifungal agents	range	MIC		MFC
		50%	90%	range
Fluconazole	0.125 - ≥ 64	0.5	2	0.5 – 256
Amphotericin B	0.06 - 1	0.25	1.0	0.06 – 2
Caspofungin	0.015 - 1	0.125	0.5	0.06 – 2

The analysis comparative of MIC and MFC showed that fluconazole had MFC 4 X higher than MIC for 13 (41.9%) *C. albicans* isolates. The equal values of MFC and MIC of amphotericin B and caspofungin were found in 22 (71%) isolates (Table 2).

Table 2. Distribution of MFC against 31 *C. albicans* isolates according to the MICs for three antifungal agents

MFC = n × MIC	Number (%) of isolates with MFC n-folds higher than the MIC for		
	Fluconazole	Amphotericin B	Caspofungin
MFC = MIC	5 (16.1)	22 (71)	22 (71)
MFC = 2 X MIC	12 (38.7)	6 (19.3)	9 (29)
MFC = 4 X MIC	13 (41.9)	3(9.3)	0
MFC = 8 X MIC	1 (3.2)	0	0

The killing patterns of caspofungin and amphotericin B constructed in medium RPMI 1640 buffered with MOPS against *Candida* isolates were similar to MIC or MFC values, evaluated previously. For the amphotericin B fungicidal activity, the maximal effect was verified in until 6 h of incubation at concentration equal to MIC for three isolates named 2, 3 and 5 of *C. albicans* and at concentrations equal to MFC for the isolate 34 and for *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Fig. 1). The maximal effect of caspofungin fungicidal activity, occurred until 6 h of incubation at concentration equal to MIC for the isolates 34 of *C. albicans* and for *C. parapsilosis* ATCC 22019, while for 2, 3 and 5 isolates this activity occurred in 24 h. After 6 h at concentrations equal to MFC the maximal effect was observed for all isolates (Fig. 2).

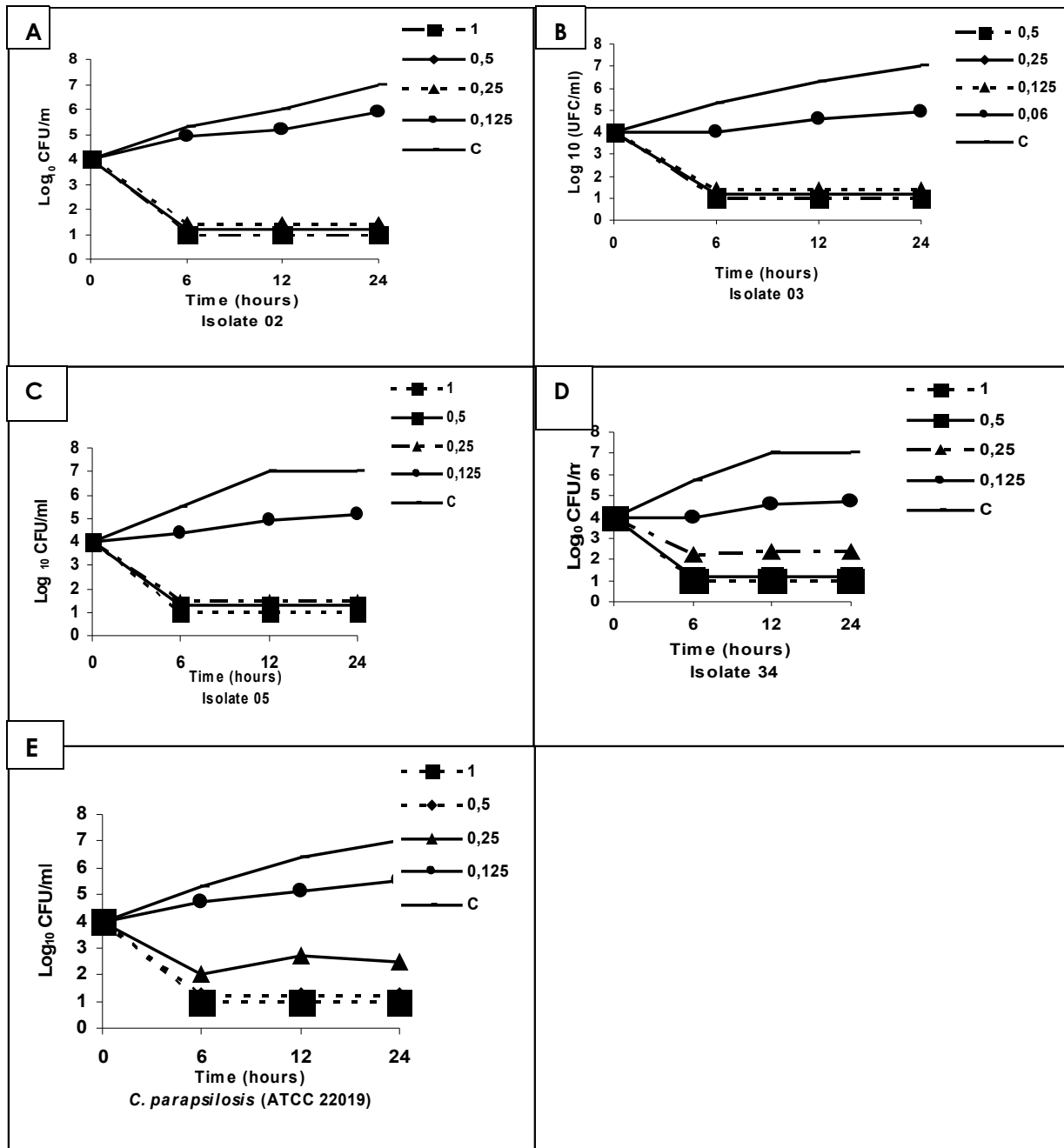


FIG. 1. Time-kill curves for amphotericin B against clinical *C. albicans* isolates. A-isolate 2 (MIC= MFC=0.25 $\mu\text{g/ml}$); B-isolate 3 (MIC = MFC= 0.125 $\mu\text{g/ml}$); C-isolate 5 (MIC=MFC= 0.25); D-isolate 34 (MIC=0.25; MFC=0.5 $\mu\text{g/ml}$); E-*C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC= 0.25, MFC=1). —Growth control; ■=4X MIC; ◆=2X MIC; ▲=MIC; ●=1/2 MIC

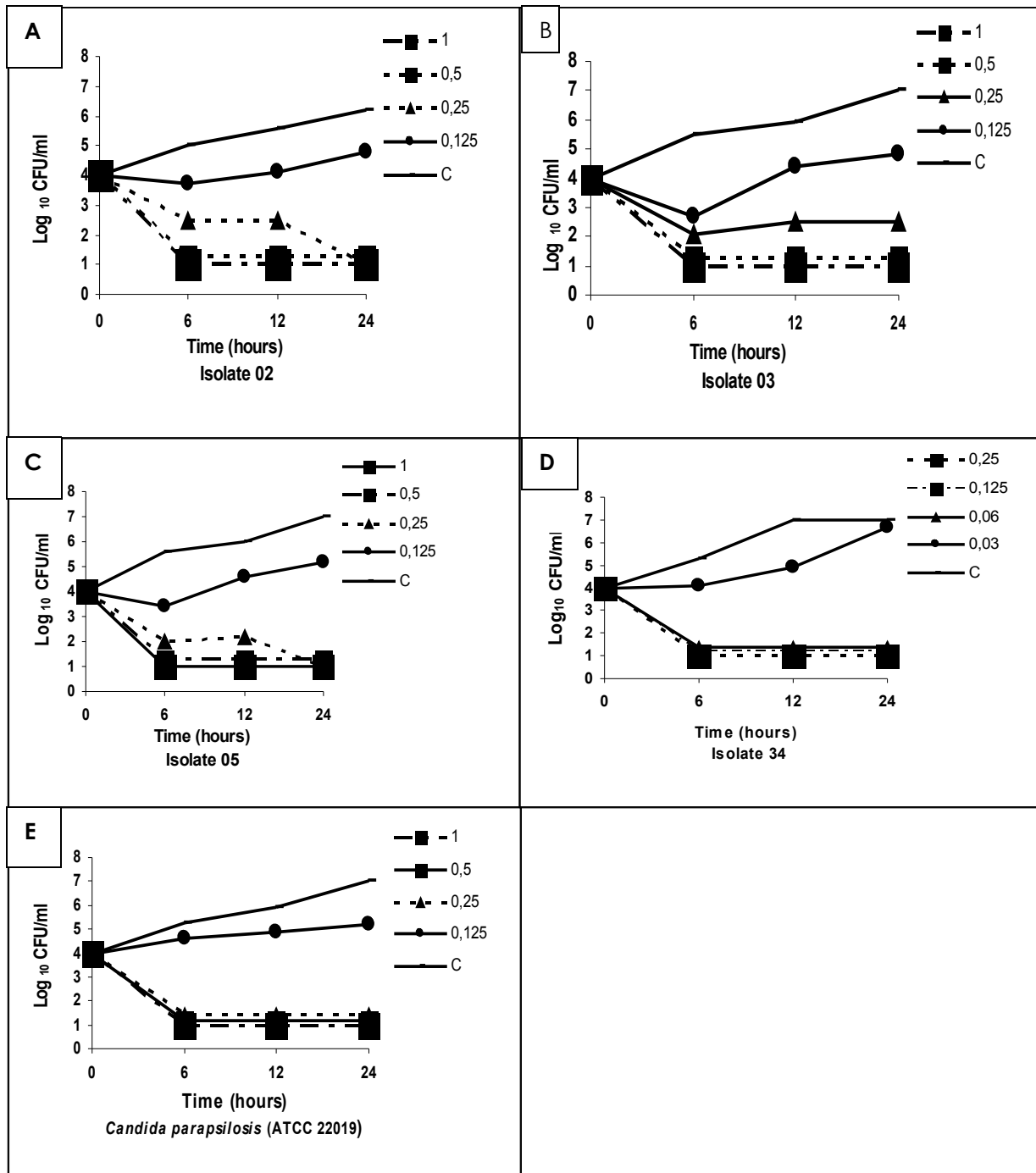


FIG. 2. Time-kill curves for caspofungin against clinical *C. albicans* isolates. A-isolate 2 (MIC= 0.25, MFC=0.5 µg/ml); B, isolate 3 (MIC = 0.25, MFC= 0.5 µg/ml); C, isolate 5 (MIC=0.25, MFC= 0.5); D, isolate 34 (MIC=MFC=0.06 µg/ml); E, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC=MFC=0.25). —Growth control; ■=4X MIC; ◆=2X MIC; ▲=MIC; ●=1/2 MIC

DISCUSSION

Our antifungal susceptibility data showed that all *Candida albicans* isolates obtained from HIV⁺ patients were highly susceptible to amphotericin B and caspofungin. It is well known that amphotericin B and caspofungin have excellent *in vitro* activity against *C. albicans* isolates. MICs of caspofungin ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ were found for 99% of 3959 clinical isolates of *Candida* studied by Pfaller *et al.* (29) with a concentration of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ able to inhibit 90% of isolates of *C. albicans*. The antifungal testing performed against 1997 clinical isolates of *Candida* obtained from BSI (bloodstream infection) showed that amphotericin B was highly active against the most of isolates with MIC₉₀ of 1 $\mu\text{g/ml}$ for *C. albicans* (28). In this study of these two antifungal agents susceptibility profile exhibited for all *C. albicans* isolates was ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, with the MIC₉₀ of caspofungin of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and of amphotericin B of 1.0 $\mu\text{g/ml}$.

Although fluconazole is used as a standard prophylaxis and therapy of candidiasis (22) we determined 2 isolates resistant to this drug. These two resistant isolates were susceptible to amphotericin B and to caspofungin with MICs of 0.125 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ for amphotericin B and of 0.25 and 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for caspofungin. Studies *in vitro* have showed *Candida* clinical isolates fluconazole resistant. Among the 3959 isolates of *Candida*, Pfaller *et al.* (29) observed a total of 157 resistant to fluconazole. Interestingly, these same researchers verified that caspofungin was active against the isolates *Candida* resistant to fluconazole. The results of the *in vitro* susceptibility tests obtained by Nowika *et al.* (26) showed that 4 *C. albicans* isolates resistant to fluconazole were susceptible to amphotericin B. Treatment failures and recurrence of infection has been seen involving the use of fluconazole (10, 30, 33).

Several researchers have showed that caspofungin and amphotericin B have fungicidal activity (7, 9, 30). For 71% of *C. albicans* isolates the minimal fungicidal concentrations were equal to minimum inhibitory concentrations of amphotericin B and Caspofungin (Table 2). For caspofungin the MFC was 2 X MIC (table 2) in 29% of the isolates and for amphotericin B was observed that MFC was 2 X MIC in 19.3% and 4X MIC in 6.4% of the isolates (Table 2). Similar results have been observed by Cantón *et al.* (5) for amphotericin B that showed differences between MIC and MFC greater than four dilutions for 2 *C. albicans* isolates. For caspofungin, have been reported MICs comparable the MFCs for *C. albicans* (2, 13).

If the results of differences between MIC and MFC observed for these isolates can cause the treatment failure is still few known. Studies of correlation clinical

significance and MFC are needed to establish this point. Cantón *et al.* (6) have postulated that the use of the time kill curves to provide assessment of fungicidal activity is better than MIC or MFC endpoint.

Our *in vitro* pharmacodynamics findings by time kill curves revealed that amphotericin B fungicidal activity was only exerted at 2X MIC for one isolate resistant to fluconazole and to *C. parapsilosis* ATCC 22019 fluconazole susceptible (MFCs for these isolates were also greater than 2 X MIC), and in two susceptible and one resistant isolates to fluconazole, the fungicidal activity was equal to MIC (Fig. 1). Although our results had similarity those of Cantón *et al.* (6) that suggested that the fungicidal activity of amphotericin B against *C. albicans* is depending on the strain, in our work there are indications that suggest that the killing effect is concentration dependent.

By the way, according to Ernst *et al.* (11), the killing of *C. albicans* under caspofungin effect is concentration dependent, too. In our study, the caspofungin killing effect was more evident at MFC in 6 hours of incubation than at MIC found to this drug in this time (Fig. 2). It is known that the levels of this antifungal agent attainable in the plasma for clinical isolates treated with caspofungin has been seen to be fourfold or more the MIC values detected *in vitro* (30).

In summary, amphotericin B seemed to be more potent than caspofungin as suggested by time kill curves against *C. albicans*. Amphotericin B had its fungicidal activity maximal (E_{max}) in until 6 hours of incubation equal to MIC for three isolates, while for caspofungin this type of activity was seen after 24 hours. These results were similar to Bonaventura *et al.* (3) that verified EC_{50} (concentration producing 50% of E_{max}) of 0.8 h for amphotericin B and of 1.3 h for caspofungin against the *Candida* isolates.

The results of time-kill curve comparable to MFC become the determination of MFC an alternative choice for the detection of the fungicidal activity of these drugs.

REFERENCES

1. Barchiesi, F. Maracci, M.; Radi, B.; Arzeni, D.; Bladassarri, I.; Giacometti, A.; Scalise, G. (2002). Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Antimicrob Chemother.*, 50: 999-1002.

2. Bartizal, K.; Gill, C.J.; Abruzzo, G.K.; Flattery, A.M.; Kong, L.; Scott, P.M.J.; Smith, G.; Leighton, C.E.; Bouffard, A.; Dropinski, J.F.; Balkovec, J. (1997). *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41: 2326-2332.
3. Bonaventura, G.D.I.; Spedicato, I.; Picciani, C.; D'Antonio, D.; Piccolomini, R. (2004). *In vitro* pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 4453-4456.
4. Burgess, D.S.; Hastings, R.W.; Summers, K.K.; Hardin, T.C.; Rinaldi, M.G. (2000). Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 36: 13-18.
5. Cantón, E.; Pemán J.; Viudes, A.; Quindós, G.; Gobernado, M.; Espinel-Ingroff, A. (2003). Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diag Microbiol Infect Dis.*, 45: 203-206.
6. Cantón, E., Pemán, J.; Gobernado, M.; Viudes, A.; Espinel-Ingroff, A. (2004). Patterns of amphotericin B Killing Kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48: 2477-2482.
7. Cantón, E., Pemán, J.; Sastre, M.; Romero, M.; Espinel-Ingroff, A. (2006). Killing Kinetics of Caspofungin, Micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 2829-2832.
8. Chattopadhyay, A.; Caplan, D.J.; Slade, G.D.; Shugars, D.C.; Tien, H.C.; Patton, L.L. (2005). Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. *Community. Dent. Oral. Epidemiol.*, 33: 35-44.
9. Clemons, K.V.; Espiritu, M.; Parmar, R.; Stevens, D.A. (2006). Assessment of the Paradoxical effect of caspofungin in the therapy of candidiasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 1293-1297.
10. Costa, M., Passos, X.S.; Miranda, A. T.B.; Araújo, R.S.C.; Paula, C.R.; Silva, M.R.R. (2004). Correlation of *in vitro* itraconazole and fluconazole susceptibility

- with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia.*, 157: 43-47.
11. Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Ernst, M.E.; Messer, S.A.; Pfaller, M.A. 1999. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK- 0991 determined by time-kill methods. *Diag Microbiol. Infect. Dis.*, 33: 75-80.
 12. Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Pfaller, M.A. (2000). Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 44: 1108-1111.
 13. Espinel-Ingroff, A. (1998). Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the Echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY 303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2950-2956.
 14. Garbino, J. (2004). Caspofungin- a new therapeutic option for oropharyngeal candidiasis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 187-189.
 15. Ghannoum, M.A. (2001). Candida: a causative agent of an emerging infection. *JID. Symposium. Proceedings.*, 6: 188-196.
 16. Gughani, H.C.; Becker, K.; Fegeler, W.; Basu, S.; Chattopadhyaya, D.; Baveja, U.; Satyanarayana, S.; Kalghatgi, T.; Murlidhar, A. (2003). Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. *Mycoses.*, 46: 281-288.
 17. Hernandez, S.; López-Ribot, J.L.; Najvar, L.K.; McCarthy, D.I.; Bocanegra, R.; Graybill, J.R. (2004). Caspofungin Resistance in *Candida albicans*: Correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive candida esophagitis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48: 1382-1383.
 18. Hossain, M.A.; Reyes, G.H.L.; Long, A.; Mukherjee, P.K.; Ghannoum, M.A. (2003). Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 1427-1429.
 19. Kennedy, H.F.; Shankland, G.S.; Bagg, J.; Chalmers, E.A.; Gibson, B.E.S.; Williams, C.L. (2006). Fluconazole and itraconazole susceptibilities of *Candida*

- spp* isolated from oropharyngeal specimens and blood cultures of paediatric haematology/ oncology patients. *Mycoses.*, 49: 457-462.
20. Klepser, M.E.; Ernst, E.J.; Lewis, R.E.; Ernst, M.E.; Pfaller, M.A. (1998). Influence of test conditions on antifungal time kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47: 1207-1212.
 21. Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (1998). The Yeast, A Taxonomic Study. *Fourth edition*, Elsevier.
 22. Martin, M.V. (1999). The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 44: 429-437.
 23. Martinez, R. (2006). An update on the use of antifungal agents. *J. Bras. Pneumol.*, 32: 449-460.
 24. Melo, N.R.; Taguchi, H.; Jorge, J.; Pedro, R.J.; Almeida, O.P.; Fukushima, K.; Nishimura, K.; Miyaji, M. (2004). Oral *Candida* flora from Brazilian Human Immunodeficiency Virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 99: 425-431.
 25. NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A, NCCLS, Pennsylvania, 19087, vol.17, p.1-29.
 26. Nowika, J.; Nawrot, U.; Juszczack, K.; Gusin, B. (2005). Susceptibility to antifungal agents of *Candida* species isolated from paediatric and adult patients with haematological diseases. *Mycoses.*, 48: 385-390.
 27. Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Mills, K.; Bolmström, A.; Jones, R.N. (2001). Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4387-4389.
 28. Pfaller, M.A.; Diekma, D.J.; Jones, R.N.; Messer, S.A.; Hollis, R.J. (2002). Trends in antifungal susceptibility of *Candida spp* isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENSTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 852-856.

29. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Messer, S.A.; Hollis, R.J.; Jones, R.N. (2003). *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida spp.*, including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47: 1068-1071.
30. Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Boyken, L.; Rice, C.; Tendolkar, S.; Hollis, R.J.; Diekema, D.J. (2003). Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 5729-5731.
31. Pfaller, M.A.; Boyken, L.; Hollis, R.J.; Messer, S.A.; Tendolkar, S.; Diekema, D.J. (2006). *In vitro* susceptibilities of *Candida spp* to caspofungin: four years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 760-763.
32. Swinne, D.; Wattle, M.; Nolard, N. (2005). *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Rev. Iberoam. Micol.*, 22: 24-28.
33. Yang, Y.L.; Li, S.Y.; Cheng, H.H.; Lo, H.J.; TSARY Hospitals. (2005). The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC. Infect. Dis.*, 5: 99.
34. Yang, Y.L.; Lo, H.J.; Hung, C.C.; Li, Y. (2006). Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC. Infect. Dis.*, 6: 8.

Artigo II Effects of antifungal agents in Sap activity of *Candida albicans* isolates
Sap activity of *C. albicans*

Manuscrito submetido para publicação no Journal of Medical Microbiology

Janine de Aquino Lemos,¹ Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes,¹ Lúcia Kioko Hasimoto e Souza,¹ Carolina Rodrigues Silva,¹ Xisto Sena Passos,¹ Maria do Rosário Rodrigues Silva^{1*}

¹. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

Some antifungal agents have showed to exert effects on expression of virulence factors of *Candida* as production of aspartyl proteinase (Sap). In this study, we sought to determine and to compare the influence of fluconazole and voriconazole in proteinase activity of this microorganism. Thirty one isolates obtained of oral mucosa from HIV⁺ patients were used in this study. The MICs of fluconazole and voriconazole were determined using the broth microdilution method with RPMI1640 medium; and with yeast carbon base-bovine serum albumin (YCB-BSA) medium. The Sap activity following the digestion of BSA as substrate was determined for four *C. albicans* strains arbitrary chosen according to susceptibility (susceptible or resistant) to fluconazole or voriconazole. “In vitro” susceptibility testing using the two media presented similar MIC values. Increased Sap activity was observed in resistant isolates on presence of drugs, but the Sap activity by susceptible isolates to azoles showed behavior different on presence of drug. Further studies involved in the family of 10 *SAP* genes that encode aspartyl proteinase in *C. albicans* and regulation mechanism of drugs are necessary to answer the question about difference in behavior of susceptible *C. albicans* isolates.

Corresponding author: Mailing address: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Rua 235 S/N, 74605-050 Goiânia, Goiás, Brasil. Phone: 55 62 2096127. Fax: 55 62 32611839. E-mail: rosario@iptsp.ufg.br

INTRODUCTION

The recognized clinical importance of candidiasis and the emergence of azole antifungal drug resistance have increased the interest of investigations to understanding the mechanisms of *Candida* pathogenicity (Ghannoum, 2001; Nucci & Kieren, 2005). *C. albicans* is the most common pathogen of humans and can be responsible for systemic infections in immunocompromised hosts. Characteristics associated with the pathogenicity of *Candida* include apart from predisposing host factors, hyphae formation, phenotypic switching, adhesion, drug resistance, production of phospholipase and of aspartyl proteinase (Sap) (De Bernardis *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2002; Naglik *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005) Of these, the Sap proteins, products of a family of 10 *SAP* genes are the most significant hydrolytic enzymes involved in the virulence of *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2005). The relationship of this protein with virulence has been demonstrated by degradation of cellular substrates such as proteins related to immunological and structural defenses of host (Monod *et al.*, 1998; Felk *et al.*, 2000; Copping *et al.*, 2005).

Triazole derivatives are antifungal agents used for different indications regarding prophylaxis and treatment of severe fungal infections (Castagnola *et al.*, 2004; Lipp, 2008). Fluconazole is the most commonly prescribed antifungal agent for the prophylaxis and therapy of candidiasis (Burgess *et al.*, 2000; Bonaventura *et al.*, 2004), while voriconazole a new triazole that presents the same mechanism of action of fluconazole (inhibition of ergosterol synthesis) has demonstrated excellent activity against *Candida* species (Klepser *et al.*, 2000; Pfaller *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007). Some antifungal agents have showed to exert effects on expression of virulence factors

of *Candida* (Willis *et al.*, 2001). The secreted aspartyl proteinase production *C. albicans* isolates can be influenced by presence of fluconazole (Wu *et al.*, 2000).

Currently, no data regarding to voriconazole, triazole related to fluconazole, in Sap production by *C. albicans* has been described. Therefore, in this study, we sought to determine and to compare the influence of fluconazole and voriconazole in proteinase activity of this microorganism.

METHODS

Microorganisms. Thirty one *C. albicans* isolates, obtained of oral mucosa from HIV⁺ patients, previously identified according to Kurtzman and Fell (1998) and in parallel by culture onto CHROMagar[®] Candida medium (CHROMagar, Paris, France) were used in this study. All isolates were stored in sterile distilled water at room temperature and subsequently inoculated onto Sabouraud dextrose agar (SDA- DIFCO) for 24 – 48 hours at 35°C for further assays. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used as control.

Antifungal susceptibility testing. The MICs of fluconazole e voriconazole were determined using the broth microdilution method according to CLSI M27-A2 (CLSI, 2002) with RPMI1640 medium (CLSI 2002); and with the Sap-inducing medium, yeast carbon base-bovine serum albumin (YCB-BSA) containing vitamins (0.1µl/ml; IsoVitaleX enrichment) and 0.2% glucose and BSA (fraction V) and adjusted to pH 5.6 (Crandall & Edwards, 1987). The antifungal agents were obtained as standard powders and stock solutions were dissolved in water (fluconazole) or in 100% dimethyl sulfoxide (voriconazole). The final concentrations of the antifungal agents were 0.03 to 16 µg/ml for voriconazole and 0.125 to 64 µg/ml for fluconazole.

The yeast inoculum was prepared from 24 hours old cultures. The cell density was adjusted with a spectrophotometer (at 530 nm wavelength) to yield a yeast stock of 1×10^6 to 5×10^6 cells/ml. Further dilutions were made with RPMI 1640 broth/YCB medium, resulting in final inoculum of approximately 0.5×10^3 to 2.5×10^3 cells/ml. One hundred microliters of the fungal suspension and 100 μ l of the antifungal agents were dispensed into the wells of microdilution tray. End points were read visually after 48 h of incubation at 35°C for cells grown in RPMI 1640 medium and after 90 h of incubation at 25°C for cells grown in YCB-BSA medium Wu *et al.*, 2000). MICs of fluconazole and voriconazole were considered as the lowest tested concentration with a significant reduction (approximately 50%) in growth compared to control tube growth. MICs ≥ 64 μ g/ml for fluconazole (CLSI, 2002) and ≥ 2 μ g/ml for voriconazole (Pfaller *et al.*, 2006) were defined as resistant.

Determination of Sap activity. The Sap activity was determined for four *C. albicans* strains. These isolates were arbitrary chosen according to susceptibility (susceptible or resistant) to fluconazole or voriconazole determined by *in vitro* susceptibility testing. A yeast suspension of 1×10^7 cells/ml was added in erlenmeyer flasks with 30 ml of YCB-BSA medium containing 0; 1 X MIC; 1/2 X MIC; 1/4 X MIC of fluconazole or voriconazole. These flasks were incubated for 14 days at 25°C in shaker at 160 rpm. Proteinase activity was determined following the digestion of BSA as substrate according to Crandall & Edwards (1987). A aliquot of 500 μ l of culture supernatant was added of 2.0 ml 1% of BSA in 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer, pH 3.5 and incubated at 37°C for 30 min. The reaction was then stopped by adding 5.0 ml ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA). Centrifugation at 1500 g for 10 min followed by filtration through a 0.45 μ m porosity filter was performed to remove the precipitated protein. The A_{280} nm was used to determine the amount of proteolysis of the filtrate.

Control tubes containing 0.5 ml culture supernatant were incubated for 30 min at 37°C followed by the addition of 5.0 ml TCA and then 2.0 ml of BSA. One unit (U) of proteinase activity was defined as equal to a change in absorbance 280 nm in 30 min at pH 3.5 at 37°C.

RESULTS

In vitro susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *C. albicans* isolates determined by microdilution broth method showed no differences in the MICs values by using RPMI 1640 or YCB-BSA medium.

Proteolytic activity was determined in two resistant and two susceptible isolates to each one of drugs that presented the same MIC values. The resistant isolates presented MICs of 128 µg/ml for fluconazole and of 2.0 µg/ml for voriconazole, while the susceptible isolates showed MICs of 0.5 µg/ml for fluconazole and for voriconazole. Sap production of these isolates studied was detected in 48 hours of incubation with maximal activity between the 8^o to 12^o day, usually decreasing on 14^o day.

The assays made with fluconazole (0; 1; 1/2 and 1/4 MIC) showed that two *C. albicans* resistant isolates (MICs=128 µg/ml) exhibited the same pattern of proteinase activity, where gradative increase of this activity was related to incubation time and the concentration of drug. High levels of Sap were detected between the 8^o and 12^oday. These fluconazole resistant isolates in presence of 1 X MIC presented more proteinase activity than in 0, 1/4 or 1/2 MIC fluconazole. These results are presented in figures 1 and 2.

Similar to resistant isolates, the two *C. albicans* susceptible isolates showed gradative increase of Sap related to incubation time. High levels of this enzyme were detected between the 8^o and 12^o day for two isolates However proteinase activity of these

isolates was different depending on concentration of fluconazole. The isolate 03 exhibited more Sap on the absence of drug, while the isolate 05 produced more Sap on presence of 1 X MIC of fluconazole. The proteolytic activity of susceptible isolates are exhibited in figure 2.

The proteinase activity of *C. albicans* isolates on absence or presence of voriconazole showed similar patterns to those presented by fluconazole. The proteolytic activity of two resistant *C. albicans* isolates (MICs=2.0 µg/ml) to voriconazole was related with incubation time and with the concentration of antifungal agent. High levels were detected between 8° and 12° day, decreased on 14° day and on presence of 1 X MIC presented more proteinase activity than in 0, 1/4 or 1/2 MIC voriconazole. These results are presented in figure 3.

Similar to resistant isolates, the two voriconazole *C. albicans* susceptible isolates showed gradative increase of this activity related to incubation time. High levels of Sap were found between the 8° and 12° day for isolate number 02 and between the 6° and 10° day for isolate number 03. However proteinase activity of these isolates was different depending on concentration of voriconazole. The isolate 02 presented more Sap on presence of 1 X MIC of voriconazole while the isolate 03 exhibited more Sap on the absence of drug, The proteolytic activity of susceptible isolates to voriconazole are exhibited in figure 4.

DISCUSSION

The characteristics of virulence presented by *C. albicans* are important to determinate the infection in host (Naglik *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2005). The proteinase production by this yeast shows a strict correlation to pathogenicity (De Bernardis *et al.*, 2001). Some antifungal agents have the ability to reduce the virulence factors increasing the efficacy of treatment (Willis *et al.*, 2001; Koga-Ito *et al.*, 2006).

In this study, the choice of *C. albicans* isolates (resistant and susceptible to fluconazole or voriconazole) was due to results obtained *in vitro* susceptibility testing using the microdilution broth method with media of RPMI 1640, standardized by CLSI (2002) or with Sap inducing, YCB-BSA (Crandall & Edwards, 1987). These two medium presented similar results of voriconazole or fluconazole against all isolates tested. Previously, this similarity of MIC values had been found by Wu *et al.* (2000).

Contrasting results have been seen in Sap activity under action of azoles (Wu *et al.*, 2000; Copping *et al.*, 2005). This question was analyzed in this work. The results found in this study for Sap production in resistant *C. albicans* isolates showed a clear link between known virulence factors in exposition of the yeast to antifungal agent. The two antifungal agents fluconazole and voriconazole increased over extracellular Sap enzyme activity according to concentration of drug, so the isolates were considered as dose dependent. The high concentrations of drugs caused an increased Sap activity in resistant isolates (Figs 1 and 3). Preliminary studies have known that patients infected with fluconazole resistant *C. albicans* and treated with this drug can enhance the Sap production (Vargas & Soll, 1999). There are suggestions that the efflux mechanism of drugs regulates the transport of Sap into membrane-bound vesicles and up-regulation of such transport explain the increased Sap activity in resistant isolates Cannon *et al.*, 1998).

The differences in Sap activity by susceptible isolates to azoles (03 and 05 to fluconazole and 02 and 03 to voriconazole) when exposed to these drugs, which one isolate increased with addition of drug and the other decreased (Figs 2 and 4), showed that there is other factors unknown that interfered in this response. There are indications that the same antifungal agents present similarity in the production of Sap,

as observed for the isolate number 03 exposed to both antifungal agents, which presented decreased Sap activity.

Although for resistant isolates, there are indications of relationship between production of Sap and drug, the same fact seems do not occur for susceptible isolates. Further studies related to expression profile of 10 *SAP* genes that encode aspartyl proteinase in *C. albicans* and to regulation mechanism of drugs are necessary to answer the question about difference in behavior of susceptible *C. albicans* isolates.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Pfizer for providing Voriconazole powder, and CNPq by financial support.

REFERENCES

- Bonaventura, G. D. I., Spedicato, I., Picciani, C., D'Antonio, D., Piccolomini, R.(2004).** *In vitro* pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4453-4456.
- Burgess, D. S., Hastings, R. W., Summers, K. K., Hardin, T. C., Rinaldi, M. G.(2000).** Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **36**, 13-18.
- Cannon, R. D., Fischer, F. J., Niimi, K., Niimi, M., Arisawa, M. (1998).** Drug pumping mechanisms in *Candida albicans*. *Jpn J Med Mycol* **39**, 73-78.
- Castagnola, E., Machetti, M., Bucci, B., Viscoli, C. (2004).** Antifungal prophylaxis with azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* **10**, 86-95.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A2, CLSI, Pennsylvania, 19087, **vol.17**, p.1-29.

Copping, V. M. S., Barelle, C. J., Hube, B., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P., Odds, F. C. (2005). Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP 9* secreted proteinase genes. *J of Antimicrob Chemother* **55**, 645-654.

Crandall, M., Edwards, J. E. JR. (1987). Segregation of proteinase-negative mutants from heterozygous *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**, 2817-2824.

De Bernardis, F., Sullivan, P. A., Cassone, A. (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* **39**, 303-313.

Felk, A., Schafer, W., Hube, B. (2000). *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Acession N° AF146440.

Ghannoum, M. A. (2001). Candida: A causative agent of an emerging infection. *J of Invest Dermatol Sympos Proceed* **6**, 188-196.

Jin, Y., Samaranayake, Y. H., Yip, H. K., Samaranayake, L. P. (2005). Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **160**, 191-200.

Klepser, M. E., Malone, D., Lewis, R. E., Ernst, E. J., Pfaller, M. A. (2000). Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time –kill methodology. *Antimicrob Agents of Chemother* **44**, 1917-1920.

Koga-Ito, C. Y., Lyon, J. P., Vidotto, V., Resende, M. A. (2006). Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia* **161**, 219-223.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (1998). The Yeast, A Taxonomic Study. Fourth edition, Elsevier,

Lan, C. Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Sherer, S., Davis, R. W., Agabian, N. (2002). Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *PNAS*; **99**, 14907-14912.

Li, Y., Nguyen, M. H., Derendorf, H., Cheng, S., Clancy, C.J. (2007). Measurement of voriconazole activity against *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* isolates using time-kill methods validated by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2985-2987.

Lipp, H. P. (2008). Antifungal agents-clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Mycoses* **51**, 7-18.

Monod, M., Hube, B., Hess, D., Sanglard, D. (1998). Differential regulation of SAP 8 e SAP 9, which encode two new members of secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **144**, 2731-2737.

Naglik, J. R., Albrecht, A., Bader, O., Hube, B. (2004). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and host/pathogen interactions. *Cel Microbiol* **6**, 915-926.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol and Molec Biol* **67**, 400-428.

Nucci, M., Kieren, A. M. (2005). Emerging Fungal diseases. *Clin Infect Dis* **41**, 521-526.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messe, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J. (2003). Activities of fluconazole and voriconazole against 1.586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. *J Clin Microbiol* **41**, 1440-1446.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Rex, J. H., Espinel-Ingroff, A., Johnson, E. M., Andes, D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. A., Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Troke, P., Walsh, T. J., Warnock, D. W. (2006). Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretative breakpoints. *J Clin Microbiol* **44**, 819-826.

Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**, 365-377.

Vargas, K., Soll, D. R. (1999). Abstr 5th ASM *Candida* Candidiasis Con. abstr A 21, p. 2.

Willis, A.M., Coulter, W. A., Fulton, C. R., Hayes, J.R., Bell, P. M., Lamey, P. J. (2001). The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; **91**, 317-321.

Wu, T., Wright, K., Hurst, S. F., Morrison, C.J. (2000). Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1200-1208.

Fig 1. Proteinase activity of *C. albicans* isolates 02 and 34 (fluconazole resistant) on presence or absence of MICs of fluconazole (0 MIC=control); 1/4 MIC= 32 µg/ml; 1/2 MIC=64 µg/ml; MIC=128 µg/ml) with time in culture.

Fig 2. Proteinase activity of *C. albicans* isolates 03 and 05 (fluconazole susceptible) on presence or absence of MICs of fluconazole (0 MIC=control; 1/4 MIC= 0.125 µg/ml; 1/2 MIC=0.25 µg/ml; MIC=0.5 µg/ml) with time in culture.

Fig 3. Proteinase activity of *C. albicans* isolates 08 and 36 (voriconazole resistant) on presence or absence of MICs of voriconazole(0 MIC=control); 1/4 MIC= 0.5 µg/ml; 1/2 MIC=1.0 µg/ml; MIC=2.0 µg/ml) with time in culture.

Fig. 4. Proteinase activity of *C. albicans* isolates 02 and 03 (voriconazole susceptible) on presence or absence of MICs of voriconazole (0 MIC=control); 1/4 MIC= 0.125 µg/ml; 1/2 MIC=0.25 µg/ml; MIC=0.5 µg/ml) with time in culture.

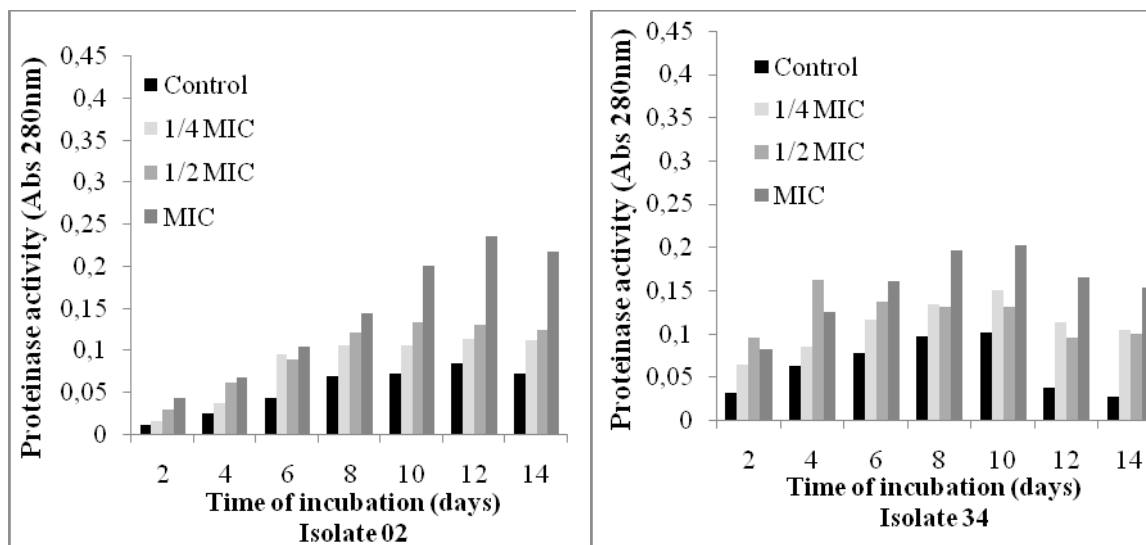


Figure 1

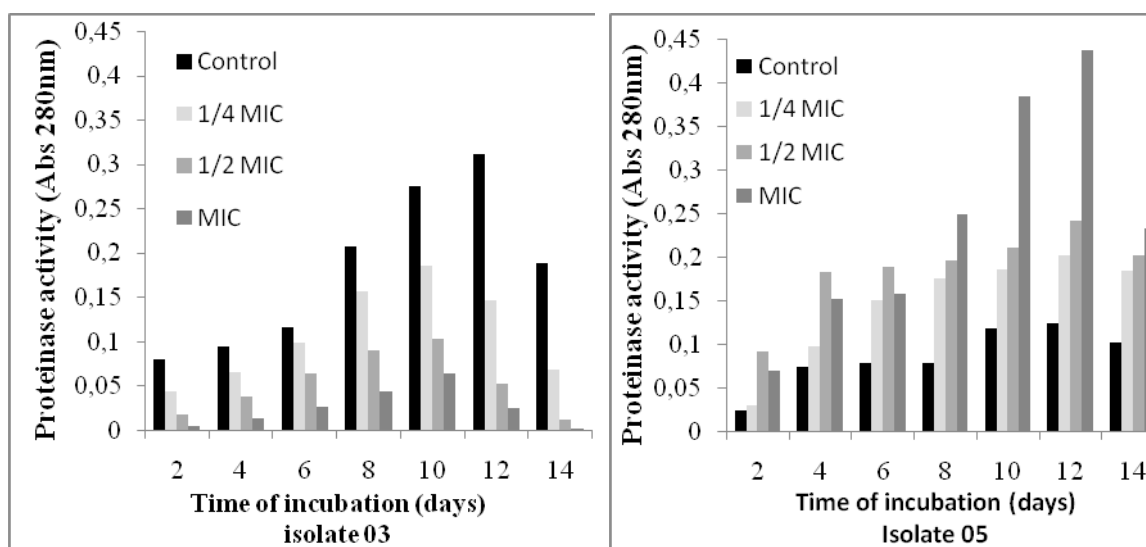


Figure 2

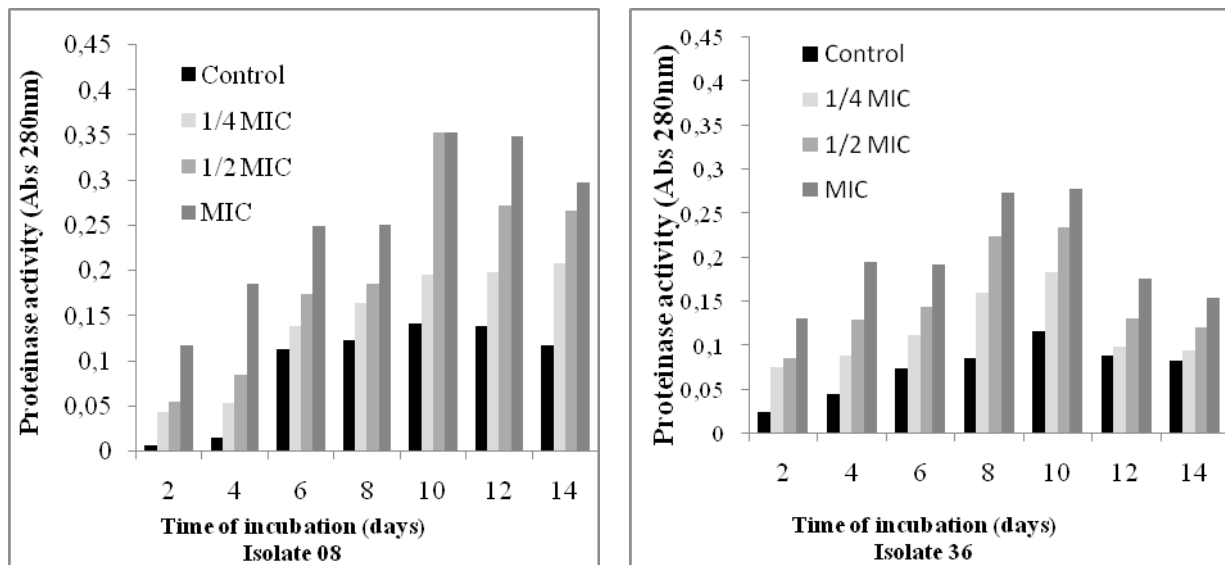


Figure 3

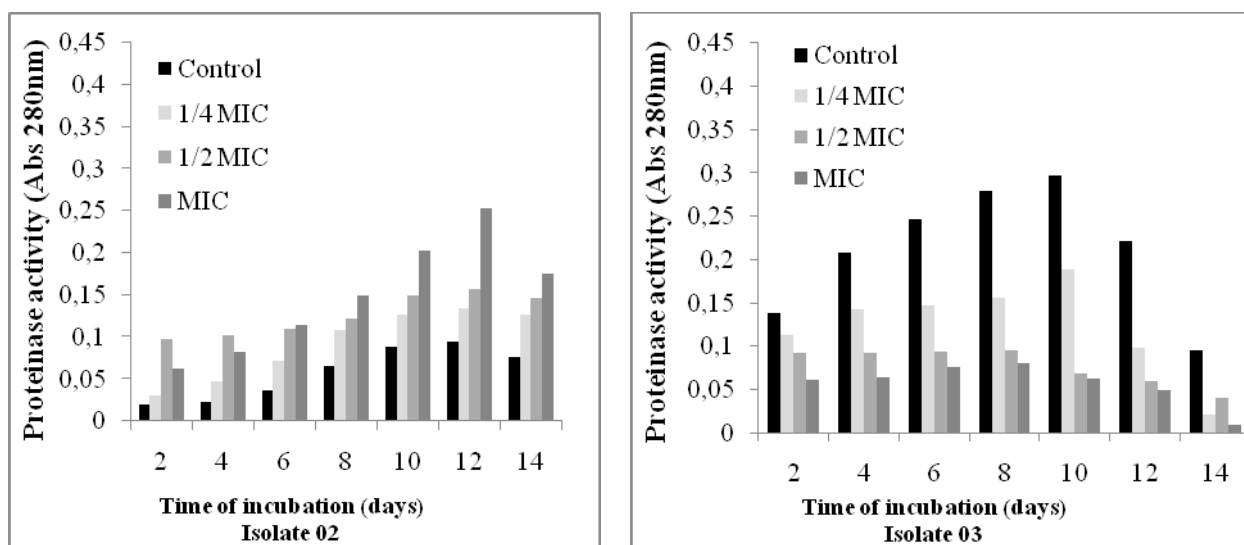


Figure 4

Normas para publicação na revista Brazilian Journal of Microbiology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Scope of the journal
- Submission of a manuscript
- Publication of a manuscript
- Preparation of a manuscript

Scope of the journal

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

Submission of a manuscript

Submission of a manuscript to **Brazilian Journal of Microbiology** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br/>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

Publication of a manuscript

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

Preparation of a manuscript

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research** papers, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)

- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the Resumo for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicelular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 2008 *SBM*

Departamento de Microbiologia - ICB II – USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214

Cidade Universitária

05508-900 São Paulo SP – Brasil

Tel. / Fax: +55 11 3813-9647



bjm@sbmicrobiologia.org.br

Normas para publicação na revista Journal of Medical Microbiology

JMM Instructions for Authors

SUBMISSION OF PAPERS FOR PUBLICATION

Authors must use the Bench>Press online submission and peer-review system. The benefits of online submission include reduced time taken to give you a decision and savings in courier and postal charges. **Postal submissions and manuscripts submitted by email will not be considered.** Papers should be prepared as described in these Instructions, with double line spacing, but to aid online reviewing it is particularly important to provide continuous line numbering in the PDF or Word file. Please also be as economical as possible with the layout of your paper in order to minimize costs for the Editors and referees. [Click here for more details](#). Authors are strongly encouraged to provide the names and contact details of up to five potential referees during the submission process.

Papers that were submitted via ESPERE before 1 January 2008 must now be revised through the Bench>Press system. The revised version should be treated as a new submission; the check-box 'This paper is a resubmission' should be selected and the ESPERE manuscript number must be given. A response to the comments of the editor and reviewers must also be supplied.

Any queries should be directed to Dr Melanie Scourfield (Senior Staff Editor) at the Editorial Office.

JMM Editorial Office
Society for General Microbiology
Marlborough House
Basingstoke Road
Spencers Wood
Reading RG7 1AG
UK

e-mail: jmm@sgm.ac.uk

Tel: +44 118 988 1826

Fax: +44 118 988 1834

Editorial Policy

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)