

FERNANDA PAHIM SANTOS

**COMPARAÇÕES GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE
DIFERENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO
E CANDIDEMIA POR *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina-Disciplina de Infectologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA PAHIM SANTOS

**COMPARAÇÕES GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE
DIFERENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO
E CANDIDEMIA POR *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina - Disciplina de Infectologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientador: Dr. Guilherme Maranhão Chaves

**São Paulo
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Vice-Chefe do Departamento: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética (0753/07), contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Fernanda Pahim Santos

**COMPARAÇÕES GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE DIFERENTES
ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO E CANDIDEMIA POR
*Candida albicans***

Presidente da banca:

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Profa. Dra. Rosana Puccia

SUPLENTE

Dedicatória

Aos meus pais,

Márcio Souza Santos (in memoriam) e

Jocelene Pahim Santos (in memoriam),

Pelos mais felizes anos de minha vida. Obrigada pela paz, amor e união com que caminhamos juntos durante sete lindos anos. Confio em Deus e acredito que todos nós temos uma missão nesta jornada e, sei que a de vocês foi a de semear o amor e a bondade por onde passaram. Vocês estão gravados como uma lembrança muito doce em meu coração, e sou uma pessoa orgulhosa de ser fruto deste lindo amor, que se perpetuou pela eternidade.

Aos meus avós,

Márcio Brasil dos Santos (in memoriam) e

Mozza Souza Santos (in memoriam),

Por todo o amor e carinho incondicionais que me dedicaram, assumindo com êxito o papel de pais, na ausência dos meus genitores. Vezinho, jamais esquecerei das conversas em que você contava da infância difícil e de todos os obstáculos que teve que contornar para concretizar o sonho de constituir uma família, para mim você é um exemplo de garra, honestidade e humildade, ao qual quero muito seguir. Vezinha, sua dedicação e disciplina sempre foram peças-chaves para que eu me tornasse uma pessoa de bem. Sinto muito a falta de vocês, mas essa distância tem um significado maior e, isto foi você mesmo que me ensinou, a sempre seguir em frente em busca de nossos objetivos.

Agradecimentos

À **Deus**, pela dádiva de viver. Por toda luz que brilha em meu caminho e, também pelos momentos em que descobri forças para ultrapassar os obstáculos interpostos nessa jornada, que me fizeram crescer como ser humano.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**, pela credibilidade e apoio. Serei eternamente grata e honrada por tê-lo como orientador. Obrigada por me apresentar o mundo fantástico da micologia.

Ao **Dr. Guilherme**, sua presença foi essencial para que esse trabalho acontecesse. Obrigada pela disponibilidade e preocupação. Você participou ativamente do meu crescimento profissional me ensinando com muito zelo tudo que sei sobre mecanismos de virulência e biologia molecular e, além disso, acreditando no meu trabalho. Muito obrigada!

Aos meus avós, **Jocely e Marlene**, pelo apoio incondicional. Apesar da distância, vocês estiveram mais presentes do que nunca, sempre me oferecendo um ombro nos momentos que mais precisei. Amo vocês! Muito obrigada!

À minha **Tia Marília**, que sempre me inspirou. Você é um exemplo de dedicação e sucesso profissional, sempre me espelharei em você. Obrigada por sempre oferecer o seu apoio e atenção.

Aos meus padrinhos de coração, **Jorge e Cândida**, por ter me recepcionado e me adotado como filha no começo de tudo. Sem o incentivo de vocês não teria chegado lá. Obrigada por me fazer acreditar no meu potencial!

À minha amiga **Tânia**, minha segunda mãe em São Paulo, sempre tão zelosa e preocupada. Jamais esquecerei de todas as conversas e de todo o seu carinho e torcida por mim. Muito obrigada!

Ao meu querido amigo **Thomas**, por me mostrar como os fungos são mais interessantes do que as bactérias. Obrigada por acreditar na minha capacidade e me indicar o caminho da pós-graduação.

Ao meu amor, **Ricardo**, por ter sonhado esse sonho junto comigo, e pelo companheirismo, afinal de contas, foram diversos finais de semana abdicando de outros programas para estar ao meu lado, sempre me apoiando e acreditando. Te amo muito!

A **Beatriz (Bia)**, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e nos mais divertidos também. Você é a irmã que escolhi!

Ao **Daniel** (Dan), pelas palavras sempre tão doces. Você é um amigo que quero levar pra vida toda, uma pessoa realmente muito especial. Obrigada por ser meu conselheiro em diversos momentos e pelo incentivo, sua marca registrada.

Ao **Fernando** (Fê), pelo companheirismo, pelas risadas, por ser sempre essa pessoas tão divertida.

À **Gisela** (Corneta), minha grande amiga. Companheira para todas as horas. Obrigada pelos conselhos sempre tão acertados.

Ao **Ricardo** (Ri), pela tranquilidade sempre tão contagiante, afinal de contas, “deixa acontecer”.

À **Sabrina** (Garota Enxaqueca), pela sua amizade. Pelos papos, pela parceria de todos os momentos.

À minha amiga **Sarah** (Sarita), por todo o seu carinho e atenção. Você é um exemplo de garra e determinação que quero seguir em minha vida.

A todos os meus amigos do LEMI que compartilharam comigo deste sonho: **Analy, Débora, Edméa Helena, Letícia, Maria 1, Maria 2, Jorge, Patrício, Tiago, Viviane.**

Às minhas amigas **Aline Bertei, Aline Flores, Ana Lígia, Juliana, Patrícia, Vergínia e Sandra**, por estarem sempre comigo, prontas para dividir alegrias e tristezas.

À **Fapesp** e **CNPq**, pelo apoio financeiro (Processo nº 2006/05472-4).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

Muito Obrigada....

Uma mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original"

ALbert Einstein

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
Resumo	ii
Abstract	ii
<u>1.0 INTRODUÇÃO</u>	01
1.1 Infecções de corrente sanguínea por <i>Candida</i> na medicina contemporânea....	02
1.2 <i>Candida albicans</i> e seus mecanismos de virulência	04
1.2.1 Adesinas	04
1.2.2 Variação Morfológica	06
1.2.3 Enzimas hidrolíticas.....	08
1.2.4 Formação de biofilme	11
1.3 Candidíase hematogênica e sua origem endógena	14
1.4 Tipagem molecular	16
1.5 Sensibilidade de <i>C. albicans</i> a drogas antifúngicas	18
<u>2. OBJETIVOS</u>	20
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	22
3.1 Seleção das amostras	23
3.2 Verificação de viabilidade e pureza das leveduras armazenadas no LEMI e identificação fenotípica das amostras	26
3.3 Análise da micromorfologia (microcultivo)	27
3.4. Diferenciação entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	27
3.5 Análise fenotípica de <i>C. albicans</i> quanto aos diferentes fatores de virulência ..	28

3.5.1. Caldo NGY para padronização do inóculo	28
3.5.2 Determinação das taxas de crescimento em <i>C. albicans</i>	28
3.5.3 Ensaio para detecção de atividade de proteinase em <i>C. albicans</i>	29
3.5.4 Ensaio para detecção de atividade de fosfolipase em <i>C. albicans</i>	30
3.5.5 Ensaio de aderência de <i>C. albicans</i> a células epiteliais bucais humanas	30
3.5.6 Ensaio de morfogênese de <i>C. albicans</i> em meio líquido	31
3.5.7 Formação de biofilme	32
3.6.6 Coloração do biofilme pelo cristal violeta	33
3.6 Testes de susceptibilidade a antifúngicos	34
3.7 Tipagem molecular	37
3.7.1 Extração de DNA e formação de protoplastos	37
3.7.2 Tratamento de DNA com RNase	38
3.7.3 Quantificação do DNA	38
3.7.4 Reações de microssatélite	39
3.7.5 Reações de PCR	40
3.7.6 Eletroforese em gel de agarose	40
3.7.7 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas	41
3.8 Análise dos resultados	42
<u>4.0 RESULTADOS</u>	44
4.1 Seleção das amostras utilizadas neste estudo e confirmação da identificação taxonômica	47
4.2 Padronização e avaliação fenotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência	46
4.2.1 Determinação da taxa de crescimento de <i>Candida albicans</i>	46
4.2.2 Ensaio de aderência de células de <i>C. albicans</i> a células epiteliais bucais humanas (CEBH)	49
4.2.3 Ensaio de capacidade de células de <i>C. albicans</i> em formarem hifa	54

4.2.4 Determinação da produção de proteinase de <i>C. albicans</i>	60
4.2.5 Determinação da produção de fosfolipase em <i>C. albicans</i>	66
4.2.6 Avaliação da formação de biofilme em <i>C. albicans</i>	71
4.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo	80
4.4 Avaliação genotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência	82
4.4.1 Genotipagem por microssatélites	82
4.4.2 Genotipagem A, B e C	90
<u>5.0 DISCUSSÃO</u>	94
<u>6.0 CONCLUSÕES</u>	113
<u>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	115

Lista de Figuras

Figura 1 Morfologias encontradas em <i>C. albicans</i>	06
Figura 2 Curvas de crescimento de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> (colonização e candidemia)	48
Figura 3 Aderência de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	49
Figura 4 Aderência de isolados clínicos de <i>C. albicans</i> (colonização e candidemia)	54
Figura 5 Formação de hifa em isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	56
Figura 6 Determinação do índice de morfologia em isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	60
Figura 7 Atividade de proteinase de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	65
Figura 8 Atividade de fosfolipase de isoaldos clínicos de <i>C. albicans</i>	66
Figura 9 Atividade de fosfolipase de isoalds clínicos de <i>C. albicans</i>	71
Figura 10 Produção de biofilme avaliada em isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	76
Figura 11 Genotipagem por microsatelite de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	86
Figura 12 Dendrograma gerado pelo programa Gel Compar II pelo método UPGMA	89
Figura 13 Genotipagem ABC de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	22

Lista de Tabelas

Tabela 1 Isolados clínicos utilizados neste estudo	25
Tabela 2 Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de susceptibilidade de leveduras	36
Tabela 3 Resumo das propriedades fenotípicas de todos os isolados em estudo ..	77
Tabela 4 Resumo das propriedades fenotípicas dos isolados apenas de colonização	78
Tabela 5 Resumo das propriedades fenotípicas de isolados de sangue em estudo	79
Tabela 6 Valores de concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos isolados clínicos testados	81

Lista de abreviaturas e símbolo

C.: <i>Candida</i>	ng: Nanograma
Ca ²⁺ : ions cálcio	ng/μL: Nanograma por microlitro
Céls/mL: Células por mililitro	nm : Nanômetro
DNA: Ácido desoxirribonucléico	nmol: Nanomol
dATP: desoxiadenosina trifosfato	P: Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso
dCTP: desoxicitosina trifosfato	PBS: Solução salina tamponada
dGTP: desoxiguanosina trifosfato	pH: Potencial hidrogeniônico
dTTP: desoxitimidina trifosfato	pmol: Picomol
dNTP: Desoxinucleosídeo	q.s.p: Quantidade suficiente para
DO: Densidade óptica	®: marca registrada.
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	rDNA: Ácido desoxirribonucléico ribossomal
<i>et al</i> : Colaboradores	RNA: Ácido ribonucleico
g: Gramas	RNAse: Ribonuclease
g/L: Gramas por litro	rpm: rotações por minuto
h: Horas	spp.: espécie
HCl: Ácido clorídrico	TAE: Tris acetato EDTA
M: Molar	™: <i>Trade mark</i>
mA: mili Amperagem	UV: Ultra violeta
mm: milímetro	Volts: unidade de corrente elétrica
mM: Milimolar	YEPD: <i>Yeast extract peptone dextrose</i> .
μg/mL: micrograma por mililitro.	X: Vezes
Mg ²⁺ : ions magnésio	x: Versus
MgCl ₂ : Cloreto de magnésio	%: Por cento
mg: Miligrama	> Maior
mg/mL: Miligrama por mililitro	< Menor
mg/L: Miligrama por litro	≥ Maior que ou igual a
μL: Microlitro	≤ Menor que ou igual a
mL: Mililitro	= igual
MOPS: Ácido morfolinopropanosulfônico	~: aproximadamente
N ^o : Número	°C: Graus <i>Celsius</i>
NaCl: Cloreto de sódio	
NaOH: Hidróxido de sódio	

RESUMO

Introdução: *Candida albicans* faz parte da microbiota humana, entretanto pode causar infecção disseminada a depender das condições imunológicas do hospedeiro. Trata-se da espécie mais virulenta do gênero *Candida*, além de ser isolada com frequência em infecções superficiais e sistêmicas. Alguns fatores de virulência são atualmente propostos para *C. albicans*, incluindo: adesão a células epiteliais e endoteliais do hospedeiro, a capacidade de secretar enzimas hidrolíticas, a transição de levedura à hifa e a capacidade de combate ao estresse oxidativo, gerado por células fagocitárias. **Objetivos:** caracterizar atributos de virulência em diferentes isolados clínicos de *C. albicans*; analisar o relacionamento genético intraespecífico e, determinar o perfil de susceptibilidade dos mesmos. **Material e Métodos:** Foram incluídos 51 isolados sequencialmente obtidos de 7 pacientes alocados em 3 grupos: a) 3 pacientes que foram apenas colonizados (17 isolados); b) 3 pacientes colonizados que evoluíram com candidemia e alta hospitalar (27 isolados); e c) 1 paciente colonizado que evoluiu com candidemia e óbito (7 isolados). Foram determinados os seguintes fatores de virulência: taxas de crescimento máximas, atividade de proteinase específica, atividade de fosfolipase, aderência de células de *C. albicans* à células epiteliais bucais humanas (CEBH), ensaio de morfogênese, formação do biofilme. Foram realizados teste de susceptibilidade a antifúngicos (TSA) pelo método de microdiluição em caldo, utilizando anfotericina B, fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina e anidulafungina. Para avaliar a variabilidade genética empregou-se técnica de microssatélites utilizando o “primer” M13, com posterior montagem de dendrograma. Foi também empregada a genotipagem ABC. **Resultados:** Observou-se que todas as cepas apresentaram similar taxa de crescimento, à exceção de um isolado (657B). As amostras apresentaram capacidade de aderência a CEBH e formação de hifa variáveis, não havendo associação direta entre estes atributos e o desfecho clínico do paciente. Na avaliação de secreção de Saps, os isolados do paciente 7, pertencente ao grupo III (candidemia/óbito), apresentaram os maiores valores de secreção desta enzima entre os isolados avaliados, seguida das cepas do paciente 4 (candidemia/alta). A produção de fosfolipase em nosso estudo foi homogênea para todos os isolados testados à exceção dos isolados do paciente 4 (candidemia/alta), o qual apresentou diversas cepas com atividade de fosfolipase negativa. Os pacientes 4 (candidemia/alta), e 7 (candidemia/óbito), obtiveram as maiores taxas de formação de biofilme entre todos os isolados testados. Quanto ao TSA, não houve ocorrência de resistência entre os isolados, porém uma única cepa (170 A) apresentou-se SDD frente a 5-fluorocitosina. As técnicas de microssatélite e genotipagem ABC evidenciam que aquelas cepas dos grupos II e III apresentam uma menor variabilidade genética do que aquelas oriundas de pacientes do grupo I (somente colonização). **Conclusão:** Foi possível verificar que além do “status” imunológico do paciente, os aspectos intrínsecos de cada cepa são importantes determinantes do sucesso de sua trajetória como patógeno. Adicionalmente, destacamos a importância de ferramentas moleculares na detecção de genótipos melhor adaptados ao organismo humano, possivelmente responsáveis pelos piores prognósticos clínicos em ambiente hospitalar.

ABSTRACT

Introduction: *Candida albicans* is part of the human microbiota, but it can cause disseminated infection depending on the host immunity status. It is the most virulent species of the genus *Candida* as well as is frequently isolated from superficial and systemic infections. Some putative virulence factors have been recently proposed for *C. albicans*, including: adhesion to host epithelial and endothelial cells, the ability to secrete hydrolytic enzymes, yeast-to-hypha transition and the capability to combat oxidative stress generated by phagocytic cells. **Objectives:** to characterize virulence attributes of different *C. albicans* clinical isolates; to analyze intraspecific genetic relatedness and to determine antifungal susceptibility of clinical isolates collected from a specific clinical scenario. **Material and Methods:** We have investigated 51 isolates sequentially obtained from 7 patients divided into 3 different groups: a) 3 patients who were only colonized (17 isolates); b) 3 colonized patients who had candidemia and were discharged (27 isolates); and c) 1 colonized patient who died of candidemia (7 isolates). We have investigated the following virulence factors: maximum growth rates, proteinase and phospholipase activity, adherence to human buccal epithelial cells, morphogenesis and biofilm formation. We also performed antifungal susceptibility testing by using broth microdilution method with amphotericin B, fluconazole, itraconazole, 5-fluorocytosine, caspofungin and anidulafungin. To investigate genetic variability, we have used a microsatellite technique with primer M13, followed by dendrogram construction, in addition to A, B, C genotyping. **Results:** We have found that all the isolates except strain 657B presented similar growth rates. The strains exhibited variable ability to adhere to buccal epithelia and to form hyphae. Therefore, we could not establish a direct relationship between these virulence attributes and patients clinical outcome. Strains obtained from patient 7, belonging to group III (candidemia/death) had the highest levels of proteinase activity, seconded by the isolates collected from patient 4 (candidemia/discharge). Phospholipase activity was essentially the same for all the isolates investigated in the present study, except from some patient 4 strains (candidemia/discharge) which were phospholipase negative. Isolates from patients 4 (candidemia/discharge), and 7 (candidemia/death) showed the highest levels of biofilm formation. We could not detect resistance to antifungal drugs among the isolates. However, a unique strain was DDS to 5-fluorocytosine (170 A). Microsatellite and A, B, C typing demonstrated that isolates from groups II and III (candidemia) showed lower genetic variability than the strains belonging to group I (only colonized). **Conclusion:** It was possible to verify that besides host immunity, each isolate had particular aspects which could be important factors to guarantee their success as pathogens. In addition, we emphasize the importance of molecular tools to detect genotypes well adapted to the human organism, which are likely responsible for worse prognosis in the hospital environment.

Pahim, Fernanda

Comparações genóticas e fenotípicas de diferentes isolados clínicos de colonização e candidemia por *C. albicans*. / Fernanda Pahim - São Paulo, 2009.
xx 126f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Genotypic and phenotypic comparisons among different *C. albicans* clinical isolates of colonization and candidemia

1. *Candida albicans*. 2. Isolados clínicos 3. Genotipagem . 4. Fenotipagem.

1.0 INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma levedura capaz de sobreviver como comensal em superfícies mucosas como trato gastrointestinal, oral e vaginal em indivíduos saudáveis. Frequentemente causa infecções superficiais de pele e mucosas, sendo que no ambiente hospitalar é responsável por uma alta prevalência de infecções invasivas. Entre os fatores de risco para infecção invasiva por este agente, encontram-se o uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e procedimentos médicos invasivos. Neste contexto, considera-se *Candida* como patógeno oportunista. *C. albicans* figura como a mais virulenta espécie do gênero *Candida*, em modelos de infecção experimental, fator este que pode ser justificado pela presença de um conjunto de atributos de virulência que contribuem para a sua patogenicidade (Weems, 1992; Mavor *et al.*, 2005; Odds, 1994).

1.1 Infecções de corrente sangüínea por *Candida* na medicina contemporânea

Nas últimas duas décadas, hospitais de países de todos os continentes vêm relatando o aumento significativo das infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, destacando-se aquelas causadas pelo gênero *Candida*. Além disso, as candidemias possuem taxas de mortalidade atribuída da ordem

de 40%, representando um importante problema em saúde pública (Wey *et al.*, 1988; Pfaller *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2003).

Wisplinghoff *et al.* (2004) em um estudo realizado entre março de 1995 a setembro de 2002, em 49 hospitais nos Estados Unidos da América (EUA), coletaram 24.179 casos de infecção de corrente sanguínea nosocomial e demonstraram que o gênero *Candida* foi o 4º agente mais comumente isolado em hemoculturas, respondendo por 9% das infecções de corrente sanguínea e posicionando-se apenas atrás dos casos de bacteremia por *Staphylococcus* coagulase-negativo (31%), *Staphylococcus aureus* (20%) e *Enterococcus* spp. (9%).

Recentemente, Colombo *et al.* (2006), em estudo prospectivo de vigilância de candidemia no Brasil relataram a detecção de 712 casos de candidemia, com uma incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões ou 0,37 casos por 1000 pacientes/dia. *C. albicans* foi isolada em 40,9% dos casos, seguida de *Candida tropicalis* (20,9%), e *Candida parapsilosis* (20,5%). Este estudo foi realizado entre março de 2003 a dezembro de 2004, englobando 11 centros médicos do Brasil.

Tendo em vista a alta mortalidade de candidemia, é importante avançar no conhecimento dos fatores associados à patogenicidade de *C. albicans*, no sentido de ampliar as possibilidades de prevenção e controle da infecção (Cowen & Steinbach, 2008; Colombo *et al.* 2003; Douglas *et al.*, 1994; Yang, 2003).

1.2 *Candida albicans* e seus mecanismos de virulência

A patogenicidade de *C. albicans* está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência. Alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de identificá-los. Essa série de atributos de virulência auxilia na invasão aos tecidos do hospedeiro, bem como no escape aos mecanismos de defesa do organismo humano, garantindo ao patógeno uma habilidade ímpar de sobreviver e infectar vários sítios anatômicos com diferentes pressões ambientais. Alguns destes fatores propostos para *C. albicans*, incluem: transição levedura-hifa, adesão a células do hospedeiro, capacidade de secretar enzimas hidrolíticas, e também a produção de biofilme, que, apesar de não ser classificado estritamente como fator de virulência, auxilia no estabelecimento da infecção e resistência do microorganismo no hospedeiro (Schaller et al., 2005; Cutler, 1991; Odds, 1994).

1.2.1 Adesinas

A adesão às células epiteliais do hospedeiro é um evento inicial crucial no estabelecimento da doença e essencial para a sobrevivência do microorganismo (Odds, 1994). *Candida albicans* se utiliza de componentes protéicos, denominados adesinas, para aderir às células humanas, e também em dispositivos médicos, como cateteres, próteses dentárias, tubos traqueais, podendo, conseqüentemente, formar biofilme (Nobile et al., 2006; Bizerra et al., 2008).

Algumas proteínas, nomeadas de aglutininas, são supostas em desempenhar a função de adesina, reconhecendo receptores protéicos na superfície celular do hospedeiro e ligando-se à eles. Entre elas estão as “aglutinin-like sequence” (ALS), uma família de proteínas composta por pelo menos 9 genes. Esses genes são regulados diferencialmente de acordo com condições fisiológicas como, meio de crescimento, variação morfológica e estágio de crescimento. A deleção de genes *ALS* individuais com posteriores testes fenotípicos das cepas mutantes demonstrou que os genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4* e *ALS9* contribuem para a adesão de *C. albicans* à células epiteliais e endoteliais (Filler, 2006; Yang, 2003; Calderone, 2001; Zhao et al., 2007; Hoyer & Hecht, 2000).

HWP1 foi primeiramente descrito como um gene específico de formação de tubo germinativo, sendo a proteína hwp1p, codificada por este gene. Esta proteína forma complexos estáveis com células epiteliais bucais humanas (CEBH). As sequências de aminoácidos do domínio N-terminal da Hwp1p são ricas em prolina, o que as torna similares às proteínas encontradas em mamíferos servindo como substratos das transglutaminases (enzimas responsáveis pela catalização de complexos entre proteínas no hospedeiro). Esta adesina facilita a conexão entre o tubo germinativo de *C. albicans* às CEBH (Hitomi, 2005; Staab et al., 1996; Sundstrom, 1999; Staab et al., 1999). Staab et al. (1999), evidenciaram este processo em experimento com cepas mutantes para este gene ($\Delta hwp1/\Delta hwp1$), as quais apresentaram uma redução em 5 vezes na capacidade de aderir à CEBH quando comparadas aos níveis de aderência da cepa do tipo selvagem, confirmando a classificação de Hwp1p como uma adesina implicada na virulência de *C. albicans*.

1.2.2 Variação Morfológica

C. albicans é considerada um fungo pleomórfico, uma vez que transita por quatro diferentes morfologias, incluindo: blastosporo (célula oval que se origina por brotamento), pseudohifa (cadeia de células alongadas cuja separação da célula mãe não ocorre durante o processo de brotamento e que possuem constricção antes de cada novo brotamento), hifa verdadeira (filamento linear formado por células septadas e com constricção não visível) e clamidósporo (Fig. 1). Acredita-se que variações entre as três primeiras morfologias estejam relacionadas à invasão de tecidos humanos e sejam influenciadas por condições genéticas e ambientais adversas (Calderone and Fonzi, 2001; Odds *et al.*, 2001).

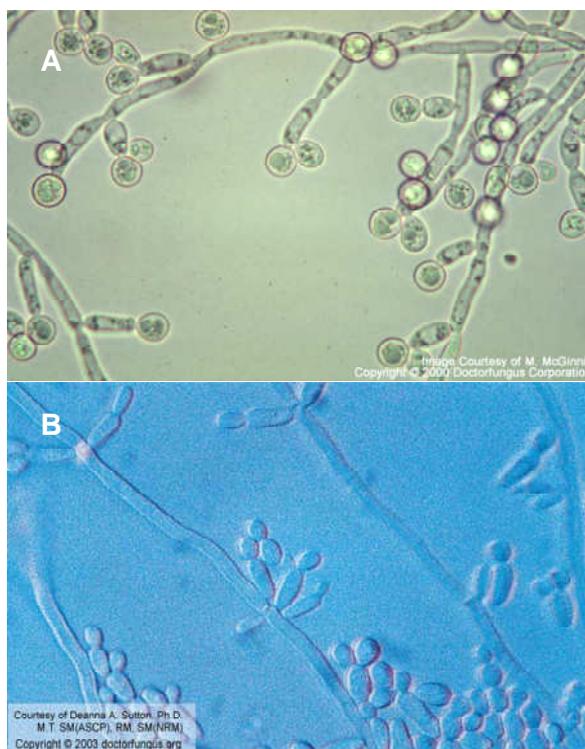


Figura 1. Morfologias encontradas em *C. albicans*. Clamidósporo (A), hifa verdadeira e blastoconídeo (B). Foto extraída de <http://www.doctorfungus.org>.

Alguns investigadores têm demonstrado que em tecidos infectados não há o predomínio de uma única morfologia, sugerindo que ambas, blastosporo e hifa verdadeira, desenvolvam importante função no desenvolvimento e progressão da infecção. Entretanto, a transição levedura-hifa é um fator amplamente reconhecido como importante para a virulência de *C. albicans*, uma vez que tem sido demonstrado em experimentos *in vivo* que mutantes defectivos na formação de hifa apresentaram-se menos virulentos (Lo *et al.*, 1997; Brown e Odds, 2001). Proteínas como Hwp1p e Als, além de desempenharem função de adesinas, também são reconhecidas como hifa-específicas. Estas são modificadas na porção C-terminal pela adição da glicoproteína glicosilfosfatidilinositol (GPI), produzindo um reconhecimento inicial pela membrana celular. Subseqüentemente, a GPI é clivada e a proteína à ela ligada (Als ou Hwp1) transpõe-se para a parede celular. Como resultado, a hifa adapta-se, aderindo às células do hospedeiro, causando dano ao tecido através da proteólise. Importante destacar que Hwp1p é uma adesina direcionada à células epiteliais, Alsp1p às células endoteliais e, Als3p à ambas, fator este que promove ampla adaptação da hifa de *C. albicans* para aderir em ambos os tecidos, epitelial e endotelial (Kumamoto & Vincles, 2005).

O fator regulador da formação de hifa melhor caracterizado é o Efg1p. Esta proteína foi identificada pela sua habilidade de promover filamentação em *S. cerevisiae*. Mutantes com deleções de *EFG1* exibem formação defeituosa de hifa em *C. albicans*, como demonstrado por Lo *et al.* (1997). Além disso, Efg1p tem sido relacionada à regulação da expressão de inúmeros genes, incluindo genes codificadores de fatores de virulência, como por exemplo: SAP (que codificam proteinases aspárticas secretadas) e, até mesmo os genes *ALS3* e *HWP1*, citados anteriormente. Diante destas evidências,

seria mais lógico entender Efg1p como um regulador de virulência ao invés de um simples promotor de morfogênese (Kumamoto & Vince, 2005).

1.2.3 Enzimas hidrolíticas

Outra importante arma de *C. albicans*, relacionada à virulência, é a produção de enzimas hidrolíticas, as quais são capazes de clivar as proteínas do hospedeiro com a principal finalidade de adquirir nutrientes. Contudo, este artifício é caracterizado como um fator de virulência, uma vez que estas proteinases também atuam destruindo células e moléculas do sistema imune humano, tais como: queratina, colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e enzimas do “burst” oxidativo no momento da infecção (Hube & Naglik, 2001; Odds, 2008, Monod *et al.*, 2002).

As proteinases aspárticas secretadas (Saps) são enzimas hidrolíticas codificadas por uma família de pelo menos 10 genes. As funções propostas para as proteinases durante a infecção incluem: digestão das proteínas do hospedeiro para suprimento nutricional; evasão do sistema imunológico humano através da degradação de imunoglobulinas e proteínas do complemento; e aderência e degradação das barreiras do hospedeiro durante a invasão e resistência ao ataque antimicrobiano (Hube *et al.*, 2001; Monod *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998).

Acredita-se que a existência de uma família tão numerosa de genes, *SAP*, composta por pelo menos 10 genes, esteja relacionada à necessidade de *C. albicans* se adaptar a diversos tecidos e microambientes, atuando em uma ampla faixa de pH (2,0 – 7,0). Também parece estar associada à codificação de determinadas Saps

atuando em conjunto com outros fatores de virulência. Por exemplo, os genes *SAP4-6* são regulados durante a transição de levedura à hifa e, a expressão de *SAP1* e *SAP3* ocorre durante o fenômeno de “phenotypic switching” (Hube & Naglik, 2001). Além disso, pode-se sugerir adicionalmente que as proteinases aspárticas secretadas funcionem como um mecanismo compensatório no caso de falha, remoção ou perda de outra enzima hidrolítica em *C. albicans* (Ernst, 2000; Soll, 1997).

Tavanti *et al.*, (2004) demonstraram a importância das Saps em um modelo comparando dois cariótipos (b e c) de *Candida albicans* em duas populações distintas: indivíduos saudáveis, portadores de cepas comensais, e pacientes que evoluíram com candidíase oral, na presença e ausência do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Avaliou-se uma possível expressão diferencial de genes *SAPs* entre os cariótipos b e c. A média da atividade de proteinase entre as cepas comensais foi significativamente mais baixa quando comparada às cepas de infecção (ambas do cariótipo b). Entretanto, os isolados comensais do tipo c apresentaram maiores níveis de Sap do que aqueles obtidos em infecção. Este trabalho evidencia que cepas comensais possuem diferentes padrões de expressão de genes *SAP*, sugerindo que determinados cariótipos podem ter potenciais de expressão de fatores de virulência distintos, influenciando o desfecho clínico da candidíase no hospedeiro.

A produção de fosfolipase extracelular por *C. albicans* é considerada outro aspecto importante de sua virulência. Microscopia eletrônica e ensaios bioquímicos radioativos demonstraram que a atividade de fosfolipase nessa levedura está presente na superfície da célula leveduriforme, e é principalmente encontrada na extremidade de crescimento das formas filamentosas. Seu alvo fundamental são os fosfolípidos da

membrana celular, os quais são hidrolizados levando a ruptura da membrana celular no momento da invasão tissular. Algumas funções para as fosfolipases durante a infecção foram postuladas, entre elas: penetração à célula do hospedeiro, adesão à células epiteliais e invasão de epitélio oral humano (Banno *et al.*, 1985; Schaller *et al.*, 2005; Barret-Bee *et al.*, 1985).

Ibrahim *et al.* (1995) comparam a habilidade de cepas de *C. albicans* recuperadas do sangue de pacientes com isolados obtidos da cavidade oral de indivíduos sadios em produzirem fosfolipase. Estes isolados clínicos, com diferentes níveis de expressão de fosfolipase, foram também comparados quanto à sua virulência em modelo murino de candidíase disseminada. Nas amostras de sangue, foram observadas altas taxas de produção de fosfolipase quando comparados às cepas comensais. No modelo de infecção em camundongo, outros fatores de virulência foram avaliados em paralelo, entretanto, somente a atividade de fosfolipase foi preditora de mortalidade. Estes dados sugerem um envolvimento de fosfolipase no processo de invasão dos tecidos por *C. albicans*.

Quatro fosfolipases têm sido descritas na literatura: PlA, PlB, PlC e PlD (Ansell & Hawthorne, 1964). Mukherjee *et al.* (2001) avaliaram a virulência de uma cepa de *C. albicans* mutante, para o gene *PLB1*, em modelo murino de candidíase disseminada. Quando houve a reintrodução deste gene, o isolado demonstrou crescimento e morfologia similares à cepa parental. A virulência da cepa parental foi comparada àquela cepa revertida, e apresentaram-se similares. Para comparar as habilidades do mutante, da cepa parental e da cepa revertida em atravessar a barreira do trato gastrointestinal causando infecção sistêmica, foi utilizado um modelo de candidíase

oral intragástrica em camundongos jovens. Realizou-se exames histológicos e análise de unidades formadoras de colônia (UFC) do patógeno em homogenizado hepático, revelando uma maior capacidade das cepas parental e revertida em invadir a mucosa gástrica, quando comparada à cepa mutante. *PLBs* e *PLDs* têm sido reportados como os principais genes envolvidos na virulência (Hube *et al.*, 2001).

1.2.4 Formação de biofilme

C. albicans possui ainda a capacidade de formar biofilme, sendo esta fortemente associada à mortalidade em candidemia, infecções persistentes e resistência aos antimicrobianos. Desta forma, pode ser considerada um importante fator contribuinte para a virulência desta espécie. Os biofilmes são notoriamente difíceis de serem eliminados atuando como fontes de infecções (Donlan & Costerton, 2002).

Biofilmes são estruturas de microorganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas, embebidas em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), cujas células possuem taxas de crescimento e fenótipos alterados. Esta matriz de EPS pode ser composta de populações que se desenvolvem a partir de uma única espécie ou de uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas.

A gênese do biofilme de *C. albicans* envolve a adesão à uma superfície, seja ela um tecido humano, seja um dispositivo médico, seguida da proliferação das células leveduriformes na extensão da mesma. Há a subsequente formação de hifa verdadeira, e a finalização da origem desta estrutura ocorre com a maturação, onde o crescimento leveduriforme está reprimido, ocorrendo uma alta taxa de transição levedura-

hifa, onde subsequentemente a matriz de EPS envolve esse aglomerado de células. Algumas vantagens da formação do biofilme incluem: proteção dos microrganismos contra as agressões geradas pelo meio ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e aquisição de modificações genéticas (Douglas, 2002; Blankenship & Mitchell, 2006; Adam *et al*, 2002).

Shin *et. al* (2002) compararam a capacidade de formar biofilmes em isolados sanguíneos de sete diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, entre outras) entre si e com as mesmas espécies isoladas em diferentes sítios anatômicos, utilizando meio contendo glicose. Foi observado que em comparação às espécies de *Candida não-Candida albicans* (61%), *C. albicans* foi capaz de produzir menos biofilme (8%). Entre os isolados de *Candida não-Candida albicans*, cepas de sangue produziram mais biofilme (79%) do que aquelas obtidos de outros sítios do organismo (52%). Esses dados sugerem uma associação entre a capacidade das espécies de *Candida* em produzir biofilme e um maior potencial desses isolados para causar fungemia relacionada à cateter venoso central (CVC) em pacientes sob administração de nutrição parenteral total (NPT).

A redução na susceptibilidade da terapia antifúngica frente a células de levedura organizadas em biofilme tornou-se um grande problema em saúde pública. Alguns mecanismos são propostos para explicar o fenômeno de resistência, que incluem o aumento na expressão de bombas de efluxo de membrana e alteração nos alvos das drogas. Hawser & Douglas (1995) utilizaram um modelo *in vitro* formando biofilme em discos de PVC, o mesmo material utilizado na produção de cateteres, para posterior determinação da susceptibilidade à diversas drogas e comparação com organismos

controles, que continham células planctônicas. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) detectadas nas células de leveduras do biofilme foram de 30 a 2000 vezes maiores do que as CIMs das células planctônicas demonstrando uma maior taxa de resistência aos antifúngicos nessas estruturas (Mukherjee & Chandra, 2004)

Há evidências de que células do biofilme formado sobre materiais implantados estejam sendo constantemente liberadas para a corrente sanguínea. Por estas razões, estudos sobre formação de biofilme de *Candida* spp. ganharam interesse considerável (Calderone, 2001).

A família *ALS* tem sido implicada na formação do biofilme, uma vez que a expressão do gene *ALS1* e outros membros desta família aumenta durante o desenvolvimento do mesmo *in vitro*. Essa regulação positiva talvez reflita a concomitante formação de hifa em biofilmes (Zhao *et al.*, 2005).

Além disso, *HWP1* aparece positivamente regulada durante o processo de formação do biofilme, como evidenciou Garcia-Sanchez *et al.* (2004) em estudo comparando transcriptoma do biofilme produzido por cepa selvagem, produtora de hifa (SC5314), e uma cepa mutante (*cph1/cph1 efg1/efg1*), defectiva para produção de hifa (Nobile & Mitchell, 2006).

Frente a todas essas evidências da participação dos fatores de virulência no estabelecimento da infecção, é de suma importância aglutinar todas as informações para que se obtenha um modelo de investigação sobre os mecanismos de patogenicidade de *Candida albicans*, permitindo estabelecer novas estratégias de controle e prevenção das infecções causadas por este patógeno.

1.3 Candidíase hematogênica e sua origem endógena

Uma vez que *C. albicans* faz parte da microbiota humana normal, a forma mais comum de aquisição desta levedura é por via endógena. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota, ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *C. albicans* através da mucosa entérica até os capilares mesentéricos. Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida*, como o uso de antibióticos, ou determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal (jejum prolongado, nutrição parenteral total, hipotensão, quimioterapia) podem potencializar o fenômeno de translocação no tubo gastrointestinal (Alexander *et al.*, 1990).

Vários autores têm estabelecido os fatores de risco para a aquisição de candidemia, alguns deles através de estudos caso-controle. Voss *et al.* (1997) relacionam os seguintes fatores de risco identificados em estudos de análise multivariada aplicada a variáveis reconhecidas em estudos caso-controle: idade, azotemia, catéter venoso central, quimioterapia, colonização, quebra da barreira cutâneo-mucosa, reação enxerto versus hospedeiro, hemodiálise, hiperglicemia, uso de antibióticos de amplo espectro, neutropenia, nutrição parenteral, esteróides e cirurgia.

A colonização por *Candida* spp. é um fator de risco independente para candidemia e precede à doença invasiva na maioria dos casos. Alguns autores sugerem que o risco de infecção aumenta com o número de sítios colonizados e é dependente das espécies colonizantes (Vincent *et al.*, 1998). Há evidências de que 5 a 15% dos pacientes hospitalizados já estejam colonizados na admissão no hospital, mas esta proporção aumenta consideravelmente com o tempo e a exposição aos fatores de risco.

Conseqüentemente, aproximadamente 50-86% dos pacientes gravemente doentes poderão estar colonizados por *Candida* spp. durante sua permanência nas unidades de terapia intensiva por períodos prolongados. Entretanto, somente 5-30% desta população desenvolverão infecções invasivas por espécies de *Candida* (Borzotta *et al.*, 1999; Saiman *et al.*, 2000; Pelz *et al.*, 2001; Blot *et al.*, 2002).

Outros aspectos que enfatizam a origem intestinal de candidemia são o envolvimento extensivo do trato gastrointestinal em infecções sistêmicas por este agente, a colonização prévia como fator de risco para candidemia e a eficiência da profilaxia antifúngica em pacientes com câncer na eliminação ou redução da colonização por *Candida*, prevenindo candidemia (Nucci & Anaissie, 2001). Algumas investigações utilizando técnicas de genotipagem relatam a ocorrência dos mesmos genótipos entre cepas isoladas de diferentes sítios do organismo e em tempos de coletas diferentes em um mesmo paciente (Stephan *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2004). Em contrapartida, outra investigação acessou o perfil genotípico de isolados de *C. albicans* através do emprego das técnicas: MLST, genótipo ABC e “status” MTL. Isolados de diversos sítios foram avaliados e, interessante, as culturas positivas isoladas sequencialmente de dois voluntários sadios apresentaram genótipos distintos. Estes dados sugerem a presença de cepas de diferentes genótipos colonizando um mesmo indivíduo ou mesmo microvariações dos isolados, reforçando a hipótese de ocorrerem substituições de cepas de *C. albicans* em indivíduos colonizados (Jacobsen *et al.*, 2008).

1.4 Tipagem molecular

Com o objetivo de identificar e tipar as leveduras do gênero *Candida*, vários pesquisadores vêm utilizando diferentes técnicas moleculares como o RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), a cariotipagem realizada com eletroforese em campo pulsátil (Pulsed Field Gel Electrophoresis–PFGE), a análise de fragmentos de restrição de DNA com hibridação a sondas específicas de DNA, análise das seqüências de nucleotídeos de genes ribossômicos, e mais recentemente Multilocus Sequence Typing - MLST (Tavanti, 2005).

Marol & Yücesoy (2008) avaliaram a variabilidade genética em 70 isolados de *Candida*, consistindo em 42 cepas de *Candida albicans*, 16 de *Candida glabrata* e 12 de *Candida tropicalis*, isolados de diversos sítios em uma unidade de terapia intensiva. Os isolados foram tipados por RAPD utilizando-se os oligonucleotídeos OPE-03, OPE-18, RP4-2 e AP50-1. Nos pacientes com infecções por *Candida*, a maioria dos isolados apresentaram diferentes padrões de bandas. Somente 3 cepas de *C. albicans* isoladas em um espaço curto de tempo de pacientes diferentes, tiveram o mesmo padrão por RAPD, o que era esperado, uma vez que acredita-se que a infecção de pacientes por *Candida sp.* seja adquirida via fonte endógena.

Outra metodologia utilizada para avaliar a variabilidade genética de *C. albicans* é a análise de microsatélite (primer M13), que são seqüências pequenas repetidas em “tandem” que aparecem por todo o genoma. Estes marcadores moleculares são úteis no emprego de genotipagem (Meyer, 2001). Casali *et al.* (2003) utilizaram o “primer” M13 específico para uma região de microsatélites de *C. neoformans*. Este estudo

diferenciou e agrupou satisfatoriamente isolados deste fungo provenientes de regiões geográficas diferentes e caracterizou subgrupos geneticamente distintos. O “primer” M13 tem sido empregado na tipagem de cepas patogênicas de outras leveduras, incluindo espécies de *Candida* e *Sacharomyces cerevisiae* (Xu *et al.*, 1999).

Um sistema de tipagem molecular de *C. albicans* denominado de genotipagem A, B, C foi proposto por McCullough *et al.*, (1999). Foi verificado que haviam isolados desta espécie que apresentavam um inserto de 379 nucleotídeos no DNA ribossomal codificando a região 26 S do RNA ribossomal. Essa inserção implica na presença de uma banda maior de 4.2 Kb. Isolados de *C. albicans* possuidores desta banda maior foram denominados de genótipo B. A presença de uma banda menor de 3.7 Kb, cujo inserto encontrava-se ausente, representava isolados de *C. albicans* genótipo A. Um íntron do grupo I homólogo no mesmo ponto de inserção foi observado em cepas de *C. dubliniensis*, uma espécie altamente relacionada geneticamente a *C. albicans*. Entretanto, esse intron era aproximadamente 300 nucleotídeos maior de que o do genótipo B em *C. albicans*. Foi encontrado também um genótipo mais raro, denominado de *C. albicans* genótipo C, que sugere-se ser possivelmente um intermediário de reprodução sexuada entre os genótipos A e B.

Sugita *et al* (2002) avaliaram a expressão diferencial de produção de fosfolipase e protease dos três genótipos possíveis (A, B, C) em 56 isolados clínicos de *Candida albicans*. Os autores verificaram que as cepas com genótipo B apresentaram níveis de atividade de proteinase e fosfolipase maiores que os isolados de genótipos A e C. Tal evidência sugere a importância dos diferentes genótipos para compreensão da patogênese de *C. albicans*.

1.5 Sensibilidade de *C. albicans* a drogas antifúngicas

C. albicans é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos como fluconazol e itraconazol são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos. Resistência a anfotericina B é anedótica (Sanglard & Odds, 2002).

Tem sido demonstrada a capacidade adaptativa de *C. albicans* à pressão seletiva de drogas antifúngicas, principalmente azólicos. Estima-se que a principal população de risco para ocorrência de *C. albicans* resistente a fluconazol é representada por pacientes com AIDS e uso prolongado de azólicos (Milan, 1998, Lattif *et al.*, 2004). Nestes pacientes, tem sido documentado o aumento progressivo de concentração inibitória mínima (MIC). Além disso, resistência associada à candidemia em pacientes imunossuprimidos com doenças hematológicas malignas que recebem profilaxia com altas doses de fluconazol também pode ocorrer (McCullough *et al.*, 1999; Marr *et al.*, 2001).

Este trabalho propõe documentar a aquisição endógena de infecção hematogênica por *Candida* e investigar atributos de virulência que possam sofrer modulação na transição do estado de colonização para infecção invasiva, através da observação de possíveis diferenças na expressão dos fatores de virulência nas cepas comensais e naquelas que causaram infecção. Da mesma forma, serão avaliados mecanismos de virulência entre cepas de *C. albicans* associadas à candidemia com e sem desfecho de morte.

2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- I. Caracterizar padrão genotípico de amostras de *C. albicans* isoladas sequencialmente de pacientes colonizados/infectados por *Candida spp.*

- II. Caracterizar mecanismos adaptativos de virulência documentados ao longo da transição colonização/infecção.

- III. Caracterizar atributos de virulência entre cepas de *Candida* isoladas de pacientes com candidemia que evoluíram com diferentes desfechos clínicos mediante tratamento (morte vs. sobrevida).

- IV. Avaliar o perfil de susceptibilidade destes isolados à drogas antifúngicas.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção das amostras

As amostras de *C. albicans* foram selecionadas entre cepas isoladas durante um estudo de coorte longitudinal envolvendo pacientes de terapia intensiva, trabalho este já concluído pelo Laboratório Especial de Micologia (LEMI), Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Neste estudo analisou-se ao longo de 18 meses a dinâmica de colonização/infecção invasiva por *Candida* spp. em 390 pacientes críticos seqüencialmente admitidos numa unidade de terapia intensiva (Rosas *et al.*, 2004). Ao longo deste período foram isoladas mais de 2.000 leveduras em diferentes sítios nos pacientes analisados, amostras estas identificadas em nível de espécie e imediatamente congeladas e estocadas em freezer a -70 °C.

Para o presente estudo foram selecionadas **51** amostras de *C. albicans* pertencentes ao banco de microorganismos acima descrito, cepas estas isoladas de 3 grupos de pacientes, a saber:

Grupo I: pacientes com colonização persistente, sem desenvolvimento de fungemia ao longo de sua internação;

Total de 17 cepas seqüencialmente isoladas de 3 pacientes, 2 do sexo masculino e 1 do sexo feminino, idade variando entre 58 e 61 anos, com APACHE score entre 20 e 22 no momento da internação. Estas amostras foram obtidas de pacientes que evoluíram com episódios persistentes de colonização por *Candida* spp, sem ocorrência de fungemia ao longo de sua internação (Tabela 1).

Grupo II: pacientes com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da mesma internação e evolução para alta hospitalar;

Total de 27 cepas seqüencialmente isoladas de 3 pacientes, 2 do sexo masculino e 1 do sexo feminino, idade variando entre 47 e 62 anos, com APACHE II score entre 20 e 25 no momento da internação, que evoluíram com episódios persistentes de colonização por *Candida* spp. seguidos por fungemia ao longo da mesma internação (Tabela 1).

Grupo III: paciente com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da internação e evolução a óbito;

Total de 7 cepas isoladas de 1 paciente do sexo masculino, com 55 anos, que apesar de apresentar faixa etária semelhante ao grupo anterior, ausência de doença de base rapidamente fatal, APACHE II score de 11, significativamente mais baixo que os demais pacientes, teve evolução para morte associada à candidemia ao longo de sua internação (Tabela 1).

Para efeito comparativo, além destes isolados clínicos, 2 cepas controles de *C. albicans* foram incluídas neste estudo: ATCC 90028 (Pancholli *et al.*, 2004) e SC 5314 (Gillum, 1984), sendo esta última sempre utilizada em estudos de virulência desta espécie e por ter sido seqüenciado o seu genoma.

Tabela 1. Isolados clínicos utilizados neste estudo

Paciente	No do banco de microrganismos	Sítio de isolamento	Desfecho clínico
Paciente 1	868 A1	swab retal	Colonização
	881 A	swab retal	
	893 A	swab retal	
	904 A	swab retal	
	904 B	urina	
	904 C1	catéter	
	914 A	swab retal	
	914 B	urina	
Paciente 2	138 C	secreção traqueal	Colonização
	143 A	swab retal	
	143 C	ferida operatória	
Paciente 3	133 C1	secreção traqueal	Colonização
	170 A	swab retal	
	170 D1	cateter	
	176 A	swab retal	
	184 A1	swab retal	
	184 C	cateter	
Paciente 4	624 A	swab retal	Candidemia e alta
	645 A	swab retal	
	657 A	swab retal	
	657 B	urina	
	672 A	swab retal	
	672 B	urina	
	672 D	cateter	
	687 A1	swab retal	
	687 B	urina	
	687 C	cateter	
	704 A	swab retal	
	704 B	urina	
	731 A	swab retal	
	731 D	sangue	
Paciente 5	15 B1	urina	Candidemia e alta
	15 D	sangue	
	19 B	urina	
Paciente 6	680 A	swab retal	Candidemia e alta
	690 A	swab retal	
	690 C	secreção traqueal	
	724 A	swab retal	
	763 A	swab retal	
	763 B	urina	
	777 A	swab retal	

	777 B	urina	
	791 B	urina	
	757	sangue	
Paciente 7	965 A	swab retal	Candidemia e morte
	965 C1	secreção traqueal	
	974 C	secreção traqueal	
	974 D	cateter	
	982 E	cateter	
	1002 B	urina	
	997,5G	sangue	

3.2 Verificação de viabilidade e pureza das leveduras armazenadas no LEMI e identificação fenotípica das amostras

Previamente aos experimentos, as cepas foram submetidas à verificação de sua pureza e viabilidade. Para isso, foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA / Oxoid, Cambridge, UK) contendo cloranfenicol, com repiques sucessivos, a fim de que os testes fossem realizados com culturas recentes.

Para avaliação da pureza, as leveduras foram semeadas com alça de níquel-cromo pela técnica de esgotamento, em placas de Petri (90x15 mm) descartáveis contendo meio CHROMagar *Candida*® (BD, NJ, USA), meio cromogênico seletivo, que permite a identificação de culturas mistas de leveduras. Após 48 horas de incubação a 37 °C, as colônias sugestivas de *C. albicans* tiveram sua identificação confirmada por presença de clamidoconídios em microcultivo (Warren e Hazen 1995, Baumgartner *et al.*, 1996).

Todas as amostras foram repicadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e, em seguida, adicionadas ao meio YEPD contendo 20% de glicerol para serem congeladas em freezer a -70°C e montagem do banco de microrganismos deste estudo.

3.3 Análise da micromorfologia (microcultivo)

Com a finalidade de observar as estruturas micromorfológicas típicas de *C. albicans* (clamidoconídios), cada amostra foi semeada com o auxílio de agulha de níquel-cromo em três estrias sobre a placa de Petri contendo ágar fubá (fubá 20 g/L; Agar Oxoid 10 g/L; Tween 80 5ml/L) com Tween-80. As estrias feitas sobre o ágar foram cobertas com lamínulas esterilizadas e a placa incubada a 25-28°C, durante 48-96h. As leituras foram realizadas diariamente, com as objetivas de 10x e 40x à microscopia óptica (40 x de magnificação; Olympus, PA, USA).

3.4 Diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Células crescidas por 48 h em ágar Sabouraud foram suspensas em água destilada esterilizada e ajustadas em espectrofotômetro a fim de produzir uma suspensão 85% de transmitância a 530 nm. Alíquotas de 20 µL de cada inóculo foram adicionadas a tubos contendo 1 mL de Sabouraud em caldo suplementado com 6.5% de cloreto de sódio (NaCl) incubados por 96 h. As culturas foram examinadas visualmente para verificação de crescimento (turbidez) em intervalos de 24 h . Colônias de *C. albicans* produziram crescimento visível até 96 h de incubação. Células de *C. dubliniensis* não apresentaram nenhum crescimento por até 96 h de incubação (Alves *et al.*, 2002).

Foi previsto no experimento a confirmação da identificação de *C. dubliniensis* por tipagem molecular (genotipagem ABC), para todos os isolados avaliados (McCullough *et al.*, 1999).

3.5 Análise fenotípica de *C. albicans* quanto aos diferentes fatores de virulência

3.5.1 Caldo NGY para padronização do inóculo

Para a caracterização fenotípica dos diferentes isolados, as amostras foram inicialmente crescidas em meio NGY (Neopeptona Difco 1g/L; dextrose 4g/L; Extrato de leveduras Difco 1g/L). Quando as células são inoculadas por “wet looping” neste meio (com uma alça em anel carregada por um filme de suspensão de leveduras rapidamente imersa no meio e removida) e incubadas por 18-24 h em shaker a 30 °C, 200 rpm, um inóculo de aproximadamente 2×10^8 cells/mL é produzido.

3.5.2 Determinação das taxas de crescimento em *C. albicans*

As taxas de crescimento foram medidas em duplicata. Quinhentos μ L de uma cultura “overnight” em NGY foram transferidos para YPD líquido (Peptona Oxoid 20 g/L; dextrose 20 g/L; Extrato de leveduras Oxoid 10 g/L) e RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA), com a finalidade de originar um inóculo inicial de aproximadamente $DO_{600\text{ nm}} = 0.050$. Dois grupos de erlenmeyers foram inoculados com a suspensão de células. O primeiro grupo foi inoculado imediatamente a 37 °C com rotação de 200 rpm em shaker. O segundo grupo foi mantido no gelo por 8 h sendo posteriormente aquecido a 37 °C e colocado na incubadora. O uso de dois grupos de erlenmeyers, separados por 8 h do início do período de incubação, permitiu a obtenção de amostragens a cada hora por um período de 26 h pela combinação dos dados obtidos nos dois diferentes grupos. O

crescimento das amostras foi determinado pela absorbância em DO_{600 nm} utilizando-se o meio YPD como branco.

3.5.3 Ensaio para detecção de atividade de proteinase em *C. albicans*

A atividade de proteinase foi determinada utilizando-se a metodologia de Copping *et al.* (2005). Lotes contendo 50 µL de células crescidas em NGY foram transferidos a tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YCB+ BSA (yeast carbon base Difco 11.7 g/L; dextrose 10 g/L; bovine serum albumine fraction V Sigma 5g/L) e incubadas em shaker a 30 °C por 72 h. A turbidez da cultura (DO_{600 nm}) foi determinada em espectrofotômetro (Gene Quant Pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). A atividade proteolítica foi determinada pelo aumento de produtos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) medida a 280 nm em triplicata. Um volume de 250 µL do sobrenadante das culturas foi adicionado a 1 mL de tampão citrato de sódio (0,1M citrato de sódio Sigma; 0,1M ácido cítrico Sigma) acrescido de 1% BSA, pH 3.8. Tubos controle contendo apenas os sobrenadantes das culturas foram incluídos. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 2.5 mL de TCA 5% (w/v) a cada tubo e 1 mL do tampão citrato de sódio foi adicionado aos tubos controle. Os tubos foram incubados no gelo por 10 min. Os precipitados foram removidos por centrifugação à temperatura ambiente, 1800 g por 15 min e a absorbância em DO_{280nm} dos sobrenadantes dos tubos teste foi determinada utilizando-se os sobrenadantes dos tubos controle como branco.

3.5.4 Ensaio para detecção de atividade de fosfolipase em *C. albicans*

Para a detecção da atividade de fosfolipase, foi utilizado o método de Price *et al.* (1982). Culturas crescidas “overnight” em NGY foram diluídas e padronizadas a uma concentração de 2×10^5 cells/mL; e a suspensão de células inoculada em triplicata em superfície de agar fosfolipase (agar Sabouraud adicionado de 1 M NaCl; 5 mM de CaCl_2 ; 80 mL de gema de ovo Sigma após autoclavação e resfriamento do meio). As placas foram incubadas por 72 h. Após o período de incubação, os diâmetros das colônias e os halos formados foram medidos. O Pz (zona de fosfolipase) foi determinado pela seguinte equação.

$$P_z = \frac{\text{diâmetro da colônia (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)} + \text{zona de precipitação (cm)}}$$

As amostras com valores de $P_z=1.0$ são consideradas fosfolipase negativas, enquanto que valores mais baixos indicam cepas produtoras de fosfolipase.

3.5.5 Ensaio de aderência de *C. albicans* a células epiteliais bucais humanas

O método de Bates *et al.* (2005) foi utilizado. Células de *C. albicans* foram crescidas “overnight” em NGY. Amostras de células epiteliais bucais humanas (CEBH) foram coletas de voluntários saudáveis com swab estéril friccionado por 2 min na cavidade oral e transferidos para tubos de Falcon contendo 5 mL de PBS

e mantidas refrigeradas até o momento de experimentação. Suspensões de *C. albicans* e CEBH foram centrifugadas a 1200 g (4 °C) por 5 min e lavadas três vezes com PBS, sob as mesmas condições de centrifugação. O inóculo foi padronizado para 5×10^6 células/mL (*C. albicans*) e 5×10^5 células/mL de CEBH. Os dois tipos de células foram misturados em iguais proporções (200 µl de cada suspensão) e incubados a 30 °C por 1h. Subseqüentemente, as células foram fixadas em formalina e o número de células de *C. albicans* aderidas por cada CEBH determinado. Pelo menos 150 CEBH foram contadas e o ensaio realizado em triplicata. As contagens celulares foram realizadas em microscópio óptico de contraste de fase (40 x de magnificação; Olympus, PA, USA).

3.5.6 Ensaio de morfogênese de *C. albicans* em meio líquido

Para indução da formação de hifa em meio líquido, células crescidas em NGY foram padronizadas para uma concentração inicial de 1×10^6 células/mL e inoculadas em erlemeyers pré-aquecidos (37 °C) contendo 50 mL de soro fetal bovino (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) a 10% em H₂O e incubados à mesma temperatura com rotação de 200 rpm. Após 3 h de incubação, alíquotas de 500 µL de cada cepa foram retiradas e adicionadas à igual volume de formaldeído a 10% em PBS. A metodologia descrita por Merson-Davies & Odds (1989) foi utilizada para estimar a morfologia das células (índice de morfologia-IM). Para tanto, foram observadas 100 células de cada amostra em microscopia de contraste de fase (Olympus, PA, USA). Se as células estivessem na forma de levedura, o IM foi considerado 1. Se o comprimento celular total fosse de aproximadamente o dobro do diâmetro, o IM= 2. Células com aparência de pseudohifa obtiveram o IM de 3. Tubos

germinativos longos ou hifas verdadeiras de lados paralelos foram considerados IM=4. Os blastosporos parentais foram excluídos da contagem.

3.5.7 Formação de biofilme

Para a indução de biofilme foi seguido o protocolo de Jin *et al.* (2003). Células de *C. albicans* foram cultivadas em SDA a 37°C por 18 horas. Os isolados foram inoculados em 5 mL do meio RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA), tamponado com 0,164M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) e o pH acertado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 10 M, e incubados *overnight* durante 18 horas a 200 rpm. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 8000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo o pellet formado lavado duas vezes em 5 mL de PBS (solução salina de tampão fosfato, pH 7,2, Ca²⁺ e Mg²⁺ livres), em iguais condições de centrifugação. Para ajustar a concentração celular (10⁷ céls/mL em uma densidade óptica de 0,38 a 520 nm) o pellet celular foi ressuspenso em 5 mL de PBS e 1 mL desta suspensão foi transferida para uma cubeta para acertar a densidade óptica.

Subsequentemente, para a fase de adesão, transferiu-se a suspensão do inóculo padronizado para placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços, pré-esterilizadas. Para cada poço da placa foram adicionados 100 µL da suspensão, sendo as mesmas incubadas por 1,5 h a 37° C sob agitação mecânica de 75 rpm. Como controle negativo, 8 poços foram tratados de maneira idêntica, excluindo-se os conteúdos celulares.

Após a fase de adesão, aspirou-se suspensão de células não aderidas, sendo os poços lavados duas vezes com 150 μ L de PBS. Imediatamente, um total de 100 μ L de meio RPMI-1640 foi adicionado em cada um dos poços e a placa incubada 66 horas a 37° C sob agitação de 75 rpm. Após este período, o biofilme foi quantificado utilizando-se coloração de cristal violeta. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata.

3.5.8 Coloração do biofilme pelo cristal violeta

Após a indução de biofilme, removeu-se por pipetagem o meio RPMI-1640 sendo cada poço da placa lavado duas vezes com 150 μ L de PBS. Depois de retirado o PBS, a placa foi mantida por 45 minutos à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foram adicionados 110 μ L de solução aquosa de cristal violeta 0,4% (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) em cada poço com incubação por 45 minutos, seguido de três lavagens com 300 μ L de água milli-Q esterilizada. Seqüencialmente, as amostras foram descoradas com 200 μ L de etanol 95% por um período de 45 minutos. Cerca de 100 μ L da solução descorante foi transferida para uma nova placa e submetida à quantificação em leitor espectrofotométrico de placas, com filtro de 570 nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste para normalização dos resultados.

3.6 Testes de susceptibilidade a antifúngicos

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme a norma de padronização publicada no documento M27-A2 pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Além dos isolados clínicos selecionados para este estudo, organismos controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, foram incluídos em cada lote de ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos. Esta verificação é possível uma vez que são conhecidas previamente as CIMs para estes microrganismos controles frente aos antifúngicos a serem testados.

Utilizou-se meio de cultivo líquido, RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio. Foram pesados 10,4 g de RPMI-1640 e 18 g de dextrose, em seguida este meio foi hidratado em 1L de água destilada esterilizada. O meio foi tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) e o pH acertado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 10 M. Posteriormente, a solução resultante foi esterilizada por filtração em filtro biológico de 0,22 micra (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA).

Os antifúngicos testados foram diluídos em dez diferentes concentrações seriadas, a saber: fluconazol (Pfizer Incorporated, New York, NY, EUA) e 5-fluorocitosina (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) para 1,25 a 640 µg/mL, itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, EUA) para 0,078 a 40 µg/mL, anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) e caspofungina (Merck, Rahway, N.J., EUA) e anidulafungina (Pfizer Incorporated, New York, N.Y. EUA) para 0,3 a 160 µg/mL. As dez diferentes concentrações de cada antifúngico foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100 µg/mL destas

concentrações foram dispensadas nas placas de microtitulação (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA), utilizando-se pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystem, Helsinki, Finland). Concentrações progressivas de drogas foram dispensadas seqüencialmente nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 foram utilizados como controles de crescimento, sendo dispensados apenas 100 µg/mL do diluente do antifúngico, meio de cultura e inóculo. Os poços da coluna 12 foram os controles de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -70° C até sua utilização por período máximo de 6 meses. No dia do experimento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem utilizadas.

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura a ser testada, realizado em SDA, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI-1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. Alíquotas de 100 µg/mL da solução do inóculo padrão foram dispensadas nos poços contendo 100 µg/mL de diferentes concentrações dos antifúngicos testados. Ao final, as placas foram transferidas para a estufa a 35°C, sendo a leitura do teste realizada de 24 a 48 horas após a incubação.

Foi considerado como CIM para azóis, 5-fluorocitosina e equinocandinas a menor concentração da droga que apresentou cerca de 50% de redução em sua turbidez comparativamente ao poço controle positivo. Para os poliênicos, a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visualmente perceptível (CLSI, 2008).

Os critérios para definição de susceptibilidade e ponto de corte para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e equinocandinas foram aqueles sugeridos pelo CLSI, 2008. Não existe definição de pontos de corte estabelecidos para anfotericina B. Para anfotericina B, utilizamos aqueles preconizados por outros autores (Nguyen *et al.*, 1998; Dewsnup, 1994; Maenza *et al.*, 1996; Rex *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1997). A Tabela 2 ilustra os valores de ponto de corte utilizados para a interpretação dos testes de susceptibilidade neste estudo.

Tabela 2. Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de susceptibilidade de leveduras

Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a categoria				
Antifúngicos	Sensível (S)	SDDependente* /Intermediário	Resistente (R)	Referências
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64	CLSI, 2008
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25 a	≥ 1	CLSI, 2008
5- Fluorocitosina	≤ 4	8 a 16	≥ 32	CLSI, 2008
Anfotericina B	≤ 1		≥ 2	Nguyen <i>et al.</i> , 1998; Dewsnup, 1994; Maenza <i>et al.</i> , 1996; Rex <i>et al.</i> , 1995; Rex <i>et al.</i> , 1997,
Capofungina	≤ 2		≥ 4	CLSI, 2008
Anidulafungina	≤ 2		≥ 4	CLSI, 2008

*Susceptibilidade dose-dependente: categoria exclusiva para triazólicos

**Não existem valores de corte pré-estabelecidos

3.7 Tipagem molecular

3.7.1 Extração do DNA e formação de protoplastos

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de isolamento de Wach *et al.* (1994). Para este procedimento, as células de *C. albicans* foram crescidas “overnight” em 5 mL de YPD contidas em tubos de Falcon de 15 mL, sob agitação de 200 rpm e incubadas a 30 °C. Foi transferida, em seguida, alíquota de 1,3 mL da cultura para tubo de microcentrifugação de 1,5 mL, sendo o mesmo, centrifugado a 6000 rpm por 3 minutos. As células foram lavadas em 1 mL de água milli-Q esterilizada e ressuspensas no agitador de tubos.

Após nova centrifugação, o sobrenadante foi removido, as células homogeneizadas em 200 µL de tampão protoplasto (β -mercaptoethanol Pharmacia; Tris-HCl 1M, pH 7.4; EDTA 5 M pH 8.0, Zymolyase ICN Biomedicals 0.2 mg/1 mL de água milli-Q q.s.p.) e incubadas por 1h a 37°C em banho-maria. Posteriormente, 200 µL de tampão de lise (NaOH 10M, SDS 10% v/v, 1 mL água milli-Q q.s.p) foram adicionados à suspensão sendo a mesma incubada a 65 °C por 20 minutos, e, em seguida, resfriada rapidamente no gelo. Para precipitar as proteínas e restos celulares, foram adicionados 200 µL de acetato de potássio (5M, pH 5,4) ao tubo de microcentrifugação, sendo o mesmo incubado no gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada em velocidade máxima por 3 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrifugação.

Foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol (Merck & Co., Inc., NJ, USA) no tubo e misturado suavemente por inversão e incubando à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação em velocidade máxima por 5 minutos, o

sobrenadante foi desprezado, sendo 1 mL de etanol (70%; Merck & Co., Inc., NJ, USA) adicionado ao precipitado, homogeneizado por inversão e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e, novamente, centrifugado por 10 minutos em velocidade máxima.

A lavagem com etanol foi repetida, o precipitado seco por 10 minutos em fluxo laminar e o DNA dissolvido em 50 μ L de água milli-Q esterilizada.

3.7.2 Tratamento do DNA com RNase

Para remoção do RNA e purificação do DNA, aos tubos contendo DNA foram adicionados 48 μ L de água milli-Q esterilizada, 1 μ L de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e 1 μ L de RNase A (USB Corporation) a 10 mg/mL e colocados em banho-maria a 37°C por 1h. O DNA foi precipitado com a adição de 10 μ L de acetato de sódio (NaOAc) 3 M e 220 μ L de etanol absoluto gelado. A suspensão foi homogeneizada, incubada por 10 minutos no gelo e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de etanol 80% para retirar o sal. O tubo de microcentrifugação foi centrifugado, novamente, por 15 minutos a 14.000 rpm, o etanol retirado e o precipitado seco durante 5 a 10 minutos em fluxo laminar. A dissolução completa do “pellet” foi realizada em 50 μ L de água milli-Q.

3.7.3 Quantificação do DNA

Alíquotas de 5 μ L de DNA foram diluídas em 1 mL de água milli-Q. Em seguida, a absorbância foi medida utilizando-se como comprimento de onda DO₂₆₀

nm em espectrofotômetro (GeneQuant^{pro} Amersham Pharmacia Biotech AB, Cambridge, UK). Segundo Sambrook *et al.* (1989), a absorbância igual a 1, contém uma concentração de 50 µg/mL de DNA dupla fita, 40 µg/mL de DNA fita simples e ~ 20 µg/mL de oligonucleotídeos de fita simples. Também foi medida a absorbância DO_{280 nm} de comprimento de onda para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA. A razão entre as leituras DO_{260 nm}/DO_{280 nm} permite uma estimativa da pureza do DNA, que deve apresentar valores entre 1,8 e 2,0. A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de contaminantes e proteínas, e na sua ocorrência, a extração foi realizada novamente.

3.7.4 Reações de microssatélite

Para essas reações, foram adicionados em tubos de microcentrifugação de 0,2 mL, as seguintes substâncias: 11,5 µL de água milli-Q esterilizada, 2,5 µL de 10 X "buffer" (Invitrogen Corporation, CA, USA), 5 µL de dNTP mix 1,25 mM (Amersham - Pharmacia Biotech); 3,5 µL de MgCl₂ (Invitrogen Corporation, CA, USA) 25 mM, 1 µL do oligonucleotídeo 50 pmol/µL (BIO.SYNTHESIS) 0,13 µL de Tween-20; 0,4 µL de Taq DNA polimerase (500 U) (Invitrogen Corporation, CA, USA) e 1 µL de DNA diluído à 40 ng/µL, totalizando em um volume de 25 µL. Foi utilizado os oligonucleotídeo M13 (Casali *et al.*, 2003) para a metodologia do microssatélite.

A amplificação foi realizada em um termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) utilizando-se os seguintes ciclos de PCR: 1 ciclo de 97 °C por 3 min (desnaturação inicial); 40 ciclos de 93 °C por

20 s (desnaturação), 50 °C por 20 s (anelamento) e 72 °C por 2 min (extensão) e 1 ciclo de 72 °C por 5 min (extensão final).

3.7.5 Reações de PCR

Para as reações de PCR foram adicionados em tubos de microcentrifugação de 0,2 mL de capacidade os seguintes componentes: 25uL de PCR Master Mix 2X, PROMEGA [Taq DNA polimerase 50u/mL; deoxinucleotídios (dATP,dGTP,dCTP,dTTP, 400µM cada); MgCl₂ 3mM, 1uL de cada oligonucleotídio na concentração inicial de 10 pmol/µL; 1 uL do DNA genômico diluído a 40ng/uL, 22uL de água milli-Q esterilizada livre de nucleases (PROMEGA), totalizando um volume de 50uL.

Foram utilizados os seguintes ciclos de PCR: ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94° C – 1 minuto (desnaturação); 55°C – 1 minuto (hibridização); 72° C- 1 minuto (extensão). Para o ciclo de extensão final, foi utilizada a temperatura de 72°C por 5 minutos. Para a técnica de genotipagem ABC, os “primers” CA-INT-L (5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA-3') e CA-INT-R (5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3') foram utilizados (McCullough *et al.*, 1999).

3.7.6 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen Corporation, CA, USA) para a eletroforese foi usado na concentração de 1,2% em solução tampão TAE 1X (Tris, 4,84g; acetato, 1,14g; EDTA, 2mL). Os produtos amplificados pelos PCRs

foram diluídos em tampão orange G (10uL da reação em 2uL do tampão orange G) e 1 ul do marcador de peso molecular (100 base pair Ladder / Invitrogen Corporation, CA, USA), foi diluído em 9uL de água milli –Q esterilizada e 2uL do tampão Orange G. Foram adicionadas 12 uL da reação diluída a cada orifício do gel. Para a corrida eletroforética dos produtos da amplificação de microssatelites foi utilizada uma corrente elétrica de 100 volts por 30 minutos e em seguida a 55 volts por 5:30 horas. Para a realização da eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas com os “primers” para PCR foi empregada uma corrente elétrica de 100 volts por 1:30 horas.

Após o término da eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (USB Corporation) durante 20 minutos (400 mL de TAE 1X + 20 µL de brometo de etídio 10 mg/mL) e descorado em água destilada por 15 minutos.

Os padrões de bandas contidos nos géis tiveram sua imagem visualizada em um transiluminador de raios UV (UVP – BioDoc – it TM System), capturada e transferida para um disquete (no formato JPEG) para posterior análise em Software Analítico.

3.7.7 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas

A análise dos resultados gerados pelo método de microssatelite foi realizada por dendrograma utilizando o programa GEL COMPAR II versão 4.0 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análise de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas obtidos.

Os géis foram comparados entre si após o aporte de suas imagens pelo programa Gel Compar II. Este programa corrige distorções do gel, como padrões de sorriso, através da comparação com um padrão universal e seleciona

automaticamente as bandas presentes no gel. As imagens originais dos géis foram analisadas visualmente para desconsiderar artefatos. O coeficiente de Dice com tolerância de 2% foi utilizado para esta análise que se baseia na presença e ausência de bandas, bem como do maior peso para as bandas em comum entre as amostras analisadas para gerar a matriz de similaridade. Para gerar o dendrograma, utilizou-se o método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), que baseado na matriz de similaridade, faz o agrupamento par a par das amostras, gerando desta maneira o agrupamento em uma árvore enraizada.

3.8 Análise dos resultados

1) A comparação de aspectos de virulência de *C. albicans*, seja na comparação entre cepas colonizantes x infectantes, ou mesmo na tentativa de identificar alguns atributos cujos resultados permitam correlacionar ao desfecho do paciente, foi complementada por análise estatística utilizando-se a técnica de análise de variância pelo método Oneway ANOVA (SPSS versão 15.0 for Windows).

2) Em relação à distribuição dos valores de CIM para os antifúngicos, estes foram analisados de três formas:

1) Variação dos valores, representando os limites inferior e superior das CIMs de cada antifúngico, referentes às diferentes espécies de leveduras testadas;

2) CIM₅₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento dos isolados testados;

3º) CIM₉₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir 90% do crescimento dos isolados testados;

4º) Prevalência de isolados, considerados sensíveis, intermediários e resistentes à diferentes drogas;

4.0 RESULTADOS

4.1 Seleção das amostras utilizadas neste estudo e confirmação da identificação taxonômica

As amostras de *C. albicans* foram selecionadas entre cepas isoladas durante um estudo de coorte longitudinal envolvendo pacientes de UTI. Neste estudo de coorte longitudinal analisou-se ao longo de 18 meses a dinâmica de colonização/infecção invasiva por *Candida* spp em 390 pacientes críticos seqüencialmente admitidos numa unidade de terapia intensiva (Rosas *et al.*, 2004). Ao longo deste estudo foram isoladas mais de 2.000 leveduras em diferentes sítios nos pacientes analisados, amostras estas identificadas em nível de espécie e imediatamente congeladas e estocadas em freezer a -70 °C. Todas as cepas exibiram a coloração verde em CHROMagar*Candida*®, foram capazes de formar clamidosporos em agar-fubá e exibiram turbidez em teste de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, confirmando a identificação previamente realizada como *C. albicans* para todas as cepas testadas neste estudo.

Para o presente estudo foram selecionadas **51** amostras de *C. albicans* pertencentes ao banco de microorganismos acima descrito, cepas estas isoladas de 3 grupos de pacientes (Tabela 1, pag. 27), a saber:

Grupo I: pacientes com colonização persistente, sem desenvolvimento de fungemia ao longo de sua internação (17 cepas)

Grupo II: pacientes com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da mesma internação e evolução a alta (27 cepas)

Grupo III: paciente com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da internação e evolução a óbito (7 cepas)

Para efeito comparativo, além destes isolados clínicos, 2 cepas controles de *C. albicans* foram incluídas neste estudo: ATCC 90028 (Pancholli *et al.*, 2004) e SC 5314 (Gillium, 1984), sendo esta última sempre utilizada em estudos de virulência desta espécie e por ter sido seqüenciado o seu genoma. A Tabela 1 (página 27) ilustra os isolados utilizados neste estudo, bem como seus sítios de isolamento, numeração no banco de microorganismos e desfecho clínico do paciente.

4.2 Padronização e avaliação fenotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência

4.2.1 Determinação da taxa de crescimento de *Candida albicans*

Para a padronização das curvas de crescimento das diferentes amostras foi utilizada uma adaptação do método descrito por Bates *et al.* (2005). Células crescidas “overnight” em NGY apresentando DO_{600nm} de aproximadamente 1.0, apresentam-se na concentração de 2×10^8 células/mL. Similar DO_{600nm} e número de células foram obtidos para todas as amostras a serem testadas. Utilizou-se duas condições diferentes de crescimento, YPD, 200 rpm a 30 °C, que é um meio de cultura padrão para o cultivo de células de leveduras, bem como o meio RPMI-1640 a 37 °C, que é bastante

utilizado no cultivo de células humanas (leucócitos) e, portanto, simularia condições mais aproximadas ao que acontece com o organismo humano. Todos os isolados apresentaram taxas de crescimento sem diferença estatisticamente significativa à exceção do isolado 657 B (paciente 4 que foi colonizado e desenvolveu candidemia), que cresceu mais lentamente que os demais isolados nas duas condições testadas. A figura 2 representa o resultado da curva de crescimento de alguns dos isolados avaliados neste estudo.

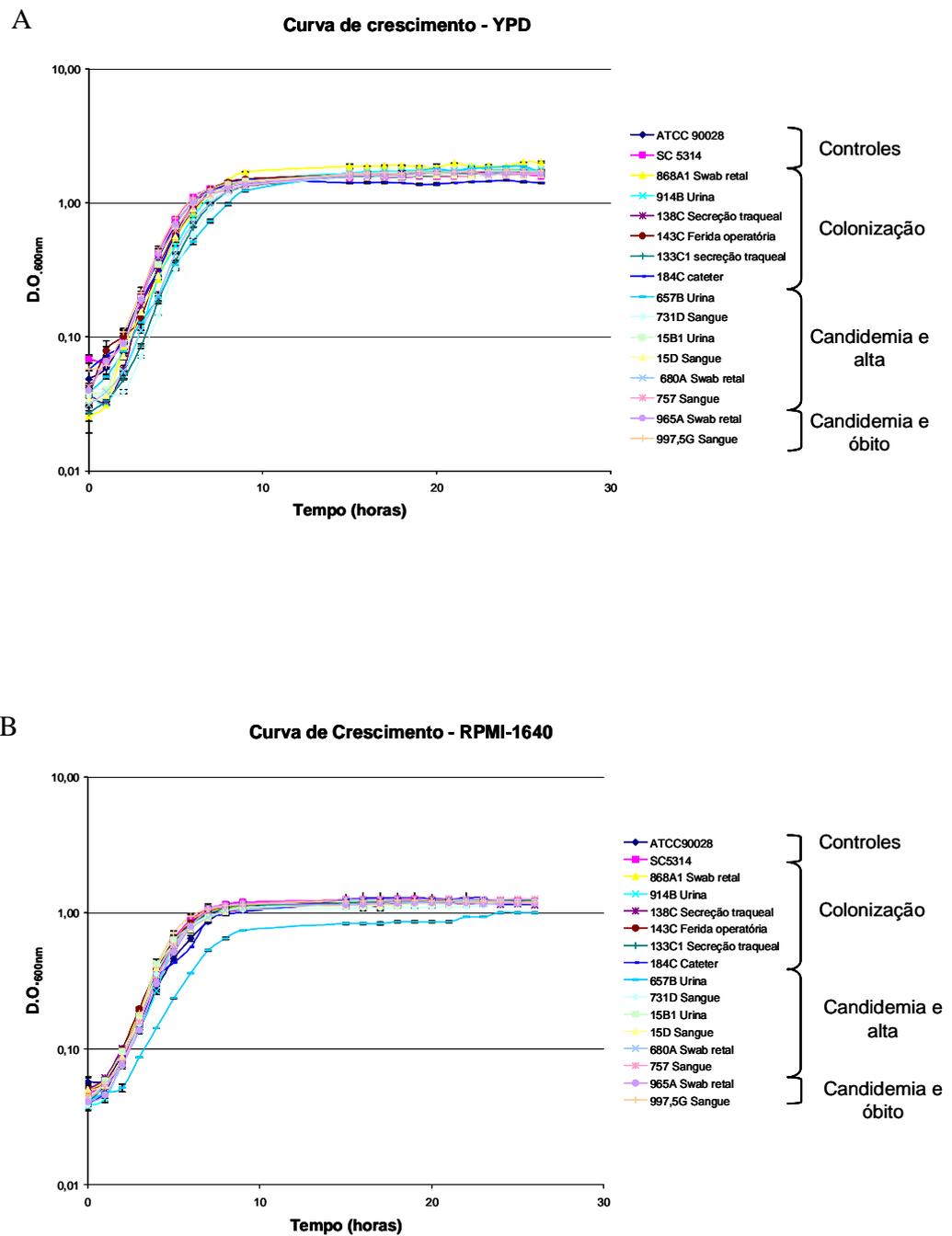


Figura 2. Curvas de crescimento de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia) na forma de blastoconídeos em YPD (A) e RPMI-1640 (B). O crescimento foi monitorado por 26h a 37°C com rotação de 200rpm. As barras representam o desvio padrão de dois experimentos independentes

4.2.2 Ensaio de aderência de células de *C. albicans* a células epiteliais bucais humanas (CEBH)

Células crescidas em NGY foram lavadas em PBS e padronizadas de forma que para cada ensaio de aderência existisse uma proporção de 10:1 (células de *C. albicans* X CEBH) incubadas a 30 °C por 1 hora (200 rpm). Células fixadas em formalina-PBS foram contadas em microscopia por contraste de fase (Figura 3).

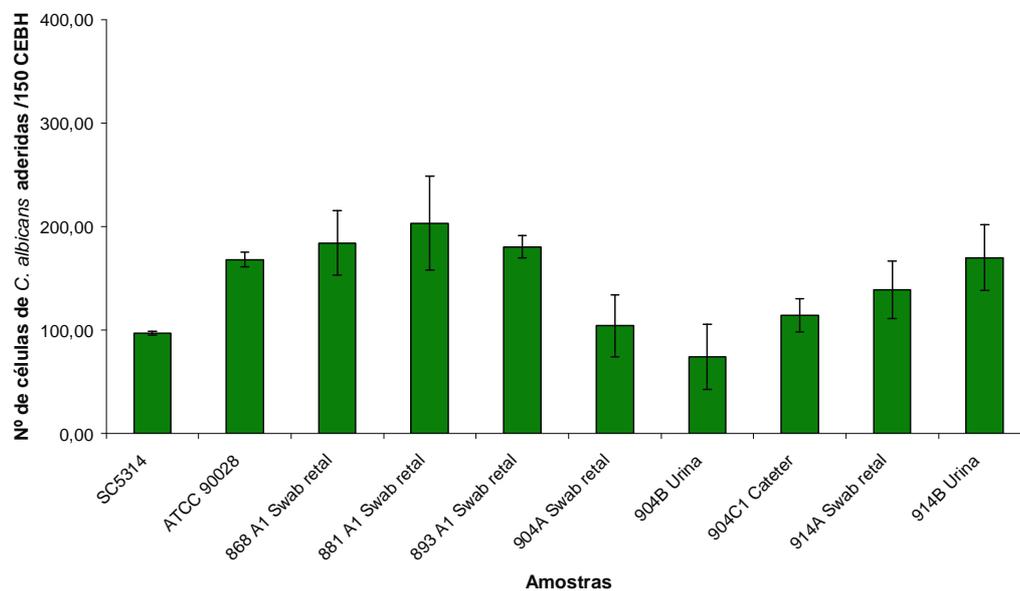


Figura 3. Aderência de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização) a CEBH após período de incubação de 1 h a 30 °C. A seta compacta representa a célula epitelial, enquanto que a célula pontilhada, a célula de *C. albicans*.

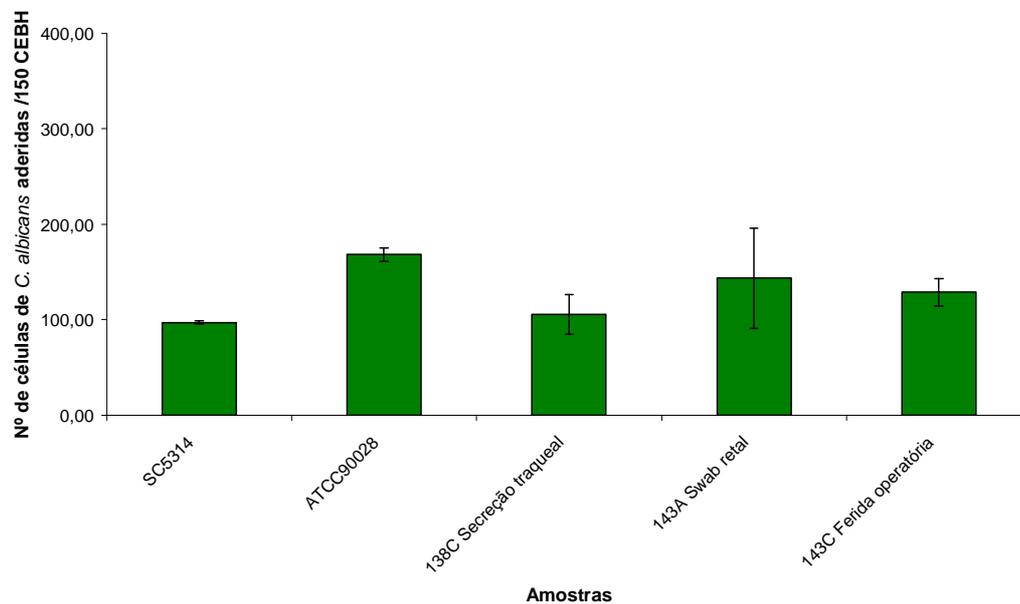
De maneira geral, as cepas colonizantes do paciente 1, apresentaram alta aderência às células epiteliais (> 100 células de *C. albicans*/CEBH) enquanto que nos dois outros pacientes que não desenvolveram candidemia (2 e 3), a capacidade de aderência apresentada pelas células de *Candida* foi baixa, especificamente no paciente 3 onde apenas cerca de 30 células de *C. albicans* foram encontradas aderindo cada 150 CEBH. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; Fig. 4). Com relação aos

pacientes que evoluíram com candidemia, foi observada uma variável habilidade de aderência das diferentes cepas. Enquanto que na maioria dos pacientes (4, 5 e 7) foi verificada uma alta aderência (≥ 100 células de *C. albicans*/CEBH para vários isolados), as cepas que colonizaram o paciente 6 apresentaram em geral uma aderência mais baixa, se comparadas aos demais isolados dos outros pacientes, onde a maioria dos isolados apresentou menos de 50 células de *Candida* aderidas em 150 CEBH. Entretanto, devido à alta variabilidade de capacidade de aderência a CEBH dos isolados de um mesmo paciente, essa diferença não se apresentou estatisticamente significativa (Fig. 4). Torna-se importante também ressaltar que a cepa 997, 5 G isolada do paciente 7 (Grupo III), apresentou alta aderência (cerca de 175 células de *C. albicans*/CEBH; Fig. 4). Este paciente, apesar de apresentar baixo apache score (11), apresentou mortalidade atribuída à candidemia.

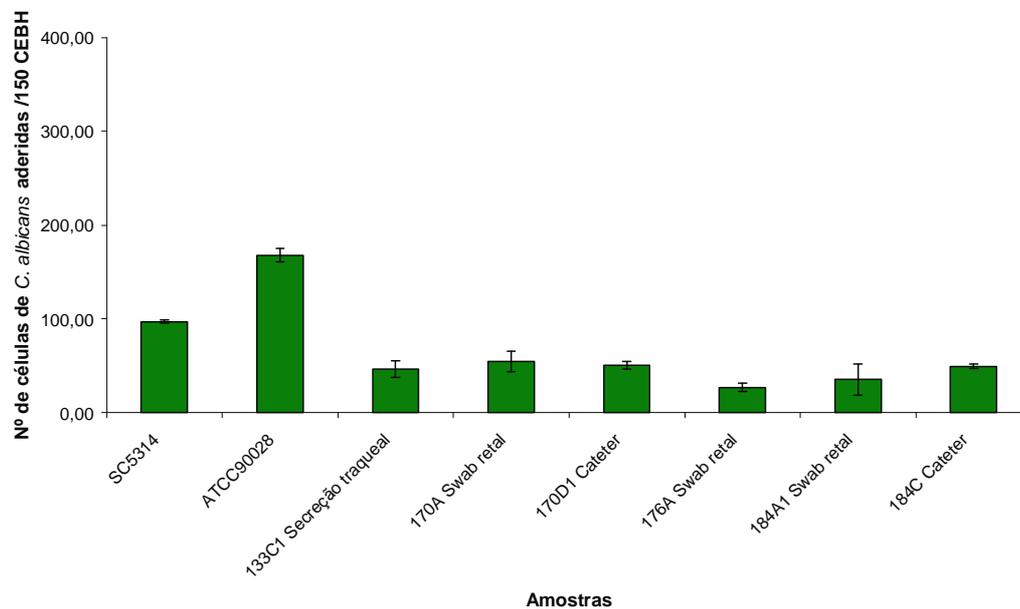
**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 1) Grupo I/Colonização**



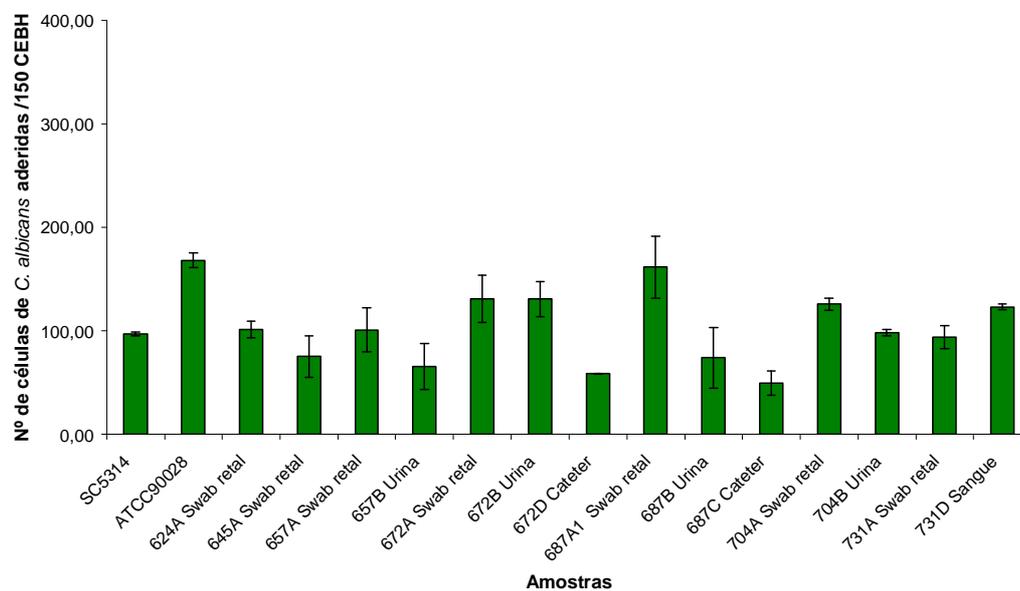
**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 2) Grupo I/Colonização**



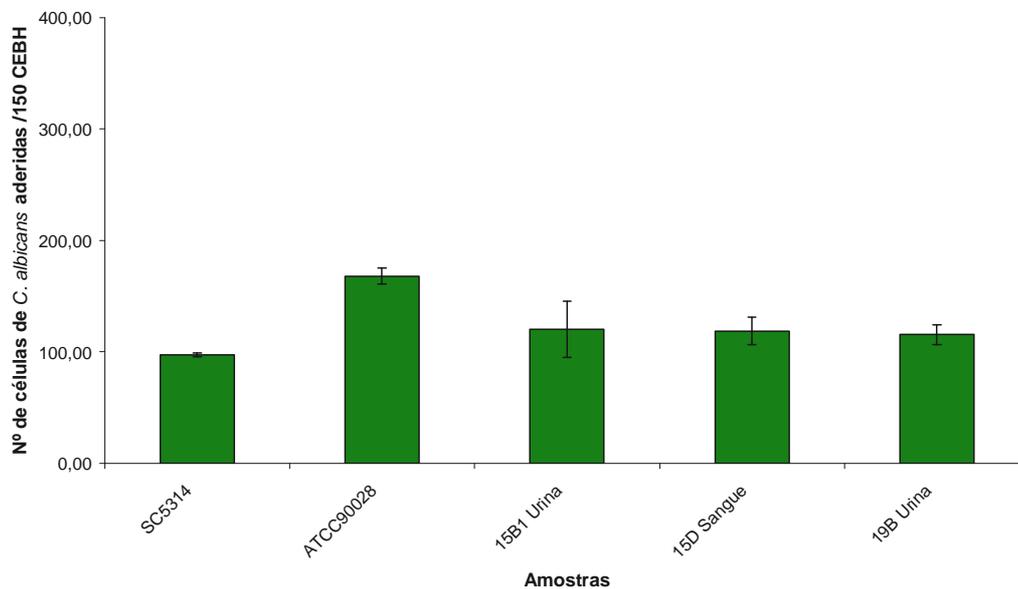
**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 3) Grupo I/Colonização**



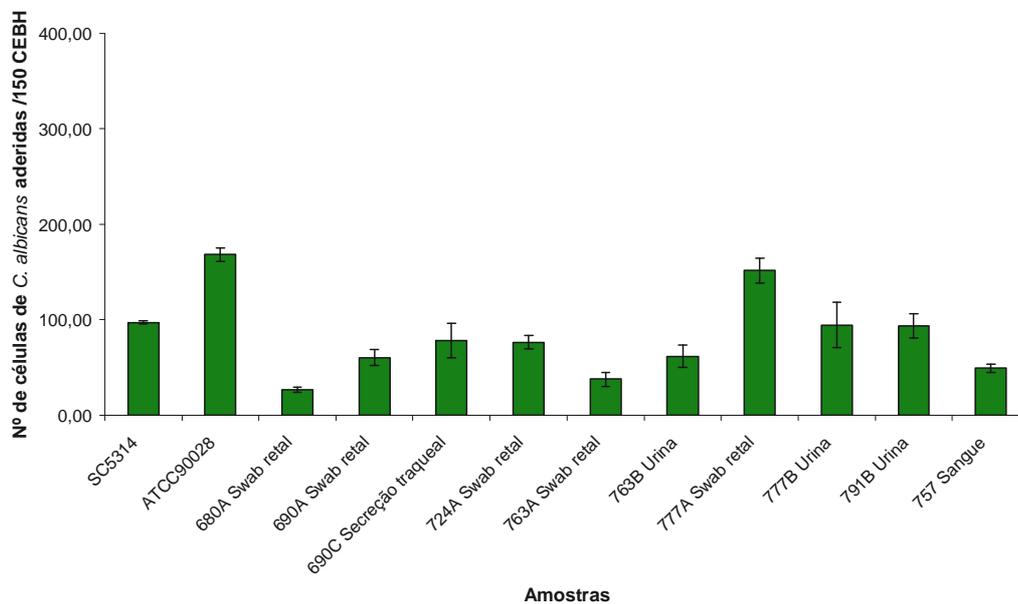
**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 4) Grupo II/Candidemia e alta**



**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 5) Grupo II/Candidemia e alta**



**Aderência de *C. albicans* a CEBH
(Paciente 6) Grupo II/Candidemia e alta**



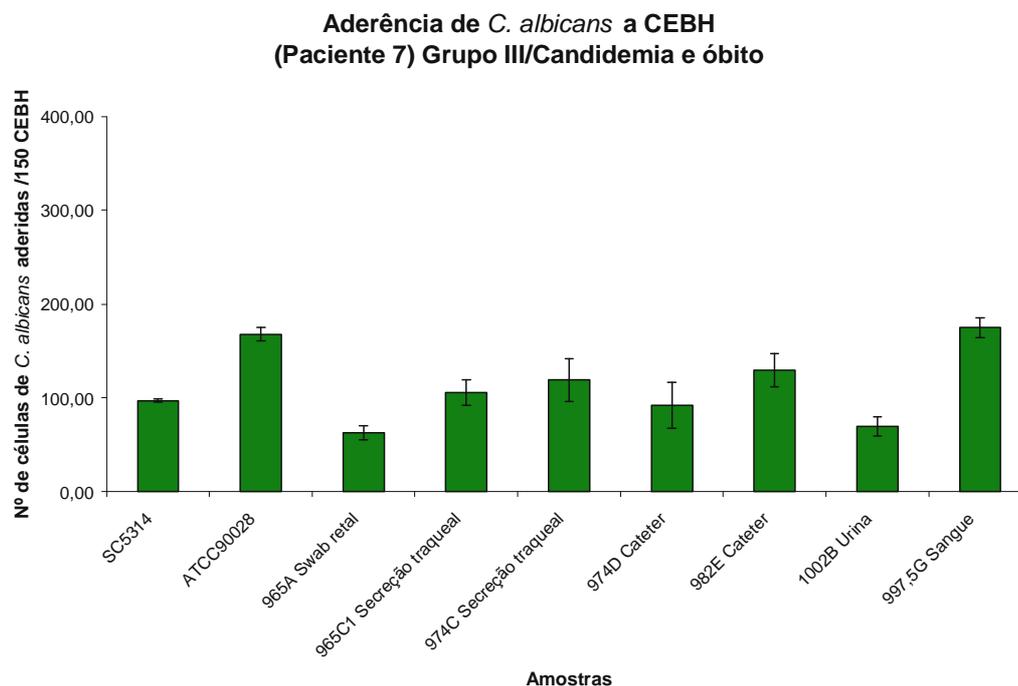


Figura 4. Aderência de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia) a CEBH após período de incubação de 1 h a 30 °C. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. Os isolados do paciente 3 (apenas colonizado) apresentaram baixa aderência a CEBH quando comparados aos isolados dos pacientes 1 e 2 (apenas colonizados) e 4, 5, 6 e 7 (com candidemia; * $p < 0,05$).

4.2.3 Ensaio de capacidade de células de *C. albicans* em formarem hifa

Para a padronização da técnica de quantificação da capacidade de formação de hifa, células crescidas “overnight” foram padronizadas para uma concentração de 10^6 células/mL, sendo inoculadas em soro fetal bovino (FBS) por 3 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Como controle, foi utilizada a cepa de referência SC 5314. Quando crescidas sob essas condições, aproximadamente 100% das células de SC 5314

formam hifa verdadeira (IM=4), servindo de parâmetro comparativo com as demais cepas clínicas.

A Figura 5 ilustra três diferentes cepas quanto à capacidade de formar tubo germinativo, importante fator de virulência desta espécie. Em **A)** observamos que a cepa SC5314 forma longos tubos germinativos, constituindo hifas verdadeiras de lado paralelo com IM=4. Em **B)**, apesar da cepa 757 ter sido isolada da corrente sanguínea de paciente candidêmico, cerca de 50% das células formaram hifas verdadeiras, enquanto que o restante das células permaneceu sobre a forma de blastosporos. Em **C)**, observamos a cepa 997,5 G, isolada de sangue e apresentando longos tubos germinativos com IM=4.

Como o soro é o mais potente indutor de formação de hifa em *C. albicans*, era esperada uma alta percentagem das células de todas as cepas apresentando longo tubo germinativo, com hifa verdadeira (IM=4). A formação de hifa foi bastante expressiva na maioria das cepas testadas (Fig. 6). Interessantes resultados foram observados nos pacientes que evoluíram com candidemia: as cepas dos pacientes 5 e 6 apresentaram uma menor percentagem de formação de hifa (cerca de 50 % das células apresentaram IM de 1 ou 2), quando comparadas aos pacientes 4 e 7, caracterizados como altamente produtores de tubo germinativo. Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. É importante ressaltar que, os isolados do paciente 7, que apesar do baixo APACHE score, teve óbito atribuído à candidemia, apresentaram longos tubos germinativos em 100% das células de cepas colonizantes e do isolado de sangue (Fig. 6).

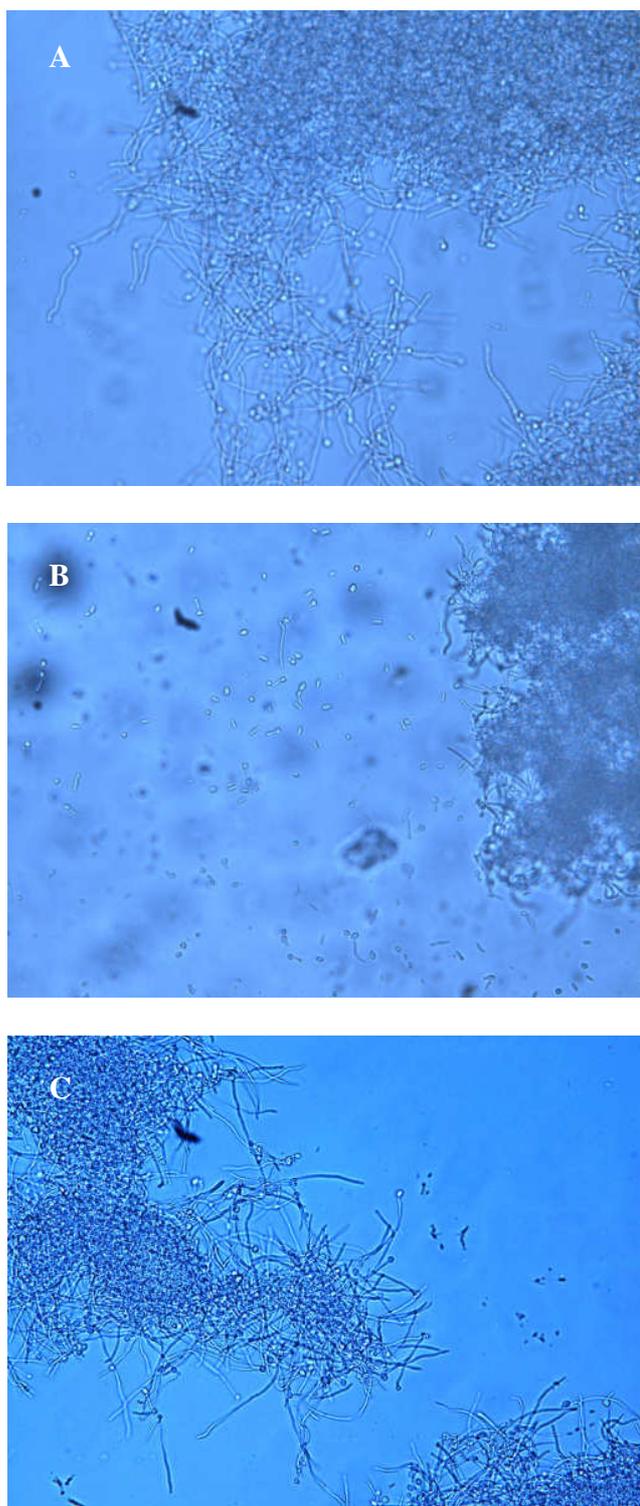
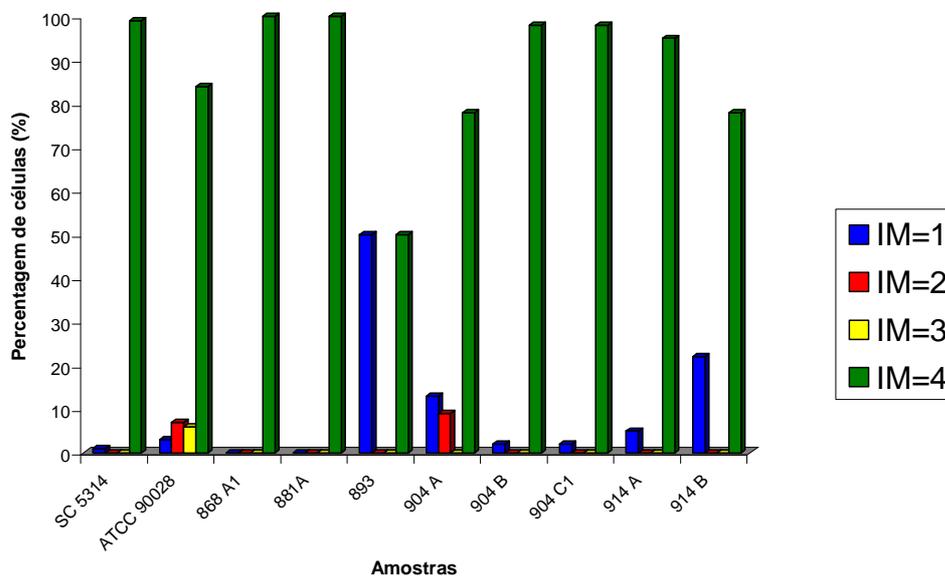
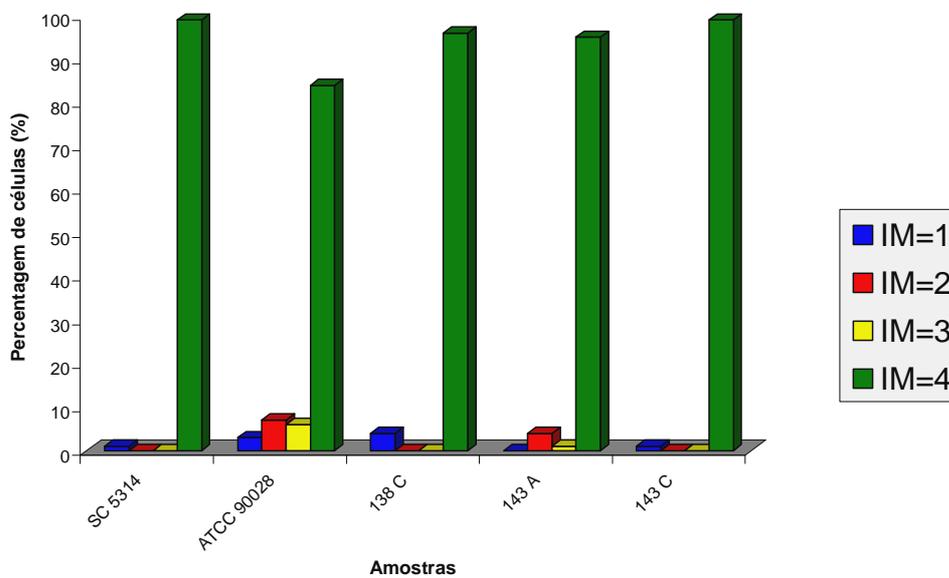


Figura 5. Isolados clínicos de *C. albicans* após 3 h de incubação em SFB (10%) a 37 °C, 200 rpm . A) SC5314, B) 757, C) 997,5 G

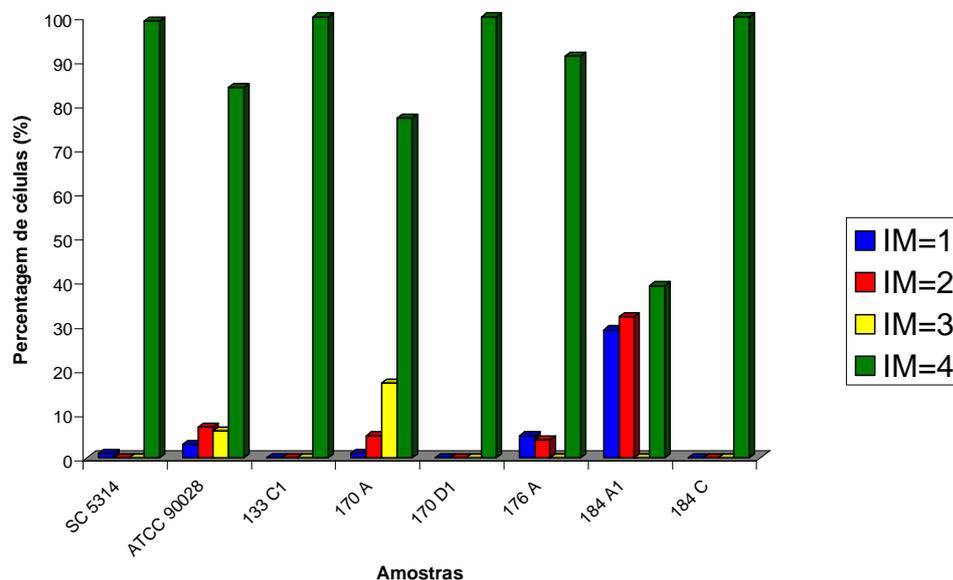
Formação de hifa em SFB a 37°C
(Paciente 1) Grupo I/Colonização



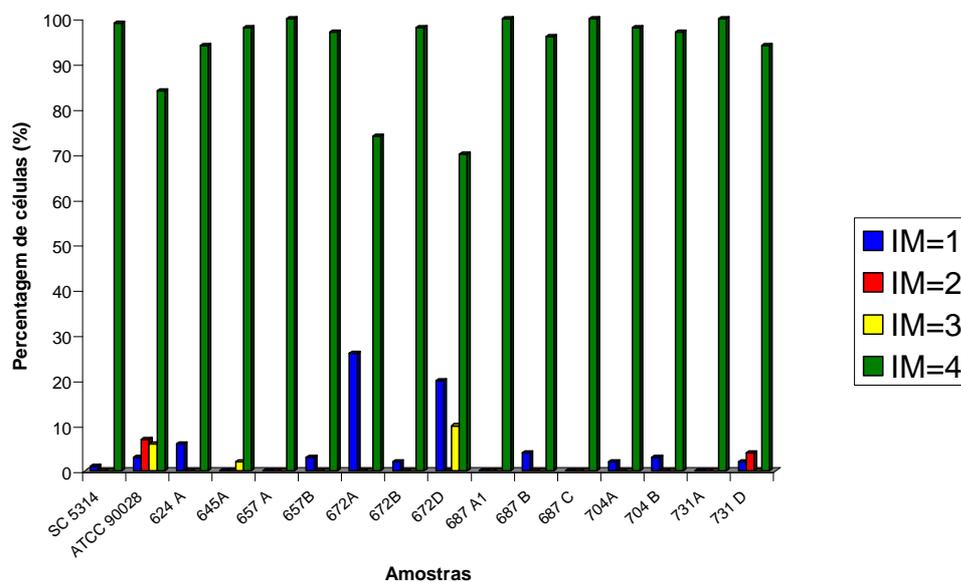
Formação de hifa em SFB a 37°C
(Paciente 2) Grupo I/Colonização



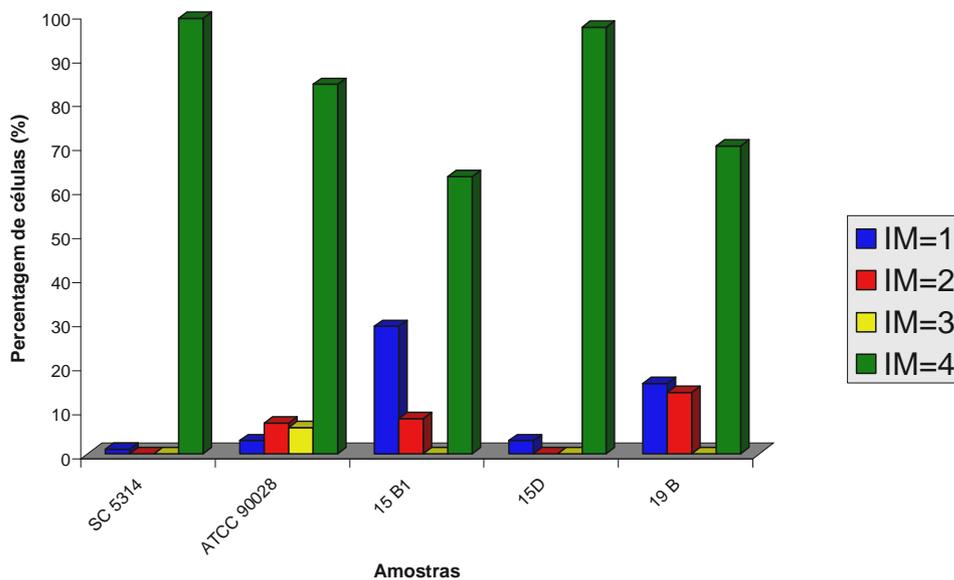
Formação de hifa em SBF a 37°C
(Paciente 3) Grupo I/Colonização



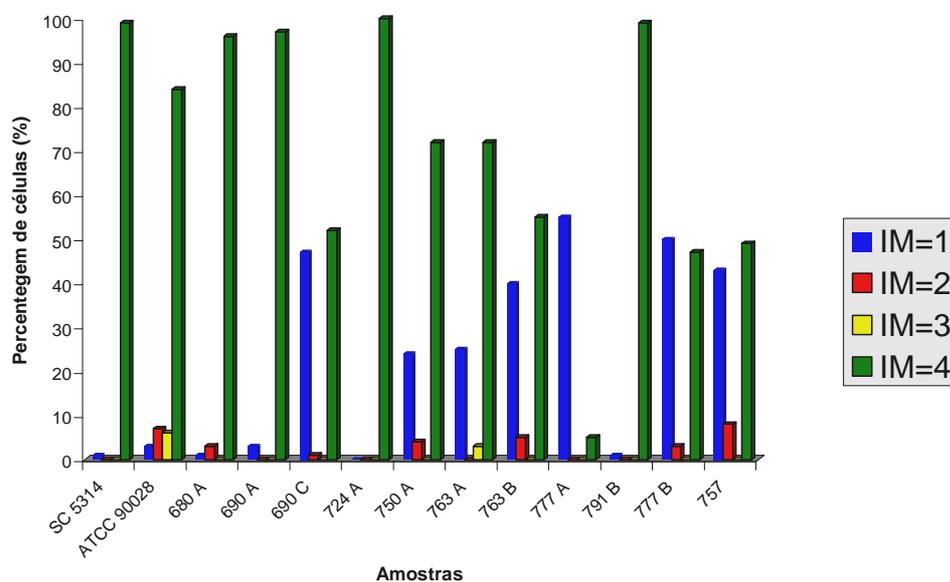
Formação de hifa em SFB a 37°C
(Paciente 4) Grupo II/Candidemia e alta



Formação de hifa em SFB a 37°C
(Paciente 5) Grupo II/Candidemia e alta



Formação de hifa em SFB a 37°C
(Paciente 6) Grupo II/Candidemia e alta



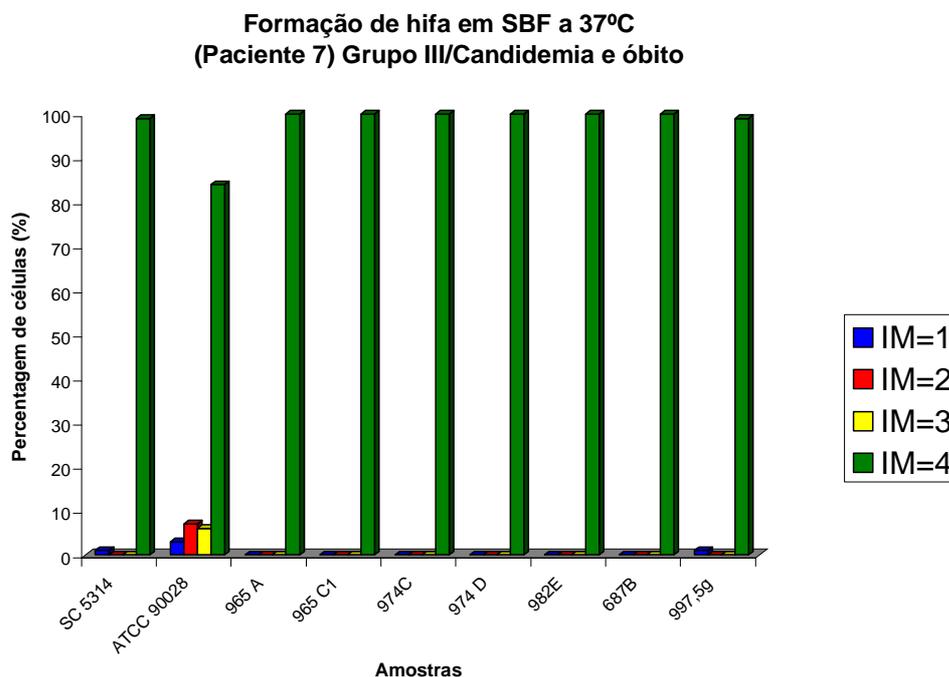


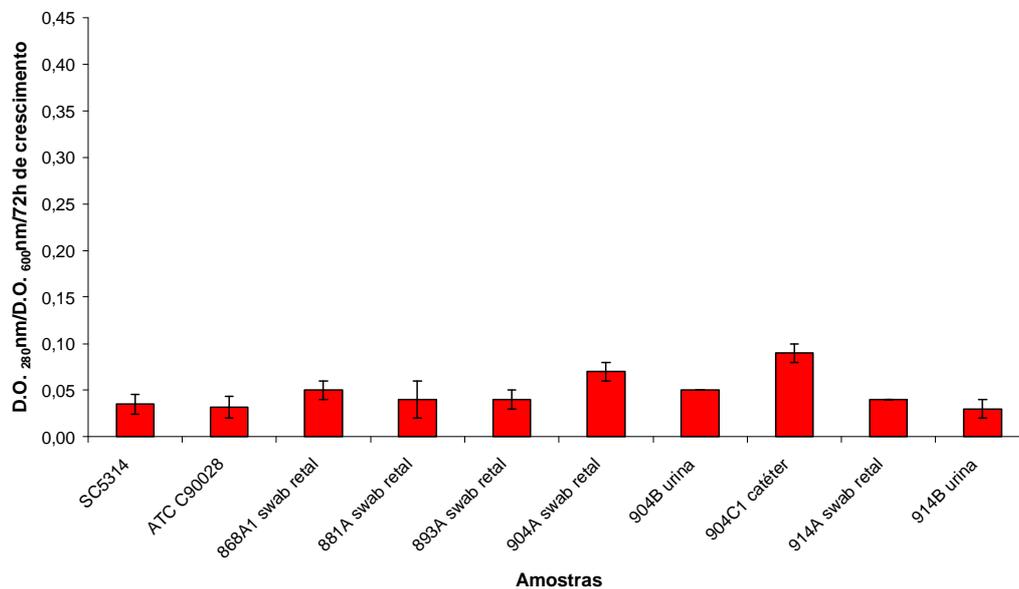
Figura 6. Determinação do índice de morfologia em isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia) após 3 h de incubação em SFB a 37 °C, 200 rpm. IM=1 blastosporos; IM=2 pseudo-hifas com até o dobro de sua largura em comprimento; IM=3 pseudo-hifas alongadas; IM=4 hifas verdadeiras

4.2.4 Determinação da produção de proteinase de *C. albicans*

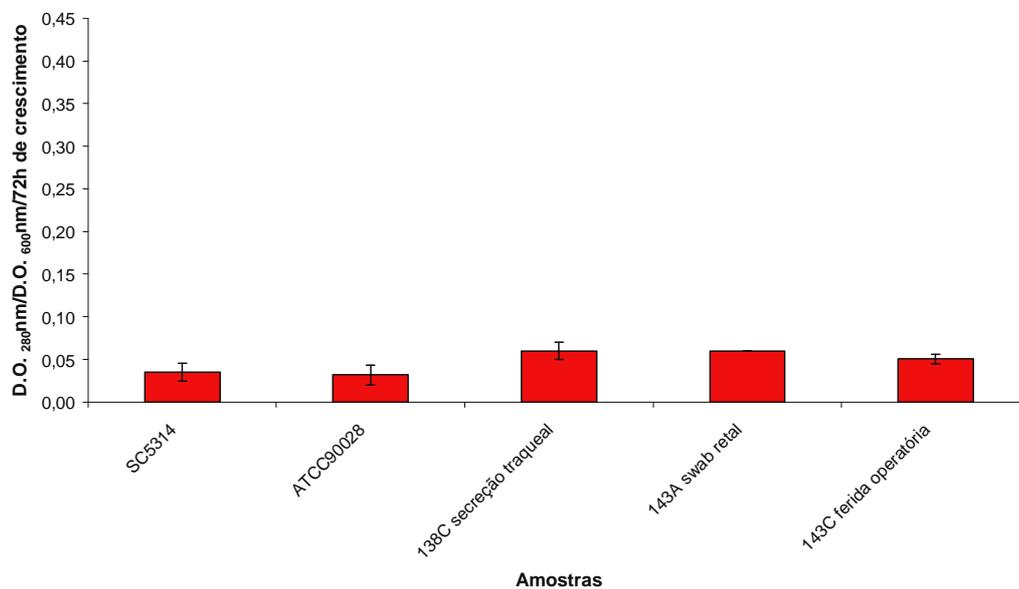
Para a indução de produção de proteinases dos isolados, células de *C. albicans* foram cultivadas em YCB+BSA durante 72h. Este meio de cultura apresenta albumina como única fonte de nitrogênio presente em sua composição. Foram quantificados os produtos solúveis dissolvidos em TCA resultantes da degradação de proteínas após período de incubação do sobrenadante das culturas em BSA preparado em tampão citrato pH 3,8 por 1h. A atividade de proteinase foi expressa em função do crescimento das culturas em YCB+BSA (DO_{600nm}).

As cepas controle ATCC90028 e SC5314 não apresentaram altos níveis de produção de proteinase quando comparadas com os outros isolados utilizados neste estudo (0,04 e 0,06 respectivamente). Na maioria das vezes, os isolados dos pacientes 1, 2 e 3, que representam o Grupo I, foram caracterizados como baixos produtores de proteinase, uma vez que obtiveram valores em torno de 0,05 (Fig. 7). Entre os pacientes do grupo que evoluiu com candidemia (Grupo II) foi possível verificar uma alta produção de proteinase para as cepas do paciente 4 ($p < 0,05$), onde a maioria dos isolados produziu mais que o dobro de proteinase que a cepa de referência SC 5314 (Fig. 7). Interessantemente, o paciente 7 (Fig. 7), único representante do Grupo III, apresentou valores elevados de atividade de proteinase e teve morte atribuída à candidemia, apesar de apresentar baixo APACHE II score ($p < 0,05$). Entretanto, os pacientes 5 e 6 (Fig. 7), que também evoluíram com candidemia, apresentaram baixa atividade de proteinase ($p < 0,05$), sugerindo que este fator não deve ser o único determinante na evolução clínica dos pacientes que apresentaram candidemia (Fig. 7).

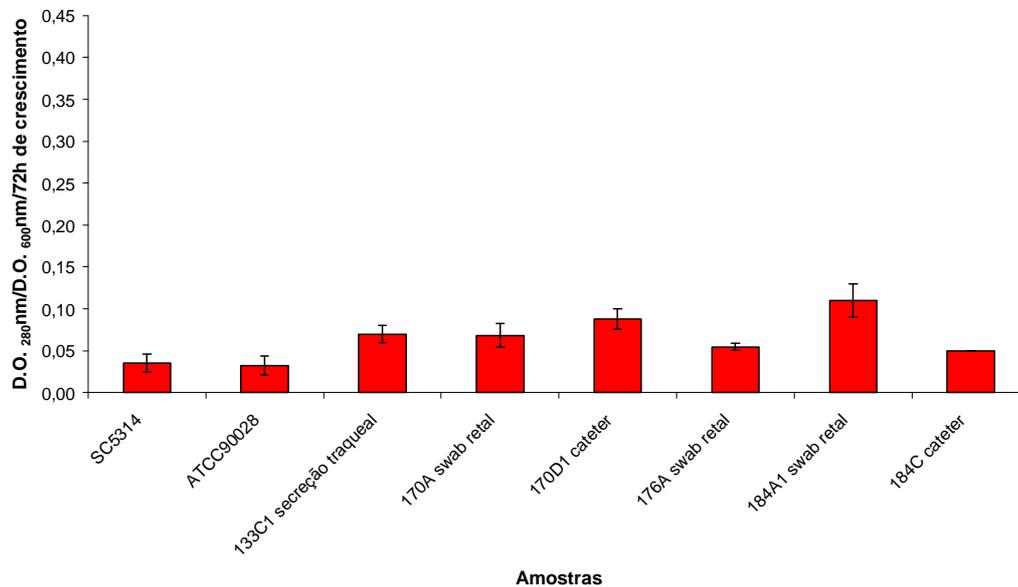
**Atividade de proteinase
(Paciente 1) Grupo I/Colonização**



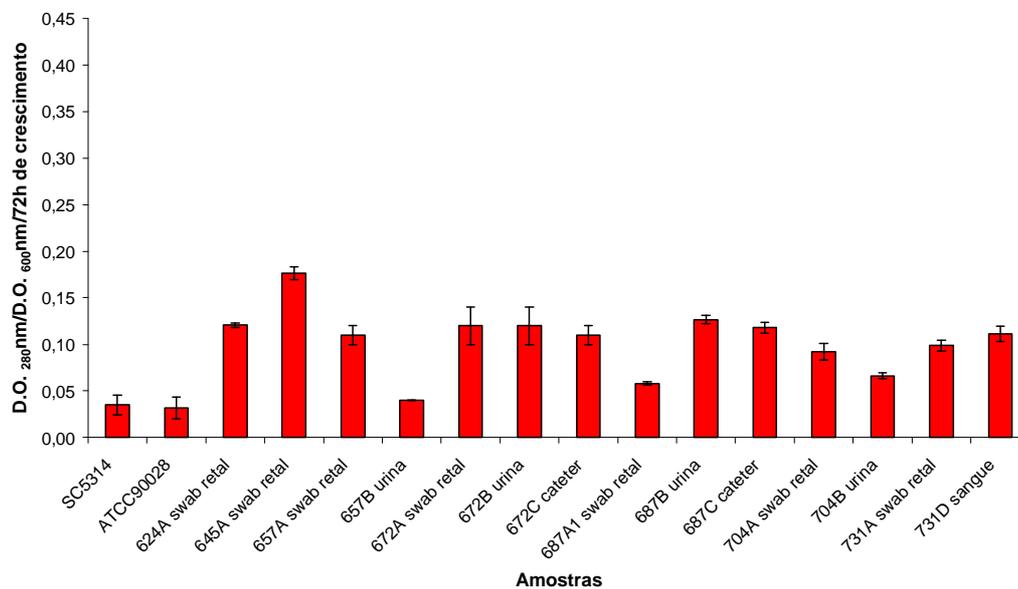
**Atividade de proteinase
(Paciente 2) Grupo I/Colonização**



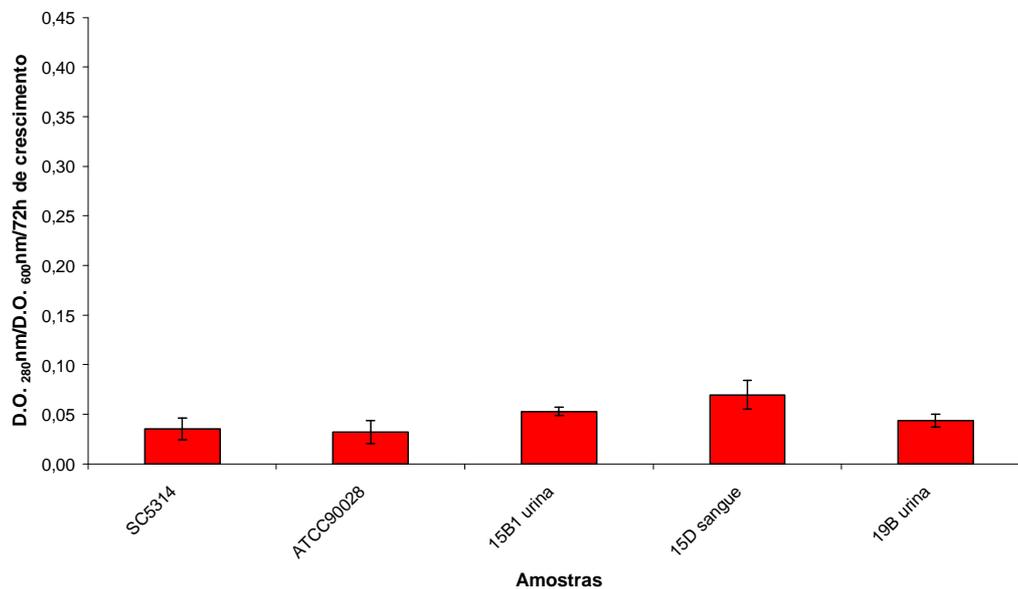
**Atividade de proteinase
(Paciente 3) Grupo I/Colonização**



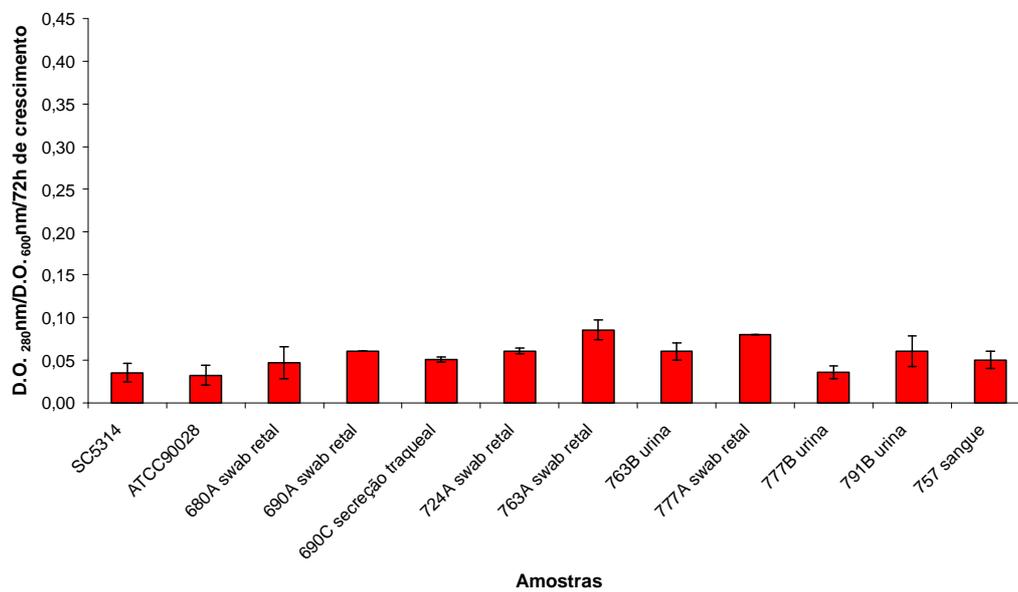
**Atividade de proteinase
(Paciente 4) Grupo II/Candidemia e alta**



**Atividade de proteinase
(Paciente 5) Grupo II/Candidemia e alta**



**Atividade de proteinase
(Paciente 6) Grupo II/Candidemia e alta**



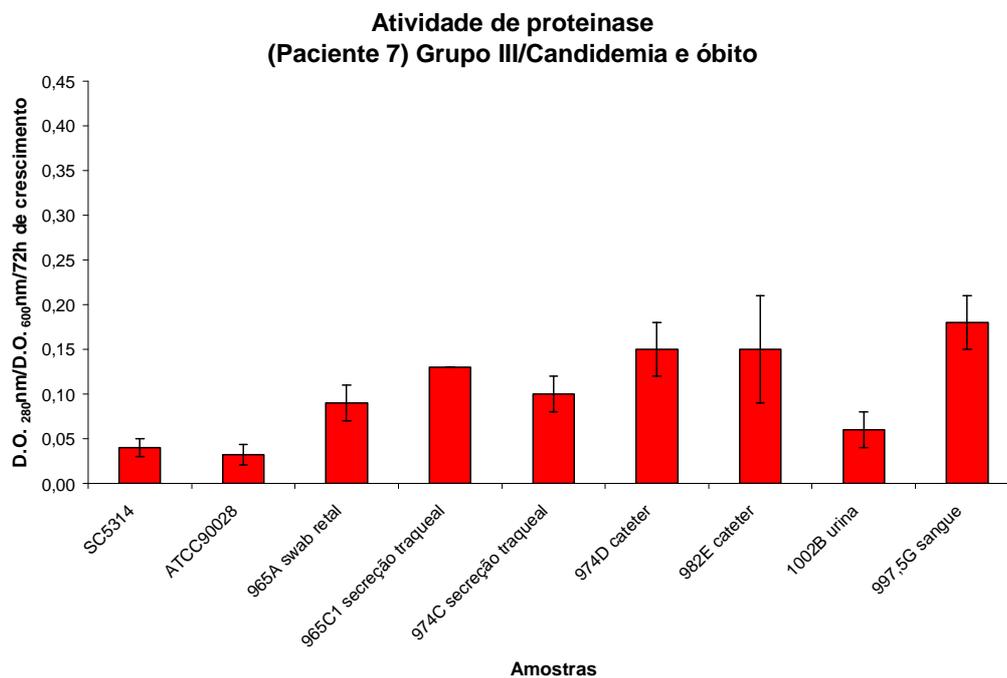


Figura 7. Atividade de proteinase de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia) com células crescidas em YCB+BSA por 72 h, 30 °C a 200 rpm. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. Os isolados dos pacientes dos 4 e 7 apresentaram maior atividade de proteinase que os pacientes 1, 2 e 3 (apenas colonizados) e 5 e 6 (com candidemia; $p \leq 0,05$).

4.2.5 Determinação da produção de fosfolipase em *C. albicans*

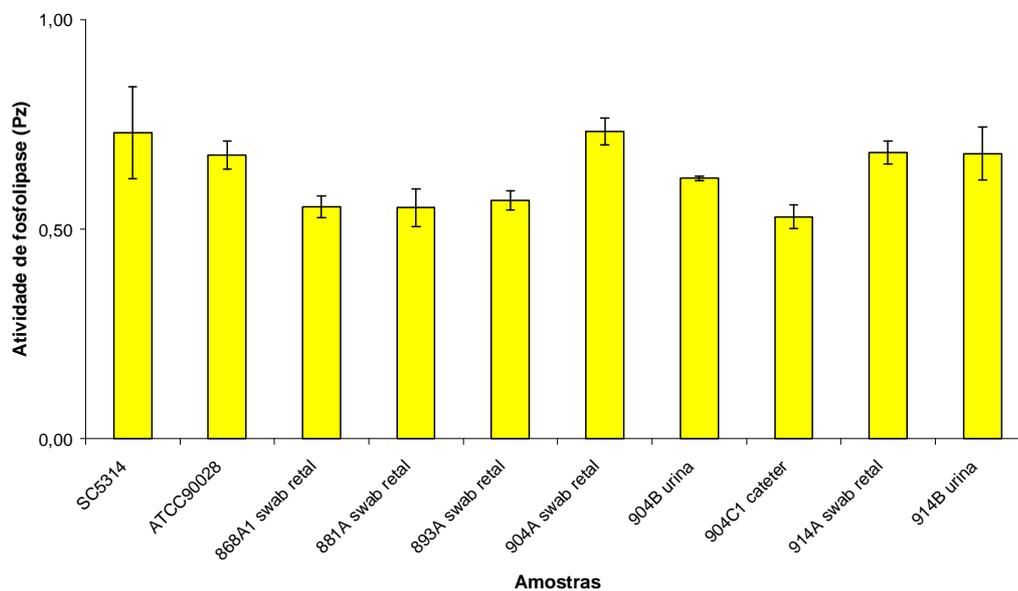
Para a indução da atividade de fosfolipase dos isolados do presente estudo as cepas foram crescidas em meio de agar fosfolipase, onde os fosfolídeos contidos na gema de ovo são degradados pela produção desta enzima pelas células de *C. albicans*, resultando em ácidos graxos. Os ácidos graxos formam um complexo de precipitação com o cálcio também presente no referente meio de cultura, resultando em um halo ao redor da colônia. Quando os halos de precipitação são medidos, valores de $P_z = 1$ ou muito próximos a 1 indicam atividade de fosfolipase negativa. Valores mais baixos indicam alta produção de fosfolipase (Fig. 8).



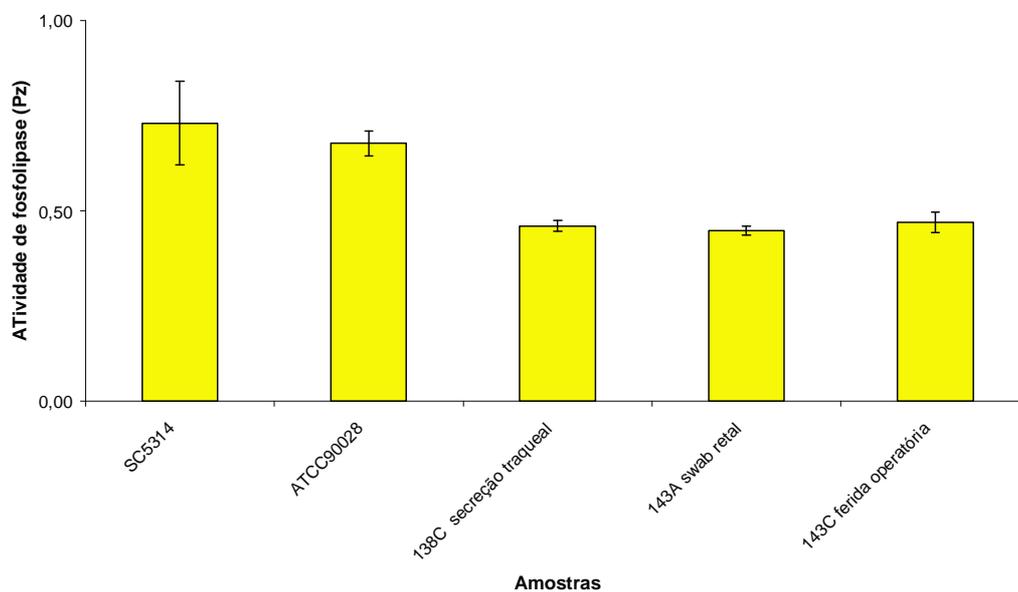
Figura 8. Atividade de fosfolipase de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização) após 72 h de incubação a 30 °C. As setas representam a produção de fosfolipase em determinada cepa em triplicata. A ausência de halo indica produção de fosfolipase negativa.

A produção de fosfolipase foi regular e substancial em 6 dos 7 pacientes avaliados, independente se colonizados ou com candidemia, sugerindo a importância da produção desta enzima tanto na sobrevivência dos isolados comensais no microambiente humano (uma vez que esse microorganismo faz parte da microbiota normal), tanto quanto na invasão e degradação dos fosfolipídios dos tecidos infectados. Vale mencionar que, os isolados dos pacientes 4 e 7 mantiveram um perfil homogêneo e similar da expressão de todos os fatores de virulência avaliados, à exceção do ensaio de fosfolipase. Sob estas condições de crescimento, a maioria dos isolados do paciente 4 apresentou atividade de fosfolipase negativa ($p < 0,05$). A partir disso, podemos estabelecer um paralelo com o desfecho clínico deste paciente, uma vez que o mesmo, após desenvolver infecção invasiva, evoluiu com alta, diferentemente do paciente 7, que apesar das melhores condições de saúde (APACHE II score mais baixo), foi a óbito, sugerindo um importante papel desta enzima hidrolítica no sucesso da infecção (Fig. 9).

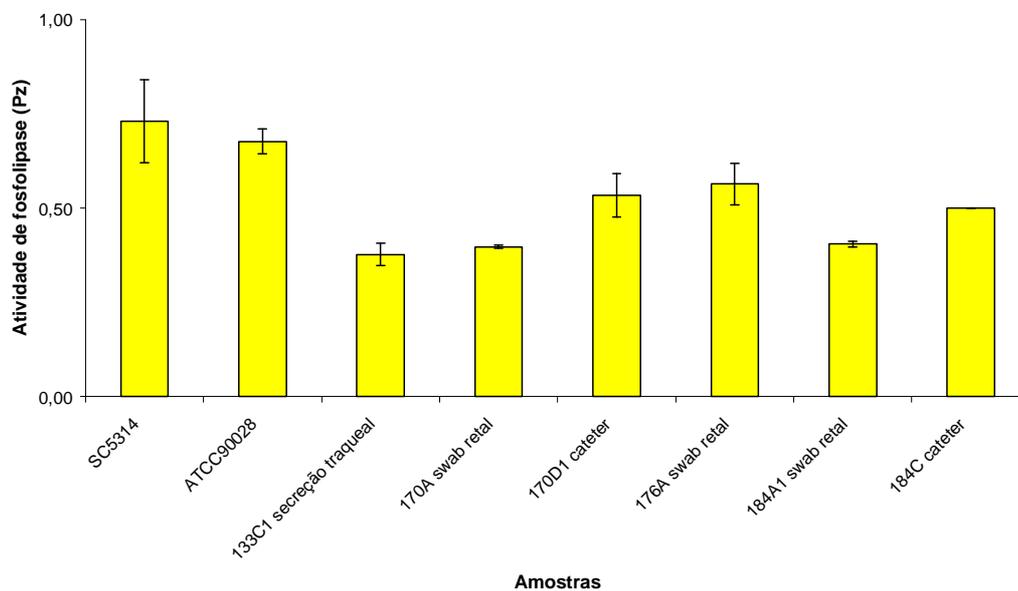
**Atividade de fosfolipase
(Paciente 1) Grupo I/Colonização**



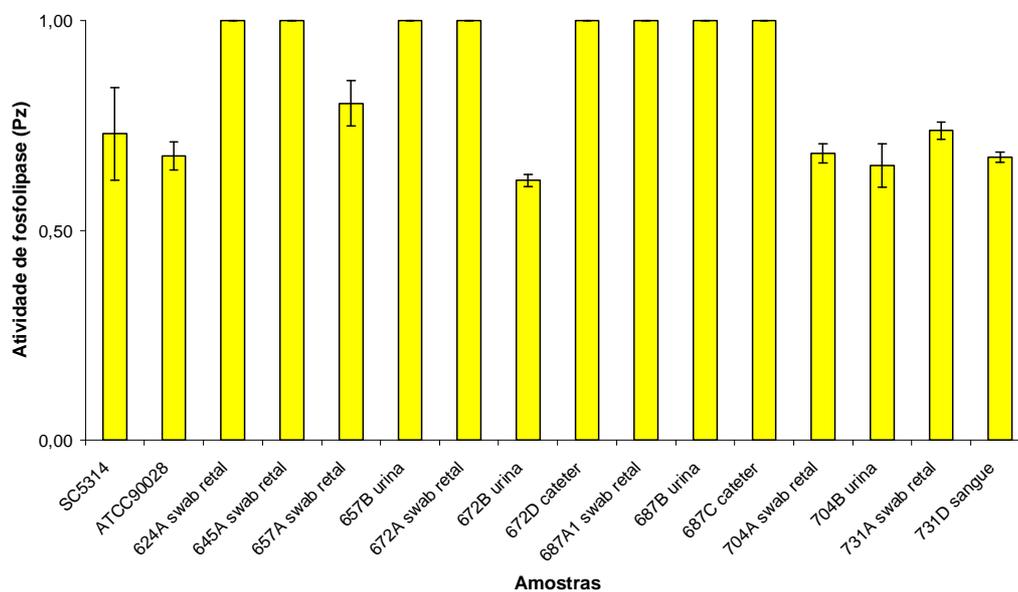
**Atividade de fosfolipase
(Paciente 2) Grupo I/Colonização**



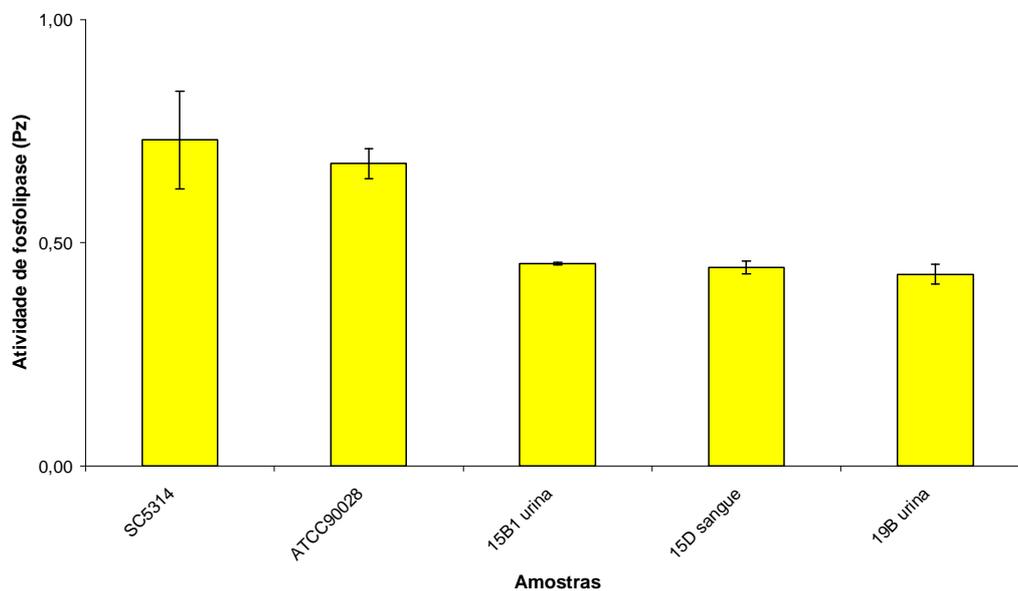
**Atividade de fosfolipase
(Paciente 3) Grupo I/Colonização**



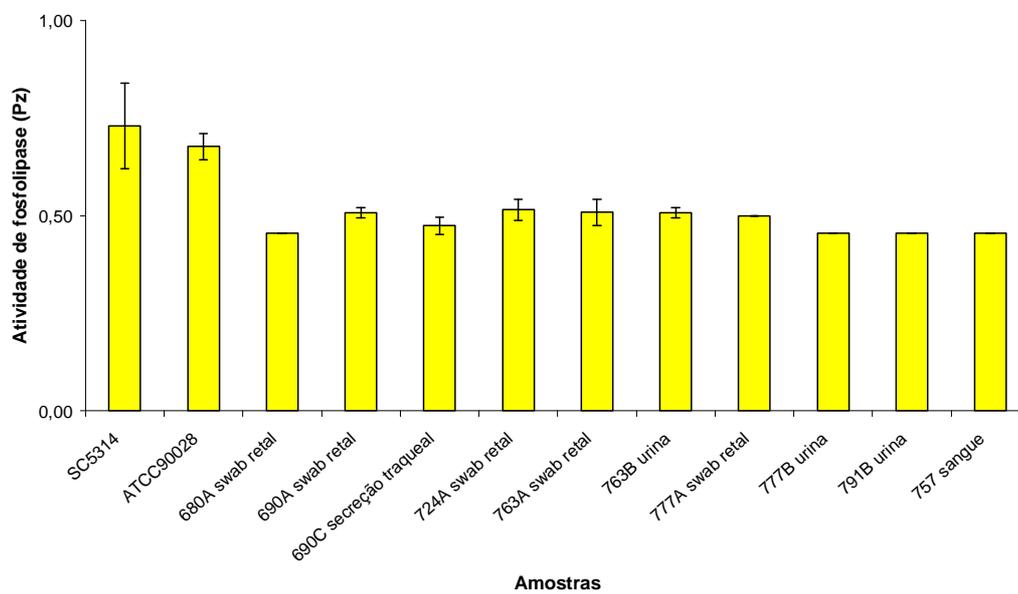
**Atividade de fosfolipase
(Paciente 4) Grupo II/Candidemia e alta**



**Atividade de fosfolipase
(Paciente 5) Grupo II/Candidemia e alta**



**Atividade de fosfolipase
(Paciente 6) Grupo II/Candidemia e alta**



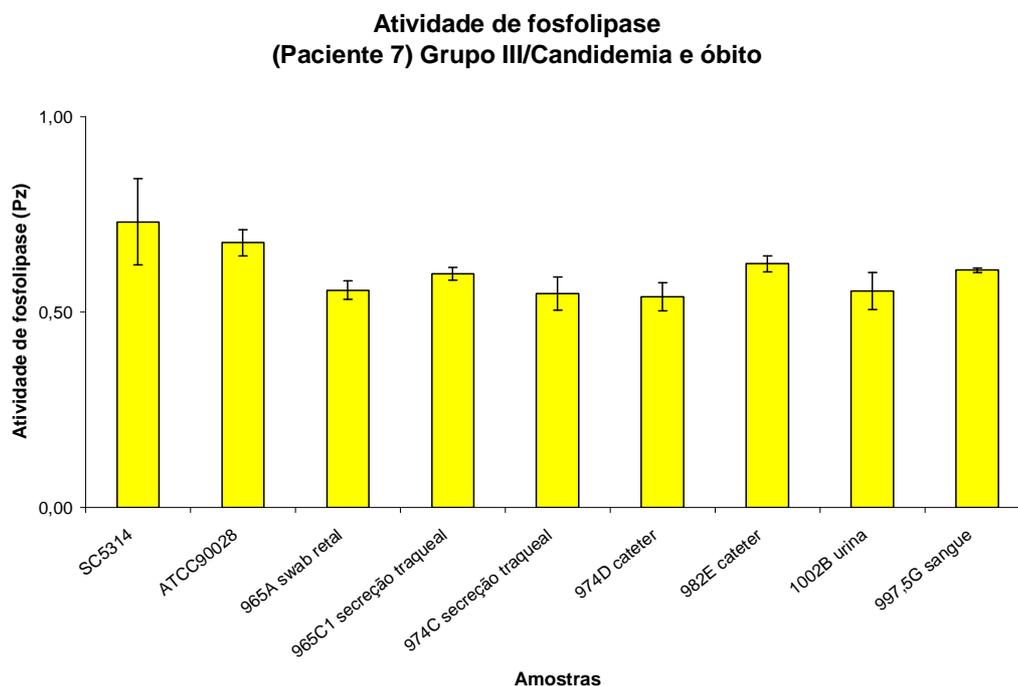


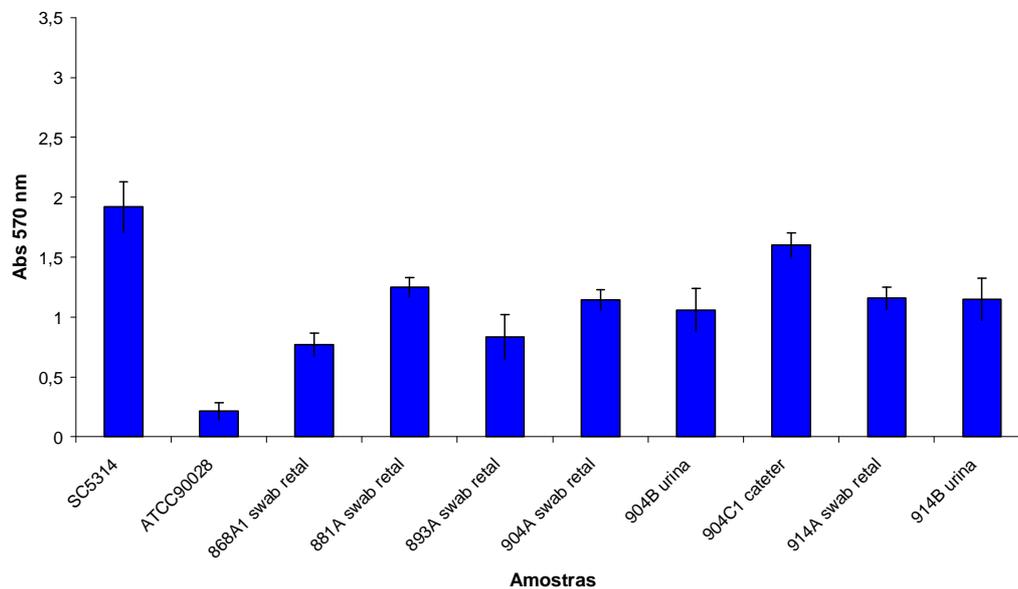
Figura 9. Atividade de fosfolipase de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia) após 72 h de incubação a 30 °C. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. Os isolados do paciente 4 apresentaram menor atividade de fosfolipase que os isolados dos pacientes 1, 2 e 3 (apenas colonizados) e 5, 6 e 7 (com candidemia; $p \leq 0,05$).

4.2.6 Avaliação da formação de biofilme em *C. albicans*

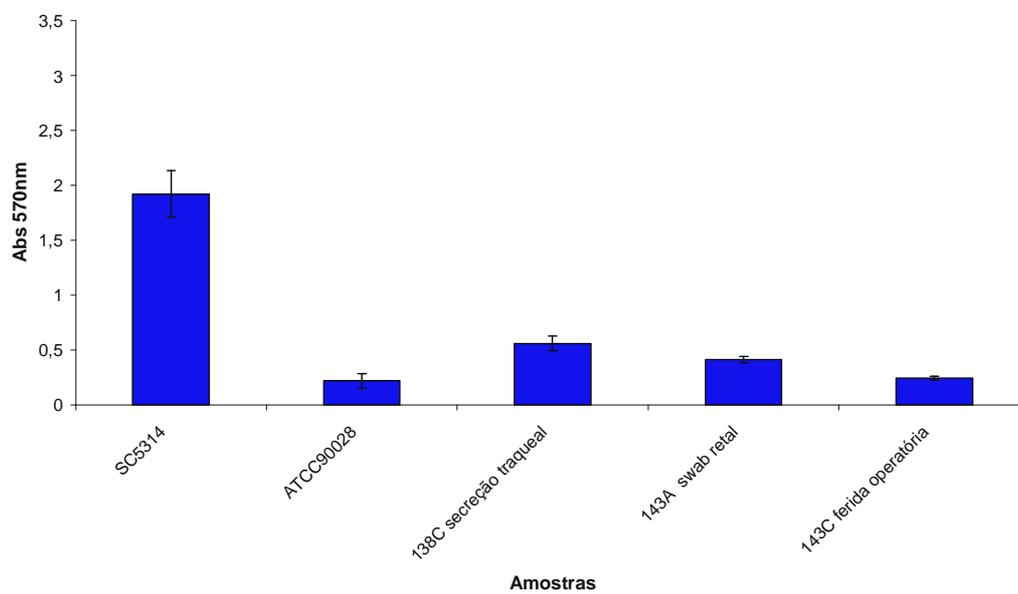
A formação de biofilme foi avaliada para todas as cepas de *C. albicans* selecionadas para este estudo, utilizando-se uma adaptação da metodologia preconizada por Jin *et al.* (2003). A formação do biofilme foi induzida em placas de poliestireno a 37°C por 48 horas. Após a fase de adesão das células à placa, as mesmas foram lavadas com o intuito de retirar células não aderidas. Subsequentemente, foi realizada a coloração do biofilme maduro com cristal violeta e posterior descoloração com álcool 95°. Esta solução alcoólica teve sua D.O., a um comprimento de onda de 570nm,

medida como forma de quantificar indiretamente a biomassa presente no biofilme. Foi possível verificar no Grupo I (pacientes 1, 2 e 3 que apenas foram colonizados por *C. albicans*) uma variável habilidade quanto à capacidade de formação de biofilme. As cepas isoladas do paciente 2 apresentaram formação de biofilme estatisticamente significante mais baixa que as cepas dos pacientes 1 e 3 (Figs. 22 e 23; $p \leq 0,05$). Quando observados os resultados dos pacientes que evoluíram com candidemia, é possível verificar uma maior capacidade de formação de biofilme nos isolados dos pacientes 4 e 7, quando comparados aos pacientes 5 e 6, caracterizados como baixos produtores de biofilme (Figs. 23, 24 e 25; $p \leq 0,05$), seguindo a tendência observada para os demais fatores de virulência (atividade de proteinase e formação de tubo germinativo) para estes dois pacientes.

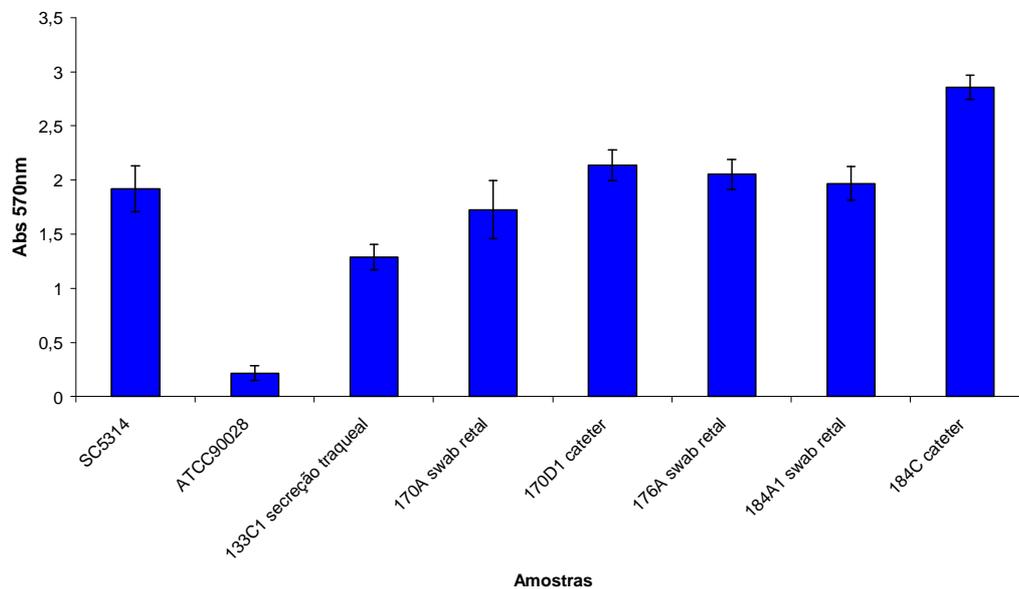
**Produção de biofilme
(Paciente 1) Grupo I/Colonização**



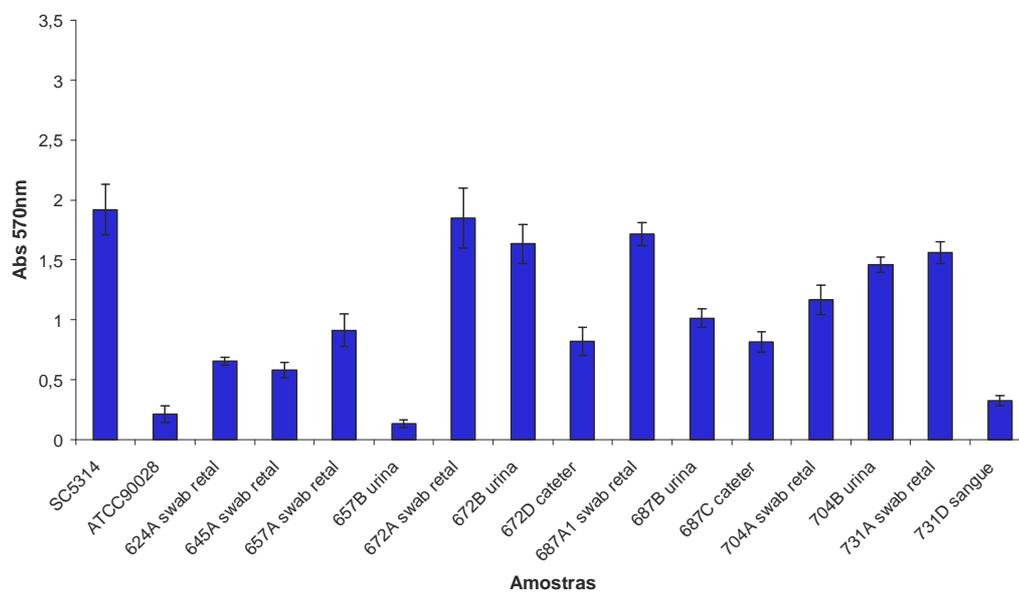
**Produção de biofilme
(Paciente 2) Grupo I/Colonização**



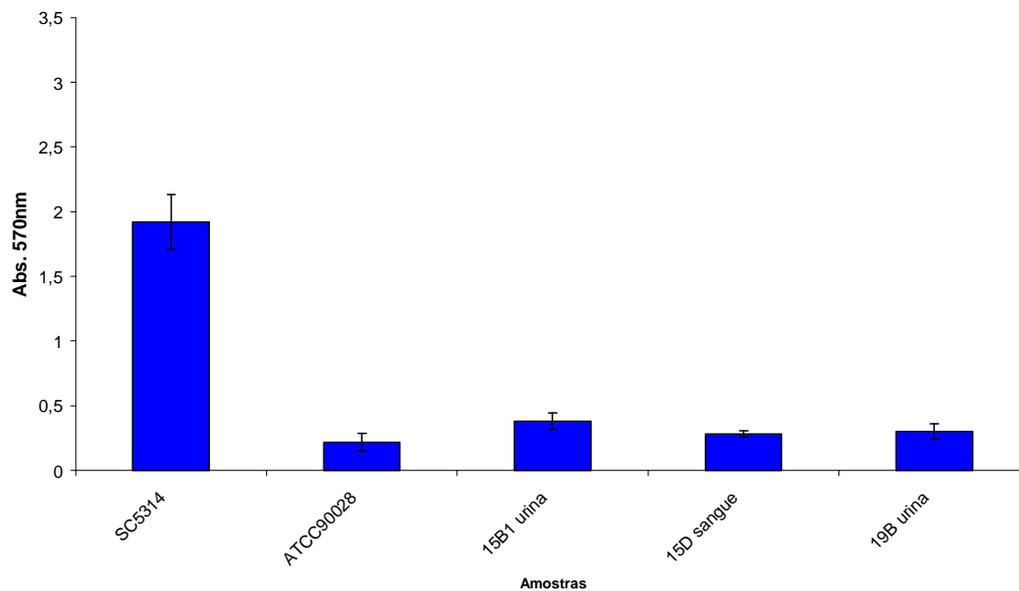
**Formação de biofilme
(Paciente 3) Grupo I/Colonização**



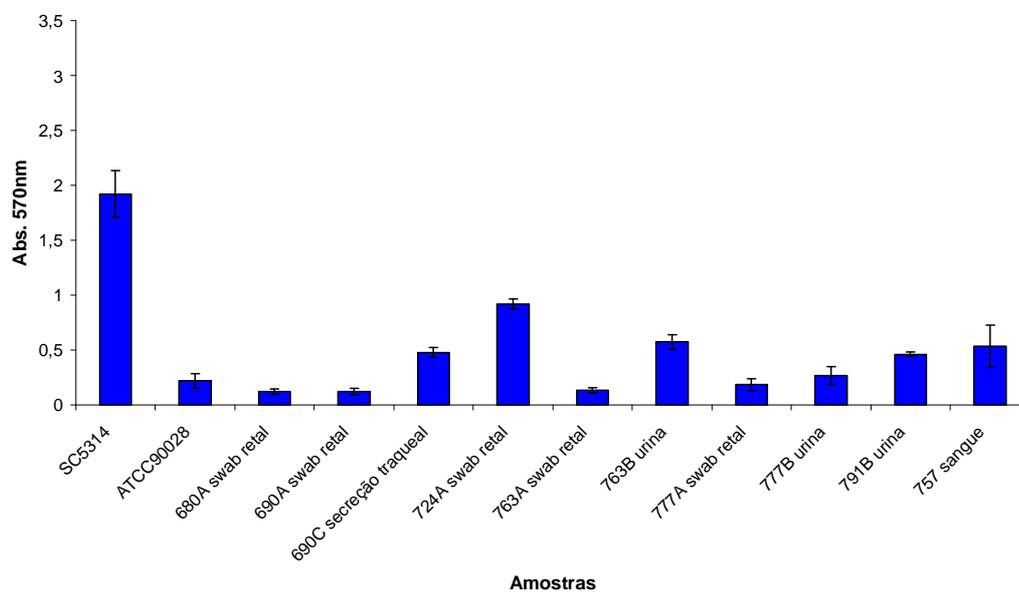
**Formação de biofilme
(Paciente 4) Grupo II/Candidemia e alta**



**Formação de biofilme
(Paciente 5) Grupo II/Candidemia e alta**



**Formação de biofilme
(Paciente 6) Grupo II/Candidemia e alta**



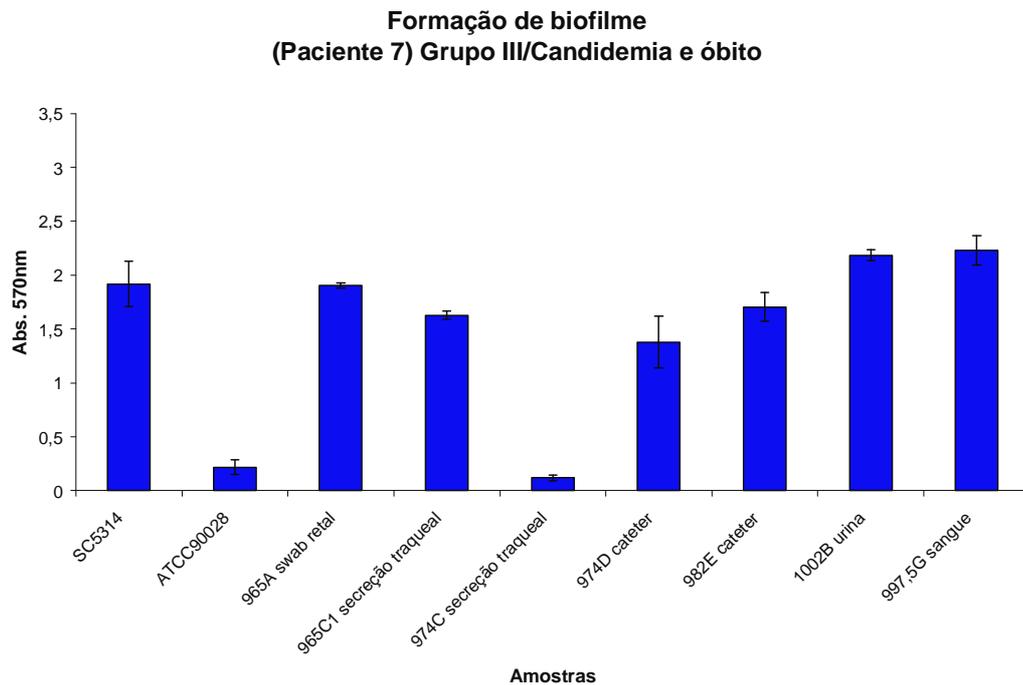


Figura 10. Produção de biofilme avaliada em isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia). Aplicação da técnica de coloração pelo cristal violeta. As barras representam o desvio padrão do ensaio realizado em quintuplicata. Os isolados do paciente 2 (apenas colonizado) apresentaram baixa formação de biofilme quando comparados aos isolados dos pacientes 1 e 3 (apenas colonizados; $p \leq 0,05$) e os isolados dos pacientes 4, 5, 6 e 7 (com candidemia; $p \leq 0,05$).

A tabela 3 estabelece uma comparação das propriedades fenotípicas de todos os isolados frente aos ensaios realizados com a cepa de referência de expressão de fatores de virulência, SC5314. Em geral, dentro dos grupos propostos de acordo com o desfecho clínico do paciente, houve grande variabilidade nos resultados obtidos, não sendo possível estabelecer uma correlação direta entre todos os fatores avaliados e o desfecho clínico dos pacientes.

Tabela 3. Resumo das propriedades fenotípicas de todos os isolados em estudo comparadas com a cepa de referência SC5314

Paciente	Aderência à CEBH	Formação de hifa	Atividade de proteinase	Atividade de fosfolipase	Formação de biofilme
Paciente 1 (Colonização)	Média a alta	Média a alta	Baixa a média	Alta	média a alta
Paciente 2 (Colonização)	Média	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Paciente 3 (Colonização)	Baixa	Média a alta	Baixa a média	Alta	Alta
Paciente 4 (Candidemia e ALTA)	Média a alta	Média a alta	Média a alta	Baixa a média	média a alta
Paciente 5 (Candidemia e ALTA)	Média	Média a alta	Baixa	Alta	Baixa
Paciente 6 (Candidemia e ALTA)	Baixa a média	Baixa, média e alta	Baixa a média	Média a alta	Baixa
Paciente 7 (Candidemia e MORTE)	Média a alta	Alta	Média a alta	Alta	Média a alta

A tabela 4 apresenta os resultados das cepas isoladas de sítios colonizados de todos os pacientes independente se evoluíram ou não com candidemia frente aos testes realizados em comparação com o organismo-controle SC5314. É possível verificar que os isolados de colonização dos pacientes 4 (Grupo II, candidemia/alta) e 7 (Grupo III, candidemia/óbito) apresentam um perfil homogêneo de alta expressão de todos os fatores de virulência avaliados à alguns dos isolados do paciente 4, com baixa atividade de fosfolipase.

Tabela 4. Resumo das propriedades fenotípicas dos isolados apenas de **colonização** de todos os pacientes, independente do desfecho clínico, comparadas à SC5314.

Paciente	Aderência à CEBH	Formação de hifa	Atividade de proteinase	Atividade de fosfolipase	Formação de biofilme
Paciente 1	Média a alta	Média a alta	baixa	Alta	Média
Paciente 2	Média	alta	baixa	Alta	Baixa
Paciente 3	Baixa	Média a alta	baixa	Alta	Alta
Paciente 4	Média a alta	Alta	média a alta	Média a baixa	Alta
Paciente 5	Média	Média a alta	baixa	Alta	Baixa
Paciente 6	Baixa a média	Média	baixa	Alta	Baixa
Paciente 7	média	Alta	alta	Alta	Alta

Uma análise dos resultados expressos pelos isolados de sangue dos pacientes dos grupos II e III (candidemia/alta e candidemia/óbito, respectivamente) são demonstrados na tabela 5. Neste cenário, fica evidente à exacerbada expressão de todos os fatores de virulência na cepa de sangue do único paciente que teve mortalidade atribuída à candidemia (paciente 7).

Tabela 5. Resumo das propriedades fenotípicas dos isolados de **sangue** (Candidemia e alta vs. Candiemia e óbito) comparadas à SC5314.

Paciente	Aderência à CEBH	Formação de hifa	Atividade de proteinase	Atividade de fosfolipase	Formação de biofilme
Paciente 4 (731 D)	Média	Alta	Média	Média	Baixa
Paciente 5 (15D)	Média	Média	Baixa	Alta	Baixa
Paciente 6 (757)	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Baixa
Paciente 7 (997,5G)	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta

4.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme a norma de padronização publicada no documento M27-A2 pelo CLSI (2008). Além dos isolados clínicos avaliados neste estudo, organismos controle de *C. parapsilosis*, ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídos em cada dia de experimento, uma vez que as CIMs apresentadas por estas cepas frente aos antifúngicos testados são previamente conhecidas. Foram utilizados os antifúngicos: fluconazol (Pfizer Incorporated, New York, NY. EUA), 5-fluorocitosina (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, EUA), anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA), caspofungina (Merck, Rahway, N.J., EUA) e anidulafungina (Pfizer Incorporated, New York, N.Y. EUA).

Para a anfotericina B, nenhuma cepa apresentou valores de CIM superiores a 0,25 µg/mL, sendo as mesmas, portanto, sensíveis a essa droga. Quando testadas ao fluconazol, as cepas tiveram valores de CIMs $\leq 0,5$ µg/mL e foram classificadas como sensíveis. Em relação ao itraconazol, todos os isolados foram inibidos por valores de CIM $\leq 0,06$ µg/mL. Frente ao antifúngico 5-fluorocitosina, os isolados apresentaram-se com valores de CIM que variaram de 0,125 a 4 µg/mL caracterizando-se como sensíveis, a exceção do isolado 170 A, isolado de swab retal, que apresentou-se com susceptibilidade dose dependente (CIM = 8 µg/mL)

Apesar de não existir consenso sobre relevância clínica de breakpoint para a caspofungina e anidulafungina, observou-se que as cepas de *C. albicans*

apresentaram CIMs variando de 0,125 a 0,5 µg/mL e de 0,06 µg/mL, respectivamente. A tabela 3 ilustra a sensibilidade encontrada para todos os isolados testados.

A Tabela 6 ilustra os valores das CIMs para todas as drogas testadas (fluconazol, 5-fluorocitosina, itraconazol, anfotericina B, caspofungina e anidulafungina), e seus respectivos CIM50 (concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas) e CIM90 (concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas).

Tabela 6. Valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) apresentadas pelos isolados clínicos testados

Droga	Nº de isolados	Variação da CIM		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Sensibilidade %
		(µg/µL)				
Fluconazol	53	0,125-0,5		0,125	0,25	100
Anfotericina B	53	0,03-0,25		0,125	0,25	100
5-Fluorocitosina	53	0,125-8		0,5	2	98
Itraconazol	53	0,03		0,03	0,03	100
Caspofungina	53	0,125-0,25		0,125	0,125	100
Anidulafungina	53	0,06		0,06	0,06	100

Ao longo do estudo de coorte longitudinal, não foram observadas quaisquer diferenças no padrão de susceptibilidade das cepas inicialmente isoladas de episódios de colonização quando comparadas àquelas isoladas do episódio de candidemia. Não houve diferença de susceptibilidade entre cepas relacionadas à candidemia em pacientes que tiveram alta hospitalar quando comparadas ao paciente que evoluiu a óbito.

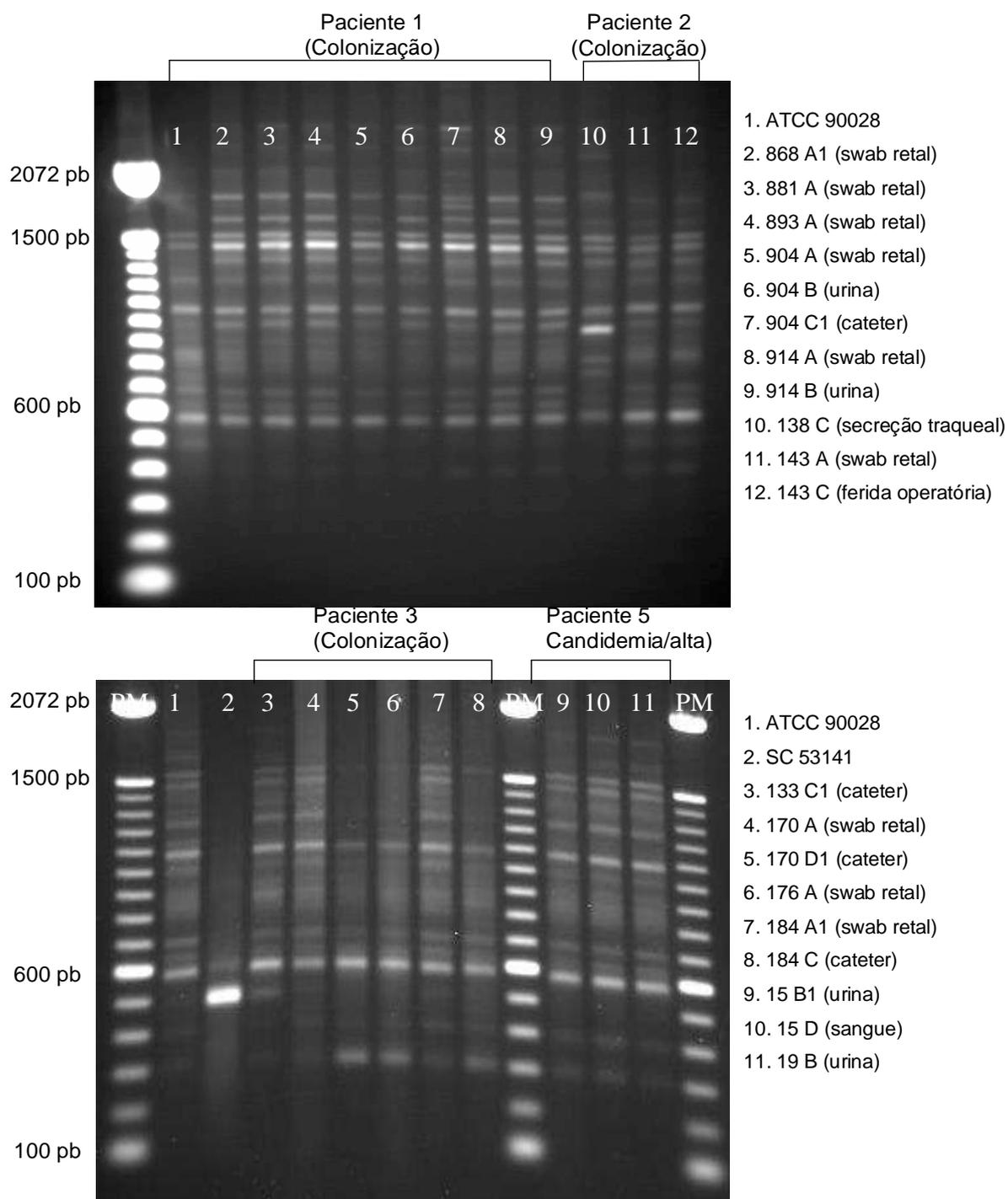
4.4 Avaliação genotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência

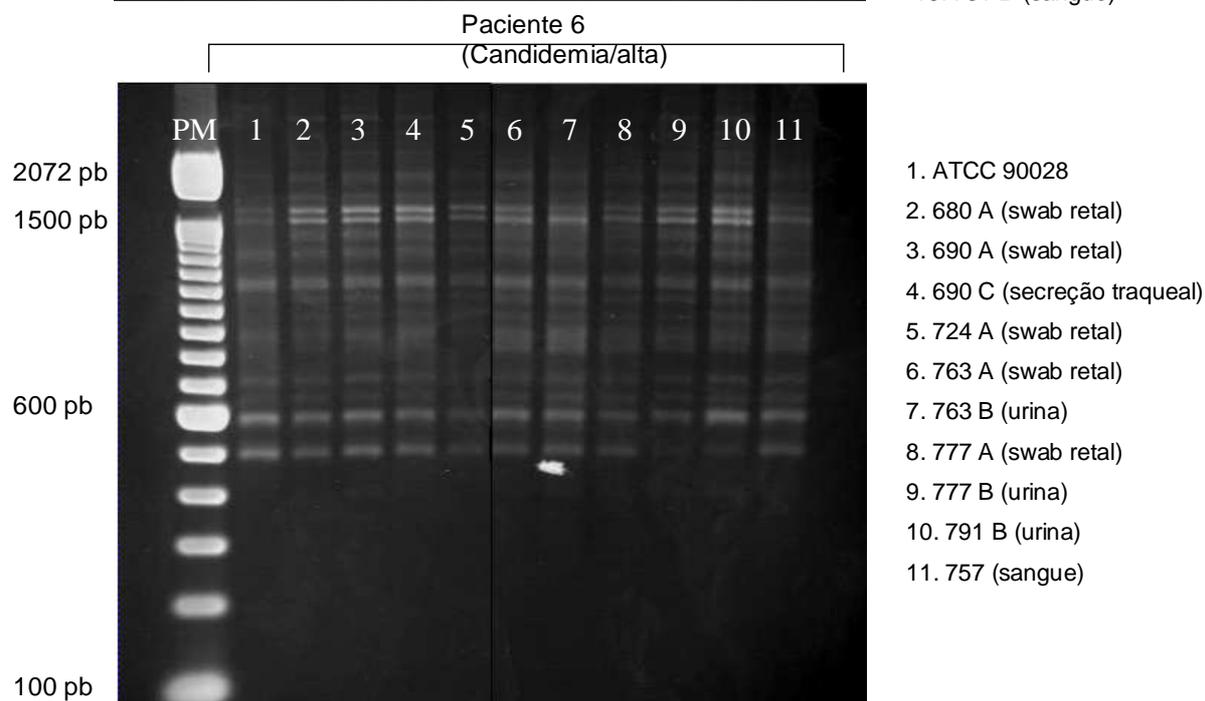
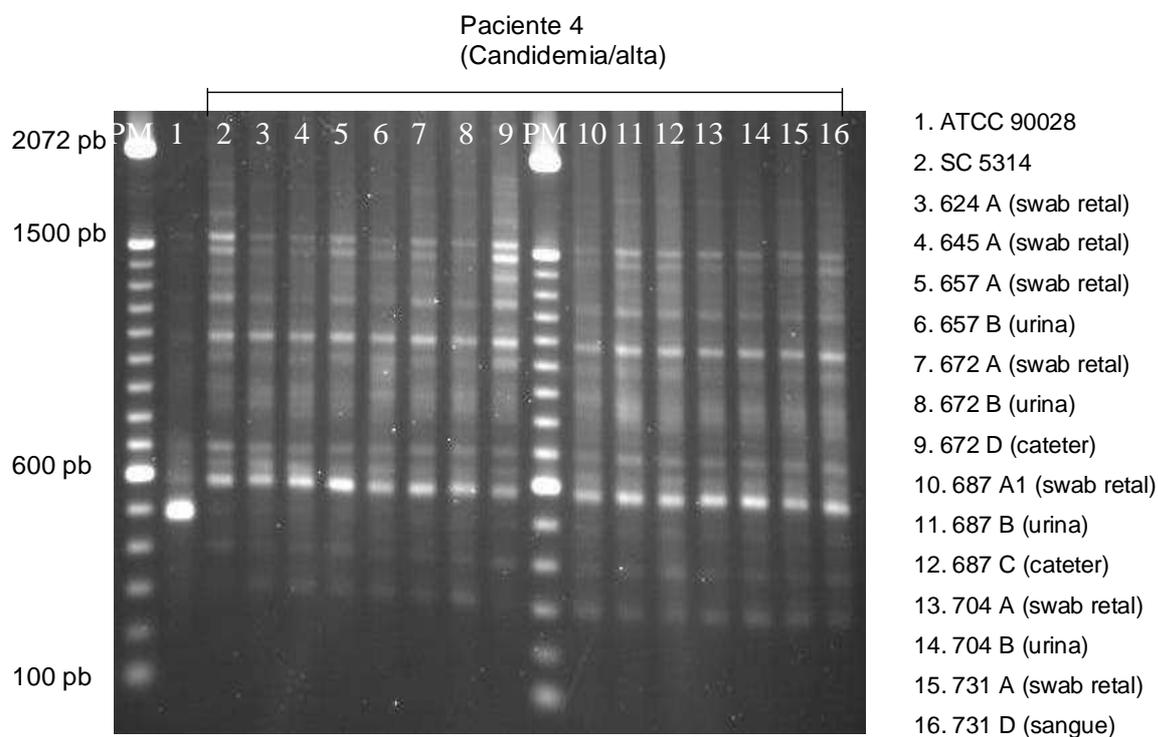
4.4.1 Genotipagem por microssatélites

O DNA genômico de todas as cepas foi amplificado com o “primer” M13 direcionado a seqüências de microssatélite repetitivas do genoma. A amplificação gerou padrão de bandas característicos e suficientemente discriminatórios intra-especificamente quando observados visualmente (Fig. 11), bem como houve um satisfatório agrupamento das cepas geneticamente relacionadas dos diferentes pacientes por análise de dendrograma (Fig. 12). Além disso, as cepas controle SC5314 e ATCC90028 foram agrupadas em clusters totalmente distintos, confirmando o poder discriminatório da técnica (Fig. 12).

Os resultados finais obtidos com essa técnica comprovam que cada paciente foi colonizado por um conjunto de cepas muito provavelmente de origem endógena (Fig. 11). Observou-se também que ocorre uma maior variabilidade genética entre os isolados dos pacientes que apenas foram colonizados por *C. albicans*, como é o caso do isolado 138 C de secreção traqueal, que apresentou um perfil genotípico visual bastante distinto em comparação com os isolados 143 A (swab retal) e 143 C (ferida operatória; paciente 2). A mesma tendência pode ser observada no paciente 3, onde claramente dois genótipos distintos podem ser visualizados. Ainda avaliando os pacientes apenas colonizados, observamos também um perfil genotípico distinto para a cepa 904C1, isolada de ponta de cateter, quando comparado com os demais isolados (Fig. 11).

Entretanto, quando observados os perfis genotípicos dos isolados dos pacientes que foram previamente colonizados por *C. albicans* e tiveram candidemia como evolução clínica, foi possível observar visualmente que os perfis genotípicos não variavam de maneira expressiva, sendo na maioria das vezes indistinguíveis visualmente (Fig. 11).





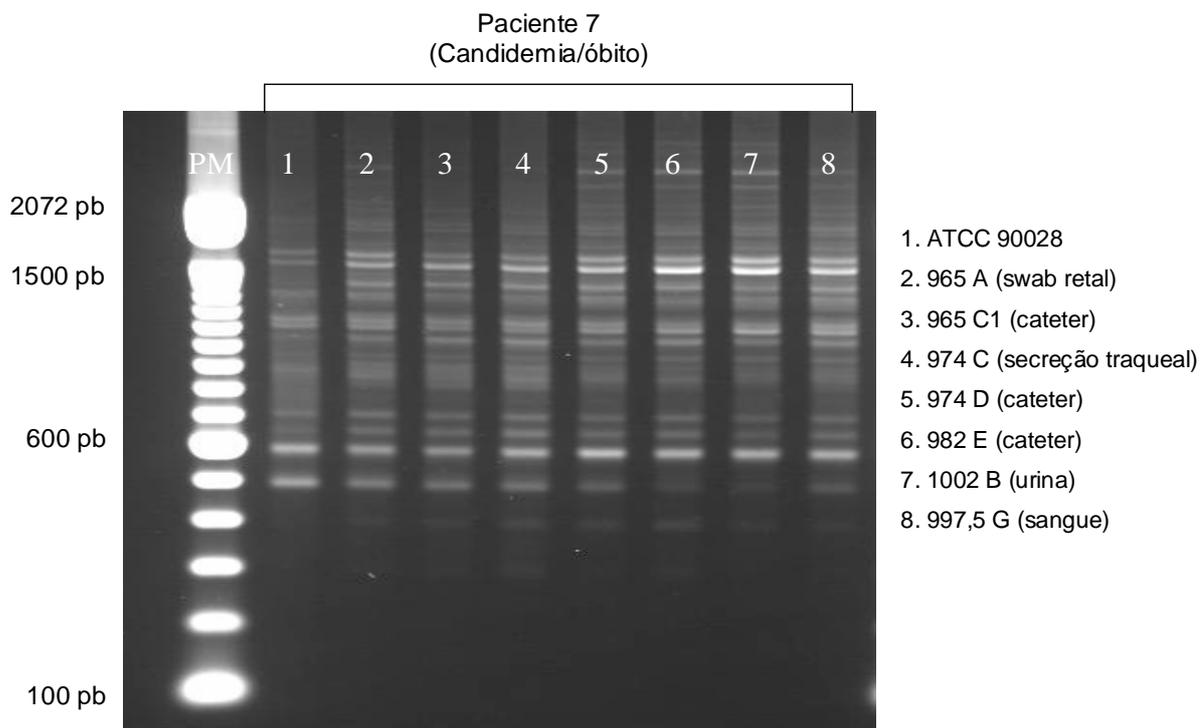


Figura 11. Genotipagem por microsatélite de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia). PM= Marcador de peso molecular. Os demais números correspondem ao número de depósito no banco de microorganismos no LEMI.

Com a análise de dendrograma gerado pela análise das bandas amplificadas pelo Programa GELCOMPARE II, confirmou-se ainda mais os achados anteriores. Tornou-se claro que a partir de uma análise quantitativa do relacionamento genético desses isolados, é possível inferir que nos pacientes que foram apenas colonizados e que não desenvolveram candidemia ocorre uma expressiva variabilidade de genótipos das cepas, sugerindo substituição de cepa e microevolução. Enquanto que a maioria dos isolados seqüenciais do paciente 1 (linha rosa) apresentaram-se idênticas (similaridade de 100%) pelas análises do dendrograma gerado, o isolado 904 C1,

encontra-se localizado em cluster distinto dos demais isolados, confirmando os achados observados visualmente da análise do gel de agarose. No paciente 2 (linha azul claro), o isolado 138 C de secreção traqueal, que apresentou um perfil genotípico observado visualmente bastante distinto em comparação com os isolados idênticos 143 A (swab retal) e 143 C (secreção traqueal), também se posicionou em um cluster distinto. Esta tendência é ainda mais notória perante os isolados do paciente 3 (linha laranja), onde alguns isolados são considerados até 62% dissimilares, sendo posicionados no dendrograma em clusters altamente distintos. Neste paciente, apenas dois isolados 170 A e 174 A1 (ambos de swab retal) foram considerados idênticos (100% de similaridade; Fig. 12).

Com relação aos pacientes que foram colonizados por *C. albicans* e desenvolveram candidemia, o paciente 4 (linha azul escura) foi o que apresentou uma maior variabilidade genética no perfil de cepas colonização por esta espécie. Seus isolados apresentaram cerca de 85% de similaridade, sugerindo que os mesmos também sofreram microevoluções ao longo do período de internação deste paciente. Entretanto, pode-se observar que o isolado que causou candidemia neste paciente (731 D) apresentou 100% de similaridade com o isolado de colonização de urina 704 B, sugerindo que a cepa que infecta é a mesma que previamente coloniza.

No paciente 5 (linha amarela), que apenas foi colonizado por dois isolados de *C. albicans*, o isolado de sangue 15 D também foi considerado altamente relacionado (acima de 96%) com os isolados colonizantes 19 B e 15 B1, que apresentaram 100% de similaridade.

No pacientes 6 (linha vermelha), a mesma tendência foi observada. Apesar de os isolados de colonização terem possivelmente sofrido microevolução, o isolado de sangue 757 também apresentou acima de 93% de similaridade com as demais cepas colonizantes.

Interessantemente, no paciente 7 (linha verde) que teve APACHE score mais baixo que os demais, entretanto com evolução clínica de óbito, a cepa isolada de candidemia (997,5 G) apresentou 100 % de similaridade com cepas seqüenciais isoladas de mais de um sítio colonizante, como cateter, urina e ferida operatória, sugerindo tratar-se de cepa bem adaptada para sobreviver nos microambientes de colonização e corrente sanguínea (Fig. 12).

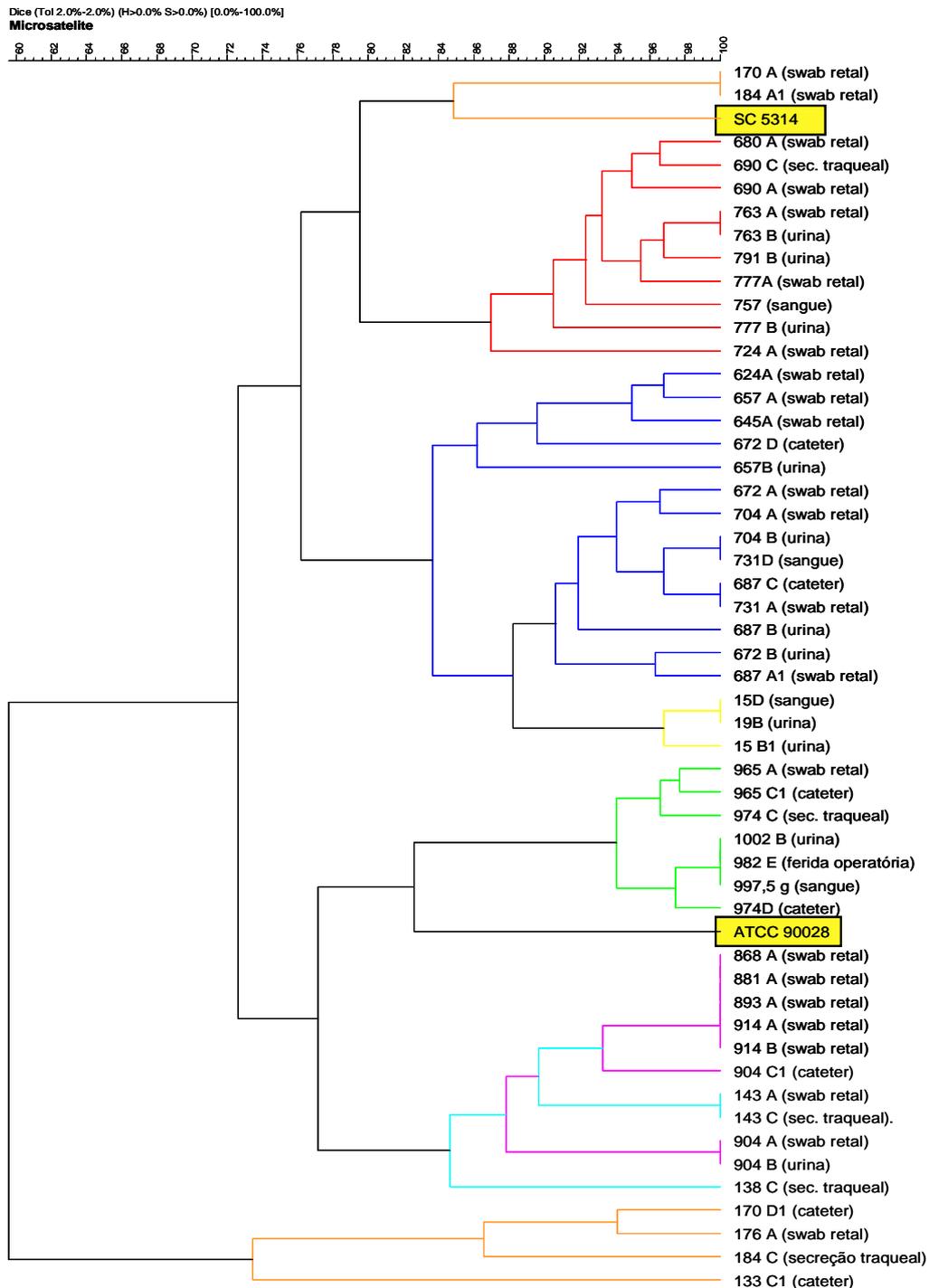


Figura 12. Dendrograma gerado pelo programa GelComparII pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando-se o “primer” M13. As cores representam os diferentes pacientes. Paciente 1 (rosa), paciente 2 (azul claro), paciente 3 (laranja), paciente 4 (azul escuro), paciente 5 (amarelo), paciente 6 (vermelho) e paciente 7 (verde claro). As cepas destacadas em amarelo correspondem aos controles SC 5314 e ATCC 90028.

4.4.2 Genotipagem A, B e C

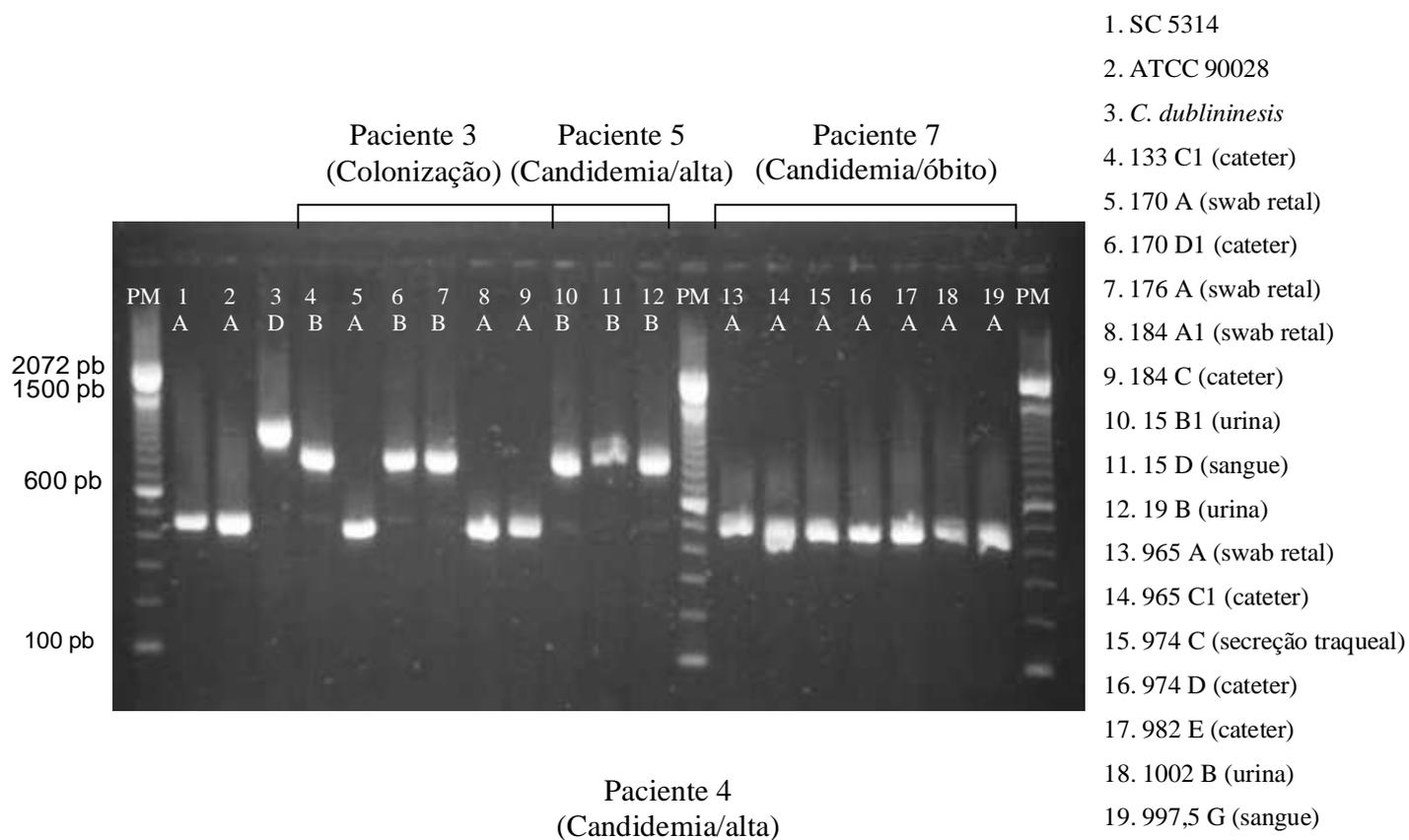
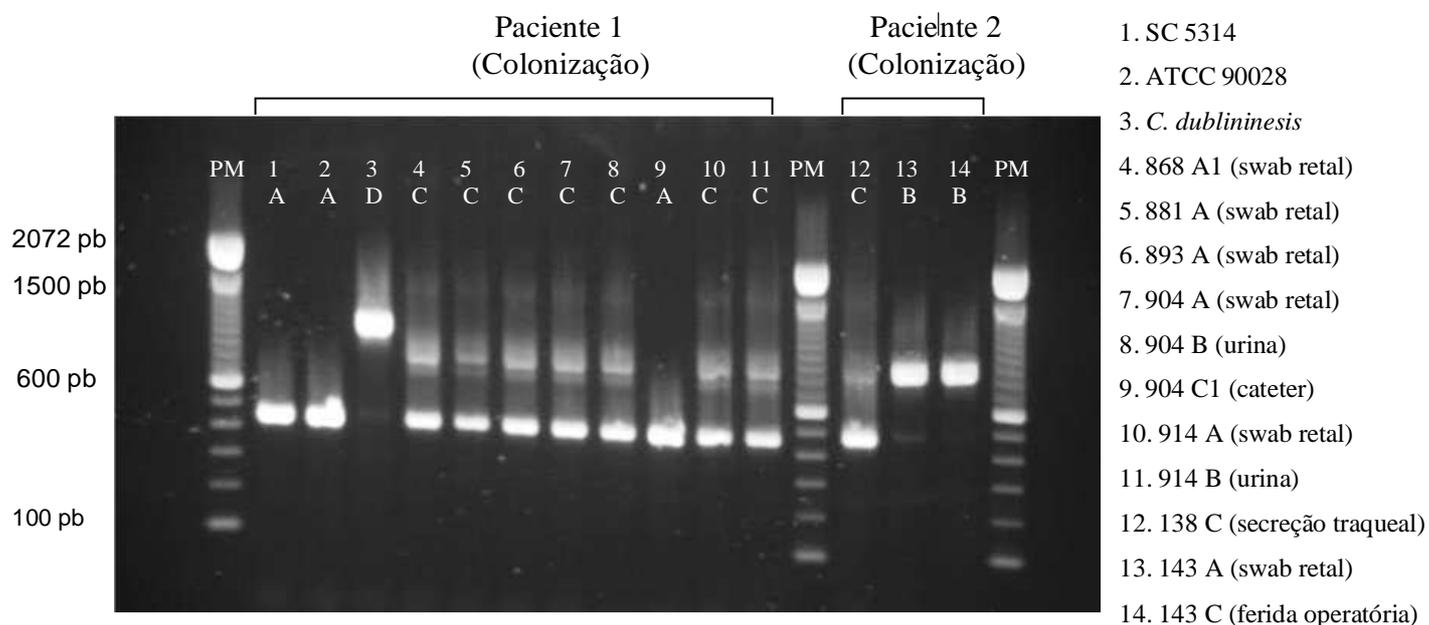
Quando empregada esta metodologia na avaliação dos isolados deste estudo, encontraram-se alguns achados interessantes. Observamos que enquanto nos pacientes que foram apenas colonizados, houve uma variação de mais de um genótipo indicando claramente a presença de mais de uma cepa colonizando o paciente, reforçando os achados da tipagem por microsatélite, os pacientes que evoluíram com candidemia apresentaram um único genótipo A, B, C desde o início da colonização até o final da infecção.

Com relação aos pacientes que não desenvolveram candidemia, o paciente 1 apresentou-se colonizado com a maioria das cepas do genótipo C e um isolado do genótipo A. Trata-se do isolado 904 C1 de ponta de cateter, que a análise de dendrograma dos microsatélites revelou uma maior dissimilaridade genética deste, quando comparado com os demais. O paciente 2 apresentou dois isolados com genótipo B: os dois isolados também considerados idênticos pela técnica do microsatélite 143 A (swab retal) e 143 C (secreção traqueal) e um com genótipo C (138 C de secreção traqueal), que pela análise de microsatélite foi posicionado em outro cluster. Já o paciente 3 apresentou um misto de genótipos A e B (Fig. 13), que também foram representados por diferentes clusters pela análise do dendrograma por microsatélite. Esses resultados corroboram com a hipótese de que parece ser mais comum a

substituição de cepas colonizantes por *C. albicans* em pacientes que não desenvolveram candidemia (Fig. 13)

Em se tratando dos pacientes que evoluíram com candidemia, os pacientes 4 e 7 foram colonizados exclusivamente por cepas do genótipo A, enquanto os isolados do pacientes 5 e 6 foram colonizados exclusivamente por cepas do genótipo B (Fig. 13). Nenhuma das cepas isoladas de pacientes com candidemia era do genótipo C.

Resultados



Resultados

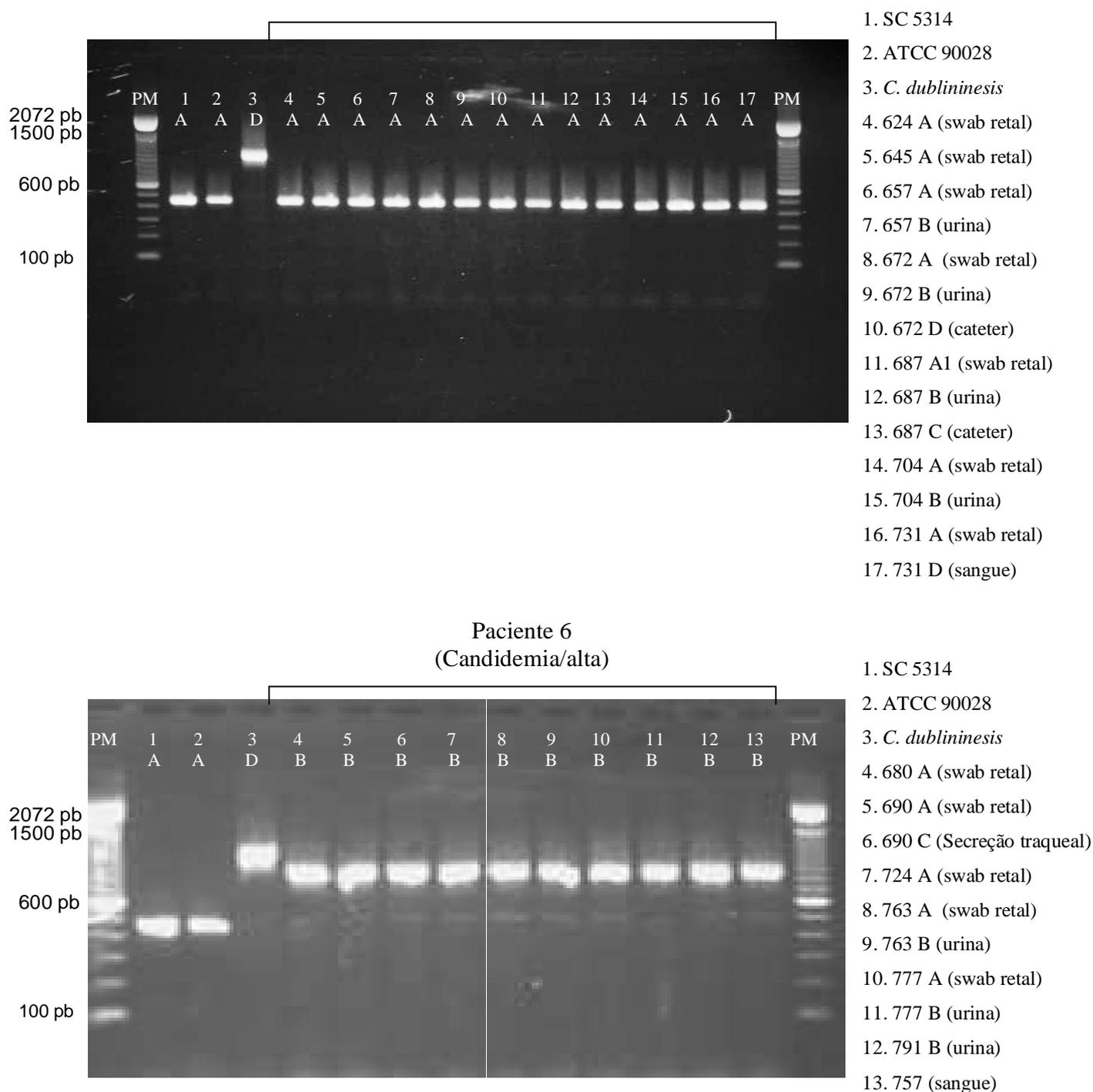


Figura 13. Genotipagem A, B, C de isolados clínicos de *C. albicans* (colonização e candidemia). PM= Marcador de peso molecular. Os demais números correspondem ao número de depósito no banco de microorganismos no LEMI.

5.0 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos adaptativos de virulência de *C. albicans* em episódios de colonização/candíemia documentados ao longo da internação em UTI de pacientes com condições clínicas semelhantes, como tentativa de avaliar isoladamente o papel do patógeno no estabelecimento da candidíase hematogênica. Entre estes pacientes haviam indivíduos que foram apenas colonizados por *C. albicans* e recebiam alta hospitalar, enquanto que outros, após a colonização fúngica apresentaram quadro de candidemia, evoluindo com dois desfechos clínicos possíveis: alta hospitalar ou óbito. A caracterização dos fatores do patógeno foi realizada através de aplicação de ensaios *in vitro* para avaliação de taxa de crescimento, capacidade de aderência à CEBH, avaliação da morfogênese (transição levedura-hifa), secreção de enzimas hidrolíticas (proteínase e fosfolipase) e formação do biofilme de isolados clínicos colhidos sequencialmente destes pacientes, no momento da internação em UTI. Além da caracterização dos fatores de virulência, avaliou-se o grau de relacionamento genético destes isolados através de tipagem molecular por microssatélites e genotipagem ABC. Finalmente, foram verificadas diferenças nos perfis de susceptibilidade destas cepas à diversas drogas antifúngicas.

Com relação à avaliação da taxa de crescimento dos isolados, foi possível verificar que a cepa 657B, isolada de urina, pertencente ao paciente 4, representante do grupo II (candíemia/alta), demonstrou uma taxa de crescimento mais lenta em relação à todos os demais isolados, em ambos os meios de cultivo testados (YPD e RPMI 1640; Fig. 2). Este mesmo isolado apresentou baixa expressão de todos os fatores de virulência avaliados, sugerindo que a baixa velocidade de crescimento poderia estar influenciando o “fitness” celular, impedindo que o mesmo expressasse os fatores de patogenicidade em função do prejuízo do seu metabolismo. À exceção deste

isolado, todas as demais cepas avaliadas neste estudo apresentaram semelhantes taxas de crescimento, indicando claramente que a velocidade de proliferação destes microorganismos não teve grande importância no desfecho clínico destes pacientes.

Em 2008, um estudo conduzido por Zhang *et al.* Relatou o papel do gene *CaECM25* na morfogênese, organização da parede celular e virulência de *C. albicans*. A deleção deste gene, resultando na construção do mutante *CaecmΔ25/Δ25*, resultou em uma taxa de crescimento mais baixa acompanhada de reduzida formação de hifa e aderência à superfícies plásticas neste isolado. Os autores apontam a taxa de crescimento lenta como fator indiretamente relacionado ao decréscimo da virulência desta cepa. Pudemos verificar a mesma tendência, para este isolado que apresentou deficiência na taxa de crescimento e uma menor expressão dos fatores de virulência avaliados

No ensaio de aderência à CEBH, houve uma variabilidade na capacidade deste fator entre os isolados, destacando-se a baixa adesão das cepas do paciente 3 (Grupo I, apenas colonizado), que apresentaram poucas células de *C. albicans* aderindo às CEBH, diferentemente dos isolados de todos os outros pacientes, independente do grupo (I, II ou III) de que foram isolados ($p < 0,05$). De maneira geral, não foi possível traçar uma correlação entre a capacidade de aderir as células epiteliais e o desfecho clínico dos pacientes, uma vez que dois indivíduos que não desenvolveram candidemia também foram colonizados por cepas altamente aderentes. É importante ressaltar que os isolados dos pacientes 4 (grupo II, candidemia/alta) e 7 (grupo III, candidemia/óbito) apresentaram alta aderência às CEBH, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, devido à variabilidade dos isolados. Torna-se importante destacar o isolado de sangue do paciente 7 (997,5G), com 175 células de *C. albicans* aderidas/ 150 CEBH, o qual apesar do baixo APACHE

II score de 11, foi a óbito com morte atribuída à candidemia, sugerindo a importância da alta aderência no desfecho clínico deste paciente.

Bernhardt *et al.* (2001) ressaltaram a importância da adesão de *C. albicans* na mucosa esofágica com posterior formação de hifa para que ocorra invasão tissular, também requerida para ocorrência de infecção sistêmica. Neste estudo foram utilizados isolados clínicos, comensais e cepas de referência para inferir a intensidade da aderência em tecidos esofágicos reconstituídos com células esofágicas “monolayer” (HET1-A). Os isolados de pacientes com a forma mais severa de candidíase esofágica ou candidemia aderiram à HET1-A mais eficientemente do que os isolados de pacientes com candidíase esofágica média, cepas comensais e de referência. Adicionalmente, uma cepa de *C. albicans* CSSK21, a qual teve gene responsável pela regulação da via de sinalização transducional de formação de hifa deletado (*ssk1*), aderiu menos às células HET1-A do que a cepa parental ou aquela com o gene reintroduzido. Em modelo de tecido esofágico reconstituído, todos os isolados à exceção dos comensais e de referência penetraram no epitélio. Esses dados reforçam a importância na correlação de alta aderência e invasão dos tecidos. Entretanto, alguns dos nossos isolados de pacientes apenas colonizados também apresentaram alta aderência nos impedindo de traçar uma correlação direta deste fator e o desfecho clínico destes pacientes.

Com relação à capacidade de formação de hifa verdadeira, nossos resultados demonstraram que a maioria dos isolados apresentaram um IM=4, significando que a maior parte das células de um único isolado formaram hifa verdadeira. No paciente 4 (grupo II candidemia/alta) observamos altos percentuais de formação de hifa. Mais uma vez todos os isolados do paciente 7 (grupo III, candidemia/óbito), o qual teve baixo APACHE II score no momento da internação,

entretanto teve morte atribuída à candidemia, tiveram 100% de suas células formando longas hifas verdadeiras, enquanto que os isolados dos pacientes 5 e 6 (grupo II), também oriundos de pacientes que desenvolveram candidemia, apresentaram de maneira geral, células com IM de 1, 2 ou 3, indicando predominância de blastosporos e pseudohifas em detrimento de hifas verdadeiras. Vale ressaltar que estes pacientes tiveram alta clínica, quando tratados para candidemia, enfatizando mais uma vez a importância do papel do patógeno para que ocorra o sucesso da candidíase invasiva.

Lo *et al.* (1997) demonstraram os seguintes fatores de transcrição importantes na transição levedura-hifa: Cph1p e Efg1p através da construção de mutantes únicos ou duplos. Mutantes únicos, $\Delta cph1/cph1$ ou $\Delta efg1/efg1$ foram parcialmente defectivos, enquanto que o mutante para estas duas vias de sinalização $\Delta cph1/cph1/\Delta efg1/efg1$ (mutante duplo) foi completamente defectivo para filamentação e, além disso, demonstrou-se não invasivo em modelo murino, explicitando, desta forma, a importância da formação de hifa na manutenção da infecção invasiva. Portanto, a formação de longas hifas verdadeiras de lados paralelos de todos os isolados oriundos do paciente 7, pode ter influenciado na morte do mesmo.

Resultados muito expressivos das análises dos fatores de virulência foram demonstrados pelo ensaio de atividade das Saps. Os isolados do grupo I (somente colonizados), representado pelos pacientes 1, 2 e 3 apresentaram, de maneira consistente, uma baixa produção de proteinase (Fig. 7). É possível perceber que os isolados do paciente 7, pertencente ao grupo III (candidemia/óbito), aquele que teve morte atribuída à candidemia, apresentaram os maiores valores de expressão de proteinase entre todos os isolados avaliados ($p < 0,05$). Nas cepas do paciente 4 (grupo II, candidemia/alta), também foi observada uma alta produção de proteinase. Porém, quando observadas as cepas dos pacientes 5 e 6, pertencentes ao grupo II

(candidemia/alta), a produção de proteinase foi estatisticamente mais baixa. Portanto, torna-se ainda mais evidente o papel do patógeno no desfecho clínico do paciente 7, que apesar das melhores condições de saúde, indicadas pelo seu baixo APACHE II score (11), teve o pior desfecho neste estudo (óbito).

Kuriyama *et al.* (2003), testaram a atividade das Saps em isolados de *C. albicans* de candidíase oral e compararam estes resultados com os de cepas obtidas a partir de indivíduos saudáveis. Não houve correlação entre a produção de proteinases e as diferentes formas de candidíase oral (pseudomembranosa, eritematosa crônica, hiperplásica crônica). Entretanto, quando comparado os isolados de candidíase com aqueles obtidos de indivíduos saudáveis, houve uma associação entre candidíase oral e uma alta atividade de Saps inerente aos isolados de *C. albicans*. Estes achados evidenciam a secreção de Saps como evento decisivo no estabelecimento da candidíase oral.

Foi observada tendência semelhante em trabalho proposto por Tavanti *et al.* (2004), que avaliaram a expressão diferencial dos genes *SAP1-10* em isolados de *C. albicans* de indivíduos saudáveis e em pacientes com candidíase oral, portadores ou não do HIV. A correlação entre a expressão dos genes *SAP1-10* das referidas cepas indicou uma predominância na expressão de *SAP2* nos isolados de candidíase oral quando comparados aos isolados comensais, indicando novamente uma efetiva participação desta enzima na patogênese da candidíase.

Em estudo conduzido por Gokce *et al.* (2007), foram avaliados isolados sanguíneos de *Candida spp.* e a capacidade de secreção de proteinase e fosfolipase e, produção de biofilme dos mesmos, na tentativa de estabelecer correlação entre os fatores de virulência e a ocorrência de infecção. Entre as espécies isoladas haviam 68 cepas de *C. albicans*, 6 de *C. glabrata*, 4 de *C. guilliermondii*, 2 de *C. krusei*,

8 de *C. parapsilosis* e 11 de *C. tropicalis*. A percentagem de isolados produtores de proteinase entre os isolados de *C. albicans* foi da ordem de 89,7%, enquanto que apenas 25,8% das espécies de *Candida não-Candida albicans* foram proteinase positivas. A produção de fosfolipase foi detectada em 60,3% das cepas de *C. albicans* e em nenhum dos isolados de *Candida não-Candida albicans*. Este estudo indica que a secreção de enzimas hidrolíticas (proteinase e fosfolipase) são importantes fatores de virulência para diversas espécies de *Candida*, sendo a atividade mais expressiva encontrada em *C. albicans*. Achados semelhantes foram verificados em nossa investigação, uma vez que em nossos isolados sanguíneos foram detectadas altas concentrações de secreção de proteinase e fosfolipase.

A produção de fosfolipase em nosso estudo foi homogênea para todos os isolados testados à exceção dos isolados do paciente 4 (grupo II, candidemia/alta), o qual apresentou diversas cepas com atividade de fosfolipase negativa. Interessantemente, houve um incremento da produção desta enzima à medida que a infecção progredia, com os isolados apresentando atividade de fosfolipase positiva próximos do episódio de candidemia neste paciente. Vale ressaltar que este foi o único fator de virulência fracamente expresso pela maioria das cepas deste paciente que, teve alta após a instituição do tratamento com terapia antifúngica, destacando esta diferença com relação aos isolados do único paciente que morreu de candidemia, o qual expressou todos os fatores de virulência de forma bastante expressiva, incluindo a atividade de fosfolipase. Diante deste resultado é razoável indicar que a baixa atividade de fosfolipase dos isolados deste paciente pode ter influenciado no desfecho clínico do mesmo, uma vez que estas cepas expressaram altamente todos os demais fatores de virulência (à exceção da fosfolipase), e o

paciente obteve alta hospitalar sugerindo a relevância da atividade de fosfolipase para a ocorrência dos desfechos clínicos destes pacientes.

O método utilizado na presente avaliação foi idealizado por Price *et al.* (1982), trata-se de uma técnica em placa para o “screening” da atividade de fosfolipase extracelular em *C. albicans*. Esta técnica demonstra variação na atividade de fosfolipase entre diferentes isolados da referida espécie, entretanto a razão utilizada para aferir esta atividade, a zona de precipitação (Pz), é uma medida semiquantitativa, conferindo uma limitação na utilização desta metodologia. Este fator poderia ter influenciado nossos resultados, no sentido de não demonstrar grandes variações intra-específicas (Niewerth & Kortling, 2001).

Utilizando modelo murino de candidíase, Barret-Bee *et al.* (1985) mensuraram a atividade de fosfolipase em seis isolados (quatro de *C. albicans*, um de *C. parapsilosis* e um de *Saccharomyces cerevisiae*). Foi encontrada correlação entre a atividade da referida enzima e dois outros parâmetros de patogenicidade. Os isolados de *C. albicans* que apresentaram maior aderência a CEBH e eram mais patogênicos em ratos também apresentavam a maior atividade de fosfolipase, dados estes que reforçam a associação entre atividade desta enzima e virulência em *C. albicans*. Em nossa investigação não obtivemos êxito em estabelecer esta correlação, uma vez que todos os isolados independente do grupo de pacientes apresentaram atividade de fosfolipase positiva. Porém, a ausência da atividade desta enzima nos isolados colonizantes, pode ter influenciado no desfecho clínico do paciente 4, o qual apresentou isolados com perfil fenotípico de expressão dos fatores de virulência semelhante àquele paciente cujo desfecho foi de óbito (paciente 7), porém evoluiu com alta hospitalar.

Nosso ensaio para a formação de biofilme revelou que nos isolados dos pacientes que formaram o grupo I (apenas colonizados) há uma evidente diferença na formação de biofilme, destacando-se um biofilme menos denso nos isolados do paciente 2 quando comparados aos pacientes 1 e 3 do mesmo grupo. Mais uma vez, os pacientes 4, do grupo II (candidemia/alta), e 7 do grupo III (candidemia/óbito), obtiveram as maiores taxas de formação de biofilme entre todos os isolados testados, seguindo uma tendência de maior expressão dos fatores de virulência avaliados neste estudo. Os isolados dos pacientes 5 e 6 do grupo II (candidemia/alta) apresentaram valores inferiores quando comparados aos referidos anteriormente.

Shin *et al.* (2002) compararam a capacidade de formar biofilmes em uma coleção de isolados clínicos sanguíneos e de outros sítios anatômicos pertencentes à sete diferentes espécies de *Candida*. Esta investigação demonstrou que 8% dos isolados de *C. albicans* tinham a habilidade de formar biofilme, enquanto que 61% das espécies de *Candida não-Candida albicans* foram capazes de formar biofilme. Entretanto, o achado mais interessante foi de que isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com cateter venoso central ou nutrição parenteral total tinha um maior potencial de formação de biofilme. Baseado neste estudo é razoável indicar que isolados que formam mais biofilme tendem à ser mais patogênicos, o que foi observado em algumas cepas de nosso estudo.

Em outra investigação conduzida por Kuhn *et al.* (2002), foi verificada a formação de biofilme em diferentes espécies de *Candida*, utilizando ensaio de peso seco. Quando comparadas as capacidades de formar biofilme de cepas de *C. albicans* invasivas e não invasivas, foi demonstrado que os isolados sanguíneos e de cateteres formaram significativamente mais biofilme do que os isolados de outros sítios.

Além disso, cepas de *C. albicans* tiveram uma produção de biofilme estatisticamente significante maior do que cepas de *C. parapsilosis*, quando da comparação entre espécies. Esses resultados reafirmam a relação entre a formação de biofilme e um maior potencial patogênico em *C. albicans*.

No presente estudo, a maioria dos isolados avaliados foi susceptível aos antifúngicos testados pela análise *in vitro*, corroborando com os achados de outros autores (Pfaller *et al.*, 2007; St-Germain *et al.*, 2008; Hajjeh *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2001).

Em relação ao perfil de susceptibilidade dos isolados à anfotericina B, todas os nossos isolados foram sensíveis (Tabela 3). Nossos resultados são condizentes com vários estudos citados na literatura, no qual isolados de *C. albicans* apresentaram CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ em relação a esta droga (Fadda *et al.*; 2008; Alves *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2004; Cuenca-Estrella *et al.*, 2002).

Com relação ao fluconazol, todas as cepas foram sensíveis (CIM₅₀=0,125 $\mu\text{g/mL}$ e CIM₉₀= 0,25 $\mu\text{g/mL}$; Tabela 3). Conforme esperado, todos os isolados também foram sensíveis ao itraconazol (Xu *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2007; Pfaller *et al.*, 2007). No Brasil e América Latina vários estudos têm demonstrado que *Candida sp.* resistentes ao fluconazol em infecção hospitalar trata-se de evento raro (Da Matta *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2003; Girão *et al.*, 2008).

Interessante notar que, em relação ao antifúngico 5-fluorocitosina, um único isolado de *C. albicans* da nossa casuística demonstrou susceptibilidade dose dependentes a essa droga: a cepa 170 A, isolada de swab retal, pertencente ao paciente 3 (grupo I, somente colonização), com CIM = 8 $\mu\text{g/mL}$. À exceção deste isolado, todos os outros foram qualificados como sensíveis à esta droga, independente do paciente de origem.

Balaban *et al.* (2007) avaliaram a relação entre os genótipos ABC e a susceptibilidade à antifúngicos em 70 isolados clínicos de *C. albicans*, para verificar dados da literatura que indicam uma associação entre genótipo A e uma maior taxa de resistência à 5-fluorocitosina (Mercure *et al.*, 1993). Entre as cepas estudadas 35 (50%) foram classificadas como sendo *C. albicans* do genótipo A, 9 (12,9%) do genótipo B e 26 (37,1%) eram do genótipo C. Após análise estatística não foi possível comprovar associação descrita na literatura, sendo indicado para tanto um estudo mais sofisticado com intuito de detectar tal ligação entre genótipo A e resistência à 5-fluorocitosina. Em nossa casuística também não foi possível detectar esta associação, embora a cepa 170 A, o único isolado SDD, era do genótipo A.

Na nossa investigação, a susceptibilidade *in vitro* da espécie *C. albicans* para a caspofungina e anidulafungina apresentou CIM₅₀ variando entre 0,125 a 0,25 µg/mL e 0,06 µg/mL, respectivamente. As equinocandinas têm sido bastante utilizadas para tratamento de candidíase invasiva. Nesse ínterim, muitos estudos tem investigado a emergência de resistência à esta classe de medicamentos. Pfaller *et al.* (2008) investigaram a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Candida spp.* a anidulafungina, capofungina e micafungina, durante 6 anos em estudo de vigilância global. Nesta casuística, as três equinocandinas avaliadas foram bastante ativas contra *Candida spp.* Especificamente em relação a *C. albicans*, 99,6% dos isolados foram inibidos por concentração ≤ 2 µg/mL de caspofungina e 100% das cepas foram inibidas pela mesma concentração de anidulafungina e micafungina. Esta investigação indica uma excelente atividade *in vitro* das equinocandinas contra isolados de *Candida spp.* e, adicionalmente aponta uma linearidade na atividade destas drogas ao longo de 6 anos.

De forma geral, as casuísticas apontadas até o momento em literatura para *C. albicans* são abundantes e em sua grande maioria, apontam

sensibilidade às drogas existentes no mercado. Entretanto, pôde-se observar pequenas variações de susceptibilidade entre as cepas nos estudos conduzidos até o momento (St. Germain *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2008). Estes dados reforçam a necessidade de realização contínua de estudos de vigilância epidemiológica para a documentação de mudanças no perfil de sensibilidade a antifúngicos.

Com a análise genotípica, foram verificados dados bastante interessantes acerca do relacionamento genético intraespecífico das cepas utilizadas neste estudo. Observando-se o dendrograma gerado pela técnica de microssatélite (Fig. 12) nos pacientes do grupo I (somente colonizados) destaca-se uma maior variabilidade dos genótipos apresentados pelos seus isolados, sugerindo que haja microevolução e substituição de cepas no decorrer da colonização. Em contrapartida, nos pacientes que foram colonizados por *C. albicans* e desenvolveram candidemia (Grupos II e III), houve uma menor variabilidade genotípica dos isolados, os quais apresentaram altos coeficientes de similaridade em comparação aos isolados dos pacientes do grupo I. Importante ressaltar que no paciente 7, o isolado causador da candidíase invasiva (997,5G) apresentou 100% de similaridade com os isolados de colonização de urina (1002B) e ferida operatória (982 E) do mesmo paciente (Fig. 12), destacando forte evidência de que a cepa invasora é a mesma que previamente coloniza. É possível tratar-se de cepa de *C. albicans* adaptada a sobreviver nas mais diversas condições ambientais existentes no organismo humano obtendo, portanto, maior sucesso no estabelecimento da candidemia.

Sampaio *et al.* (2005) utilizando PCR Multiplex com 3 loci de microssatélites (*CDC3*, *EF3* E *HIS3*), procedeu a realização de genotipagem de 114 isolados clínicos de *C. albicans*, incluindo múltiplos isolados do mesmo paciente coletados em diferentes sítios e também ao longo de episódios de infecção

vulvovaginal. Após análise dos resultados alcançados a partir das cepas relacionadas, ficou claro que a ocorrência de microevoluções dos isolados presentes em sítios de colonização e infecção recorrente é comum e, que este evento parece ser mais freqüente do que a substituição de cepas.

Com o objetivo de explorar a prevalência de populações mistas de *C. albicans* entre pacientes, Jacobsen *et al.* (2008) realizaram um estudo prospectivo com aplicação da metodologia de MLST de seis colônias individuais de *C. albicans* selecionadas aleatoriamente em 32 placas de isolamento primário de cepas comensais, de indivíduos saudáveis e de infecção na cavidade oral e vaginal. Este estudo revelou que microvariações ocorrem mais frequentemente em isolados comensais do que em cepas infectantes. Nossos achados corroboram à estes dados, uma vez que os isolados originários dos pacientes do grupo I (somente colonizados) apresentaram-se com maior variabilidade genética, possivelmente indicando acontecimento de microvariações e de substituição de cepas, do que aqueles oriundos dos pacientes dos grupos II e III (candidemia/alta e candidemia/óbito, respectivamente), corroborando com a nossa hipótese de que os isolados que infectaram são idênticos ou altamente similares aos que colonizaram, evidenciando que a persistência de um único genótipo deve estar relacionado ao desfecho clínico de candidemia.

Em outra investigação, Dalle *et al.* (2008) utilizou microssatélites para acessar o relacionamento genético de cepas seqüencialmente colhidas de episódios de colonização em pacientes com leucemia aguda. Dos 8 pacientes colonizados por *C. albicans* selecionados randomicamente, 429 isolados foram submetidos à análise genotípica. Sete pacientes carregavam um único genótipo de *C. albicans* em todos os nichos do organismo e ao longo do estudo. Em um único caso, foram observadas pequenas diferenças genotípicas. Além disso, cada paciente possuía

um clone de *C. albicans* específico. No único paciente que desenvolveu candidemia, a cepa de sangue foi idêntica às demais cepas de colonização prévia. Neste estudo foi demonstrado que em pacientes com leucemia aguda, evolução genética e reposição de cepas é evento raro. Nossos dados corroboram à este estudo, uma vez que, os isolados oriundos dos pacientes com os piores desfechos (como o do paciente que desenvolveu candidemia) tiveram perfis genéticos altamente similares.

Em uma outra investigação, Xu *et al.* (1999), com o objetivo de avaliar variabilidade genética de isolados *C. albicans*, aplicaram técnica de PCR-RFLP para avaliar 2 grupos de cepas clínicas isoladas de pacientes portadores ou não do HIV, e outro grupo de cepas provenientes de indivíduos saudáveis. Foi observado que os isolados de cepas clínicas apresentaram menor diversidade genotípica se comparadas com as cepas oriundas de indivíduos saudáveis, sugerindo que algumas cepas estão mais envolvidas em desordens clínicas. Estas evidências reforçam alguns resultados encontrados, uma vez que tendência semelhante foi identificada em nossa investigação.

Como demonstrado pelos resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC, nos pacientes pertencentes ao Grupo I (somente colonização) há mais de um genótipo (A, B ou C) indicando a presença de mais de uma cepa colonizando o paciente e, esses dados corroboram aos encontrados na análise por microssatelites, onde há uma maior dissimilaridade entre os isolados de colonização quando comparados àqueles dos grupos aos quais os pacientes evoluíram com candidemia (grupos II e III). Esses resultados corroboram com a hipótese de que parece ser mais comum a substituição de cepas colonizantes por *C. albicans* em pacientes que não desenvolveram candidemia.

No que se refere aos pacientes dos grupos II e III (candidemia/alta e candidemia/óbito, respectivamente) há claramente a ocorrência de um único genótipo A ou B desde o início dos episódios de colonização até o isolamento da levedura no sangue. Além disso, vale mencionar que, os isolados dos pacientes 4 e 7, aqueles que expressaram mais intensamente a maioria dos fatores de virulência avaliados *in vitro*, foram caracterizados exclusivamente como *C. albicans* genótipo A, o mesmo genótipo apresentado pela cepa controle SC5314, altamente virulenta em modelos de candidíase *in vivo*. Por outro lado, os isolados dos pacientes 5 e 6, também pertencentes ao grupo II, que, entretanto, apresentaram de maneira geral uma menor expressão dos fatores de virulência, foram classificados como *C. albicans* genótipo B. Esses dados sugerem um possível papel no predomínio do genótipo A entre as cepas mais virulentas e o sucesso na persistência da colonização e estabelecimento da candidíase hematogênica.

Nawrot *et al.* (2008), avaliaram atividade proteolítica e genótipos ABC em isolados de sangue e trato respiratório. Foi determinado que o genótipo A foi mais prevalente em isolados de sangue (75%) e naqueles pacientes que desenvolveram candidose (80%) se comparados com cepas de colonização (57,8%). Em se tratando dos isolados de trato respiratório, houve maior expressão de proteinase das cepas de genótipo B do que as de genótipo A, porém tal associação não foi detectada nos isolados sanguíneos. Nosso dados corroboram à este estudo, uma vez que em sua totalidade os isolados dos pacientes 4 e 7 (candidemia/alta e candidemia/óbito, respectivamente) foram classificados como genótipo A.

Em estudo realizado por Sugita *et al* (2002), onde foram avaliadas 56 cepas clínicas de *C. albicans* quanto à secreção de enzimas hidrolíticas (protease e fosfolipase) entre os diferentes genótipos A, B ou C, maior atividade das enzimas

hidrolíticas proteinase e fosfolipase foi detectada em cepas de *C. albicans* do genótipo B. Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, alguns dos isolados de *C. albicans* que expressaram consistentemente todos os fatores de virulência, incluindo estas enzimas, tratavam-se de cepas de *C. albicans* do genótipo A, bem como o organismo-controle SC5314, que é conhecido como altamente virulento em experimentos *in vivo*.

Nenhuma casuística que estabelecesse associação entre tipagem ABC e impacto no desfecho clínico do paciente foi encontrada até o presente momento. Porém, é razoável estabelecer esta correlação a partir dos dados obtidos em nosso estudo, pois no paciente 7 (Grupo III), evidenciamos o predomínio do genótipo A em isolados que foram altamente similares, correspondendo aos achados da genotipagem pela metodologia de microssatélites e, que além de expressarem de forma expressiva todos os fatores de virulência avaliados, também foram a causa do óbito deste paciente, o que leva a crer que este genótipo está relacionado à maior virulência.

Em estudo utilizando MLST, genotipagem ABC, “status” MTL e PFGE com enzima de restrição para caracterizar os perfis genéticos de 51 cepas clínicas de *C. albicans* coletados em 12 hospitais em Taiwan, Chen *et al.* (2006) objetivaram avaliar a efetividade da ferramenta MLST em relação ao PFGE com enzima de restrição para discriminar isolados de *C. albicans*, e demonstraram que o MLST é confiável e superior à técnica de PFGE para traçar microevoluções entre cepas de *C. albicans* em um mesmo paciente. Adicionalmente, os genótipos de MLST corresponderam aos mesmos genótipos ABC e década de isolamento, porém não tiveram associação com sítio anatômico, hospital de origem, “status” MTL e padrão de resistência à fluconazol. Este trabalho demonstra a relevância desta técnica (genotipagem ABC) em determinar perfil genotípico dos isolados de *C. albicans*, uma

vez que demonstra boa correlação com a técnica de MLST, que é reconhecida como uma das melhores ferramentas aplicadas na obtenção de resultados precisos para avaliar diversidade e epidemiologia global de patógenos (Jacobsen *et al.*, 2008).

Tavanti *et al.* (2005) submeteram 416 isolados de *C. albicans* de origens diferentes à análise por MLST. Ficou demonstrado que clados distintos de *C. albicans* diferiram significativamente nas proporções em que seus isolados foram obtidos de corrente sanguínea, de orofaringe, vagina e outros sítios, indicando que, particularmente algumas cepas, pertencentes ao mesmo “cluster”, se diferenciam de outras na proporção em que são isoladas na forma disseminada ou em infecções de mucosa. Através de análise estatística, foi estabelecida correlação entre os clados gerados pelo método de MLST, genotipagem ABC e sítio anatômico de isolamento, indicando possível tendência entre os genótipos específicos de *C. albicans* e sua propensão em infectar ou colonizar nichos específicos no organismo. Importante ressaltar que uma maior taxa de resistência à 5-fluorocitosina foi encontrada nos isolados de *C. albicans* genótipo A. Em nossa casuística detectamos sensibilidade dose dependente à esta droga em um único isolado (170 A), o qual trata-se de cepa classificada como *C. albicans* genótipo A.

Analisando todos os resultados em conjunto, no que se refere à expressão de fatores de virulência, nosso estudo não demonstrou uma associação individual e consistente dos fatores de virulência e maior predisposição à invasividade, uma vez que houve considerável variação nos diferentes ensaios aplicados. Diante desta grande variabilidade, pudemos reconhecer baixa correlação entre os fatores isoladamente e o estabelecimento de candidíase invasiva. Por outro lado, aquele paciente que apesar das melhores condições de saúde houve morte atribuída à candidemia, foi colonizado por cepas capazes de expressar todos os fatores de

virulência avaliados em níveis que foram de médios à altos, sugerindo que o pior desfecho, o de morte, foi diretamente influenciado por este perfil fenotípico.

Vale ressaltar que, os isolados do paciente 6 (Grupo II, candidemia/alta), apresentaram média a baixa expressão dos fatores de virulência avaliados e, curiosamente, este paciente evoluiu à alta. Todas essas evidências levam a crer que o nível de expressão dos fatores de virulência relacionam-se diretamente com a capacidade que o microorganismo possui de causar dano, instalar-se, sobreviver e multiplicar-se, e conseqüentemente agregando à este cenário o pior desfecho, o óbito, do que propriamente com a possibilidade de eventos de colonização transitarem à infecção.

A análise genotípica revelou informações relevantes a respeito do perfil genético dos isolados e sua relação com a patogenicidade. Verificou-se que, naqueles pacientes em que havia colonização por cepas altamente relacionadas, ocorreram os piores desfechos, sugerindo tratar-se de cepas bem adaptadas capazes de sobreviver no organismo e ocasionar infecção hematogênica. Em contrapartida, os pacientes que cursaram somente com colonização, portavam cepas com maior variabilidade genotípica, indicando o possível acontecimento de microevolução, ou mesmo substituição de cepas. Além disso, a genotipagem ABC forneceu outra associação razoável, de que genótipos específicos tem ligação com piores prognósticos, uma vez que todos os isolados dos pacientes 4 e 7 (Grupo II e III, candidemia/alta e candidemia/óbito, respectivamente) apresentaram-se como *C. albicans* genótipo A, o mesmo genótipo apresentado pelo organismo-controle SC5314, sabidamente virulenta em modelos animais.

Por conseguinte, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento dos aspectos de virulência de *C. albicans* em um cenário clínico pré-estabelecido,

avaliando o impacto dos atributos de virulência na evolução clínica em eventos de candidíase. Tendo em vista que *C. albicans* é um fungo oportunista com altas taxas de morbidade e mortalidade atribuídas, pudemos verificar que além do “status” imunológico do paciente, os aspectos intrínsecos de cada cepa são importantes determinantes do sucesso de sua trajetória como patógeno. Adicionalmente, destacamos a importância de ferramentas moleculares na detecção de genótipos mais agressivos e bem adaptados no organismo humano, possivelmente responsáveis pelos piores prognósticos clínicos em ambiente hospitalar.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

8.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

1. A avaliação da similaridade genética dos isolados com o emprego da técnica de microsatelites evidenciou que a colonização prévia com cepas altamente relacionadas representa maior risco de desenvolvimento de candidíase invasiva e, em contrapartida, os pacientes portadores de cepas com maior variabilidade genética cursam com episódios de colonização sem invasão do hospedeiro. Além disso, pode-se sugerir que determinados genótipos de *C. albicans* possuem potencial patogênico mais agressivo que outros, como indicam os resultados obtidos pela técnica de genotipagem ABC. Neste contexto, nos pacientes que desenvolveram candidemia, o genótipo A foi associado à maior virulência
2. Não foi possível estabelecer uma associação direta e consistente entre os fatores de virulência expressos avaliados neste estudo e uma maior predisposição ao evento de candidemia, em vista da variabilidade encontrada em nossos resultados. Entretanto, evidenciamos que estes fatores quando exacerbadamente expressos influenciam diretamente no nível do dano causado pelo microorganismo. O paciente que evoluiu à óbito tinha todos os fatores de virulência altamente expressos.
3. Em sua grande maioria, as cepas desta investigação foram sensíveis às drogas testadas. Nenhuma alteração consistente de sensibilidade a antifúngicos pôde ser relacionada à genotipagem ABC, embora o único isolado SDD à 5-fluorocitosina seja do genótipo A, sendo este associado à resistência à esta droga.

Adam, B., G. S. Baillie, and L. J. Douglas. 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 51:344-9.

Alexander, J. W., S. T. Boyce, G. F. Babcock, L. Gianotti, M. D. Peck, D. L. Dunn, T. Pyles, C. P. Childress, and S. K. Ash. 1990. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 212:496-510; discussion 511-2.

Alves, S. H., E. Boff, P. Pozzatti, L. A. Scheid, E. de Loreto, L. T. Ottoneli Oliveira, V. Aquino, L. C. Severo, and J. M. Santurio. 2009. Relationship between susceptibility of *Candida spp.* isolates to amphotericin B and death or survival of patients with candidemia episodes. *Mycopathologia* 167:65-71.

Alves, S. H., E. P. Milan, P. de Laet Sant'Ana, L. O. Oliveira, J. M. Santurio, and A. L. Colombo. 2002. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43:85-6.

Antunes, A. G., A. C. Pasqualotto, M. C. Diaz, P. A. d'Azevedo, and L. C. Severo. 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46:239-41.

Balaban, N., Z. C. Karahan, I. Mumcuoglu, A. Cayirli, and S. Kustimur. 2007. The relationship between *Candida albicans* 25S intron genotypes and antifungal susceptibilities. *Mikrobiyol Bul* 41:245-51.

Banno, Y., T. Yamada, and Y. Nozawa. 1985. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 23:47-54.

Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson, and J. F. Ryley. 1985. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 131:1217-21.

Bates, S., H. B. Hughes, C. A. Munro, W. P. Thomas, D. M. MacCallum, G. Bertram, A. Atrih, M. A. Ferguson, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow. 2006. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281:90-8.

Baumgartner, C., A. M. Freydiere, and Y. Gille. 1996. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *albicans* ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 34:454-6.

Bernhardt, J., D. Herman, M. Sheridan, and R. Calderone. 2001. Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis* 184:1170-5.

Bizerra, F. C., C. V. Nakamura, C. de Poersch, T. I. Estivalet Svidzinski, R. M. Borsato Quesada, S. Goldenberg, M. A. Krieger, and S. F. Yamada-Ogatta. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 8:442-50.

Blankenship, J. R., and A. P. Mitchell. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9:588-94.

Blot, S. I., K. H. Vandewoude, E. A. Hoste, and F. A. Colardyn. 2002. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med* 113:480-5.

Borzotta, A. P., and K. Beardsley. 1999. *Candida* infections in critically ill trauma patients: a retrospective case-control study. *Arch Surg* 134:657-64; discussion 664-5.

Brown, G. D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413:36-7.

Calderone, R. A. 1993. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch Med Res* 24:275-9.

Calderone, R. A., and W. A. Fonzi. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9:327-35.

Casali, A. K., L. Goulart, L. K. Rosa e Silva, A. M. Ribeiro, A. A. Amaral, S. H. Alves, A. Schrank, W. Meyer, and M. H. Vainstein. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 3:405-15.

Chen, K. W., Y. C. Chen, H. J. Lo, F. C. Odds, T. H. Wang, C. Y. Lin, and S. Y. Li. 2006. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J Clin Microbiol* 44:2172-8.

Chong, P. P., Y. L. Lee, B. C. Tan, and K. P. Ng. 2003. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 52:657-66.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008; 28(14):1-40.

Colombo, A. L., and T. Guimaraes. 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.*. Rev Soc Bras Med Trop 36:599-607.

Colombo, A. L., Z. Nakagawa, F. Valdetaro, M. L. Branchini, E. J. Kussano, and M. Nucci. 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida spp.* collected from Brazilian tertiary care hospital. Med Mycol 41:235-9.

Colombo, A. L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock, and J. Morgan. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol 44:2816-23.

Copping, V. M., C. J. Barelle, B. Hube, N. A. Gow, A. J. Brown, and F. C. Odds. 2005. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. J Antimicrob Chemother 55:645-54.

Cowen, L. E., and W. J. Steinbach. 2008. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. Eukaryot Cell 7:747-64.

Cuenca-Estrella, M., W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, B. A. Arthington-Skaggs, E. Mellado, D. W. Warnock, and J. L. Rodriguez-Tudela. 2002. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother 46:3644-7.

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

da Matta, D. A., L. P. de Almeida, A. M. Machado, A. C. Azevedo, E. J. Kusano, N. F. Travassos, R. Salomao, and A. L. Colombo. 2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagn Microbiol Infect Dis 57:399-404.

Dewsnup, D. H., and D. A. Stevens. 1994. Efficacy of oral amphotericin B in AIDS patients with thrush clinically resistant to fluconazole. J Med Vet Mycol 32:389-93.

Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-93.

Douglas, C. M., J. A. Marrinan, W. Li, and M. B. Kurtz. 1994. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. *J Bacteriol* 176:5686-96.

Douglas, L. J. 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 19:139-43.

Ernst, J. F. 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146 (Pt 8):1763-74.

Fadda, M. E., G. S. Podda, M. B. Pisano, M. Deplano, and S. Cosentino. 2008. Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three year survey. *J Prev Med Hyg* 49:69-74.

Filler, S. G. 2006. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* 9:333-9.

Garcia-Sanchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3:536-45.

Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13:122-43, table of contents.

Gillum, A. M., E. Y. Tsay, and D. R. Kirsch. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198:179-82.

Girao, E., A. S. Levin, M. Basso, S. Gobara, L. B. Gomes, E. A. Medeiros, and S. F. Costa. 2008. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. *Med Mycol* 46:581-8.

Godoy, P., I. N. Tiraboschi, L. C. Severo, B. Bustamante, B. Calvo, L. P. Almeida, D. A. da Matta, and A. L. Colombo. 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* bloodstream isolates from Latin American hospitALS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:401-5.

Gokce, G., N. Cerikcioglu, and A. Yagci. 2007. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 164:265-9.

Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 42:1519-27.

Hawser, S. P., and L. J. Douglas. 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2128-31.

Hoyer, L. L., and J. E. Hecht. 2000. The *ALS6* and *ALS7* genes of *Candida albicans*. *Yeast* 16:847-55.

Huang, Y. C., L. H. Su, T. L. Wu, and T. Y. Lin. 2004. Genotyping analysis of colonizing *Candidal* isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 58:200-3.

Hube, B., D. Hess, C. A. Baker, M. Schaller, W. Schafer, and J. W. Dolan. 2001. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* 147:879-89.

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

Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 63:1993-8.

Jacobsen, M. D., A. D. Duncan, J. Bain, E. M. Johnson, J. R. Naglik, D. J. Shaw, N. A. Gow, and F. C. Odds. 2008. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res* 8:1334-8.

Jin, Y., H. K. Yip, Y. H. Samaranayake, J. Y. Yau, and L. P. Samaranayake. 2003. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral

yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 41:2961-7.

Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70:878-88.

Kumamoto, C. A., and M. D. Vences. 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7:1546-54.

Kuriyama, T., D. W. Williams, and M. A. Lewis. 2003. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol* 18:405-7.

Lattif, A. A., U. Banerjee, R. Prasad, A. Biswas, N. Wig, N. Sharma, A. Haque, N. Gupta, N. Z. Baquer, and G. Mukhopadhyay. 2004. Susceptibility pattern and molecular type of species-specific *Candida* in oropharyngeal lesions of Indian human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 42:1260-2.

Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90:939-49.

Maenza, J. R., J. C. Keruly, R. D. Moore, R. E. Chaisson, W. G. Merz, and J. E. Gallant. 1996. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 173:219-25.

Marol, S., and M. Yucesoy. 2008. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses* 51:40-9.

Marr, K. A., C. N. Lyons, K. Ha, T. R. Rustad, and T. C. White. 2001. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:52-9.

Matsumoto, F. E., A. L. Dias, M. S. Melhem, M. W. Szeszs, M. E. Auler, L. S. Ruiz, E. Goncalves da Silva, R. F. Gandra, and C. R. Paula. 2007. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. *Can J Microbiol* 53:1300-6.

Mavor, A. L., S. Thewes, and B. Hube. 2005. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 6:863-74.

McCullough, M. J., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 1999. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 37:417-21.

McCullough, M. J., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 1999. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 29:1220-5.

McManus, B. A., D. C. Coleman, G. Moran, E. Pinjon, D. Diogo, M. E. Bougnoux, S. Borecka-Melkusova, H. Bujdakova, P. Murphy, C. d'Enfert, and D. J. Sullivan. 2008. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 46:652-64.

Merson-Davies, L. A., and F. C. Odds. 1989. A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 135:3143-52.

Meyer, W., K. Maszewska, and T. C. Sorrell. 2001. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med Mycol* 39:185-93.

Milan, E. P., M. N. Burattini, E. G. Kallas, O. Fischmann, P. R. Costa, and A. L. Colombo. 1998. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32:211-6.

Monod, M., and Z. M. Borg-von. 2002. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem* 383:1087-93.

Monod, M., B. Hube, D. Hess, and D. Sanglard. 1998. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144 (Pt 10):2731-7.

Monod, M., G. Togni, B. Hube, and D. Sanglard. 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13:357-68.

Morgan, J. 2005. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep* 7:429-39.

- Mukherjee, P. K., and J. Chandra. 2004. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7:301-9.
- Mukherjee, P. K., K. R. Seshan, S. D. Leidich, J. Chandra, G. T. Cole, and M. A. Ghannoum. 2001. Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* 147:2585-97.
- Nawrot, U., J. Skala, K. Włodarczyk, P. A. Fonteyne, N. Nolard, and J. Nowicka. 2008. Proteolytic activity of clinical *Candida albicans* isolates in relation to genotype and strain source. *Pol J Microbiol* 57:27-33.
- Nguyen, M. H., C. J. Clancy, V. L. Yu, Y. C. Yu, A. J. Morris, D. R. Snyderman, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi. 1998. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 177:425-30.
- Niewerth, M., and H. C. Korting. 2001. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44:361-7.
- Nobile, C. J., J. E. Nett, D. R. Andes, and A. P. Mitchell. 2006. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 5:1604-10.
- Nucci, M., and E. Anaissie. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* 33:1959-67.
- Odds, F. C. 1994. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31:S2-5.
- Odds, F. C. 2008. Secreted proteinases and *Candida albicans* virulence. *Microbiology* 154:3245-6.
- Odds, F. C., N. A. Gow, and A. J. Brown. 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol* 2:REVIEWS1009.
- Pancholi, P., S. Park, D. Perlin, C. Kubin, and P. Della-Latta. 2004. Molecular characterization of fluconazole resistance in a case of *Candida albicans* ocular infection. *J Clin Microbiol* 42:5938-9.

Pelz, R. K., C. W. Hendrix, S. M. Swoboda, M. Diener-West, W. G. Merz, J. Hammond, and P. A. Lipsett. 2001. Double-blind placebo-controlled trial of fluconazole to prevent Candidal infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 233:542-8.

Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133-63.

Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1:11-23.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, and S. A. Messer. 2001. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 39:3254-9.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, and R. J. Hollis. 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* 41:1440-6.

Price, M. F., I. D. Wilkinson, and L. O. Gentry. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7-14.

Rex, J. H., C. R. Cooper, Jr., W. G. Merz, J. N. Galgiani, and E. J. Anaissie. 1995. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 39:906-9.

Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 24:235-47.

Rosas, R.C., Nucci, M, Castelo A., Salomão, R., Blecher S., Almeida, L.P., Santos, V. and Colombo, A.L. (2004) Predictive value of *Candida spp.* colonization in the diagnosis of candidemia in intensive care unit patients 44 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, p 410.

Saiman, L., E. Ludington, M. Pfaller, S. Rangel-Frausto, R. T. Wiblin, J. Dawson, H. M. Blumberg, J. E. Patterson, M. Rinaldi, J. E. Edwards, R. P. Wenzel, and W. Jarvis. 2000. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr Infect Dis J* 19:319-24.

Sampaio, P., L. Gusmao, A. Correia, C. Alves, A. G. Rodrigues, C. Pina-Vaz, A. Amorim, and C. Pais. 2005. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol* 43:3869-76.

Sanglard, D., and F. C. Odds. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2:73-85.

Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48:365-77.

Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48:365-77.

Shin, J. H., S. J. Kee, M. G. Shin, S. H. Kim, D. H. Shin, S. K. Lee, S. P. Suh, and D. W. Ryang. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 40:1244-8.

Soll, D. R. 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2):279-88.

Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283:1535-8.

Staab, J. F., C. A. Ferrer, and P. Sundstrom. 1996. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 271:6298-305.

Stephan, F., M. S. Bah, C. Desterke, S. Rezaiguia-Delclaux, F. Foulet, P. Duvaldestin, and S. Bretagne. 2002. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* 35:1477-83.

St-Germain, G., M. Laverdiere, R. Pelletier, P. Rene, A. M. Bourgault, C. Lemieux, and M. Libman. 2008. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 19:55-62.

Sugita, T., S. Kurosaka, M. Yajitate, H. Sato, and A. Nishikawa. 2002. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 46:881-3.

Sugita, T., M. Nakajima, R. Ikeda, T. Matsushima, and T. Shinoda. 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 40:1826-30.

Sundstrom, P. 1999. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2:353-7.

Tavanti, A., A. D. Davidson, M. J. Fordyce, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds. 2005. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43:5601-13.

Tavanti, A., G. Pardini, D. Campa, P. Davini, A. Lupetti, and S. Senesi. 2004. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*SAP1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol* 42:4726-34.

Vincent, J. L., E. Anaissie, H. Bruining, W. Demajo, M. el-Ebiary, J. Haber, Y. Hiramatsu, G. Nitenberg, P. O. Nystrom, D. Pittet, T. Rogers, P. Sandven, G. Sganga, M. D. Schaller, and J. Solomkin. 1998. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med* 24:206-16.

Voss, A., J. L. le Noble, F. M. Verduyn Lunel, N. A. Foudraine, and J. F. Meis. 1997. Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection* 25:8-11.

Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793-808.

Warren NG, and Hazen KC. *Candida, Cryptococcus and other yeast of medical importance*. Manual of Clinical Microbiology. 1995; 723-727.

Weems, J. J., Jr. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 14:756-66.

Wey, S. B., M. Mori, M. A. Pfaller, R. F. Woolson, and R. P. Wenzel. 1988. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 148:2642-5.

Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39:309-17.

Xu, J., C. M. Boyd, E. Livingston, W. Meyer, J. F. Madden, and T. G. Mitchell. 1999. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol* 37:3835-43.

Xu, Y., L. Chen, and C. Li. 2008. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *J Antimicrob Chemother* 61:798-804.

Yang, C. W., T. M. Barkham, F. Y. Chan, and Y. Wang. 2003. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *J Clin Microbiol* 41:472-4.

Zhang, T., W. Li, D. Li, Y. Wang, and J. Sang. 2008. Role of *CaECM25* in cell morphogenesis, cell growth and virulence in *Candida albicans*. *Sci China C Life Sci* 51:362-72.

Zhao, X., S. H. Oh, and L. L. Hoyer. 2007. Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol* 45:429-34.

Zhao, X., S. H. Oh, K. M. Yeater, and L. L. Hoyer. 2005. Analysis of the *Candida albicans* *als2p* and *als4p* adhesins suggests the potential for compensatory function within the *ALS* family. *Microbiology* 151:1619-30.157

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](#)