

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

PAMELLA DE BRITO XIMENES VILELA

**CÂNCER DE PRÓSTATA E INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA: ABORDAGEM
CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA**

Recife
2018

PAMELLA DE BRITO XIMENES VILELA

**CÂNCER DE PRÓSTATA E INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA: ABORDAGEM
CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife
2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Vilela, Pamella de Brito Ximenes

Câncer de próstata e infecção fúngica invasiva : abordagem clínico-epidemiológica e de marcadores de virulência / Pamella de Brito Ximenes Vilela. - 2018

81 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr^a. Rejane Pereira Neves.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Próstata – Câncer. 2. Micologia médica. 3. Fungos. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (Coorientador). III. Título.

616.65

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 014

PAMELLA DE BRITO XIMENES VILELA

**CÂNCER DE PRÓSTATA E INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA: ABORDAGEM
CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 28/08/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Rejane Pereira Neves/ UFPE (Orientadora)

Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Membro externo)

Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Membro externo)

Dra. Ildnay de Souza Lima Brandão (Membro externo)

Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto (Membro externo)

Dedico esta tese à todos os profissionais da área da saúde que trabalham diariamente com o intuito de minimizar o sofrimento e de salvar a vida dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo amor a mim dedicado, por sempre ouvir minhas orações e renovar minhas forças.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, José Lelis Ximenes e Maria dos Praseres de Brito Lucena Ximenes, por todo amor, dedicação e compreensão pelas ausências em alguns momentos.

Agradeço ao meu esposo Rafael José Vilela de Oliveira, por todo amor e companheirismo.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Rejane Pereira Neves, por todos os ensinamentos transmitidos.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, por todo apoio e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF), por possibilitarem a realização desta pesquisa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Agradeço aos professores do Departamento de Micologia, em especial a Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães e ao Prof. Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Micologia Médica e do Laboratório de Imunodiagnóstico de Micoses Sistêmicas, Michellângelo Nunes, Daniela Buonafina, Melyna de Andrade, Franz de Assiz, Ana Paula Santiago, Carlos, Tatiana, Adryelle, Ertênia, Anthony, Eduarda, Hallana, Audilene, Cícero, José, Ana Emília, Thâmara, Luiz, Madi, Nadyr, Nadja e Raquel, por todo apoio e amizade.

Agradeço aos amigos da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Carlos Fragoso, Diogo Xavier, Catarina de Lima, Thalline Cordeiro, Walter Pinto, Jadson Bezerra, Natália Souza, Sérgio Ramos e Aline Bomfim, pela amizade e cumplicidade.

Agradeço a minhas amigas e amigos, Pâmella Souza, Nathalie do Nascimento, Ewerton Florencio, Alexsandra Dantas, Profa. Danielle Macêdo, Ildnay Brandão, Heloísa Moraes e Silvio Pereira, por todo carinho e por estarem sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso.

Agradeço ao Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e ao Comitê de Ética em Pesquisas, por permitirem o desenvolvimento da pesquisa nesta instituição.

Agradeço aos médicos urologistas Dr. Luiz Henrique de Andrade Araújo, Dr. Rômulo Augusto Lucena de Vasconcelos, Dr. Leônidas Nogueira Gomes Rabêlo, Dr. André Frederico Franklin Maciel, Dr. Michel Falcão Bredow, Dr. Paulo Carvalho Neto, Dr. Françualdo Barreto, Dr. Gustavo, Dr. Clovis Fraga Tenório Pereira e Dr. Mauro Ricardo Lima Marques e ao médico anestesiológico Dr. Holmes Naspoline Filho, por toda atenção, incentivo e apoio para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço as técnicas em enfermagem Patrícia Alves, Geisa Ramos e Carla de Oliveira e a instrumentadora Niedja, por toda atenção e apoio no bloco cirúrgico.

Agradeço aos pacientes que aceitaram participar, de forma voluntária, desta pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pela realização das imagens em microscopia eletrônica.

Agradeço ao Dr. Arthur Clark e ao Me. Matheus, pelo apoio na realização das análises histoquímicas e imunohistoquímicas.

Agradeço a todos que participaram da minha vida, e que de forma indireta contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

“Enfrentar o câncer é acreditar que a ciência acompanhada da fé pode ter resultados bem melhores.”

Projeto Doe Palavras, 2015

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública importante, sendo o câncer de próstata a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens. Devido a imunodepressão desenvolvida neste grupo de pacientes, estes se tornam susceptíveis a infecções oportunistas, dentre as quais, observamos as infecções fúngicas. Este trabalho teve como objetivo, demonstrar a presença de infecções fúngicas em pacientes com câncer de próstata, a capacidade dos isolados clínicos em formarem biofilme e a utilização de lectinas como marcadores celulares teciduais e microbianos. Foram realizadas coletas de fragmentos prostáticos em 200 pacientes, a partir de biópsias, ressecções transuretrais e por prostatectomias radicais. Dos pacientes avaliados, dois apresentaram prostatite fúngica, e através de técnicas clássicas e moleculares os agentes etiológicos foram identificados como, *Candida glabrata* e *Trichosporon inkin*. Após testes de susceptibilidade *in vitro*, o isolado de *C. glabrata* apresentou sensibilidade a caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B, sendo dose dependente para o fluconazol. E *T. inkin* apresentou resistência à caspofungina, micafungina e anidulafungina, sendo sensível ao fluconazol e à anfotericina B. As duas espécies demonstraram a capacidade de formar biofilmes maduros com 48 horas. Também foi analisado o perfil de carboidratos das paredes celulares fúngicas e teciduais, com a marcação das lectinas WGA, Con A, UEA-I e PNA e da galectina-3, observando-se diferença na presença do adenocarcinoma de próstata e principalmente quando associado à infecção fúngica. Dessa forma, concluímos que, os fatores de virulência dos fungos são fundamentais no estabelecimento e disseminação das infecções, e que o uso das técnicas de citoquímica, histoquímica e imunohistoquímica podem auxiliar no reconhecimento precoce de possíveis alterações na próstata, como o câncer, com ou sem processo fúngico infeccioso.

Palavras-chave: Adenocarcinoma. *Candida glabrata*. *Trichosporon inkin*. Biofilme. Lectinas. Galectina-3.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem, with prostate cancer being the second most common malignant neoplasm in men. Due to the immunosuppression developed in this group of patients, these become susceptible to opportunistic infections, among which, the fungal infections are observed. This work aimed to demonstrate the presence of fungal infections in patients with prostate cancer, the ability of clinical isolates to form biofilm and the use of lectins as tissue and microbial cell markers. Prostatic fragments were collected in 200 patients, from biopsies, transurethral resections and radical prostatectomies. Of the evaluated patients, two presented fungal prostatitis, and through classical and molecular techniques the etiological agents were identified as *Candida glabrata* and *Trichosporon inkin*. After in vitro susceptibility tests, the *C. glabrata* isolate presented sensitivity to caspofungin, micafungin, anidulafungin and amphotericin B, being dependent dose for fluconazole. And *T. inkin* presented resistance to caspofungin, micafungin and anidulafungin, being sensitive to fluconazole and amphotericin B. Both species demonstrated the ability to form mature biofilm with 48 hours. The carbohydrate profile of the fungal and tissue cell walls was also analyzed with the marking of WGA, Con A, UEA-I and PNA lectins and galectin-3, showing difference in the presence of prostate adenocarcinoma and especially when associated with fungal infection. Thus, we conclude that, factors of fungi virulence are fundamental in the establishment and dissemination of infections, and that the use of cytochemical, histochemical and immunohistochemical techniques may help in the early recognition of possible changes in the prostate, such as cancer, with or without infectious fungal process.

Key-words: Adenocarcinoma. *Candida glabrata*. *Trichosporon inkin*. Biofilm. Lectins. Galectin-3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Teste da urease. A: Controle negativo. B: Reação positiva do *Trichosporon inkin* (URM 7551). C: Reação positiva do *Trichosporon inkin* (URM 7552).....51
- FIGURA 2** – Filograma obtido a partir de análises de sequências da região LSU (D1/D2) do rDNA, mostrando o posicionamento taxonômico das espécies de *Trichosporon*. As sequências obtidas neste estudo são mostradas em negrito.....52
- FIGURA 3** – Teste de similaridade genética dos isolados *Trichosporon inkin* (URM 7551) e *Trichosporon inkin* (URM 7552), através dos primers GACA₄ e GTG₅.....52
- FIGURA 4** – Teste da urease. A: Controle positivo. B: Reação negativa de *Candida glabrata* (URM 7550).....55
- FIGURA 5** – Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento taxonômico da *Candida glabrata* (URM 7550).....56
- FIGURA 6** – Formação do biofilme dos isolados de *Trichosporon inkin*. A: Início da formação com 24 horas. B: Biofilme maduro com 48 horas.....57
- FIGURA 7** – Formação do biofilme do isolado de *Candida glabrata*. A: Início da formação com 24 horas. B: Biofilme maduro com 48 horas.....57
- FIGURA 8** – Padrões de marcação de lectinas dos isolados de *Trichosporon inkin*. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).....59
- FIGURA 9** – Padrões de marcação de lectinas do isolado de *Candida glabrata*. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).....59

FIGURA 10 – Padrões de marcação de lectinas dos tecidos prostáticos. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).61

FIGURA 11 – Padrão de marcação de galectina-3 em tecidos prostáticos. A: Presença de marcação em fragmentos prostáticos de paciente com Hiperplasia Benígna da Próstata. B: Ausência de marcação em fragmentos prostáticos de paciente com Adenocarcinoma de Próstata.62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Padrão de marcação de lectinas dos tecidos prostático.....	60
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	- Câncer de Próstata
PSA	- Antígeno Prostático Específico
HCP	- Hospital de Câncer de Pernambuco
RTU	- Ressecção transuretral
PTR	- Prostatectomia radical
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
SDA	- Sabouraud Dextrose Ágar
BHI	- Brain Heart Infusion
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
CTAB	- Brometo de Cetil Trimetilamonio
ITS	- Espaço Interno Transcrito
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
UV	- Ultra violeta
Tris-HCl	- Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano
pH	- Potencial hidrogênio iônico
KCl	- Cloreto de potássio
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
rDNA	- Ácido desoxirribonucleico ribossômico
LSU	- Subunidade larga do ribossomo
UFC	- Unidades formadoras de colônia
Con A	- Concanavalina A
WGA	- Wheat germ agglutinin
PNA	- Peanut agglutinin
UEA-I	- Ulex europaeus agglutinin
PBS	- Tampão fosfato-salino
DAB	- Diaminobenzidina
HPB	- Hiperplasia prostática benigna
MALDI- TOF MS	- Espectrometria de Massa por Tempo de Voo Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz

CRD	- Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
ISSR	- Inter Simple Sequence Repeats
ATCC	- American Type Culture Collection
YNB	- Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO.....	18
1.2	OBJETIVOS.....	18
1.2.1	Objetivo Geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos.....	18
1.3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	19
1.3.1	Desenho e tipo de estudo.....	19
1.3.2	Local de coleta.....	19
1.3.3	Crterios de inclusão e exclusão.....	19
1.3.4	Aspectos éticos.....	19
1.3.5	Coleta dos dados e das amostras clínicas.....	20
1.3.6	Análise de riscos e benefícios.....	20
1.3.7	Diagnóstico micológico.....	20
1.3.8	Identificação clássica.....	21
1.3.9	Identificação molecular.....	21
1.3.10	ISSR-PCR para a tipagem das espécimes re-isoladas.....	22
1.3.11	Análises filogenéticas.....	23
1.3.12	Teste de sensibilidade antifúngica in vitro.....	23
1.3.13	Avaliação da capacidade de formação do biofilme.....	24
1.3.14	Caracterização das leveduras quanto à expressão de carboidratos na parede celular – ensaio de marcação com lectinas.....	26
1.3.15	Avaliação da expressão de carboidratos nas células do tecido da próstata através da histoquímica com lectinas.....	26
1.3.16	Imuno-histoquímica com galectina-3.....	27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1	CÂNCER DE PRÓSTATA.....	28
2.1.1	Diagnóstico.....	29
2.1.2	Tratamento.....	30
2.2	INFECÇÃO FÚNGICA.....	32
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DOS FUNGOS.....	35
2.3.1	Aderência.....	36
2.3.2	Biofilme.....	37

2.3.3 Lectinas.....	39
2.4 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.....	41
2.5 TRATAMENTO ANTIFÚNGICO.....	43
2.5.1 Sensibilidade.....	44
2.5.1.1 Poliênos.....	45
2.5.1.2 Azólicos.....	47
2.5.1.3 Equinocandinas.....	48
3 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	50
3.1 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA.....	50
3.2 BIOFILME.....	56
3.3 CITOQUÍMICA COM LECTINAS.....	58
3.4 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS.....	60
3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA COM GALECTINA-3.....	61
4 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A– APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	79

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública importante, sendo o câncer de próstata (CaP) a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens, superado apenas pelo câncer de pele não-melanoma. O número de novos casos no Brasil estimados para 2018 foi de 68.220 e em 2013 o número de mortes registradas foi de 13.772 (INCA, 2018). Em Pernambuco devido à baixa procura aos atendimentos primários de saúde pelos homens, o número de novos casos estimados para 2012 foi de 2.310, sendo destes 500 casos apenas em Recife, capital do estado (SILVA, SANTOS, MELLO, 2013).

O câncer de próstata ainda possui etiologia desconhecida, entretanto alguns fatores de risco são associados como: fatores genéticos em indivíduos com histórico familiar, idade superior a 65 anos, indivíduos negros possuem maior incidência e severidade da doença, componentes dietéticos com maior risco associado à ingestão de gordura animal e carnes. Adicionalmente, tem sido pesquisado a relação de fatores virais e inflamatórios (GUERRA, MOURA GALLO, MENDONÇA, 2005; RHODEN, AVERBECK, 2010; DORNAS et al., 2008). Muitos organismos patogênicos diferentes têm sido observados para infectar e provocar uma resposta inflamatória na próstata, dentre eles bactérias, vírus, fungos e parasitas (DE MARZO et al., 2007).

Os fungos são responsáveis por causar infecções oportunistas, principalmente em indivíduos imunodeprimidos pelo desenvolvimento do CaP (OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, no ambiente hospitalar estas infecções estão geralmente associadas ao cateterismo vesical e cerca de 10% dos pacientes hospitalizados necessitam de instrumentação do trato urinário (LIMA et al., 2007). Os cateteres vesicais predispõem à infecção fúngica, devido à colonização das superfícies do cateter, permitindo o desenvolvimento de biofilmes no qual os microrganismos ficam aderidos, promovendo uma alta resistência aos antimicrobianos (DIAMENT et al., 2010; PINA et al., 2010).

O diagnóstico do CaP pode ser realizado a partir do toque retal, da dosagem do Antígeno Específico Prostático (PSA) e por biópsia com auxílio da ultrassonografia transretal (RODRIGUES, SALES, 2013). O estudo histopatológico permite o diagnóstico conclusivo do CaP (DORNAS et al., 2008). Os tumores malignos apresentam com frequência padrões irregulares na glicolização de

glicoconjugados em suas células, com isso as lectinas por apresentarem um domínio de reconhecimento a carboidratos, podem ser utilizadas como marcadores histoquímicos para glicoconjugados da superfície celular (MURAMATSU, 1993), e demonstram viabilidade e eficiência como marcadores de células transformadas (BELTRÃO, 2001).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Infecções da próstata são geralmente causadas por microrganismos patogênicos, dentre estes, os fungos são responsáveis por causar infecções invasivas principalmente em indivíduos com baixa imunidade decorrente do desenvolvimento de neoplasia do órgão, associado ao uso de medicamentos imunossupressores. Além disso, o uso de dispositivos vesicais hospitalares por estes pacientes aumentam a probabilidade dos agentes etiológicos em formar biofilme fazendo com que haja um aumento na resistência às defesas do hospedeiro e as terapias antifúngicas. Dessa maneira, a realização oportuna do diagnóstico laboratorial micológico nos pacientes que apresentam câncer de próstata associada à análise das características fenotípicas de patogenicidade, como biofilme e expressão glicídica de superfície celular, podem ser utilizadas como uma nova estratégia de diagnóstico, no auxílio a uma melhor descrição epidemiológica dos casos e na escolha terapêutica mais adequada.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a presença de infecções fúngicas em pacientes com câncer de próstata, a capacidade dos isolados clínicos em formarem biofilme e a utilização de lectinas como marcadores celulares teciduais e microbianos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Coletar amostras clínicas em pacientes com suspeita e com diagnóstico de câncer de próstata;
- b) Isolar os fungos e identificá-los por métodos clássicos e moleculares;

- c) Determinar a similaridade genética entre os isolados clínicos de mesma espécie;
- d) Demonstrar a capacidade dos isolados clínicos em formar biofilme;
- e) Caracterizar, através da marcação com lectinas, a expressão de glicoproteínas da parede celular dos isolados clínicos;
- f) Evidenciar a expressão de carboidratos nas células do tecido da próstata através da histoquímica com lectinas;
- g) Caracterizar o tecido da próstata através da imunohistoquímica com galectina.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Desenho e tipo de estudo

Estudo epidemiológico do tipo exploratório e prospectivo.

1.3.2 Local de coleta

As coletas foram realizadas em pacientes atendidos no setor de urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), Recife.

1.3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos pacientes com suspeita ou com diagnóstico de câncer de próstata, atendidos no setor de urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e com idade superior a 18 anos.

Foram excluídos pacientes sem suspeita ou sem diagnóstico de câncer de próstata e com idade inferior a 18 anos.

1.3.4 Aspectos éticos

O estudo foi realizado obedecendo às diretrizes e normas regulamentares de pesquisa envolvendo seres humanos Resolução nº 466/2012 do Ministério da Saúde e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCP, sob o CAAE nº 43177015.0.0000.5205 (ANEXO A). Os pacientes assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes de serem submetidos à coleta.

1.3.5 Coleta dos dados e das amostras clínicas

As coletas foram realizadas no período de outubro de 2015 a março de 2017. A obtenção dos dados dos pacientes foi através de questionário aplicado antes da realização do procedimento cirúrgico, além da avaliação do prontuário dos pacientes. O material biológico analisado foi o tecido da próstata, coletado através de biópsia transretal, RTU (ressecção transuretral) ou PTR (prostatectomia radical) por profissional médico, dentro do bloco cirúrgico. Os fragmentos de tecido obtidos foram mantidos em dois recipientes, um contendo água com antibiótico e outro contendo formol 10%. Também foram realizadas coletas no reto dos pacientes, antes das biópsias, com o auxílio de *swab* e mantidos em tubos com água com antibiótico (Cloranfenicol). Posteriormente, foram transportadas e processadas para diagnóstico laboratorial micológico no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

1.3.6 Análise de riscos e benefícios

Riscos foram mínimos, pois a coleta de tecido da próstata foi realizada por profissionais qualificados, contudo ocorreram pequenas hemorragias localizadas que são inerentes ao procedimento. O material biológico obtido não foi de uso exclusivo da pesquisa, uma vez que essas amostras são utilizadas na rotina para diagnóstico e tratamento dos pacientes. O único risco direto que poderia ter ocorrido, era o constrangimento no momento da entrevista. No entanto, foi esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

Benefícios diretos aos participantes da pesquisa incluíram, rapidez e precisão no diagnóstico micológico, nos quais, levaram a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz, melhorando, assim, a qualidade de vida dos pacientes com câncer de próstata associado a infecções fúngicas. Os preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 da CONEP (Comissão Nacional de ética em Pesquisa) foram respeitados e as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa, constaram no TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

1.3.7 Diagnóstico micológico

O diagnóstico laboratorial micológico teve início com a preparação de lâminas clarificadas com KOH 20% de acordo com o material biológico para a realização da

microscopia direta (avaliação de parasitismo). Em paralelo, as amostras clínicas foram semeadas ou inoculadas em meio de cultura. O meio SDA (Sabouraud Dextrose Ágar) e BHI (*Brain Heart Infusion*) foram utilizados para o isolamento dos agentes etiológicos que foram mantidos a temperatura de 28 + ou – 2 °C e 37 °C. Após o crescimento fúngico, estes foram purificados para identificação através da taxonomia clássica (BARNETT et al., 2000; RAPPER, FENNEL, 1977; HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002) e molecular (GÓES-NETO et al., 2005; WHITE et al., 1990; KALIYAPERUMAL, KALAICHELVAN, 2008).

1.3.8 Identificação clássica

A caracterização taxonômica dos agentes etiológicos foi realizada através da observação dos aspectos morfológicos, macroscópicos e microscópicos (BARNETT et al., 2000; DE HOOG et al., 2000; KLICH, 2002) e bioquímicas (BARNETT et al., 2000; DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Foram analisadas diferentes características morfológicas como diâmetro, bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (BARNETT et al., 2000; RAPPER, FENNEL, 1977; HOOG et al., 2000). A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada pela observação microscópica das colônias sobre uma lâmina de vidro, contendo uma gota (40 µL) de Azul de Amann (CARRANZA, 1949). As análises bioquímicas compreenderam testes quanto à produção de urease, para tal foi utilizado o meio de cultura ágar uréia (peptona 1 g; glicose 1 g; NaCl 5 g; KH₂PO₄ 2 g; uréia 20 g; vermelho de fenol 0,012 g; ágar 18 g; água destilada q.s.p. 1000 mL; pH 6,8). Uma alça com a colônia pura foi inoculada em toda a superfície do ágar inclinado, com subsequente incubação a 30 °C e observação durante 7 dias. O resultado positivo foi evidenciado através da viragem do indicador da cor amarela inicial do meio para cor rosa ou vermelho-violeta (LACAZ et al., 2002).

1.3.9 Identificação molecular

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de cultivos em SDA contido em tubos de ensaio, mantidos a 28 °C por até seis dias. Toda colônia foi retirada do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5 g de contas de vidro (*glass beads*) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (*acid-washed*, 150-

212 µm e 425-600 µm; Sigma, U.S. sieve). O material foi triturado por agitação em alta velocidade em um *FastPrep*.

A extração do DNA genômico foi realizada com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al., (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e posterior homogeneização do material em tampão CTAB 2 %, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70 % e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Para amplificação da região ITS e LSU rDNA foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e LR1/ LSU2 (VAN TUINEN et al., 1998, SANTIAGO et al., 2014), respectivamente. Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram os mesmos descritos por Oliveira et al., (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR (5 µL) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1 % corados com *GelRed*, e visualizados sob luz UV. Os produtos de amplificação foram purificados com o “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para sequenciamento.

1.3.10 ISSR-PCR para a tipagem das espécimes re-isoladas

As reações de PCR para amplificação das regiões de sequências repetidas (ISSR) foram realizadas com os *primers* (GACA)₄ (5'-GACAGACAGACAGACA-3') e (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). A preparação da mistura de cada reação de PCR consistiu em volume final de 25 µL as seguintes condições: tampão 1 X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.25 mM, primer 0.25 mM, 0.2U Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA. Para a implementação da reação de PCR foi realizada desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos seguido de 35 ciclos, a 95 °C por 30 segundos, um passo de anelamento a 39 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados rDNA foram corados com solução de *GelRed* (0,5 µg/mL) e separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), correndo por 50 minutos a 3 V/cm distância entre os eletrodos, visualizados em um transiluminador

de luz ultravioleta e fotografado. Foram usados marcadores molecular de 1 kb plus (Fermentas[®]).

1.3.11 Análises filogenéticas

A filogenia foi reconstruída por meio de análises independentes de sequências da região ITS. As sequências obtidas foram alinhadas com outras recuperadas do *GenBank* (de acordo com o grupo de fungos em questão) com o auxílio do programa MEGA *version* 5.05 (TAMURA et al., 2007).

A caracterização molecular final se deu com a avaliação filogenética e construção de árvores. As análises bayesiana (1×10^6 gerações) e de máxima verossimilhança (1.000 bootstraps) foram realizadas, respectivamente, com MrBayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003) e PhyML (GUINDON; GASCUEL 2003), executados a partir do programa Topali 2.5 (MILNE et al. 2004). O modelo de substituição nucleotídica foi estimado (SYM+G) usando Topali 2.5.

1.3.12 Teste de sensibilidade antifúngica in vitro

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (2012). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol/L; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Os agentes antifúngicos padrões utilizados foram Anfotericina B (Sigma-Aldrich[®]), Fluconazol (Sigma-Aldrich[®]) e as equinocandinas, Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina. Diferentes concentrações das antifúngicos foram preparados e usados nos intervalos de 0,03 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, diluídos em DMSO; 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, diluído em água, e para as equinocandinas, 0,015 a 8 $\mu\text{g/mL}$, também diluídos em DMSO.

De acordo com M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012), frente a *Candida glabrata*, a anfotericina B apresenta 100% de inibição e possui a CIM de 0,25 a 1 $\mu\text{g/mL}$. Frente ao fluconazol, possui inibição de 50 a 100%, é dose-dependente quando apresenta, $\text{CIM} \leq 32 \mu\text{g/mL}$ e resistentes, $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/mL}$. Frente a anidulafungina e caspofungina, esta espécie de levedura é considerada sensível quando a $\text{CIM} \leq 0.12 \mu\text{g/mL}$, intermediário, $\text{CIM} = 0.25 \mu\text{g/mL}$ e resistente $\text{CIM} \geq 0.5 \mu\text{g/mL}$, com inibição de 50 a 100%. Diferente das outras equinocandinas, *C. glabrata* frente a

micafungina apresenta-se sensível quando $CIM \leq 0.06 \mu\text{g/mL}$, intermediário, $CIM = 0.12 \mu\text{g/mL}$ e resistente, quando $CIM \geq 0.25 \mu\text{g/mL}$. O CLSI não padroniza concentrações inibitórias mínimas para espécies de *Trichosporon* sp.

As leveduras foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) e incubadas por 24h a 35°C. As células dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de Mac Farland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2 a 5×10^3 céls/mL.

Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), nas quais foram dispostos 100 μL de cada uma das diluições das drogas a serem testadas nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 μL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 μL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para anfotericina B foram determinadas para 100%; fluconazol, de 50 a 100%; e equinocandinas de 50 a 100%, em relação aos poços controles. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), o conteúdo dos poços que mostrarem 100% de inibição no crescimento foram cultivados para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico. A CIM foi definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento. Todo o teste foi realizado em triplicata.

1.3.13 Avaliação da capacidade de formação do biofilme

Foram utilizados discos de silicone oriundos de sondas uretrais com 0,6 mm de diâmetro. Para a confecção dos discos, as sondas foram previamente planificadas entre duas lâminas de vidro e processados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Este material foi lixado em granulação fina (lixa 400) para aumentar a superfície de contato e para melhorar a aderência primária das células fúngicas. Posteriormente, com o auxílio de uma lâmina circular, as tiras de silicone foram

cortadas e os discos obtidos lavados com água e sabão e enxaguados com água destilada. Após a secagem do material, o mesmo foi esterilizado em autoclave (HAWSER; DOUGLAS, 1994).

Os ensaios para formação do biofilme foram procedidos de acordo com Vandenbosch et al. (2010) e como controle positivo, foi incluída nos testes a linhagem *Candida albicans* ATCC 90028. O meio de cultura utilizado foi o *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Sigma Sigma Aldrich) suplementado com 5 mM de glicose (Sigma-Aldrich) e pH final 6,1.

Os isolados foram crescidos em Sabouraud Dextrose por 16 horas à 37 °C, em seguida foram centrifugados e removido o sobrenadante para lavagem das células com solução salina a 0,85 % (três vezes). Estas foram ressuspensas em 1 mL de NaCl 0,85% (Novolab, Geraardsbergen, Bélgica) e o inóculo foi posteriormente diluído em meio de cultura YNB suplementado com 5 mM de glicose para se obter densidade óptica de 0,07 a um comprimento de onda de 600 nm.

Para os testes de formação de biofilme, os isolados foram cultivados nos discos de silicone estéreis em placa de microtitulação de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). Após a padronização dos inóculos fúngicos, 1 mL de uma diluição de 1:100 do inóculo em YNB foi adicionado a cada poço contendo um disco de silicone. As placas de microtitulação foram incubadas durante 1 hora à 37 °C. Subsequentemente, os discos de silicone foram lavados (três vezes) com 1 mL de 0,9 % de NaCl para remover as células não aderentes e assepticamente transferido para um novo poço. Em seguida foi adicionado 1 mL de YNB diluído (com uma concentração final de glicose de 0,2 mM), em seguida as placas foram incubadas durante 24 e 48 horas à 37 °C para posterior análise microscópica.

Para a avaliação dos estágios de formação do biofilme por leveduras emergentes, os discos de silicone em que os biofilmes foram formados foram examinados com 24 e 48 horas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um equipamento da marca FEI (Quanta 200 FEG). O processamento das amostras seguiu o protocolo proposto Duarte et al. (2003). Os biofilmes formados nos discos de cateter foram fixados em glutaraldeído a 2,5 % com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por duas horas. Após a fixação, os discos foram lavados com tampão Cacodilato 0,1 M três vezes por 10 minutos para a retirada de todo o fixador. Após esta etapa, foi realizada a pós-fixação na proporção 1:1 Ósmio 2% + tampão Cacodilato 0,1 M por 30 minutos, o que permite maior

contraste do material. Foram realizadas duas lavagens por 10 minutos em tampão Cacodilato 0,1 M e água destilada. Posteriormente as amostras foram submetidas à desidratação seriada com acetona, na concentração de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% durante 5 minutos e submetidas a secagem ao ponto crítico. A montagem do material foi feita em *stubs* de metal contendo fita de carbono e tinta de prata (que servem como condutores de elétrons) e em seguida, metalizadas através do bombardeamento com ouro.

1.3.14 Caracterização das leveduras quanto à expressão de carboidratos na parede celular – ensaio de marcação com lectinas

Na leitura da expressão de carboidratos nos isolados de leveduras, através do uso das lectinas, foi utilizado 1 mL da suspensão (10^7 células por mL) preparadas a partir de colônias crescidas em meio SDA por 48 horas. As células de leveduras foram suspensas em solução de tampão fosfato salino (PBS) e em seguida centrifugadas (2000 rpm) em *ependorfs* de 2 mL por 10 minutos até formação de um conteúdo na forma de *pellet*. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e este conteúdo foi ressuspenso em tripsina (0,1%) por 3 minutos a 37 °C, e uma nova centrifugação foi realizada, ressuspendendo o mesmo em solução de metanol conjugado a peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada intervalo entre as etapas mencionadas, o *pellet* foi lavado em PBS através de centrifugação por 10 minutos, 2 vezes seguidas. Após esta etapa, foi adicionada às células de leveduras as soluções de lectinas WGA, Con A, UEA-I e PNA (20 µg/ mL) e incubando as mesmas a 4 °C por um período de 1 hora. Em seguida, o *pellet* foi novamente ressuspenso em PBS conforme acima mencionado. Para a percepção da aglutinação de lectinas foi adicionado às células um conjugado de 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por um período de permanência de 8 minutos. Seguidamente, o conteúdo foi centrifugado em PBS antes da verificação da aglutinação das lectinas aplicadas, em microscópio óptico.

1.3.15 Avaliação da expressão de carboidratos nas células do tecido da próstata através da histoquímica com lectinas

Foram selecionados fragmentos teciduais da próstata, obtidos cirurgicamente por biópsia transretal, RTU ou PTR de pacientes do setor de Urologia do HCP.

O material colhido foi fixado em formalina a 10%, e posteriormente foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina, obtendo-se cortes com espessura de 4 µm, em micrótomo horizontal (Yamato, Japão) e colocados em lâminas previamente limpas e preparadas com adesivo a base de 3-amino-propyltriethoxy-silano (Sigma, USA).

Foram testadas as lectinas Concanavalina A (Con A), *Wheat germ agglutinin* (WGA), *Peanut agglutinin* (PNA) e *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I), todas conjugadas à peroxidase (Sigma, USA). Os tecidos foram desparafinizados em xilol e desidratados em álcool (70 - 100 %). As lâminas com os tecidos foram tratadas com solução de tripsina (0,1 %) a 37 °C por 2 minutos, em seguida colocados em metanol-H₂O₂ por 20 min e incubados com as lectinas (UEA-I, WGA, PNA e Con A – 20 µg/mL) a 4 °C por 2 horas. As lâminas foram mergulhadas (10 minutos) em 10 mM de PBS pH 7,2. A peroxidase foi revelada pela incubação por 3 minutos em PBS contendo DAB e H₂O₂. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina rápida e analisados em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão). Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, utiliza-se o carboidrato ligante. As ligações das lectinas foram inibidas utilizando-se methyl-α-D-manose para Con A, α-L-fucose para UEA-I, D-galactose para PNA e N-acetilglucosamina para WGA (Sigma, USA).

1.3.16 Imuno-histoquímica com galectina-3

Os tecidos foram cortados em 4 mm, transferidos para lâminas de vidro e desparafinados, como descrito na análise anterior. Os fragmentados foram incubados com tampão de citrato a 100 °C/ 30 minutos sob vapor de água, e lavados por 5 minutos com PBS e incubados com soro bovino liofilizado (para evitar reações cruzadas), em seguida incubados com H₂O₂ por 5 minutos, lavados com PBS e incubados com solução contendo anticorpo monoclonal anti-galectina-3 conjugado à peroxidase (na diluição 1:50) por 1 hora a 25 °C. Os tecidos da próstata foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB Kit, EUA). A revelação do anticorpo obtido por meio de reação de peroxidase foi visualizada após incubação dos tecidos expostos em uma solução contendo DAB suplementado com H₂O₂. Os cortes foram contra-colorados com hematoxilina e examinados em microscópio de luz (Olympus BH-2, Japão) (HSU et al., 1981).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

Câncer é o termo utilizado para denominar um grupo de mais de cem doenças, as quais apresentam células, que se multiplicam de forma desordenada, sendo capazes de invadir outros tecidos e órgãos através do sangue e linfa (INCA, 2018). Segundo estatísticas da *American Cancer Society* (2018) o câncer é a segunda causa mais comum de morte nos EUA, superado apenas pela doença cardíaca. Essa doença é responsável por uma em cada quatro mortes nos Estados Unidos, estima-se que 609.640 americanos morrerão de câncer em 2018, correspondendo a quase 1.700 mortes por dia. Os principais tipos de câncer entre homens e mulheres, que são responsáveis por quase metade do total de morte são o câncer de pulmão, próstata (em homens), mama (em mulheres) e colorretal (SIEGEL et al, 2018).

No Brasil, o CaP é o segundo mais frequente entre os homens (seguindo o câncer de pele não-melanoma), estima-se 68.220 novos casos em 2018. Em valores absolutos e considerando ambos os sexos é o quarto tipo mais comum, sendo a taxa de incidência maior nos países desenvolvidos, quando comparada aos países em desenvolvimento (INCA, 2018).

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, que encontra-se posicionada anteriormente ao reto e abaixo da bexiga, envolvendo parte da uretra. Produz e secreta o líquido prostático, o qual possui pH alcalino que auxilia na locomoção dos espermatozoides e, juntamente com a secreção das vesículas seminais e os espermatozoides na uretra, forma o sêmen (INCA, 2018).

Anatomicamente a próstata é dividida em quatro zonas: periférica, transicional, central e periuretral (MARANDOLA et al, 2004). Os tipos de lesões proliferativas não ocorrem com a mesma frequência em cada região. Enquanto a hiperplasia prostática benigna (HPB) ocorre predominantemente na zona transicional, a maior parte dos adenocarcinomas ocorre na zona periférica e apenas cerca de 30% na zona transicional (JOSHUA et al, 2008). Histologicamente a próstata é constituída por glândulas túbulo-alveolares dispostas em lóbulos circundados por um estroma, contidos dentro da cápsula prostática (LEDUC, 1939; BRANDES et al, 1964).

O câncer e outros processos inflamatórios afetam a glândula prostática com frequência. Em virtude da sua localização, as doenças da próstata geralmente influenciam o controle urinário, ejaculação e raramente dificuldade na defecação (EPSTEIN, 2010). No CaP, as células sofrem mutação, perdendo as características originais e se transformando em células cancerosas. Essas células se multiplicam mais rápido que o tecido de origem e comprimem os órgãos ao redor, causando tais sinais e sintomas. Além disso, podem penetrar no tecido, disseminar pela corrente sanguínea ou sistema linfático e se manter em outro órgão, evento conhecido como metástase (INCA, 2018).

A causa desta neoplasia maligna ainda permanece desconhecida. Contudo, alguns fatores como etnia, idade, influências ambientais, polimorfismos hereditários e níveis hormonais contribuem de modo importante para o surgimento desta doença, a qual pode ser precocemente diagnosticada através de exames periódicos (DE MARZO et al, 2007; EPSTEIN, 2010).

2.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico do CaP pode ser realizado a partir do toque retal, para avaliar o volume da glândula e a presença de nódulos; através da dosagem do Antígeno Específico Prostático (PSA), para definir a propensão a um tumor prostático; e ainda por biópsia com auxílio da ultrassonografia transretal, para estudo histopatológico, que permite o diagnóstico conclusivo (DORNAS et al, 2008; RODRIGUES; SALES, 2013).

O toque retal é um método muito importante para a detecção do CaP, contudo, pode haver falhas na identificação de tumores confinados ao órgão em um estágio inicial ou localizados em porções que não podem ser tocadas, ou seja, somente as porções posterior e lateral da próstata são avaliadas e cerca de 40% dos tumores ficam fora de seu alcance, sendo necessária a associação à dosagem de PSA (YAMAMOTO et al, 2001; GREENE, 2009).

O PSA é uma glicoproteína que atua como uma serina protease, sendo essencialmente produzida pela camada de revestimento epitelial das glândulas para-uretrais e pelo epitélio luminal prostático. O antígeno tem como função liquefazer o sêmen. O aumento dos níveis de PSA na corrente sanguínea tem sido relacionado a

um rompimento na arquitetura da célula da glândula prostática, com a perda da barreira da membrana basal e, como consequência, a entrada de PSA no sangue (POLASCIK et al, 1999; CARTER, 2007; LOEB; CATALONA, 2008). No tecido de CaP, observa-se uma concentração dez vezes maior do que no tecido próstatico normal, uma vez que com a perda normal da arquitetura da glândula, o PSA passa a ter acesso à circulação periférica (STAMEY, 1987; WANG, 1979; LOEB; CATALONA, 2008).

Na prática clínica, há limitações no uso do PSA como marcador tumoral, uma vez que algumas alterações e manipulações da próstata como a ejaculação, prostatites e a HPB, também são capazes de elevar os níveis do PSA (CARAM et al, 2016). Assim, na interpretação dos valores, é considerado indicativo da existência de neoplasia, quando a razão entre a fração livre e o PSA total é menor do que 10% (CATALONA et al, 2000; EASTHAM; SCARDINO, 2001; FERREIRA; KOFF, 2005).

No diagnóstico do CaP, o exame histopatológico do tecido, obtido através de biópsia, permite o diagnóstico conclusivo, sendo considerado o mais preciso. A avaliação anatomopatológica pode fornecer a graduação histológica do sistema de Gleason, que tem como objetivo, apresentar informações sobre o estadiamento do carcinoma de próstata, como a provável taxa de crescimento do tumor e a sua propensão à disseminação, além de auxiliar na escolha do melhor tratamento para o paciente (INCA/MS, 2002).

2.1.2 Tratamento

O tratamento proposto para o CaP é determinado pela perspectiva de vida do paciente e pelo estadiamento da doença. Os estágios são classificados de acordo com as letras T que corresponde à extensão local do tumor, a letra N que indica o envolvimento dos gânglios linfáticos e a M que demonstra a presença da doença em outros pontos do organismo (SROUGI, 2003). Contudo, a decisão do tipo de tratamento depende, além desses fatores, da escolha do paciente (ANANDADAS, 2010) e dos médicos assistentes (UNDERWOOD, 2010).

Os tumores restritos a próstata podem ser tratados com a PTR, cirurgia de remoção da próstata e de alguns linfonodos proximais; com radioterapia externa ou intersticial (braquiterapia). A irradiação externa incide diretamente na próstata

causando a destruição das células cancerosas, a qual é indicada para pacientes com contra-indicação à cirurgia, e a intersticial consiste na implantação de sementes radioativas, sendo indicada para pacientes com bom prognóstico. Quando o tumor não se localiza apenas na próstata e acomete outros órgãos (metástase), a doença pode ser tratada com a orquiectomia bilateral (remoção dos testículos) ou com a administração de estrogênios ou análogos sintéticos do hormônio de liberação do hormônio luteinizante (BRASIL, 2002; SROUGI, 2003).

A “conduta de espera” é utilizada especialmente em pacientes idosos com comorbidades significativas. O paciente não é tratado até que apresente algum sintoma, o que é normalmente associado ao avanço da doença ou metástase. Nessa situação, é indicado uma intervenção paliativa, como a terapia de ablação androgênica, radioterapia focal para aliviar a dor óssea ou RTU a fim de diminuir a obstrução do trato urinário (BILL-AXELSON et al, 2011), o procedimento envolve a remoção de parte da próstata, através da uretra, com o auxílio de um ressectoscópio, o qual possui uma alça elétrica para cortar o tecido e cauterizar os vasos sanguíneos (KACKER et al, 2011; MCVARY et al, 2011).

Adicionalmente à terapêutica, se faz a vigilância ativa, que consiste no acompanhamento das mudanças no grau de agressividade do câncer, através de biópsias em série e dosagens dos níveis de PSA. Então, caso ocorra alguma mudança significativa, torna-se necessária a intervenção por meio de terapia local definida (TOSOIAN et al, 2011). A vigilância ativa tem como objetivo, reduzir os danos associados ao tratamento tradicional do CaP, no entanto, ainda é necessário padronizar os critérios de inclusão e o regime de vigilância que resultaria ou não na intervenção invasiva (SANDA et al, 2008; ALEMOZAFFAR et al, 2011).

A quimioterapia foi avaliada pela primeira vez em 1976 para o CaP, e observou-se apenas 7% de respostas positivas. Estratégias de quimioterapia isoladas ou em combinação foram avaliadas, mas os resultados foram insatisfatórios (NETTO Jr, 1999). O tratamento quimioterápico não é utilizado com frequência em pacientes com CaP, pois o adenocarcinoma da próstata é pouco sensível aos antineoplásicos, sendo utilizada apenas como paliativo para sintomas e/ou obter aumento de sobrevida (RODRIGUES et al, 2014).

Ademais, alguns fatores incluindo o *status* imunológico do paciente, uso abusivo de antibióticos, idade (idosos), procedimentos invasivos e falhas nos procedimentos de controle de infecções secundárias, podem conduzir ao

desenvolvimento de infecções neste órgão, especialmente por fungos (BRASIL, 2004).

2.2 INFECÇÃO FÚNGICA

Os portadores de câncer apresentam um importante déficit imunológico, podendo ocorrer de forma secundária à doença de base ou após tratamento. O avanço nos tratamentos antineoplásicos, embora permitam que os pacientes tenham uma sobrevida maior, também expõem a um aumento no risco de infecções (NEUBURGER; MASCHMEYER, 2006; SAFDAR et al, 2011). A imunossupressão e sua regulação apresentam correlação com a incidência e a severidade das infecções (SOUSA et al, 2010). Pacientes imunossuprimidos apresentam predisposição a eventos infecciosos por defeitos permanentes ou transitórios nos mecanismos de defesa, sejam eles específicos (imunidade celular e humoral) ou não (mucosas, pele, microbiota normal, sistema fagocítico, citocinas e complemento) (FERNANDES et al, 2000).

As infecções se tornaram a primeira causa de mortalidade dos pacientes portadores de neoplasias malignas, principalmente aqueles com neutropenia prolongada (VOLKOW, 2000). É fundamental a ação dos neutrófilos para controle de infecções, uma vez que estas células são responsáveis por iniciar e executar a resposta inflamatória aguda (PAGANO et al, 2011). O risco de infecção por fungos é inversamente proporcional à contagem de neutrófilos elevando-se quanto maior for o período de duração da neutropenia (BELLESSO et al, 2010). Assim, as alterações na imunidade mediada por células predispõem os indivíduos a infecções fúngicas (PAGANO et al. 2011).

Além dos neutrófilos, os monócitos também são componentes do sistema de defesa celular, e sua redução está relacionada com o desenvolvimento de infecção fúngica. Os neutrófilos juntamente com os monócitos/macrófagos fagocitam os propágulos fúngicos na tentativa de eliminar a infecção (DVORAK et al, 2005; GARCIA-VIDAL et al, 2008; BADDLEY et al, 2010; PAGANO et al, 2011).

Em pacientes com CaP, as infecções por fungos na próstata são pouco diagnosticadas, diferente das infecções bacterianas. Contudo, as prostatites fúngicas podem causar sintomas no trato urinário inferior, com risco importante de

evolução para uma infecção sistêmica, e nestes casos o paciente apresenta um estado imunológico comprometido pela doença ou medicação instituída (GILBERT et al, 2007).

A prostatite fúngica é diagnosticada por meio de exame histológico e cultura de fluido e tecido da próstata. A prostatite granulomatosa causada por fungos está associada com as micoses sistêmicas candidíase, criptococose, blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose (MEARES, 1997).

A infecção por espécies de *Candida* no epidídimo ou na próstata é rara, mas pode estar associada com diabetes e uso de cateteres urinários (SECIL et al, 1998; GIANNOPOULOS et al, 2001), podendo causar uma variedade de condições clínicas que incluem pielonefrite (MORRIS et al, 2002), uropatia obstrutiva (BELL et al, 1993) e cistite (JACOBS et al, 1996).

O envolvimento de outras leveduras também foi relatado, como as do gênero *Cryptococcus* e *Trichosporon*. De 1946 a 2005, houve 29 casos notificados de envolvimento de espécies de *Cryptococcus* com a próstata. Inicialmente, os casos foram descobertos ao acaso após a realização de autópsia, mas em diagnósticos posteriores foram observados pela cultura de urina, sangue, líquido ou tecidos da próstata (SIDDIQUE et al, 2005). Contudo, vários relatos demonstram que a glândula prostática pode atuar como um órgão reservatório desse fungo e potencial fonte de reinfecção após a conclusão da terapia (LARSEN et al, 1989; NDIRIMBIE et al, 1994). Ainda, infecções causadas por espécies de *Trichosporon* tem sido associado com anormalidades do trato urinário ou cateteres, e em geral não evoluem para doença sistêmica (ANAISSE et al, 1992; GOKAHMETOGLUS et al, 2002). Entretanto, *Trichosporon* spp. tem sido reconhecido como um patógeno oportunista emergente para infecção invasiva em pacientes imunocomprometidos, como aqueles portadores de câncer (TREVIÑO et al, 2014).

Um estudo de 51 pacientes com blastomicose sistêmica verificou que 11 pacientes (22%) tiveram envolvimento geniturinário. Destes 11 pacientes, 10 (91%) apresentaram infecção no epidídimo e em oito (73%) a próstata infectada. No rim, testículos e prepúcio, foram observadas apenas uma lesão em cada (9%) (EICKENBERG et al, 1975).

Em 1943, foi relatado o primeiro caso de coccidioidomicose no trato genital, no qual foram identificados um total de 30 pacientes do sexo masculino com idade média de 58 anos, que tinham coccidioidomicose do trato genital. Todos os

pacientes apresentaram evidência histopatológica de inflamação granulomatosa com esférulas fúngicas, e o isolamento de fungos dimórficos a partir das culturas de urina ocorreu em 19 casos (63%). Os locais do trato genital acometidos foram o epidídimo em 18 casos, a próstata em 14 casos, e os testículos em seis (SOHAIL et al, 2005). Também já foi observada a presença de granulomas de *Coccidioides immitis* na próstata e vesículas seminais de um paciente com 54 anos, diagnosticado com adenocarcinoma na próstata (NIKU et al, 1998). Outro caso ocorreu em um paciente com 62 anos, também com diagnóstico de adenocarcinoma e com histórico de coccidioidomicose disseminada, para o qual foi tratado quatro anos antes do diagnóstico da neoplasia. Sem evidência de doença ativa, foi observada a presença de *C. immitis* na próstata e linfonodos após a realização da prostatectomia (LAWRENCE et al, 1999).

Em um estudo realizado por Yurkanin et al (2006), os autores afirmam que pacientes com prostatite apresentam obstrução urinária, alargamento da próstata, sensibilidade e nódulos palpáveis, no qual revisaram 3676 relatos de infecção no tecido da próstata, em um período de 10 anos, foi observado 44 (1,2%) casos de prostatite por *Coccidioides* sp.

A histoplasmose, assim como a coccidioidomicose, também é causada por um fungo dimórfico e pode produzir desde infecções subclínicas a doença disseminada progressiva (BRADSHER, 1996). Em um caso relatado por Mawhorter et al (2000), apresentou um paciente imunocompetente com uropatia obstrutiva, que ao ser submetido a uma RTU foi diagnosticado com histoplasmose. O exame histopatológico mostrou granulomas necrosantes em todo o tecido da próstata e presença de células leveduriformes morfológicamente consistentes com *Histoplasma capsulatum*.

A prostatite causada por *Aspergillus*, embora rara, é mais comum em pacientes com imunodeficiências (BRUNNER, 1983). Hood et al (1998) relataram o caso de um paciente com AIDS que apresentava obstrução do fluxo da bexiga e prostatite grave. Nos achados físicos a próstata apresentava aumento de tamanho, sendo diagnosticado com aspergilose após exame histológico do tecido prostático. Os fatores predisponentes a essas condições incluíram o uso prolongado de antibióticos, diabetes mellitus, carcinoma do cólon metastático, o uso crônico de esteróides e cateter vesical.

Dependendo da espécie do fungo que acomete a próstata, os pacientes podem apresentar manifestações clínicas diferentes, ou ainda serem assintomáticos, exigindo assim diferentes tratamentos. Em alguns casos assintomáticos, a prostatite fúngica localizada pode ser curada por remoção da glândula infectada e as infecções sintomáticas podem necessitar de prostatectomia e terapia antifúngica sistêmica (YURKANIN et al, 2006).

Spolidorio et al (2003) afirma que apesar dos fungos possuírem a capacidade de influenciar na severidade de alguns tipos de displasias, não há evidências que estes favoreçam o desenvolvimento de tumores, tornando-se necessários estudos para explicar a participação dos fungos na severidade de doenças de base como nas neoplasias. Contudo, sabe-se que estes microrganismos produzem fatores de virulência, os quais os tornam mais adaptados à condição de patógeno.

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DOS FUNGOS

Os fatores de virulência são os mecanismos que possibilitam a invasão da célula ou do tecido do hospedeiro, seguida por dano tecidual superficial ou profundo (NAGLIK et al, 2003). As infecções fúngicas, sobretudo as oportunistas, são geralmente graves, persistentes e recidivantes, em especial as causadas por leveduras (SIDRIM; ROCHA, 2004). Estes processos infecciosos ocorrem inicialmente após a ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro (RIBEIRO, 2008), potencializado pelos fatores de virulência.

A expressão pelos microrganismos, apesar da determinação genética, acontece quando estes são submetidos a determinadas condições ambientais, como temperatura, teor nutricional e atmosfera de oxigênio. Essas condições são específicas para cada microrganismo e para cada isolado, variando também de hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Os fatores de virulência se apresentam de acordo com o tipo, local, estágio da infecção e a natureza da resposta imune do hospedeiro; sendo os principais a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios; dimorfismo, o qual consiste na produção de estruturas filamentosas que facilitam a invasão tissular;

alteração fenotípica; formação de biofilme e produção de enzimas extracelulares e toxinas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MOHANDAS; BALLAL, 2011).

2.3.1 Aderência

As etapas de virulência, que observamos para o desenvolvimento de uma infecção, nem sempre são apresentadas em sua totalidade por um microrganismo; entretanto, o contato entre o patógeno e a superfície do hospedeiro é a etapa inicial do processo infeccioso (RIBEIRO et al, 2004; SILVA et al, 2011). Para que ocorra essa adesão, é necessária a presença de receptores específicos na membrana citoplasmática para a fixação e penetração intracelular do fungo (MAGDALENA; PERRONE, 2001).

A adesão às superfícies celulares do hospedeiro também é influenciada por outros fatores, como a formação de tubo germinativo, variações na temperatura, pH, disponibilidade de carboidratos, produção de proteases, fosfolipases e de outras enzimas extracelulares (VIDOTTO et al, 2003). Segundo Ribeiro et al (2004), o desenvolvimento de micélio por espécies de leveduras dificultam a ação fagocitária pelo sistema imune, favorecendo as infecções fúngicas uma vez que o formato micelial propicia maior aderência e o tamanho dificulta a fagocitose.

De acordo com Silva (2012), dentre os fatores predisponentes à infecção fúngica do trato urinário, destaca-se a utilização abusiva de antibiótico, sondagem vesical e medicamentos imussopressores. A maneira mais comum de proliferação do fungo é de modo ascendente, facilitando com que este patógeno acometa outras áreas, infectando posteriormente a bexiga, via uretra, indo em seguida para o rim ocasionando pielonefrite e, por fim, levando a um quadro mais grave, a fungemia, que se não for tratada, pode levar a óbito.

Entretanto, os mecanismos utilizados pelos fungos para promover a aderência a diversos tipos ou superfícies celulares ainda não foram completamente elucidados, sabe-se que é obtida pela combinação de mecanismos específicos, caracterizados pela interação ligante receptor e não específicos, que estão relacionados com a agregação, hidrofobicidade da superfície celular e interações eletrostáticas (MANFREDI et al, 2006).

As biomoléculas que facilitam a aderência do fungo às células ou ligantes do hospedeiro, são geralmente as adesinas (MANFREDI et al, 2006). E a hidrofobicidade é referente às características estruturais da superfície da parede celular. Fungos que são capazes de regular essa hidrofobicidade, possuem a habilidade de alterar a conformação das fibrilas manoprotéicas (MASUOKA; HAZEN, 1997), favorecendo a aderência dos patógenos às superfícies poliméricas inertes, como cateteres, próteses e válvulas, mas a expressão desta característica pode ser influenciada de acordo com as condições de crescimento, inclusive de acordo com a presença de compostos do próprio hospedeiro (GALLARDO-MORENO et al, 2003, BRANDÃO et al, 2018).

Para Ribeiro (2008) o mecanismo de aderência é complexo, e também envolve glicoproteínas, proteínas do tipo lectinas que possuem a capacidade de reconhecer vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento. Por parte do hospedeiro, receptores celulares para as adesinas de fungos como: fibrina, fibronectina e laminina, auxiliam na colonização da matriz extracelular.

Devido à complexidade dos mecanismos envolvidos na adesão entre a célula fúngica e o hospedeiro, torna-se difícil o conhecimento de todas as etapas envolvidas nesse processo. Contudo, essa compreensão seria favorável para a procura de um alvo mais específico do patógeno, podendo conduzir para uma terapêutica antifúngica mais eficaz, com redução dos efeitos colaterais e da resistência dos fungos (ESQUENAZI et al, 2003).

2.3.2 Biofilme

A capacidade de vários isolados de se aderirem a superfícies inertes ou vivas e se organizarem em comunidades microbianas com metabolismo particular e circundado por uma matriz extracelular compondo um biofilme é um aspecto relativo à virulência dos fungos. Nesta organização, as células fúngicas se apresentam mais resistentes a fármacos e podem representar fontes persistentes de infecção (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; RAJENDRAN, 2013).

Os biofilmes microbianos são descritos como comunidades de microrganismos aderidas irreversivelmente a uma superfície, produzindo uma

substância polimérica extracelular e que apresentam um estado metabólico diferente ao do crescimento planctônico, principalmente com relação à transcrição e interações entre as células (LINDSAY; HOLY, 2008). As vantagens dos microrganismos se estruturarem constituem na maior capacidade de absorção de nutrientes, auxiliando no crescimento mais ordenado da comunidade e maior proteção contra desidratação, radiações UV, fagocitose, e resistência a antimicrobianos (SUZUKI, 2009).

O crescimento desta estrutura pode ser observado em três fases. Na fase inicial, as células planctônicas associam-se ao substrato, formando uma interação hidrofóbica e eletrostática que associada a outros fatores biológicos geram uma aderência à superfície do substrato. Na fase intermediária a multiplicação das microcolônias permitem o início da síntese da matriz extracelular. Com a formação do biofilme ocorre o desenvolvimento de mecanismos de comunicação intercelular que resultam em expressão diferencial de genes. Na fase madura, o biofilme recém-formado é constituído de uma transição de estruturas fúngicas, enredado pela matriz extracelular polimérica, originando crescimento tridimensional (MUKHERJEE et al, 2005).

Em um biofilme maduro, as células mais próximas da superfície se tornam inativas e posteriormente morrem por falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigênio e aumento de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular. Então ocorre o crescimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme regulado através da expressão de genes, que dependem da transmissão de sinais entre as células (LA TOURETTE et al, 2003; CARDOSO, 2004). A matriz do biofilme possui conexões que possibilitam a circulação de nutrientes no interior do biofilme (DORLAN; COSTERTON, 2002). A sinalização célula a célula, especialmente o *quorum sensing* que equivale a um processo de comunicação intra e interespecies microbianas é importante para a formação de biofilmes microbianos. Esta ligação através de auto-reguladores impossibilita o crescimento populacional desnecessário e controla a competição por nutrientes e tem implicações fundamentais no processo infeccioso, principalmente para disseminação e estabelecimento de sítios de infecções (DORLAN, 2002; RAMAGE, 2005).

Segundo Mohandas, Ballal (2011) a formação de biofilme é um mecanismo natural, usado por microrganismos para sobreviver em ambientes hostis, colonizar e

se estabelecer em um novo ambiente, proporcionando proteção contra componentes do ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e troca de material genético. As condições ideais para a formação de biofilme incluem temperatura de 25 - 37 °C, pH neutro e tensão de CO₂ no ambiente. Contudo, sob condições de baixa tensão de oxigênio, observa-se a presença de células planctônicas, devido a diferença dessa condição no seu habitat natural (RAVI et al, 2009).

O desenvolvimento do biofilme por fungos tem sido descrito como uma estratégia relacionada à infecção crônica, como um resultado de resistência adquirida aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro e à terapia antifúngica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006). Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos também podem estar associados a fatores como limitações difusionais dos antimicrobianos pela matriz extracelular, mudanças fenotípicas das células no biofilme e ainda com a formação de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células, com expressão de genes que codificam bombas de efluxo (CHANDRA et al, 2001; CARDOSO, 2004).

De acordo com Kojic, Darouiche (2004) a variabilidade na produção de biofilme entre cepas fúngicas da mesma espécie podem apresentar resultados diferentes, da mesma maneira que as leveduras exibem ampla diversidade fenotípica, a qual pode estar relacionada à patogenicidade e/ou virulência. Além disso, o tratamento das infecções associadas a biofilme pode ser difícil e oneroso, demonstrando a importância do uso de uma metodologia bem estabelecida e de um diagnóstico precoce e eficaz, a fim de anteceder sua formação.

2.3.3 Lectinas

As lectinas caracterizam um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas ubíquas, observadas em várias espécies de vegetais, algas, animais e microrganismos. A depender da origem, podem apresentar padrões distintos de ligação a carboidratos. Comumente, as lectinas de algas possuem massa molecular menor que a maioria das lectinas de plantas e não demonstram afinidade por açúcares simples, ligando-se mais especificamente a oligossacarídeos, especialmente glicoproteínas (KOMATH et al, 2006).

Tanto as lectinas de origem animal quanto as de origem vegetais têm sido bastante utilizadas como ferramentas bioquímicas em pesquisas biotecnológicas e biomédicas (LIS; SHARON, 1998; TEIXEIRA et al, 2007). Essas moléculas apresentam várias atividades biológicas e são utilizadas amplamente como marcadores celulares específicos, reconhecendo inclusive alterações nos padrões de expressão de glicoproteínas associadas à maturação celular e processos patológicos (AMBROSI et al, 2005).

O fenômeno de reconhecimento proteína-carboidrato está relacionado a vários eventos celulares, principalmente na interface parasita-hospedeiro e no controle do crescimento, sinalização e motilidade das células (RÜDIGER et al, 1998). Esse fenômeno é um evento de processos biológicos naturais, sendo considerado a primeira etapa de uma variedade de interações célula-célula, como fertilização, embriogênese, migração celular, defesa imunológica e infecção microbiana (ESQUENAZI et al, 2003).

O reconhecimento específico entre patógenos fúngicos e células do hospedeiro pode ocorrer pela ligação de proteínas à carboidratos, como as lectinas, presentes na superfície de uma das células e que possuirá complementaridade com açúcares na superfície da outra célula (ESQUENAZI et al, 2003). A relação de reconhecimento é suportada por modelos de estudos que demonstram moléculas receptoras na interface fungo-hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al, 2000).

A parede celular fúngica é uma estrutura complexa e dinâmica de várias camadas, está localizada na parte externa da membrana plasmática, e possui a função de manter a forma vegetativa do fungo. Além disso, auxilia na interação inicial entre o microrganismo e o ambiente, age como barreira permeável, com funções nutricionais e conferindo proteção ao protoplasma contra injúrias físicas ou osmóticas (LÓPEZ-RIBOT et al, 2004).

A ligação lectina-carboidrato ocorre através de uma porção limitada da molécula protéica. É o segmento chamado de Domínio de Reconhecimento de Carboidrato ou CRD (Carbohydrate-Recognition Domain) que compreende um domínio globular com uma elevada conservação de resíduos de aminoácidos. Os carboidratos interagem com lectinas através de ligações de hidrogênio, devido ao elevado número de hidroxilas nos açúcares disponíveis, que atuam como doadores ou receptores de hidrogênio. Também participam da interação lectina-carboidrato,

interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals (ELGAVISH; SHANNAN, 1997; LORIS et al, 1998; SANTOS, 2001).

Segundo Lopez-Ribot et al. (2004) a parede celular de leveduras é composta basicamente (80 a 90%) por carboidratos: manano ou polímeros de manose covalentemente associados a proteínas, dando origem as glicoproteínas, também denominadas de mananoproteínas; β -glicanos, polímeros ramificados de glicose que apresentam ligações β -1,3 e β -1,6 e quitina, um homopolímero não-ramificado de N-acetil-D-glicosamina que possui ligações β -1,4.

A composição quantitativa e qualitativa dos glicoconjugados das superfícies das membranas celulares é importante para o desenvolvimento e evolução de várias doenças (TAKANO et al, 2000; YU et al, 2001). De acordo com Jabra-Rizk et al (2001) os glicoconjugados podem ter um papel importante no reconhecimento de moléculas receptoras na célula do hospedeiro, permitindo que ocorra infecção, através da adesão inicial, além de favorecer a formação de biofilmes.

2.4 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico das infecções fúngicas é realizado através de observações clínicas e laboratoriais. Nas micoses, as características clínicas na maioria das vezes não são específicas, sendo semelhantes às causadas por diversos patógenos diferentes, como bactérias e vírus. Nestes casos, o diagnóstico é realizado basicamente pelos resultados da investigação laboratorial (KAUFFMAN, 2011).

O diagnóstico laboratorial de micoses consiste no exame direto da amostra clínica infectada por meio de análise microscópica, no isolamento do patógeno após crescimento em meios de cultura para avaliação das características morfológicas da colônia, em testes imunológicas de reação antígeno-anticorpo e através de provas bioquímicas como as de assimilação de açúcares (KAUFFMAN, 2011; OLIVEIRA, 2014).

O exame direto nos casos de infecção fúngica, possibilita a observação de estruturas fúngicas, fornecendo um diagnóstico presuntivo rápido (BARNES; MARR, 2006; AQUINO et al, 2007; ROSA, 2008; WHEAT, 2009). Esse método pode ser realizado a partir de preparações das amostras clínicas com ou sem adição de hidróxido de potássio (MCCLENNY, 2005; HOPE et al, 2005; ALEXANDER;

PFALLER, 2006). Entretanto, a não visualização de estruturas fúngicas não excluem uma possível infecção (PALACIO et al, 2003; ALEXANDER; PFALLER, 2006). Uma desvantagem é a incapacidade de distinção entre diferentes espécies de fungos patogênicos, o que ressalta a importância do isolamento em meio de cultura para a identificação do agente etiológico (MCCLENNY, 2005; ALEXANDER; PFALLER, 2006; CHAMILOS; KONTOYIANNIS, 2006; WHEAT, 2009; O'GORMAN, 2011).

A escolha do meio de cultura é realizada dependendo do tipo de amostra, da suspeita clínica ou das estruturas observadas no exame microscópico direto (ANVISA, 2013). É recomendado que a cultura seja realizada em duas placas, e incubadas à temperatura de 25 – 30 °C e de 35 – 37 °C, quando houver suspeita de fungo dimórfico, para permitir o crescimento da fase leveduriforme (SIDRIM; ROCHA, 2004). A identificação dos fungos é realizada através da análise da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. Na análise da colônia deve ser observada a cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio, velocidade de crescimento entre outras características. Na análise microscópica devem ser observadas a presença e características de estruturas como, células de leveduras, hifas, esporos, que em geral, são suficientes para identificação do gênero, mas nem sempre das espécies. Sendo muitas vezes necessário o uso de provas bioquímicas ou mesmo técnicas moleculares (GALES et al; 1999; ANVISA, 2013).

Na identificação de fungos, a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS), constitui um método rápido, eficaz e preciso, que tem sido bastante utilizado nos últimos anos (BILLE et al, 2012; POSTERARO et al, 2013). O princípio do MALDI-TOF MS está de acordo com a rápida foto-volatilização e ionização da amostra biológica em uma matriz (ácido orgânico) após o bombardeio por um laser de radiação ultravioleta (UV), sendo em seguida gerada uma análise da amostra ionizada, com base na relação massa/carga (m/z) do espectro de massa (MS) após seu percurso num tubo de “voo”. Essa técnica avalia o conteúdo proteico de células do microrganismo por meio de um espectro, considerado como uma impressão digital específica. O microrganismo é identificado por comparação entre o espectro gerado e um banco de dados de espectros de referência (BDER) (PATEL, 2013).

No diagnóstico, outro método que constitui uma perspectiva para aplicação em laboratórios clínicos e com maior poder de detecção que a cultura, são os métodos moleculares. Esses métodos realizam análises de regiões do genoma

fúngico e diretamente de amostras clínicas (DEL NEGRO, 2008; SIDRIM et al, 2010). A técnica molecular mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), ferramenta capaz de amplificar sequências de DNA, por ação da enzima DNA polimerase (WHITE et al, 2009).

Devido ao alto poder de morbidade e mortalidade por micoses sistêmicas, o diagnóstico rápido e específico é fundamental para melhorar o prognóstico dos pacientes, através do uso de uma terapia antifúngica específica, diminuindo a utilização desnecessária de antifúngicos tóxicos (XAVIER et al, 2008).

2.5 TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

A terapia antifúngica inclui fármacos, que podem possuir ação fungicida ou fungistática, agindo de forma direta sobre os agentes das micoses; e avaliação comportamental e ambiental, na qual são realizadas mudanças de hábitos e adesão de condutas que reduzam o contato, a exposição e a vulnerabilidade aos fungos patogênicos (GUPTA et al, 2002).

Os principais grupos de antifúngicos utilizados na prática clínica no controle de infecções sistêmicas são os poliênicos, representados basicamente pela anfotericina B e formulações lipídicas; os triazólicos, sendo representados em especial pelo fluconazol e voriconazol; e as equinocandinas, que possui como representantes a caspofungina, anidulafungina e micafungina (PAPPAS et al, 2009).

Como consequência da similaridade bioquímica e fisiológica entre as células fúngicas e humanas, os tipos de antifúngicos disponíveis no mercado para tratamento de micoses tornam-se bastante limitados. A maior parte dos agentes antifúngicos, como a anfotericina B e os derivados azólicos, possuem como alvo a síntese do ergosterol que é um esteroide da membrana celular fúngica, semelhante ao colesterol presente na célula humana (ODDS et al, 2003).

O desenvolvimento de novos fármacos para terapia antifúngica tem alterado o tratamento das micoses invasivas, possibilitando o uso de medicamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais, considerando a espécie envolvida e o perfil de susceptibilidade às drogas. Sendo assim, torna-se fundamental para a prática clínica, a compreensão dos mecanismos de ação, do perfil de

susceptibilidade e dos mecanismos de resistência aos diferentes antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

2.5.1 Sensibilidade

O estudo da susceptibilidade antifúngica pode ser utilizado para desenvolver novos fármacos, para pesquisas epidemiológicas, para definir novos esquemas terapêuticos para o combate das infecções causadas por microrganismos patogênicos, em especial as de etiologias fúngicas. Alguns fungos não respondem adequadamente às terapias consideradas de escolha e podem necessitar do uso de novos compostos com atividade antifúngica, pois o uso abusivo das drogas clássicas induz o desenvolvimento de resistência e aumento no grau de toxicidade (REX et al, 2001; WALSH et al, 2008; PFALLER et al, 2010).

De acordo com Krcmery, Barnes (2002) as cepas de *Candida albicans* são mais invasivas e virulentas do que algumas espécies de *Candida* não- *C. albicans*, entretanto estas apresentam menor sensibilidade aos antifúngicos comuns. Fato este de relevância, pois Bonfietti et al. (2012) observaram um aumento na incidência de espécies *Candida* não- *C. albicans* na etiologia da candidemia.

Para Galban, Mariscal (2006) o maior índice de isolamento de *C. parapsilosis* no Brasil e em outros países se deve a utilização do fluconazol de forma empírica e em terapias profiláticas. Além disso, Lin et al. (2005) demonstraram que o tratamento prolongado com estes agentes podem promover uma pressão seletiva sobre as populações de leveduras.

A maioria dos relatos de resistência das leveduras estão associados ao fluconazol, observados em cepas isoladas de pacientes com AIDS ou de pacientes que foram tratados anteriormente com antifúngicos azólicos (GALBAN; MARISCAL, 2006; PFALLER et al, 2010). Em relação a resistência às equinocandinas, raros casos são observados, mas, podem ocorrer durante a terapia antifúngica (WIEDERHOLD, 2007). Uma característica positiva é que os efeitos adversos são menos frequentes do que com a anfotericina B, por atuarem em estruturas estritamente fúngicas, e a interação com outros medicamentos se torna menor quando comparada entre agentes azólicos (PAPPAS et al, 2009).

Foi publicado em 1997, um método de referência (M27-A) para ensaios de diluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) utilizado na determinação da susceptibilidade às drogas antifúngicas para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 1997). No ano 2002, foram publicados novos documentos o M27-A2 e M27-S2 que abordam a sobre seleção e preparação dos agentes antifúngicos, da interpretação dos resultados, além da implementação de testes para controle de qualidade (CLSI, 2002a e 2002b). Em 2008, novas versões foram publicadas (M27-A3 e M27-S3), acrescentando pontos de corte para as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e para o voriconazol (CLSI, 2008).

O parâmetro utilizado na avaliação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos é baseado na concentração inibitória mínima (CIM) (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZTUDELA, 2002), que é considerada a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento fúngico no teste de susceptibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2002).

A sensibilidade *in vitro* pode não predizer o sucesso da terapia, mas a possibilidade de um fármaco ou sua concentração falharem é observado quando uma cepa é resistente. Contudo, vários fatores podem influenciar no tratamento: a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento em questão, o grau de debilidade do paciente, o potencial de virulência do fungo e a acessibilidade do fármaco ao local de infecção (TAPIA et al, 2003).

2.5.1.1 Poliênos

Os poliênicos fazem parte de uma classe de antifúngicos naturais que são produzidos por espécies de *Streptomyces*, tendo como representantes a anfotericina B e a nistatina. Por possuir um amplo espectro de ação (leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos) e devido a sua atividade fungicida, a anfotericina B ainda é considerada o antifúngico de primeira escolha para o tratamento de grande parte das infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados (WALSH et al, 2008; PAPPAS et al, 2009). A anfotericina B atua de maneira irreversível ao se ligar no ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, resultando na formação de poros, levando a alterações da permeabilidade celular que proporciona a perda de

íons (em especial, potássio e metabólitos) e, posteriormente, a lise da célula fúngica (ODDS et al, 2003).

A presença de resistência secundária à anfotericina B continua sendo pouco frequente (DA MATTA et al, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER et al, 2010). Entretanto, há relatos de casos de resistência à terapia com anfotericina B (NOLTE et al, 1997; KROGH-MADSEN et al, 2006). Pfaller et al (2002) avaliaram cepas de *Candida* obtidas de pacientes na América do Norte e observaram que *C. albicans* foi suscetível à anfotericina B, com uma concentração mínima de 90% de inibição (CIM90) de 1,0 mg/mL, no entanto as outras espécies apresentaram resistência, *C. glabrata* (4,0 mg/mL), *C. parapsilosis* (4,0 mg/mL) e *C. krusei* (8,0 mg/mL). Segundo Sanglard (2002) o mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração na constituição dos lipídios na membrana celular do fungo, quando são formados no lugar do ergosterol.

No Brasil, Antunes et al (2004) avaliaram a suscetibilidade de 120 isolados, obtidos de pacientes com candidemia e todos foram considerados sensíveis a anfotericina B (CIMs < 1µg/mL). Colombo et al. (2006) avaliaram um total de 712 isolados agentes de candidemias, e não observaram nenhum achado de resistência à anfotericina B.

Mesmo sendo considerada um antifúngico com atividade de amplo espectro, a anfotericina B apresenta alta toxicidade para o paciente, isso ocorre devido a semelhança bioquímica entre o ergosterol e o colesterol, permitindo a estes fármacos agirem eventualmente também nas células do hospedeiro. A nefrotoxicidade é considerada o principal efeito colateral resultante do uso deste fármaco, pois essa droga é diretamente tóxica às células que constituem os túbulos dos néfrons, sendo então um fator limitante na sua utilização clínica (MOHR et al, 2005; PASQUALOTTO, 2008; PAPPAS et al, 2009). Com o intuito de minimizar a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B (desoxicolato), várias formulações lipídicas deste composto (lipossomal, complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) estão atualmente disponíveis, e apresentam uma menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B convencional (BOWDEN et al, 2002; WINGARD, 2002; PFALLER et al, 2010).

A anfotericina B possui baixa absorção quando administrada por via oral, por isso esta via é usada apenas para o tratamento de infecções fúngicas do trato gastrointestinal superior. Também apresenta eficácia quando usada de forma tópica,

mas para as infecções sistêmicas é recomendada a administração por via intravenosa com injeção de maneira lenta, o que permite a formação de complexos com lipossomas ou com outras preparações contendo lipídeos. Isto auxilia na farmacocinética, além de reduzir consideravelmente os efeitos secundários (RANG et al, 2003).

2.5.1.2 Azólicos

Os derivados azólicos são antifúngicos sintéticos, sendo considerado a maior classe de agentes antifúngicos, apresentam em geral ação fungistática. Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da atividade da enzima lanosterol-14 α -desmetilase (codificada pelo gene *Erg11*), que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, um componente fundamental para a integridade da membrana celular das células fúngicas (ODDS et al, 2003).

Este esterol de membrana é indispensável para a manutenção da vida celular, pois a diminuição da sua concentração, associada ao acúmulo de esteróis metilados, modifica a fluidez da membrana, fazendo com que ocorra alterações de permeabilidade seletiva e das atividades metabólicas, impossibilitando o crescimento celular (LUNA et al, 2000; ZAOUTIS et al, 2005). Quanto maior a redução deste esterol maior a capacidade antifúngica deste fármaco (LUNA et al, 2000; ZAOUTIS et al, 2005; CHEN; SORRELL, 2007; CANNON et al, 2009).

Os azóis disponíveis são divididos em dois grupos imidazóis e triazóis. Os imidazóis são formados por fármacos como cetoconazol, miconazol e clotrimazol; enquanto os triazóis são representados pelo itraconazol, voriconazol, fluconazol e posaconazol. Os triazóis são mais relacionados à enzima lanosterol-14 α -desmetilase da célula fúngica, possuindo pouca interferência nas células de mamíferos, o que resulta na diminuição dos efeitos colaterais. Devido a esta característica, os imidazóis são usados com maior frequência para o tratamento de micoses superficiais, enquanto que os triazóis podem ser utilizados tanto em infecções fúngicas superficiais quanto em infecções fúngicas sistêmicas e invasivas (CHEN; SORRELL, 2007; PAPPAS et al, 2009).

São conhecidos três mecanismos de resistência aos azólicos. O primeiro está relacionado à diminuição do acúmulo intracelular da droga devido à utilização

reduzida deste agente antifúngico ou do aumento da eliminação do fármaco devido à ação de produtos de genes de resistência aos antifúngicos; o segundo mecanismo pode ocorrer pela alteração estrutural da enzima 14 α -desmetilase, resultando na redução da sua ligação aos azólicos; e o terceiro atua na síntese aumentada de 14 α -desmetilase, por meio da amplificação do gene *Erg11* (transformação de lanosterol em ergosterol não é impedida totalmente quando sob a ação do derivado azólico) (NENOFF et al, 1999; HEILMANN et al, 2010).

Segundo Cannon et al. (2009) o uso indiscriminado e em doses subclínicas de fluconazol provocou uma seleção de cepas mais resistentes a este fármaco, além disso, tem sido relatado uma maior participação em infecções por espécies naturalmente resistentes ao fluconazol, como *C. krusei*, restringindo assim o uso clínico deste fármaco. No entanto, Chen e Sorrell (2007) afirmam que no tratamento de candidíase, ocasionada por outras espécies e na criptococose, o fluconazol se destaca pelas suas características de alta biodisponibilidade, por possuir várias vias de administração e pela boa ação antifúngica, sendo inclusive utilizado em esquemas profiláticos em pacientes imunocomprometidos.

2.5.1.3 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos, apresentando estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Três drogas estão incluídas nesse grupo a anidulafungina, caspofungina e micafungina. Destas, a primeira liberada para uso clínico foi a caspofungina, comercialmente conhecida com Cancidas®. Diferentemente da anfotericina B e dos azólicos, as equinocandinas possuem como alvo a parede celular fúngicas (DERESINSKI; STEVENS, 2003; ESTES et al, 2009). As equinocandinas agem *in vitro* em diversas leveduras e fungos filamentosos, mas possuem atividade relevante apenas para espécies de *Candida* e *Aspergillus* em infecções experimentais, sendo apenas fungistática para os fungos do gênero *Aspergillus* (ESPINEL-INGROFF, 1998; DIAKEMA et al, 2002; MORACE et al, 2005).

É uma classe de fármacos cujo mecanismo de ação consiste na capacidade de interferir na síntese da parede celular do patógeno, inibindo a β -(1,3)-glucana sintase e impedindo a síntese de glucanas. O bloqueio da produção de glucanas acarreta no desequilíbrio osmótico, interferindo assim na viabilidade da célula

fúngica (MARTINEZ, 2006). Essa inibição da síntese de glucanas também resulta em efeitos secundários sobre outros componentes da célula, como diminuição de lanosterol e ergosterol e elevação das concentrações de quitina (DOUGLAS et al, 1997).

Estes fármacos se ligam às proteínas plasmáticas, permitindo uma boa distribuição no organismo e apresentando poucos efeitos colaterais. A presença de efeitos adversos é menor quando comparada com os causados pela anfotericina B e possui menor interação medicamentosa do que os derivados azólicos. Entretanto, por apresentar administração exclusivamente endovenosa e um restrito espectro de ação, o seu uso clínico é limitado (DENNING, 2003).

A resistência às equinocandinas é rara, pois estas são menos tóxicas do que os outros antifúngicos sistêmicos. O mecanismo de resistência dos patógenos a estes agentes antifúngicos pode ser resultante de um aumento na síntese da proteína Sbp do complexo de Golgi, controlada pelo gene *GAL1*, que regula os mecanismos de transporte de componentes celulares para a parede celular dos fungos (PARK et al, 2005).

Para Garcia-Effron et al (2009) as mutações e substituições de aminoácidos nas regiões (*FKS1* e *FKS2*) do gene *FKS*, responsável por codificar a glucano-sintetase, geram resistência as três equinocandinas, resultando em fracassos terapêuticos. Espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Fusarium* entre outras, especialmente as pertencentes aos filos Basidiomycota e Zygomycota, apresentam resistência intrínseca às equinocandinas por possuírem 1,6- β -glucana em sua parede celular. De acordo com Gomez-Lopez et al. (2008), *Candida parapsilosis* *stricto sensu* também é menos susceptível às equinocandinas, principalmente à caspofungina, do que as espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA

Foram realizadas coletas em 200 pacientes, sendo 154 a partir de biópsias transretais, 21 através de RTU e 25 por PTR. Destes pacientes, 27 usavam sonda e 173 não utilizavam no momento da coleta. A faixa etária dos pacientes variou de 49 a 94 anos de idade, dentre estes, 29 se consideravam brancos, 159 se consideravam pardos e 12 se consideravam negros.

Assim como em outros cânceres, a idade é considerada um importante marcador de risco, uma vez que a incidência e a mortalidade aumentam significativamente após os 50 anos. Este fator de risco é o único bem estabelecido para o CaP, sendo geralmente diagnosticados entre a sexta e oitava década de vida, apresentando raramente casos abaixo dos 40 anos (NAKASHIMA et al., 2011). Outras pesquisas afirmam que a etnia está relacionada ao desenvolvimento do CaP, pois esse tipo de câncer é cerca de 1,6 vezes mais frequente em homens negros americanos em comparação aos homens brancos, demonstrando que aqueles são desproporcionalmente afetados (RHODEN, 2010).

Após análise das amostras clínicas, foi observada a presença de prostatite fúngica em dois desses pacientes. O primeiro paciente, 61 anos de idade, pardo, residente em Recife/ PE, foi atendido no ambulatório do setor de urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, nos exames laboratoriais apresentou os parâmetros hematológicos dentro da normalidade, coagulograma normal, sumário de urina sem alterações e cultura de urina negativa, uréia= 31,0 mg/dL, creatinina= 0,8 mg/dL, glicose= 98,0 mg/dL, parecer cardiológico sem alterações, no exame de toque retal apresentou próstata de aspecto fibroelástico, com volume de 30 g e presença de nódulos em lóbulo direito, PSA total= 16,32 ng/mL, PSA livre= 1,1 ng/mL e relação PSA livre/ PSA total= 6,7%, sendo indicado para realização de biópsia prostática.

Antes da biópsia, foi coletada com auxílio de um *swab* uma amostra do reto do paciente e o primeiro e segundo fragmento da próstata foram extraídos do terço médio direito para análise micológica, os demais foram encaminhados para análise histopatológica. O paciente retornou ao ambulatório para avaliação dos resultados, apresentando na análise histopatológica da próstata, base direita sem alterações

significativas, base esquerda sem alterações significativas, terço médio direito com presença de prostatite crônica, terço médio esquerdo sem alterações significativas, ápice direito com presença de adenocarcinoma bem diferenciado (padrão 3/3 escore 6 de Gleason) em um dos fragmentos examinados e ápice esquerdo sem alterações significativas.

No diagnóstico micológico das amostras do reto e da próstata, foi evidenciado na microscopia direta, hifas artrosporadas e hialinas, e em cultura foi observado o crescimento de colônias cremosas, branco – amareladas, com superfície lisa inicialmente, tornando-se posteriormente rugosa e cerebriforme. Na análise bioquímica, foi avaliada a capacidade de hidrolisar uréia, sendo os dois isolados positivos (Figura 1). Na análise filogenética as sequências agruparam-se com outras sequências de referência de *Trichosporon inkin* e no teste de similaridade genética os isolados apresentaram o mesmo padrão de bandas, confirmando que correspondem a mesma cepa (Figura 2 e 3). Os isolados apresentaram resistência *in vitro* à caspofungina, micafungina e anidulafungina (CIM $\geq$ 16 μ g/mL) e sensibilidade ao fluconazol (2 μ g/mL) e à anfotericina B (0,5 μ g/mL). Devido a esta comorbidade, foi indicada a realização de uma PTR, não sendo portanto, necessária a administração de antifúngico sistêmico.

FIGURA 1: Teste da urease. A: Controle negativo. B: Reação positiva do *Trichosporon inkin* (URM 7551). C: Reação positiva do *Trichosporon inkin* (URM 7552).



FIGURA 2: Filograma obtido a partir de análises de sequências da região LSU (D1/D2) do rDNA, mostrando o posicionamento taxonômico das espécies de *Trichosporon*. As sequências obtidas neste estudo são mostradas em negrito.

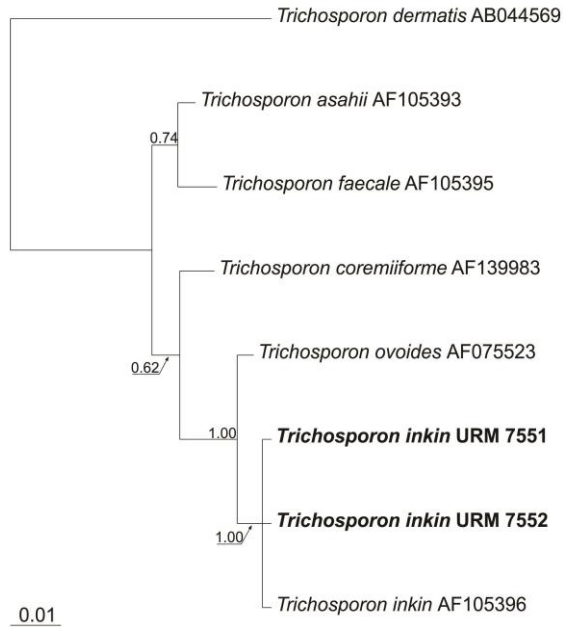
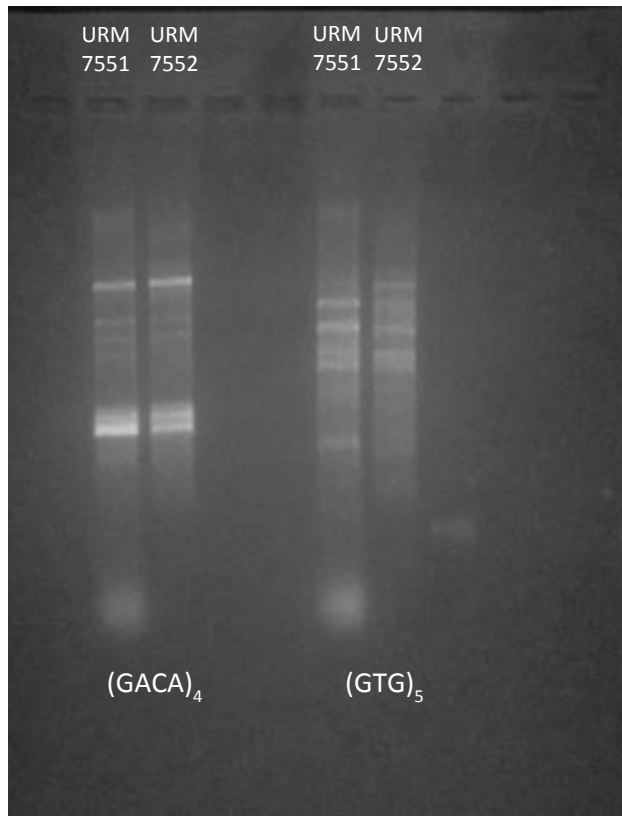


FIGURA 3: Teste de similaridade genética dos isolados *Trichosporon inkin* (URM 7551) e *Trichosporon inkin* (URM 7552), através dos primers GACA₄ e GTG₅.



Isolados de *Trichosporon* spp. apesar de serem classicamente reconhecidos por causar micoses superficiais, surgiram como patógenos em infecções invasivas, particularmente em pacientes com câncer, apresentando um prognóstico desfavorável (CHAGAS-NETO et al., 2009). As espécies mais comumente isoladas são *T. asahii*, que estão relacionados a infecções disseminadas e fatais, *T. asteroides*, responsáveis por infecções superficiais e ocasionalmente infecções disseminadas (RUAN et al, 2009) e *T. inkin*, geralmente isoladas de micoses superficiais em casos de piedra branca e raramente sendo relatadas como agentes de infecções profundas (MACÊDO et al, 2011).

Um relato recente demonstrou a participação de *T. asahii* como patógeno emergente de infecção em um paciente com câncer de próstata metastático, esse paciente utilizava tubos de nefrostomia e stents uretrais para auxiliar nas suas manifestações de uropatia bilateral. Contudo, foi necessário a retirada desses dispositivos devido ao seu mau funcionamento, sendo então enviados para realização de cultura, no qual foi observado o crescimento deste fungo (MAGEE et al, 2015).

O presente trabalho apresenta um caso raro de infecção invasiva por *T. inkin*, sendo relatado como o primeiro caso deste patógeno acometendo a glândula prostática em um paciente com adenocarcinoma de próstata. Esse fungo apresentou capacidade de disseminação, uma vez que também foi encontrado colonizando o reto do paciente. Acredita-se então que, devido à condição de imunossupressão deste paciente e o potencial patogênico deste fungo, esta levedura foi capaz de migrar através dos vasos mesentéricos, cair na corrente sanguínea e ocasionar uma micose sistêmica.

Essa relação foi demonstrada por Walsh et al (1992), que desenvolveram o primeiro modelo experimental de tricosporonose invasiva com animais, mostraram que *Trichosporon* spp. foi capaz de disseminar do intestino para o sangue e outros órgãos de coelhos imunossuprimidos, mas não em animais saudáveis. A tricosporonose sistêmica pode ser iniciada a partir da colonização gastrointestinal, em seguida pode haver uma translocação através da parede do intestino para a circulação sistêmica, a qual será, provavelmente, o local principal desta infecção. Além da disseminação endógena, alguns pacientes também podem desenvolver tricosporonose sistêmica de forma exógena (COLOMBO et al, 2011; CAIRA et al, 2011).

De acordo com a literatura, embora os dados sejam limitados, o tratamento de escolha para a tricosporonose é realizado com derivados azólicos, e outra alternativa terapêutica é a anfotericina B, que pode ser usada em combinação com voriconazol e micafungina, mas as equinocandinas não têm efeito no tratamento desta infecção. A cura da infecção invasiva por *Trichosporon* spp. depende da duração da neutropenia e do controle da infecção por intervenção cirúrgica (CASTANO et al, 2018). Esses dados corroboram com o perfil farmacológico de susceptibilidade observado dos nossos isolados, embora nenhum medicamento antifúngico tenha sido prescrito, uma vez que o foco da infecção foi removido cirurgicamente e a doença controlada.

O segundo paciente, 68 anos, pardo, residente em Recife, foi atendido no ambulatório do setor de urologia do HCP. Este paciente utilizou sonda uretral por um ano, e os exames laboratoriais mostraram os parâmetros hematológicos normais, glicose= 102,0 mg/dL, PSA Total= 66,0 ng/mL e o exame retal apresentou próstata endurecida com volume de 30 g, sendo indicado para biópsia de próstata.

Os fragmentos obtidos pela biópsia foram enviados para análise histopatológica e micológica. A análise histopatológica confirmou a presença de adenocarcinoma na próstata e o diagnóstico micológico mostrou, em microscopia direta, leveduras ovais e hialinas. Em cultura houve o desenvolvimento de colônias de coloração branca, textura cremosa e superfície lisa. Na análise bioquímica, não apresentou a capacidade de hidrolisar a uréia (Figura 4) e análise filogenética as sequências agruparam-se com outras sequências de referência de *C. glabrata* (Figura 5). O isolado foi sensível *in vitro* à caspofungina (0,5 µg/mL), micafungina (0,03 µg/mL), anidulafungina (0,03 µg/mL) e anfotericina B (0,5 µg/mL), sendo dose dependente para o fluconazol (16 µg/mL). Assim, a equipe médica decidiu realizar uma PTR para o tratamento do câncer e erradicação da infecção fúngica, sem a necessidade de administração de antifúngico sistêmico.

Apesar da importância desta comorbidade, as infecções causadas por fungos, destacando-se as leveduras, são pouco diagnosticadas. A incidência de infecções fúngicas vem aumentando, contribuindo para altos níveis de morbidade e mortalidade. *Candida albicans* é a mais prevalente em ambas as condições de saúde e doença. No entanto, *C. glabrata* está emergindo como a segunda causa de infecções disseminadas por espécies de *Candida*, causando um amplo espectro de condições clínicas (PFALLER et al, 2004). Shokohi et al. (2010) analisaram

pacientes com câncer e identificaram pela técnica de PCR, espécies de *Candida*, sendo a *C. albicans* mais comum (77,50%), seguida pelas espécies *C. glabrata* (15%), *C. tropicalis* (5%) e *C. krusei* (2,50%).

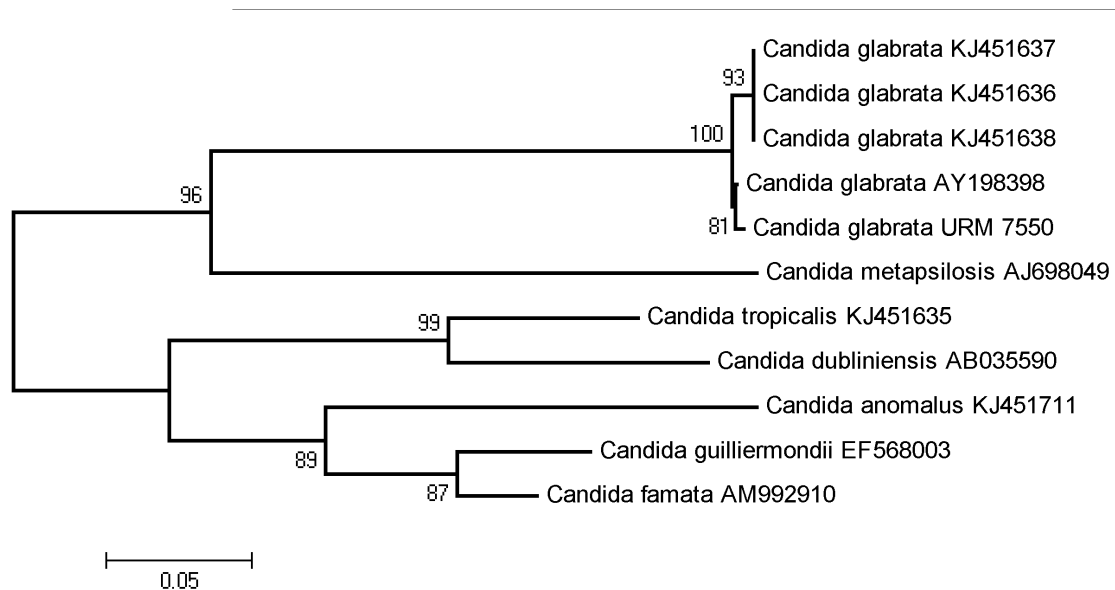
De acordo com Farmakiotis et al. (2014), *C. glabrata* é uma das espécies mais comuns do gênero isoladas em pacientes com câncer, por causa do uso de cateteres permanentes, sua possível fonte de infecção, isto sugere a habilidade da espécie em se adaptar e sobreviver em diferentes nichos de hospedeiros. Além disso, foi demonstrado a capacidade para formar biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres urinários (NG et al, 2016). Outros fatores importantes são, o uso indiscriminado de drogas anti-bacterianas e corticosteroides, cirurgia abdominal, uso de quimioterapia citotóxica e nutrição parenteral (FARMAKIOTIS et al, 2014).

Nosso relato apresenta o primeiro caso com esta levedura causando prostatite fúngica em um paciente com adenocarcinoma que utilizava cateter uretral. Apesar de ser sensível aos antifúngicos testados, alguns autores como Farmakiotis et al. (2014), afirmam que esta espécie pode apresentar multirresistência aos azólicos e equinocandina. Contudo não houve a necessidade de administração, devido a intervenção cirúrgica.

FIGURA 4: Teste da urease. A: Controle positivo. B: Reação negativa de *Candida glabrata* (URM 7550).



FIGURA 5: Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento taxonômico da *Candida glabrata* (URM 7550).



3.2 BIOFILME

Os isolados foram testados quanto a capacidade de formar biofilme em discos de silicone, e todos demonstraram essa habilidade. Os isolados de *T. inkin*, apresentaram a formação de um biofilme maduro após 48 horas (Figura 6), igualmente ao isolado de *C. glabrata* que demonstrou essa capacidade no mesmo período de tempo (Figura 7).

As espécies de *Trichosporon* possuem alguns fatores de virulência que permitem o estabelecimento da infecção e a disseminação do patógeno para vários órgãos do hospedeiro, como formação de biofilmes, produção de enzimas e componentes da parede celular. Os biofilmes são formados por leveduras apresentando brotação e filamentos, as quais são incorporados em uma matriz de polissacarídeo extracelular, fazendo com que ocorra uma melhor aderência na superfície de dispositivos implantados, dificultando a ação do sistema imunológico do hospedeiro e a eficácia das drogas antifúngicas. As enzimas expressas por *Trichosporon* spp. incluem as fosfolipases e proteases, que são responsáveis por romper a membrana das células hospedeiras e a proteólise. Além disso,

Trichosporon spp. expressam glucuronoxilomanana (GXM) na parede celular e este polissacarídeo dificulta a fagocitose pelos neutrófilos e monócitos (PIERCE et al, 2013).

A capacidade de formação de biofilme é considerada como um importante fator de virulência, e foi o mecanismo possivelmente utilizado pelo isolado de *C. glabrata* para estabelecer infecção e disseminação para a próstata. O crescimento do biofilme é considerado como o principal modo de vida microbiana, quando comparado com o crescimento planctônico, no qual as células crescem em suspensão. Estima-se que 65% - 80% das infecções humanas estejam associadas à formação de biofilmes e à causa de falhas terapêuticas, devido à sua tolerância intrínseca aos antimicrobianos e ao ataque das células do sistema imune (D'ENFERT et al, 2016).

FIGURA 6: Formação do biofilme dos isolados de *Trichosporon inkin*. A: Início da formação com 24 horas. B: Biofilme maduro com 48 horas.

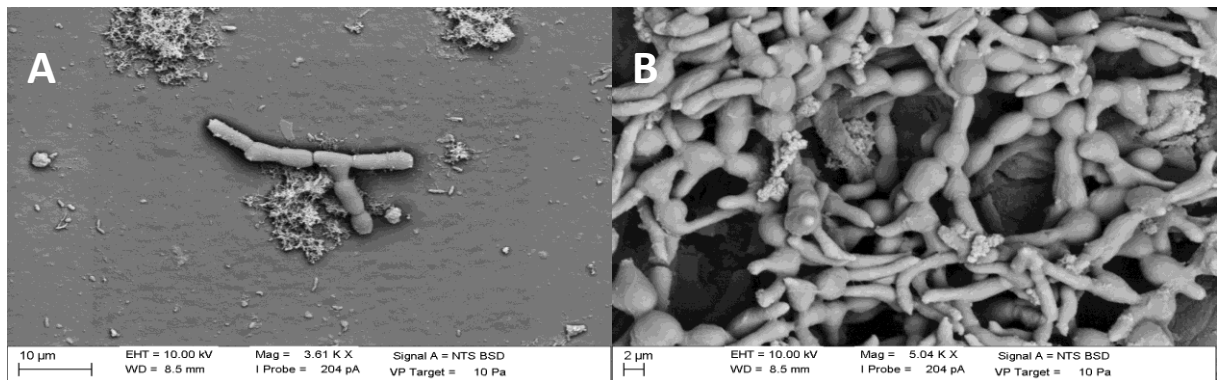
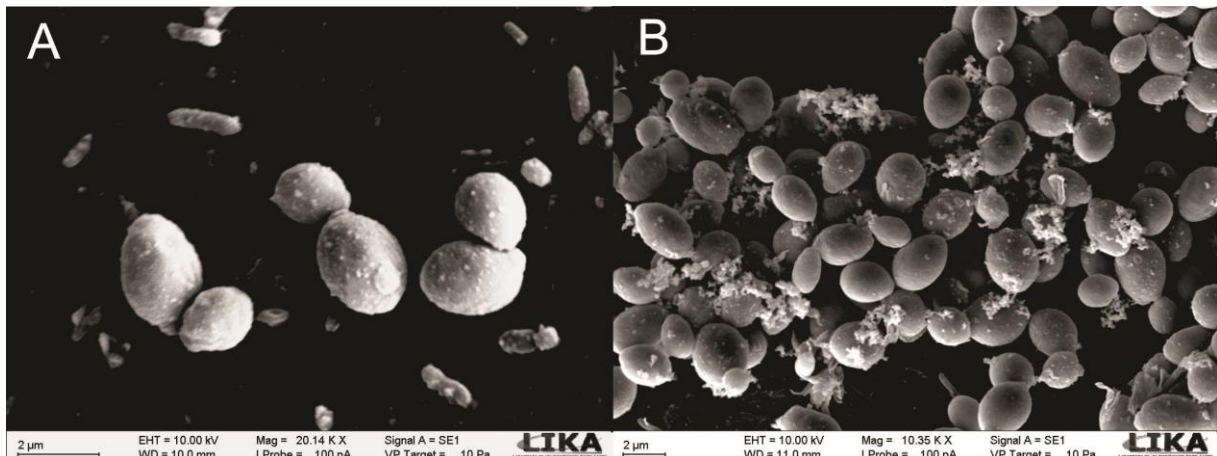


FIGURA 7: Formação do biofilme do isolado de *Candida glabrata*. A: Início da formação com 24 horas. B: Biofilme maduro com 48 horas.



3.3 CITOQUÍMICA COM LECTINAS

Os isolados de *T. inkin* apresentaram uma marcação forte (+++) para WGA e Con A, marcação moderada (++) para PNA e marcação fraca (+) para UEA-I (Figura 8). Já o isolado *C. glabrata* apresentou forte (+++) marcação para WGA, moderada (++) marcação para Con A e UEA-I e uma fraca (+) marcação para PNA (Figura 9).

Os mecanismos envolvidos na patogênese podem ser avaliados pela expressão de carboidratos na parede celular, pois a interação entre a parede celular da levedura e os receptores teciduais do hospedeiro favorece a adesão, que é o primeiro passo no estabelecimento da doença, sendo esta característica importante para fungos de interesse médico (XIMENES et al, 2015).

Lectinas são proteínas de origem não imune, que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados, e são livres ou ligadas a superfícies celulares através de sítios de ligação específicos. Elas interferem em eventos biológicos, como promoção de infecção, diferenciação celular, interação patógeno-hospedeiro, metástase e reconhecimento celular. A lectina WGA detecta a expressão de N-acetil-D-glucosamina; Con A expressão do metil- α -D-manósido; UEA-I a expressão de L-fucose; e o PNA detecta D-galactose e glicose / manose (XIMENES et al, 2015).

FIGURA 8: Padrões de marcação de lectinas dos isolados de *Trichosporon inkin*. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).

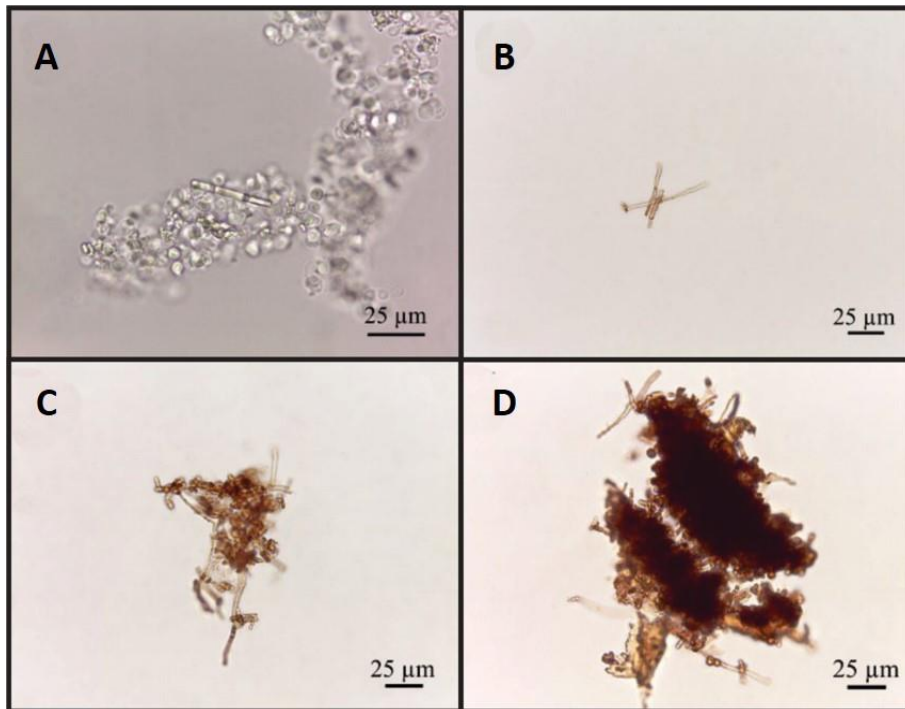
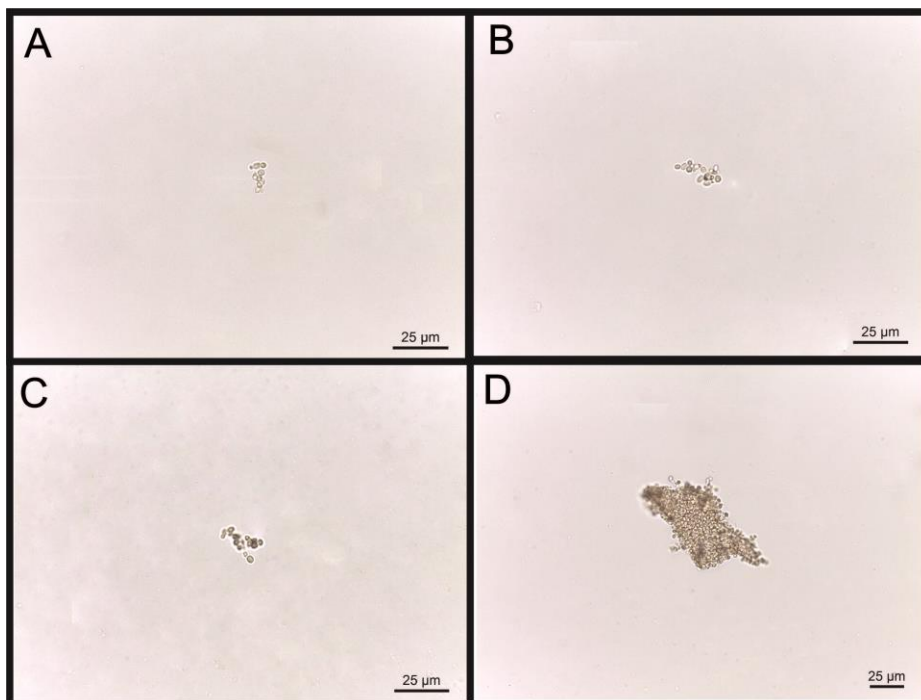


FIGURA 9: Padrões de marcação de lectinas do isolado de *Candida glabrata*. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).



3.4 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Na análise dos fragmentos prostático do paciente com adenocarcinoma associado a infecção fúngica por *T. inkin*, foi observada marcação forte (+++) para Con A e PNA, marcação moderada (++) para WGA e marcação fraca (+) para UEA-I. Os fragmentos da próstata do paciente com adenocarcinoma com prostatite por *C. glabrata* apresentaram forte marcação (+++) para Con A, UEA-I e PNA e moderada marcação (++) para WGA. Esses padrões de marcações foram comparados com os padrões da próstata de um paciente com adenocarcinoma e sem infecção fúngica e um paciente com ausência de neoplasia e prostatite (Tabela 1). O padrão de marcações de carboidratos pode ser observado na (Figura 10).

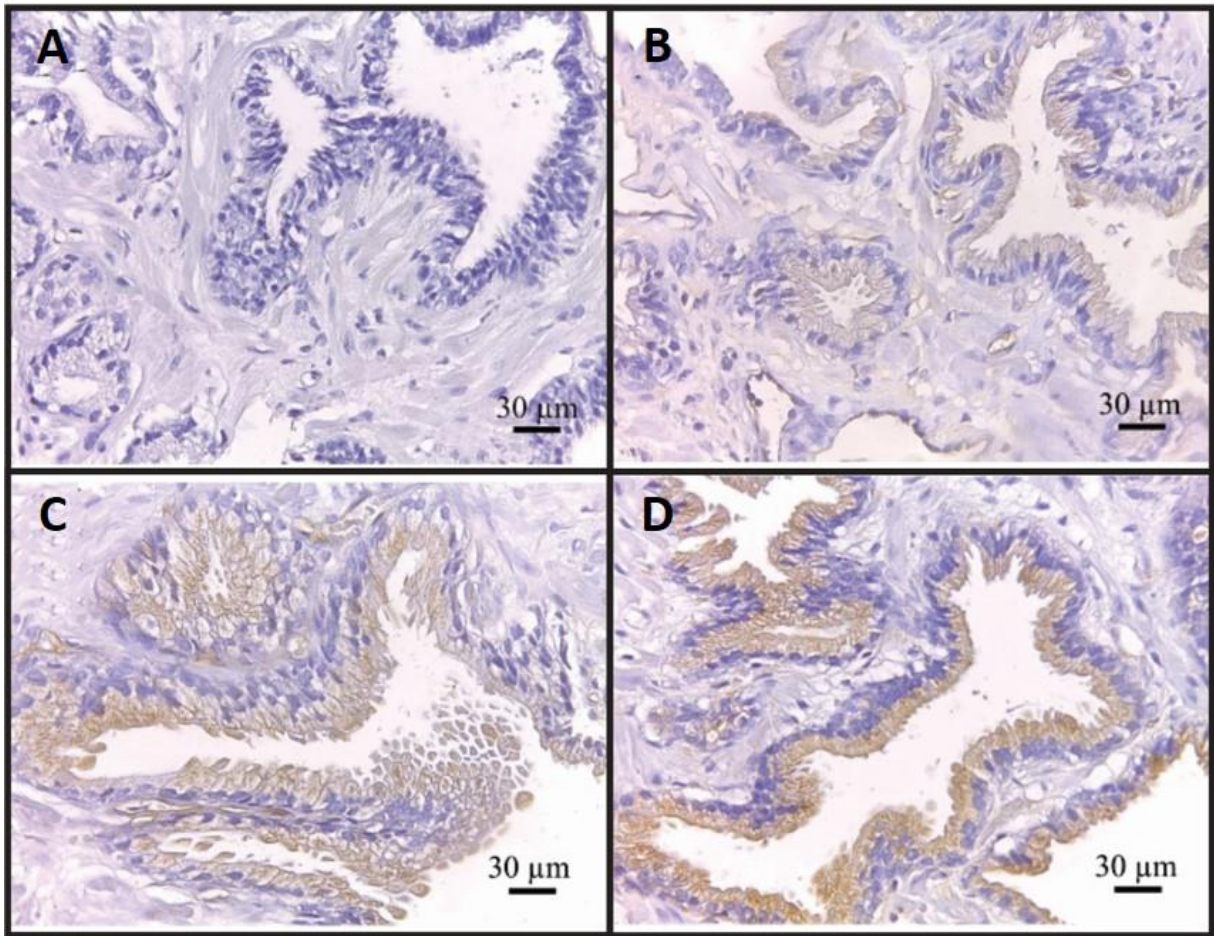
Estas alterações na expressão de glicoconjugados em tumores e os vários distúrbios celulares precisam ser mais estudados. A pesquisa sobre alterações na glicosilação celular da carcinogênese prostática é escassa (ARAÚJO-FILHO et al, 2006) e sua associação com infecção fúngica nunca foi analisada.

TABELA 1: Padrão de marcação de lectinas dos tecidos prostático

Lectinas	C+/F+ (<i>Trichosporon inkin</i>)	C+/F+ (<i>Candida glabrata</i>)	C+/F-	C-/F-
WGA	++	++	-	+
Con A	+++	+++	++	-
UEA-I	+	+++	-	+
PNA	+++	+++	++	-

Notas: WGA: wheat germ agglutinin; Con A: concanavalin A; PNA: peanut agglutinin; UEA-I: *Ulex europaeus* agglutinin I.; C+/F+ (*Trichosporon inkin*): Câncer de próstata e infecção fúngica por *T. inkin*; C+/F+ (*Candida glabrata*): Câncer de próstata e infecção fúngica por *C. glabrata*; C+/F-: Câncer de próstata sem infecção fúngica; C-/F-: Hiperplasia prostática benigna sem infecção fúngica; +++: padrão de marcação forte; ++: padrão de marcação moderado; +: padrão de marcação fraco; -: padrão de marcação ausente.

FIGURA 10: Padrões de marcação de lectinas dos tecidos prostáticos. A: Marcação ausente (-). B: Marcação fraca (+). C: Marcação moderada (++). D: Marcação forte (+++).

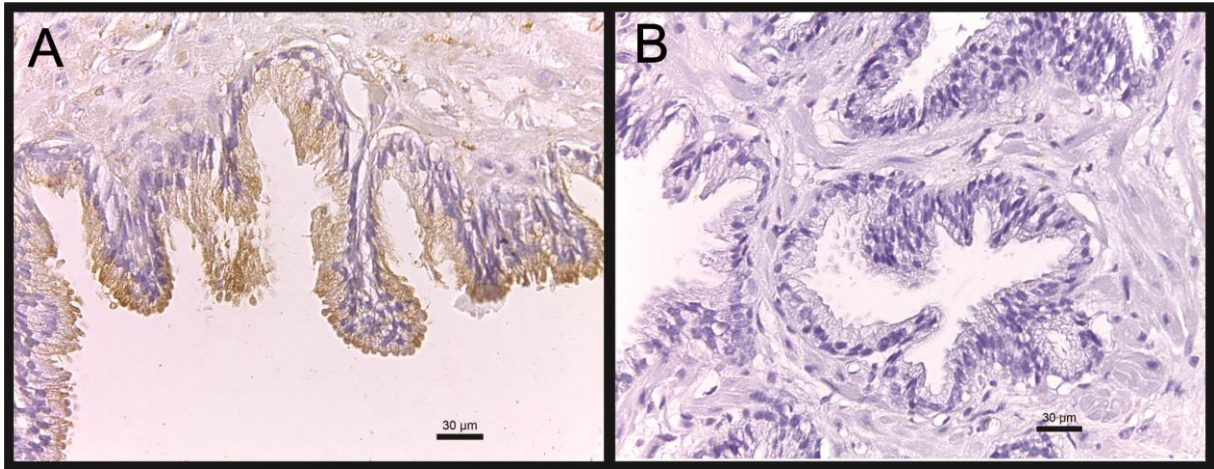


3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA COM GALECTINA-3

Uma ausência na expressão de galactose em células dos tecidos prostáticos com adenocarcinoma foi observada em nosso estudo, quando comparado a um tecido com HPB (Figura 11).

As galectinas são parte da família das lectinas de origem animal, possuem uma sequência altamente conservada no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e afinidade de ligação a β -galactosídeo. Galectina-3 tem um único domínio CRD que se liga a um domínio N-terminal por uma cadeia peptídica rica em glicina e prolina, que pode estar na forma de oligômeros e monômeros. Assim, as galectinas podem auxiliar na avaliação de alterações bioquímicas, especificamente em células, facilitando a diferenciação entre lesões tumorais de próstatas benignas e malignas (ARAÚJO-FILHO et al, 2006).

FIGURA 11: Padrão de marcação de galectina-3 em tecidos prostáticos. A: Presença de marcação em fragmentos prostáticos de paciente com Hiperplasia Benígna da Próstata. B: Ausência de marcação em fragmentos prostáticos de paciente com Adenocarcinoma de Próstata.



4 CONCLUSÕES

Os fatores de virulência dos fungos, em especial a capacidade de formação de biofilme, são importantes no estabelecimento, desenvolvimento e disseminação das infecções. E o uso das técnicas de citoquímica, histoquímica e imunohistoquímica podem auxiliar no reconhecimento precoce de possíveis alterações na próstata, como o câncer e as infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ALEMOZAFFAR, M. et al. Prediction of erectile function following treatment for prostate cancer. **JAMA**, v.306, p.1205-1214, 2011.
- ALEXANDER, B.D.; PFALLER, M.A. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.15-27, 2006.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, p.319-327, 2007.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.R.; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.3, p.593-1608, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures. **American Cancer Society**, 2012.
- ANAISSE, E.; GOKASLAN, A.; HACHEM, R. et al. Azole therapy for trichosporonosis: clinical evaluation of eight patients, experimental therapy for murine infection, and review. **Clin Infect Dis**, v.15, p.781–787, 1992.
- ANANDADAS, C.N.; CLARKE, N.W.; DAVIDSON, S.E.; O'REILLY, P.H.; LOGUE, J.P.; GILMORE, L. et al. Early prostate cancer – which treatment do men prefer and why? **BJU Int**, 2010.
- ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, Brasília - BRASIL, 2013.
- AQUINO, V.R.; GOLDANI, L.Z.; PASQUALOTTO, A.C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopathologia**, v.163, p.191-202, 2007.
- BADDLEY, J.W.; ANDES, D.R.; MARR, K.A. et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.50, p.1559–67, 2010.
- BARNES, P.D.; MARR, K.A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.20, p.545-561, 2006.
- BELL, D.A.; ROSE, S.C.; STARR, N.K. et al. Percutaneous nephrostomy for nonoperative management of fungal urinary tract infections. **J Vasc Interv Radiol**, v.4, p.311–315, 1993.

BELLESO, M.; COSTA, S.F.; CHAMONE, D.A.F.; LLACER, P.E.D. Triagem para o tratamento ambulatorial da neutropenia febril. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.32, n.5, p.402-408, 2010.

BILL-AXELSON, A. et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.364, p.1708-17, 2011.

BILLE, E. et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. In: (Ed.). **Clin Microbiol Infect. France: Clinical Microbiology and Infection**, 2011. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v.18, p.1117-25, 2012. ISBN 1469-0691.

BONFIETTI, L.X.; SZESZS, M.W.; CHANG, M.R.; MARTINS, M.A.; PUKINSKAS, S.R.B.S.; NUNES, M.O.; PEREIRA, G.H.; PANIAGO, A.M.M.; PURISCO, S.U.; MELHEM, M.S.C. Ten-Year Study of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of Candida Bloodstream Isolates at a Brazilian Tertiary Hospital. **Mycopathologia**, v.174, p.389–396, 2012.

BOWDEN, R.; CHANDRASEKAR, P.; WHITE, M. H.; LI, X.; PIETRELLI, L.; GURWITH, M.; VAN BURIK, J. A.; LAVERDIERE, M.; SAFRIN, S.; WINGARD, J. R. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Clin Infect Dis**, v.35, p. 359-66, 2002.

BRADSHAW, R.W. Histoplasmosis and blastomycosis. **Clin Infect Dis**, v.22, p.102–111, 1996.

BRANDÃO, I. S. L.; OLIVEIRA-MORAES, H. M. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; OLIVEIRA, N. T.; MAGALHÃES, O. M. C. Elastin increases biofilm and extracellular matrix production of *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, p.675-682, 2018.

BRANDES, D.; KIRCHLEIM, D.; SCOTT, W. Ultrastructure of the human prostate: Normal and neoplastic. **Lab Invest**, v.13, p.1541, 1964.

BRASIL (2004). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/introducao.pdf>> Acesso em: 20 jun, 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer da próstata: consenso. Rio de Janeiro, p. 20, 2002.

BRUNNER, H.; WEIDNER W.; SCHIEFER, H.G. Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. **J. Infect. Dis.**, v.147, p.807–813, 1983.

CANNON, R.D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R.; NIIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M.V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B.C. Efflux-mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.291-321, 2009.

CARAM, M.E.V.; SKOLARUS, T.A.; COONEY, K.A. Limitations of Prostate-specific Antigen Testing After a Prostate Cancer Diagnosis. **European Urology**, v.70, n.2, p.209-210, 2016.

CARDOSO, B.C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**- Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho, p.75, 2004.

CARTER, H.B. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Wein AJ, editor, Campbell – Walsh Urology. 9 ed. **Philadelphia: Saunders**, p.2912-2931, 2007.

CATALONA, W.J.; SOUTHWICK, P.C.; SLAWIN, K.M.; PARTIN, A.W.; BRAWER, M.K.; FLANIGAN, R.C. et al. Comparison of percent free PSA , PSA density, and age –specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. **Urology**, v.56, n.2, p.255-60, 2000.

CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D.P. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. **Medical Mycology**, v.44, p.163-172, 2006.

CHANDRA, J. et al. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.18, p.5385-5394, 2001.

CHEN, S.C.A.; SORRELL, T.C. Antifungal Agents. **Medical Journal of Australia**, v.187, p.404-409, 2007.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.599-607, 2003.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 1997.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second edition M27-A2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2002.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third edition. CLSI document M-27A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistemicas: importancia del mecanismo de accion, espectro de actividad y resistencias. **Rev Esp Quimioter**, v.23, n.4, p.169-176, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Should antifungal treatments be based upon results fo antifungal susceptibility testing? **Rev Iber Micol**, v.19, n.3, p.133-138, 2002.

DA MATTA, D.A.; DE ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMAO, R.; COLOMBO, A.L. 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**, v.57, p.399-404, 2007.

DE MARZO, Â. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v.7, n.4, p.256-269, 2007.

DEL NEGRO, G.M.B. Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco de candidemia. **Tese – Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, p.95, 2008.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, v.362, p.1142-1151, 2003.

DERESINSKI, S.C.; STEVENS, D.A. Caspofungin. **Clin Infect Dis**, v.36, n.11, p.1445-57, 2003.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALDT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.1298–1302, 2002.

DORLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DORLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.881–890, 2002.

DORNAS, M.C.; JOSÉ, A.D.R; FIGUEIREDO E FILHO, J.R.T.; CARRERETTE, F.B.; DAMIÃO, R. Câncer de próstata. **Revista HUPE**, v.7, p.1, 2008.

DOUGLAS, C.M.; D'IPPOLITO, J.A.; SHEI, G.J.; DOUGLAS, C.M.; D'IPPOLITO, J.A.; SHEI, G.J.; MEINZ, M.; ONISHI, J.; MARRINAN, J.A.; LI, W.; ABRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.; BARTIZAL, K.; MITCHELL, A.; KURTZ, M.B. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p.2471–2479, 1997.

DVORAK, C.C.; STEINBACH, W.J.; BROWN, J.M.; AGARWAL, R. Risks and outcomes of invasive fungal infections in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v.36, p.621–629, 2005.

EASTHAM, J.A.; SCARDINO, P.T. Early diagnosis and treatment of prostate cancer. **Dis Mon**, v.47, n.9, p.421-59, 2001.

EICKENBERG, H.-U.; AMIN, M.; LICH, R.Jr. Blastomycosis of the genitourinary tract. **J Urol**, v.113, p.650–652, 1975.

ELGAVISH, S.; SHANNAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends Biochem. Sci.**, v.22, p.462-467, 1997.

EPSTEIN, J.I. O trato urinário inferior e sistema genital masculino. In: Kuma, V. et al. (**Elsevier**), Patologia: bases patológicas das doenças (8 ed.), Rio de Janeiro, 2010.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK- 0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J Clin Microbiol**, v.36, n.10, p.2950-6, 1998.

ESQUENAZI, D.; SOUZA, W.; ALVIANO, C.S.; ROZENTAL, S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Tricophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.35, p.113-123, 2003.

ESTES, K.E.; PENZAK, S.R.; CALIS, K.A.; WALSH, T.J. Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin. **Pharmacotherapy**, v.29, p.17-30, 2009.

FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. Infecção Hospitalar e suas interfaces na Área da Saúde. **Atheneu**, São Paulo, 2000.

FERREIRA, M.D.; KOFF, W.J. Assessment of serum level of prostate- specific antigen adjusted for the transition zone volume in early detection of prostate cancer. **Int Braz J Urol**, v.31, n.2, p.137-45, 2005.

GALBAN, B.; MARISCAL, F. Epidemiology of candidemia in ICU. **Rev Iberoam Micol**, v.23, n.1, p.12-5, 2006.

GALLARDO-MORENO, A.M.; GARDUNO, E.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.L.; PÉREZGIRALDO, C.; BRUQUE, J.M.; GÓMEZ-GARCÍA, A.C. Analysis of the hydrophobic behaviour of different strains of *Candida parapsilosis* under two growth temperatures. **Coll. Surf. Biointerf.**, v.28, p.119-126, 2003.

GALES, A.C. et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. **J Clin Microbiol**, v.37, n.12, p.3804-8, 1999. ISSN 0095-1137.

GARCIA-EFFRON, G.; LEE, S.; PARK, S.; CLEARY, J.D.; PERLIN, D.S. Effect of *Candida glabrata* FKS1 e FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.9, p.3690-3699, 2009.

GARCIA-VIDAL, C.; UPTON, A.; KIRBY, K.A.; MARR, K.A. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. **Clin Infect Dis**, v.47, p.1041–1050, 2008.

GIANNOPOULOS, A.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; ADAMAKIS, I. et al. Epididymitis caused by *Candida glabrata*: a novel infection in diabetic patients? **Diabetes Care**, v.24, p.2003–2004, 2001.

GILBERT, J; WISE, M.D.; SHTEYNHLYUGER, A. How to Diagnose and Treat Fungal Infections in Chronic Prostatitis. **Current Approaches to Prophylaxis and Clinical Management**, p.33- 41, 2007.

GÖKAHMETOĞLU, S.; NEDRET KOÇ, A.; NAS, H. Case reports. Isolation of two *Trichosporon cutaneum* strains from urine. **Mycoses**, v.45, p.132–134, 2002.

GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PAHISSA, A.; RODRIGUEZ-TUDELLA, J.L. et al. Prevalence and susceptibility of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrob Agents and Chemother**, v.52, p.1506-1509, 2008.

GREENE, K. Postate specific antigen best practice statement 2009 update. **Journal of Urology**, v.182, p.2232-241, 2009.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic biology**, v.52, n.5, p.696-704, 2003.

GUPTA, A.K.; BARAN, R.; SUMMERBELL, R. Onychomycosis: strategies to improve efficacy and reduce recurrence. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v.16, p.579-586, 2002.

HEILMANN, C.J.; SCHNEIDER, S.; BARKER, K.S.; ROGERS, P.D.; MORSCHHAUSER, J. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, p.353–359, 2010.

HOOD, S.V.; BELL, D.; MCVEY R et al. Prostatitis and epididymoorchitis due to *Aspergillus fumigatus* in a patient with AIDS. **Clin Infect Dis**, v.26, p.229–231, 1998.

HOPE, W.W.; WALSH, T.J.; DENNING, D.W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, p.609-22, 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:
http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: jul, 2018.

INCA/MS – Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde: Câncer de próstata: consenso. Rio de Janeiro: **INCA**, 2002.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER JR, W.A.; MERZ, W.G.; BAQUI, A.A.M.A.; KELLEY, J.I.; MEILLER, T.F. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Rev Iberoam Micol**, v.18, p.17-22, 2001.

JACOBS, L.G.; SKIDMORE, E.A.; FREEMAN, K. et al. Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients. **Clin Infect Dis**, v.22, p.30–35, 1996.

JOSHUA, A.M. et al. Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.2, n.1785, p.156-181, 2008.

KACKER, R.; WILLIAMS, S.B. Endourologic procedures for benign prostatic hyperplasia. **Urol J**, v.8, n.3, p.171-6, 2011.

KAUFFMAN, C.A.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. Essentials of Clinical Mycology. **Springer**, 2011. ISBN 1441966390.

KOMATH, S.S.; KAVITHA, M.; SWAMY, A.M. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.4, p.973-988, 2006.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect**, v.50, n.4, p.243-60, 2002.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M.C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J.D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clin Infect Dis**, v.42, p.938-44, 2006.

LA TOURETTE PROSSER, B.; TAYLOR, D.; DIX, B.A. Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1502-1506, 2003.

LARSEN, R.A.; BOZZETTE, S.; MCCUTCHAN, J.A.; CHIU, J.; LEAL, M.A.; RICHMAN, D.D. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. California Collaborative Treatment Group. **Ann Intern Med**, v.111, p.125-8, 1989.

LAWRENCE, M.A.; GINSBERG, D.; STEIN, J.P. et al. Coccidioidomycosis prostatitis associated with prostate cancer. **BJU Int**, v.84, p.372–373, 1999.

LEDUC, I.E. The anatomy of the prostate and the pathology of early benign hypertrophy. **J Urol**, v.42, p.1217, 1939.

LIN, M. Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J.; FLORES, E.L.; TOLENTINO, J.; SREERAMOJU, P.; WEBER, S.G. Prior antimicrobial therapy and risk for ospitalacquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.11, p.4555-60, 2005.

LINDSAY, D.; HOLY, V.A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **J Hosp Infect**, v.64, p.313-325, 2008.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, p.637-674, 1998.

LOEB, S.; CATALONA, W.J. What to do with an abnormal PSA test. **Oncologist**, v.13, n.3, p.299-305, 2008.

LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTÍNEZ, J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.41, p.187-196, 2004.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1383, p.9-36, 1998.

LUNA, B.; DREW, R.H.; PERFECT, J.R. Agents for treatment of invasive fungal infections. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.33, p.277-299, 2000.

MAGDALENA, M.H.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.**, v.39, n.2, 2001.

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

MARANDOLA, P. et al. Molecular Biology and the Staging of Prostate Cancer. **Academica of Science**, v.1028, p.294–312, 2004.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Cells in Biofilms Are Less Susceptible than Planktonic Cells to Antimicrobial Molecules Produced by the Innate Immune System. **Infection and Immunity**, v.74, p.6118–6123, 2006.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.1021–33, 2006.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **J Bras Pneumol**, v.32, p.449-460, 2006.

MASUOKA, J.; HAZEN, K.C. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. **Microbiology**, v.143, p.3015-3021, 1997.

MAWHORTER, S.D.; CURLEY, G.V.; KURSH, E.D.; FARVER, C.E. Prostatic and central nervous system histoplasmosis in an immunocompetent host: case report and review of the prostatic histoplasmosis literature. **Clin Infect Dis**, v.30, p.595–598, 2000.

MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. **Medical Mycology**, v.43, p.125-128, 2005.

MCVARY, K.T.; ROEHRBORN, C.G.; AVINS, A.L.; BARRY, M.J.; BRUSKEWITZ, R.C.; DONNELL, R.F.; FOSTER, H.E.Jr.; GONZALEZ, C.M.; KAPLAN, S.A.; PENSON, D.F.; ULCHAKER, J.C.; WEI JT. Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v.185, p.1793-803, 2011.

MEARES, E.M.Jr. Prostatitis and related disorders, p.615–630, 1997. In WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; VAUGHAN Jr., E.D.; WIEN, A.J. (ed.), **Campbell's urology**, The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B. et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Micol**, v.38, p.113-123, 2000.

MILNE, I.; WRIGHT, F.; ROWE, G.; MARSHALL, D.F.; HUSMEIER, D.; MCGUIRE, G. TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. **Bioinformatics**, v.20, n.11, p.1806-1807, 2004.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.3, n.1, p.4–8, 2011.

MOHR, J.F.; HALL, A.C.; ERICSSON, C.D.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Fatal amphotericin B overdose due to administration of nonlipid formulation instead of lipid formulation. **Pharmacotherapy**, v.25, p.426-8, 2005.

MORACE, G.; BORGHI, E.; IATTA, R.; MONTAGNA, M.T. MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J.A. Anidulafungin, a New Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.767-769, 2005.

MORRIS, B.S.; CHUDGAR, P.D.; MANEJWALA, O. Primary renal candidiasis: fungal mycetomas in the kidney. **Australas Radiol**, v.46, p.57–59, 2002.

MUKHERJEE, P.K.; SHEEHAN, D.J.; HITHCOCK, C.A.; GHANNOUM, M.A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Ver.**, v.18, p.163-194, 2005.

NAKASHIMA, J.P.; KOIFMAN, S.; KOIFMAN RJ. Tendência de mortalidade por neoplasias malignas selecionadas em Rio Branco, Acre, Brasil, 1980-2006. **Cadernos de Saúde Pública**, v.27, n.6, p.1165-1174, 2011.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.67, n.3, p.400-428, 2003.

NDIMBIE, O.K.; DEKKKER, A.; MARTINEZ, A.J.; DIXON, B. Prostatic sequestration of *Cryptococcus neoformans* in immunocompromised persons treated for cryptococcal meningoencephalitis. **Histol Histopathol**, v.9, p.643-8, 1994.

NENOFF, P.; OSWALD, U.; HAUSTEIN, U.F. *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. **Mycoses**, v.42, p.629-639, 1999.

NETTO Jr, N.R. Urologia Prática: tumor da próstata. São Paulo, 4.ed.**ampl**, cap.4, p.215-238, 1999.

NEUBURGER, S.; MASCHMEYER, G. Update on management of infections in cancer and stem cell transplant patients. **Ann Hematol**, v.85, n.6, p.345-56, 2006.

NIKU, S.D.; DALGLEISH, G.; DEVENDRA, G. Coccidioidomycosis of the prostate gland. **Urology**, v.52, p.127, 1998.

NOLTE, F. S.; PARKINSON, T.; FALCONER, D. J.; DIX, S.; WILLIAMS, J.; GILMORE, C.; GELLER, R.; WINGARD, J. R. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p.196-9, 1997.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N.A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v.11, p.272-9, 2003.

O'GORMAN, C.M. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. **Fungal Biology Reviews**, v.25, p.151-157, 2011.

OLIVEIRA, J.C. Tópicos em Micologia Médica. 4 ed. **Rio de Janeiro**, 2014. ISBN 85-900986-1-3.

PAGANO, L.; AKOVA, M.; DIMOPOULOS, G.; HERBRECHT, R.; DRGONA, L.; BLIJLEVEN, N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.5 – 14, 2011.

PALACIO, A., CUÉTARA, M.S., PONTÓN, J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.20, p.90-98, 2003.

PAPPAS, G.; IERODIAKONOU, V.; FALAGAS, M.E. Lost in translation: differences in antimicrobial indication approval policies between the United States and Europe. **Clin Ther**, v.31, p.1595-603, 2009.

PARK, S.; NELLY, J.; NIELSEN KAHN, J. Specific substitutions in the echinocandins target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* spp. isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.3264-3273, 2005.

PASQUALOTTO, A.C. Amphotericin B: the higher the dose, the higher the toxicity. **Clin Infect Dis**, v.47, p.1110-1, 2008.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clin Infect Dis**, v.57, n.4, p.564-72, 2013. ISSN 1537-6591.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.D.; DIEKEMA, J; MESSER, S.A.; MOET, G.J.; JONES; R.N. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. **J Clin Microbiol**, v.48, p.1592-9, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v.20, p.133-63, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; BARTON, R.; BIJIE, H.; BILLE, J.; CHANG, S.C.; DA LUZ MARTINS, M.; DUSE, A.; DZIERZANOWSKA, D.; ELLIS, D.; FINQUELIEVICH, J.; GOULD, I.; GUR, D.; HOOPEN, A.; LEE, K.; MALLATOVA, N.; MALLIE, M.; PENG, N.G.; PETRIKOS, G.; SANTIAGO, A.; TRUPL, J.; VANDEN ABEELE, A.M.; WADULA, J.; ZAIDI, M. Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.67, p.162-71, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J Clin Microbiol**, v.48, p.1366- 77, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.852-856, 2002.

POLASCIK, T.J.; MANYAK, M.J.; HASEMAN, M.K.; GURGANUS, R.T.; ROGERS, B.; MAGUIRE, R.T. et al. Comparison of clinical staging algorithms and 111indium-capromab pendetide immunoscintigraphy in the prediction of lymph node

involvement in high risk prostate carcinoma patients. **Cancer**, v.85, n.7, p.1586-92, 1999.

POSTERARO, B. et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. **Expert Rev Proteomics**, v.10, n.2, p.151-64, 2013. ISSN 1744-8387.

RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update. **American Society for Microbiology**, v.4, n.4, p.633-638, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Antifungal drugs. In: Pharmacology. **Edinburg: Churchill Livingstone**, p.666-671, 2003.

RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; WORMLEY Jr, F.L. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. **Mycopathologia**, v.167, n.6, p.307-14, 2009.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; WALSH, T.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GANNOUM, M.A.; GOSEY, L.L.; ODDS, F.C.; REINALDI, M.G.; SHEEHAN, D.J.; WARNOCK, D.W. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.643-651, 2001.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S.; NAVES, P.L.F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, p.64, 2004.

RIBEIRO, E.L. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, p.129, 2008.

RHODEN, E.L.; AVERBECK, M.A. Câncer de prostata localizado. **Revista da AMRIGS**, v.54, n.1, p.92-99, 2010.

RODRIGUES, R.; SALES, C.A. Aspectos epidemiológicos e diagnósticos do carcinoma prostático. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.6, n.1, p.131-140, 2013.

RODRIGUES, S.; DORES, M.; METROGOS, V.; RODRIGUES, M.; NETO GOMES, P.; CABRITA, M.; ROSA, G.; COUTINHO, A.; NEVES, J. Carcinoma da próstata metastático resistente à castração – novas abordagens terapêuticas. **Acta Urológica Portuguesa**, v.31, n.1-2, p.36-40, 2014.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, n.12, p.1572-1574, 2003.

ROSA, C.M.G. Detecção de *Aspergillus fumigatus* em hemoculturas. **Dissertação** (Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - UP), Universidade do Porto, Porto, p.81, 2008.

RÜDIGER, H. Plant lectins - More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v.161, p.130-152, 1998.

SAFDAR, A.; GERALD, B.; ARMSTONG, D. Infections in patients with cancer: overview. In: Safdar, A. editor. Principles and Practice of Cancer Infectious Disease. **Springer Science+Business Media**, p.3-15, 2011.

SANDA, M.G. et al. Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. **N. Engl. J. Med.**, v.358, p.1250-1261, 2008.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.379–385, 2002.

SANTOS, A.C.O. Feijão camaratu, *Cratylia mollis*: Aspectos estruturais e ultraestruturais, purificação, caracterização e imunolocalização de isolectinas **(Tese de Doutorado)** CCB-UFPE Brasil, p.126, 2001.

SECIL, M.; GOKTAY, A.Y.; DICLE, O.; YORUKOGLU, K. Bilateral epididymal *Candida* abscesses: sonographic findings and sonographically guided fine-needle aspiration. **J Clin Ultrasound**, v.26, p.413–415, 1998.

SIDDIQUI, T.; ZAMANI, T.; PARADA, J.P. Primary cryptococcal prostatitis and correlation with serum prostate-specific antigen in a renal transplant recipient. **J Infect**, v.5, p.53–57, 2005.

SIDRIM, J.J.C.; COSTA, A.K.F.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; MOURA, F.E.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; NETO, M.P.A.; ROCHA, M.F.G. Molecular Methods for the Diagnosis and Characterization of *Cryptococcus*: a Review. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, p.445-458, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.G.F. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.388, 2004.

SIEGEL, R.; DEEPA NAISHADHAM, M.A; AHMEDIN JEMAL, D.V.M. Cancer Statistics, 2012. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.62, p.10–29, 2012.

SILVA, M.P. Identificação e caracterização gerais e diagnósticas das infecções do trato urinário causadas por *Candida*. **Monografia de conclusão de curso**. Novo Hamburgo- Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <[http://ged.feevale.br/bibvirtual/Monografia/Monografia MarceloSilva.pdf](http://ged.feevale.br/bibvirtual/Monografia/Monografia%20MarceloSilva.pdf)>. Acesso em: 1 set. 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of species *Candida non-Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.19, p.241-247, 2011.

SOHAIL, M.R.; ANDREWS, P.E.; BLAIR, J.E. Coccidioidomycosis of the male genital tract. **J Urol**, v.173, p.1978–1982, 2005.

SOUSA, S.R.; GALANTE, N.Z.; BARBOSA, D.A.; PESTANA, J.O.M. Incidência e fatores de risco para complicações infecciosas no primeiro ano após o transplante renal. **J Bras Nefrol**, v.32, n.1, p.77-84, 2010.

SPOLIDORIO, D.M.P.; MARTINS, V.R.G.; NOGUEIRA, R.D.; SPOLIDORIO, L.C. The frequency of *Candida* sp. in biopsies of oral mucosal lesions. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, p.89-93, 2003.

SROUGI, M. Próstata: isso é com você. São Paulo: **Publifolha**, p.125, 2003.

STAMEY, T. PSA as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. **N Engl J Med**, v.317, p.909-916, 1987.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* *in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. **Dissertação** (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias)- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.48, 2009.

TAKANO, Y.; TERANISHI, Y.; TERASHIMA, S.; MOTOKI, R.; KAWAGUCHI, T. Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. **Surg. Today**, v.30, p.1073-1082, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** V.24, p.1596–1599, 2007.

TAPIA, C.; LEON, E.; PALAVECINO, E. Antifungal susceptibility of yeasts by Etest. Comparison of 3 media. **Rev Med Chil**, v.131, n.3, p.299-302, 2003.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO C.S.; SOUZA, J.B.; HAVT, A.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; FARIAS, W.R.L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1001–1006, 2007.

TOSOIAN, J.J. et al. Active surveillance program for prostate cancer: an update of the Johns Hopkins experience. **J. Clin. Oncol.**, v.29, p.2185-2190, 2011.

TREVIÑO, M.; GARCÍA-RIESTRA, C.; ARESES, P. et al. Emerging *Trichosporon asahii* in elderly patients: epidemiological and molecular analysis by the DiversiLab system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.33, n.9, p.1497–1503, 2014.

UNDERWOOD, W.; OROM, H.; POCH, M.; WEST, B.T.; LANTZ, P.M.; CHANG, S.S. et al. Multiple physician recommendations for prostate cancer treatment: a Pandora's box for patients? **Can J Urol**, v.17, n.5, p.5346-54, 2010.

VIDOTTO, V. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to bucal and vaginal cells. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.20, p.52-54, 2003.

VOLKOW, P.; ROSA, M.L.; GORDILLO, P.; VILAR-COMPTE, D.; LAZO DE LA VEJA, S.; ARANDA-CORTÉS, G. et al. Tendencias de infecciones intra

hospitalarias en un centro oncológico, 1986-1996. **Salud pública**, v.42, n.3, p.181-187, 2000.

WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J.; DENNING, D.W.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D.P.; MARR, K.A.; MORRISON, V.A.; SEGAL, B.H.; STEINBACH, W.J.; STEVENS, D.A.; VAN BURIK J.A.; WINGARD, J.R.; PATTERSON, T.F. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.46, p.327-60, 2008.

WANG, M. Purification of a human prostate specific antigen. **Invest Urol**, v.17, p.159-163, 1979.

WHEAT, L.J. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. **Clinical Chest Medicine**, v.30, p.367–377, 2009.

WHITE, P.L.; PERRY, M.; BARNES, R.A. Polymerase Chain Reaction Diagnosis of Fungal Disease: Finally Coming of Age. **Advances in Diagnosis and Early Therapy**, v.3, p.207- 215, 2009.

WIEDERHOLD, N.P. Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of paradoxical effect. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.20, p.574-578, 2007.

WINGARD, J.R. Lipid formulations of amphotericins: are you a lumper or a splitter? **Clin Infect Dis**, v.35, p.891-5, 2002.

XAVIER, M.O.; PASQUALOTTO, A.C.; SALES, M.P.U.; SEVERO, C.B.; CAMARGO, J.J.P.; SEVERO, L.C. Invasive pulmonary aspergillosis due to a mixed infection caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p.176-178, 2008.

YAMAMOTO, T.; ITO, K.; OHI, M.; KUBOTA, Y.; SUZUKI, K.; FUKABORI, Y.; KUROKAWA, K.; YAMANAKA, H. Diagnostic significance of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in men with prostate-specific antigen levels of 4 NG/ML or less. **Urology**, v.58, p.994-998, 2001.

YU, L.G. et al. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedereich antigen-binding lectins. **J. Cell. Physiol.**, v.186, p.282-287, 2001.

ZAOUTIS, T.E.; BENJAMIN, D.K.; STEINBACH, W.J. Antifungal treatment in pediatric patients. **Drug Resistance Updates**, v.8, p.235-245, 2005.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CâNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "CÂNCER DE PRÓSTATA E INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA: ABORDAGEM CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA"

Pesquisador: Rejane Pereira Neves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43177015.0.0000.5205

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.179.690

Data da Relatoria: 14/07/2015

Apresentação do Projeto:

O câncer é um problema de saúde pública importante, sendo o câncer de próstata (CaP) a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens, superado apenas pelo câncer de pele não-melanoma, contudo ainda possui sua etiologia desconhecida. Muitos organismos patogênicos diferentes têm sido observados para infectar e provocar uma resposta inflamatória na próstata, principalmente quando os pacientes utilizam cateteres vesicais,

os quais predispoem a infecção fúngica, devido a colonização das superfícies do cateter, permitindo o desenvolvimento de biofilmes. Outra característica importante é que tumores malignos apresentam com frequência padrões irregulares na glicosilação de glicoconjugados em suas células, dessa forma lectinas podem ser utilizadas pois demonstram viabilidade e eficiência como marcadores de células transformadas. Sendo assim, essa pesquisa tem como objetivo demonstrar a interferência das infecções fúngicas no desenvolvimento do câncer de próstata, a capacidade dos isolados clínicos em formarem biofilme e a utilização de lectinas como marcadores celulares teciduais e microbianos. Para isso, após aprovação do comitê de ética, será coletado o material biológico de acordo com a solicitação médica dos pacientes internados do setor de Urologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, em seguida as amostras serão levadas para o Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER- SPCC



Continuação do Parecer: 1.179.690

Universidade Federal de Pernambuco, onde será realizado o diagnóstico laboratorial micológico, avaliação da capacidade de formação de biofilme e caracterização dos fungos quanto a expressão de carboidratos na parede celular, através de ensaio de marcação com lectinas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Demonstrar a interferência das infecções fúngicas no desenvolvimento do câncer de próstata, a capacidade dos isolados clínicos em formarem biofilme e a utilização de lectinas como marcadores celulares teciduais e microbianos.

Objetivo Secundário:

- Realizar coleta de amostras clínicas em pacientes com câncer de próstata;
- Isolar os fungos e identificá-los por métodos clássicos e moleculares;
- Determinar a similaridade genética entre os isolados clínicos de mesma espécie; •Analisar a capacidade dos isolados clínicos em formar biofilme;
- Caracterizar, através da marcação com lectinas, a expressão de glicoproteínas da parede celular dos isolados clínicos;
- Avaliar a expressão de carboidratos nas células do tecido da próstata através da histoquímica com lectinas;
- Correlacionar expressão glicídica entre a citoquímica e histoquímica com lectinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos são mínimos, pois a coleta de tecido da próstata será realizada por profissionais qualificados, contudo podem ocorrer pequenas hemorragias localizadas que são inerentes ao procedimento. O material biológico obtido não será de uso exclusivo da pesquisa, uma vez que essas amostras são utilizadas na rotina para diagnóstico e tratamento dos pacientes. O único risco direto será, caso ocorra, constrangimento no momento entrevista. No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

Benefícios:

Benefícios diretos aos participantes da pesquisa incluem, rapidez e precisão no diagnóstico micológico, nos quais, levam a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz, melhorando, assim, a qualidade de vida dos pacientes com câncer de próstata associado a infecções fúngicas. Os preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 da CONEP serão respeitados e as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa, constarão no Termo de

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 1.179.690

Consentimento Livre e Esclarecido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Reapresentação de projeto.

Os pesquisadores realizaram todas as adequações sugeridas pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória presentes e adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 11 de Agosto de 2015

Assinado por:

ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br