UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

CICERO PINHEIRO INÁCIO

CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *Gal102* EM ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MALIGNAS

Recife
2019

CICERO PINHEIRO INÁCIO

CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *Gal102* EM ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MALIGNAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rejane Pereira Neves

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Ramos de Araújo, MD.

Recife

2019

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Inácio, Cícero Pinheiro

Capacidade de adesão, formação de biofilme e avaliação da expressão do gene Gal 102 em espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias malignas / Cícero Pinheiro Inácio- 2019.

103 folhas: il., fig., tab. Orientadora: Rejane Pereira Neves Coorientador: Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices 1. Candida sp 2. Fator de virulência 3. Expressão gênica I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Araújo, Paulo Sérgio Ramos de (coorient.) III. Título

579.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2019-379

CICERO PINHEIRO INÁCIO

CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *Gal102* EM ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MALIGNAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves - Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macedo
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Profa. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ-PE

Profa. Dra. Claudia Fernanda de Lacerda Vidal, MD
Hospital das Clínicas -Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima
Universidade do Minho, Braga-Portugal

AGRADECIMENTOS

Uma das atitudes mais nobres de um homem, consiste em ter gratidão pelos pequenos (Humildade) e grandes (Complacência) contribuições recebidas ao longo da vida. Mas, agradecer, em si, não é uma tarefa fácil, uma vez que podemos falhar por não ser inteiramente justos com quem deveríamos. Falhas são possíveis e, consequentemente, inevitáveis. Entretanto, as vezes pequenas barreiras podem se estabelecer ao longo do cominho, e dificultar outrem uma reparação. Deste modo, seria uma dádiva e, ao mesmo tempo, um conforto se possuíssemos de um artifício plausível e simplória para fazermos isto, tal qual o é uma singela equação matemática. Assim sendo, quero prestar meus singelos agradecimentos profissionais, pessoais e afetivos aqueles entes e pessoas que tornaram a realização desse feito pessoal e científico realizável.

Agradecimentos profissionais:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo financiamento a pesquisa;

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia de Fungos (PPGBF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

A coleção de Culturas Micoteca URM (UFPE), pelos valorosos serviços prestados;

Aos laboratórios Sylvio Campos-Micologia Médica, Imunodiagnóstico e laboratórios Multiusuário do Departamento de Micologia - UFPE;

Ao laboratório de Biologia Celular e Molecular-LBCM-CPqAM-Fiocruz-PE e valorosas amizades ali conquistadas.

Ao hospital das Clinicas-HC/UFPE, Hospital de Câncer-HCP/PE e, sobretudo, aos pacientes que em momento de dor deram seu voto de confiança;

Aos meus orientadores, Profa. Rejane Neves e Prof. Paulo Sérgio Araújo pela confiança e ajuda no crescimento profissional;

Aos professores Armando Marsden, Reginaldo Lima-Neto, Danielle Patrícia Macedo, Oliane Magalhães, Luiz Alves, Fábio Brayner, Dyana Leal e Ana Paula Feitosa;

A equipe técnica do Departamento de Micologia e da Fiocruz-PE;

Agradecimentos pessoais

Agradeço em especial aos meus pais, Francisco e Tereza, que com seu amor e sabedoria poderam me guiar a me tornar uma pessoa melhor. As pessoas que mais considero, sempre tiveram sapiência, além de uma profunda dedicação, rigor, amor e paciência dispostos a mim e a nossa família.

Aos meus irmãos, que não são poucos (Maria, Ana, Anisia, Marta, Ceiça, Wegilla, José, Jorge e André), por serem meus melhores amigos, exemplos como pessoa humana, que em muitas ocasiões foram meus tutores e mestres.

A minha noiva, Greicilene Albuquerque. Pessoa amável, amiga e companheira fiel em todos os momentos. Agradeço, também, aos seus parentes por fazerem parte dessa caminhada.

A Profa. Rejane Neves, uma pessoa querida, gentil e rigorosa, nos momentos necessários. Agradeço a todos os conselhos e atitudes tomadas ao meu crescimento;

Aos amigos, tanto os de épocas imemoriais quanto aos novos que conquistei aqui em Recife, terra arretada. Dado as regras da vida, não terei espaço para citar um a um. Entretanto, sei que aos que direciono a palavra tomaram para si esses agradecimentos.

A todos aqueles que vierem a se beneficiar desta pesquisa; seria uma honra saber que pude contribuir para o conhecimento de outras pessoas.

Se, em algum momento passou-me algum lapso de memória, quero externar minhas sinceras desculpas por não ter mencionado outrem. Todos aqueles que passaram por mim, foram vetores que contribuíram para modelar o ser que me tornei. Assim, faço dessas minhas últimas palavras de agradecimentos aqueles que, por ventura, não foram mencionados nestes aqui.

RESUMO

Atualmente, as neoplasias malignas apresentam alta taxa de mortalidade, seja devido a própria desordem ou a fatores associados, como a presença de comorbidades e sepse. Ao mesmo tempo, as infecções ocasionadas por fungos, que acometem esse grupo de pacientes, contribuem para a elevação na taxa de morbidade e mortalidade, sendo frequentemente responsáveis por quadros graves que podem conduzir o paciente a óbito. Frequentemente, as infecções em humanos surgem devido a abordagem terapêutica e a utilização de dispositivos médicos invasivos, que aliados às condições predisponentes do hospedeiro favorecem o surgimento de infecções. Ainda, sabe-se que o agravamento da infecção pode estar relacionada ao envolvimento de genes específicos. Assim, aqueles genes relacionados à arquitetura da parede celular em *C. albicans*, como o *GAL102*, podem facilitar a patogênese. Entretanto não se sabe o envolvimento deste gene em outras espécies de *Candida* e se há relação deste com a integridade da parede celular e com a capacidade de aderência e formação de biofilme. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de adesão, formação de biofilme e a expressão do gene *GAL102* em espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias malignas**.** Os pacientes atendidos no estudo apresentaram desordens neoplásicas variadas, destacando-se o carcinoma (n=13/41, 31,7%), adenocarcinoma (n=6/41, 14,6%), sarcoma (n=5/41, 12,2%) e leucemia (n=4/41, 9,75%). A realização do estudo demonstrou uma prevalência de 8,28 casos a cada 100 pacientes. Os indivíduos mais acometidos foram idosos (37%) e pacientes do sexo feminino (53,66%). As espécies mais prevalentes foram *Candida tropicalis*, seguidas de *C. albicans, C. parapsilosis* e *C. glabrata.* Houve a ocorrência, também, de espécies incomuns como *C. pelliculosa, C. krusei* e *Cystobasidium minutum*. Em relação a capacidade de aderência as Células Epiteliais Bucais, apenas um isolado exibiu uma grande capacidade de aderência (6,25%), sendo as demais espécies de fraca aderência. Em contrapartida, quase todos os isolados apresentaram

significância estatística quanto à atividade formadora de biofilme, demonstrando o grande poder de virulência dessas espécies. Em relação a presença do gene *GAL102*, apenas nas espécies de *C. albicans* (n=7, 43,75%) e *C. tropicalis* (n=3, 17,65%) foi constatada a presença do gene. Dentre essas espécies, 3 isolados de *C. albicans* foram utilizados no experimento de qPCR. Observou-se que no isolado URM8002 o gene estava superexpresso, desempenhando um papel muito importante na constituição da parede celular de *Candida*, crescimento e transição da fase de levedura para a filamentosa. Assim, esse gene pode desempenhar um papel importante quanto à virulência e patogenicidade da espécie. Apesar de não ser possível afirmar a relação do gene *GAL102* com a capacidade de aderência, o eferido gene possui relação com a formação de biofilme nessa espécie. Ainda, foi possível concluir que apenas alguns isolados apresentam a mesma variante do gene, reforçando a idéia de que o poder patogênico de *Candida* é multifatorial e variável entre isolados de uma mesma espécie.

Palavras-chave: *Candida* sp. Fatore de virulência. Neoplasia. Epidemiologia. Expressão gênica.

ABSTRACT

Currently, malignant neoplasms either have a high mortality rate, due to the disorder itself or associated factors such as the presence of comorbidities and sepsis. At the same time, fungal infections that affect this group of patients contribute to the increase in morbidity and mortality rates and are often responsible for severe conditions that can lead the patient to death. Infections in humans often arise due to the therapeutic approach and the use of invasive medical devices, which combined with the predisposing conditions of the host favor the onset of infections. Moreover, it is known that the aggravation of infection may be related to the involvement of specific genes. Thus, those genes related to *Candida albicans* cell wall architecture, such as GAL102, may facilitate pathogenesis. However, the involvement of this gene in other *Candida* species is unknown and is related to the integrity of the cell wall and the ability to adhere and form a biofilm. Thus, the present study aimed to evaluate the adhesion capacity, biofilm formation and *GAL102* gene expression in yeast species isolated from clinical samples of patients with malignant neoplasms. The patients treated in the study presented varied neoplastic disorders, highlighting the carcinoma (n = 13/41, 31.7%), adenocarcinoma (n = 6/41, 14.6%), sarcoma (n = 5/41, 12.2%) and leukemia (n = 4/41, 9.75%). The study showed a prevalence of 8.28 cases per 100 patients. The most affected individuals were elderly (37%) and female patients (53.66%). The most prevalent species were *Candida tropicalis*, followed by *C. albicans, C. parapsilosis,* and *C. glabrata*. There were also unusual species such as *C. pelliculosa, C. krusei* and *Cystobasidium minutum*. Regarding the adherence capacity to the Oral Epithelial Cells, only one isolate showed a great adhesion capacity (6.25%), and the other species had poor adherence. In contrast, almost all isolates were statistically significant for biofilm-forming activity, demonstrating the great virulence power of these species. Regarding the presence of *GAL102* gene, only *C. albicans* (n = 7, 43.75%) and *C. tropicalis* (n = 3, 17.65%) species were found. Among these species, 3 C. albicans isolates were used in the qPCR experiment. It was observed that in the URM8002 isolate the gene was overexpressed, playing a

very important role in *Candida* cell wall constitution, growth and transition from yeast to filamentous phase. Thus, this gene may play an important role in virulence and pathogenicity of the species. Although it is not possible to affirm the relationship of the *GAL102* gene with the adhesion capacity, the referred gene is related to the biofilm formation in this species. It was also possible to conclude that only some isolates present the same gene variant, reinforcing the idea that the pathogenic power of *Candida* is multifactorial and variable among isolates of the same species.

Keywords: *Candida*. Virulence factors. Neoplasia. Epidemiology. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Desenho esquemático demonstrando as etapas de formação do biofilme de *Candida* e mecanismos de resistência.	38
Figura 2-	Via de Leloir	39
Figura 3-	Perfil etário da população acometida por leveduroses entre os anos de 2016 e 2017.	56
Figura 4-	Prevalência das espécies obtidas relacionado com o tratamento instituído para as espécies observadas.	57
Figura 5-	Perfil fenotípico dos isolados de levedura, contendo o teste auxanográfico (a, b, c, d) e o perfil de produção da enzima uréase (e). Leveduras com capacidade de assimilar os açúcares dextrose, (a), xilose (b), rafinose (c) e amido (d) foi positiva em 48h. A assimilação foi negativa nos *spots* translúcidos. Pode ser visualizado a esquerda um tubo positivo do teste de produção da enzima urease e a direita um tubo negativo (e).	62
Figura 6-	Imagem da eletroforese em gel de agarose (a) exibindo o perfil de amplificação dos isolados de *C. glabrata* (1-6) e de *C. tropicalis* (7-12). Marcador 1kb Plus DNA ladder.	64
Figura 7-	Análise filogenética do domínio D1/D2-região LSU de *Cystobasidium minutum*. Os números de acesso do *GenBank* aparecem entre parênteses, sendo os valores de *Bootstrap* discriminados ao lado das ramificações.	67
Figura 8-	Exame microscópico exibindo o perfil de aderência de *Candida albicans* a células epiteliais bucais. Foram notados perfis com ausência de aderência (a), aderência fraca (b, c) e aderência forte (d) de leveduras. Aumento de 400x.	68
Figura 9-	Microscopia óptica (a) e Microscopia Eletrônica de Varredura do Biofilme de *C. tropicalis*. São evidenciadas estruturas microscópicas (matrix polimérica, filamentos milcelianos, blastoconídios e clamidoconídios) do biofilme formado em placa de poliestireno (a) e biofilme formado no lumem de cateter contaminado (b, c, d, e).	71
Figura 10-	Atividade formadora de biofilme de espécies de levedura avaliada nos tempos de 24 e 48 horas. Teste de Tukey com nível de significância de 5%.	72
Figura 11-	Sequência parcial do gene *GAL102* de *Candida albicans* SC5314.	75
Figura 12-	Eletroforese desnaturante, em gel de agarose (1%), do RNA total exibindo as três tipos de RNA. Marcador 1Kb plus DNA *ladder*.	76

Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1- Relação dos *Primers* do estudo. 50

Tabela 2- Espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas de pacientes internados em hospitais terciários públicos de Recife-PE, entre os anos de 2016-2017. 55

Tabela 3- Perfil fenotípico dos isolados de levedura avaliadas 61

Tabela 4- Concordância entre a confirmação taxonômica, por PCR e/ou sequenciamento, e o meio cromogênico CHROMOAgar *Candida*. 63

SUMÁRIO

		Pág.
1	**INTRODUÇÃO**	13
1.1	JUSTIFICATIVA	15
1.2	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivo geral	16
1.2.2	Objetivos específicos	16
2	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**	17
2.1	CÂNCER	17
2.2	INFECÇÕES FÚNGICAS OPORTUNISTAS	19
2.3	GÊNERO *Candida*	22
2.4	LEVEDURAS PIGMENTADAS	30
2.5	DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	32
2.6	MECANISMOS DE VIRULÊNCIA	34
3	**METODOLOGIA**	41
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	41
3.2	LOCAL DE COLETA	41
3.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	42
3.4	REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	42
3.5	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA	42
3.6	**AVALIAÇÃO QUANTO À CAPACIDADE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME**	47
3.6.1	Teste de aderência às células epiteliais	47
3.6.2	Capacidade de formação de biofilme	48
3.7	**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *GAL102***	49
3.7.1	Detecção do gene *GAL102*	49
3.7.2	Extração e quantificação do RNA	51
3.7.3	RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	52
4	**ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS**	54
5	**CONSIDERAÇÕES FINAIS**	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A - PARECER CONSUBSTANCIADO	99
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO	102

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços centrados no combate ao câncer, ainda existe uma perspectiva muito alta quanto ao surgimento de casos novos da doença. Nesse sentido, são esperados o aparecimento de aproximadamente 640 mil casos novos até o ano de 2019 no Brasil (INCA, 2017). No último decênio, somente no estado de Pernambuco, a mortalidade ocasionada por neoplasias malignas apareceu entre as principais causas de morte no estado (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2012). Paralelamente, infecções fúngicas tem contribuído de maneira importante no prognóstico e sobrevida dos pacientes hospitalizados (LIN et al., 2018).

Atualmente, as infecções fúngicas oportuniscas constituem como um dos pricipais agravos a saúde, sobretudo em pacientes com câncer, representando a terceira causa de infecções da corrente sanguínea (LIN et al., 2018). Nesse sentido, as leveduras aparecem como importantes causas de morbidade e mortalidade, ao mesmo tempo em que são responsáveis por quadros graves que podem conduzir o paciente a óbito (MOLINA et al., 2012; FAGAN et al., 2013; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014).

A predisposição deste grupo de pacientes às infecções fúngicas está relacionada a vários fatores, como tratamentos invasivos pelo uso de cateter e sondas e outros dispositivos médicos (FORTÚN; GIOIA, 2017). Paralelamente, surge a necessidade de permanência hospitalar prolongada em pacientes críticos, principalmente aqueles expostos a quimioterápicos, os quais favorecem a imunossupressão (MOLINA et al., 2012; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014). Nesse cenário, tem sido observado que os pacientes com quadros malignos que desenvolvem infecções por espécies de *Candida* comumente apresentam mal prognóstico (WANG et al., 2013; FORTÚN; GIOIA, 2017; LIN et al., 2018).

Pesquisas têm demonstrado que de 65-80% das infecções microbianas em humanos são resultantes de biofilmes patogênicos. Para iniciar a formação do biofilme, é crucial a aderência de células fúngicas às células do hospedeiro e/ou dispositivos médicos, sendo esta capacidade um evidente fator de

virulência. Entre os patógenos humanos, o mais associado à formação de biofilmes são espécies de *Candida*, especialmente nas superfícies de dispositivos médicos, como sondas e cateteres. O tratamento destas infecções torna-se mais complexo devido à formação deste biofilme, que é resistente a uma variedade de agentes antifúngicos (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; SARDI et al., 2013).

Diversos estudos relatam que a arquitetura e composição da parede celular e a virulência de patógenos fúngicos podem ser alteradas pela presença de galactose, sendo a taxa de formação do biofilme mais elevada na presença de galactose, correspondendo a 3% do peso seco do material polimérico extra-celular do biofilme de *C. albicans*. A maioria dos organismos é capaz de metabolizar a galactose, indicando que as mananas da parede celular contribuem para a resposta do hospedeiro (SEN et al., 2011).

Além do biofilme e da capacidade de aderência, outros mecanismos de patogenicidade podem estar envolvidos na gravidade da infecção fúngica, que são codificados por genes identificados, como o gene *GAL102*, que foi ligado ao metabolismo da galactose em *Candida*. Este gene codifica a enzima UDP-glicose 4,6-dehidratase, sendo importante na manutenção da integridade da parede celular (ALVARES et al., 2007; GUNASEKERA et al., 2010; SEN et al., 2011; GRAVELAT et al., 2013; KAMTHAN et al., 2013).

O estudo da expressão de genes de virulência pode auxiliar na compreensão dos mecanismos inerentes à infecção fúngica. Todavia, os trabalhos neste sentido ainda são incipientes, de modo que a virulência de outras espécies de *Candida* provavelmente esteja relacionada com a manifestação deste mesmo fator genético (SEN et al., 2011). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico de infecções fúngicas sistêmicas causadas por leveduras em portadores de neoplasias, e avaliar a capacidade de adesão, formação de biofilme e expressão do gene *GAL102* em espécies de leveduras.

1.1 JUSTIFICATIVA

Segundo estimativas conservadoras haverá um aumento crescente na incidência de casos novos de câncer nos países em desenvolvimento, sobretudo no Brasil. Ao mesmo tempo, esses pacientes constituem um grupo de risco elevado à predisposição de infecções fúngicas severas, com prognóstico desfavorável. Partindo deste pressuposto, infecções por espécies de *Candida* podem conduzir a um alto índice de mortalidade. Ainda, a gravidade da infecção pode ser influencianda negativamente pelo alto potencial de virulência das espécies de *Candida* que tem maior capacidade de adesão e produção de biofilme. Além disso, este potencial pode ser determinado pela expressão do gene *GAL102*, o qual necessita ser mais estudado, sobretudo em espécies de *Candida* não-*C. albicans*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme e a expressão do gene *GAL102* em espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias malignas

1.2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar leveduras provenientes de processos infecciosos de pacientes com câncer, atendidos em unidades especializadas, na cidade de Recife - PE;
- Avaliar o grau de virulência das cepas quanto à capacidade de aderência das células de leveduras a células epiteliais humanas;
- Avaliar o grau de virulência das cepas quanto à capacidade de formação de biofilme;
- Detectar a presença do gene *GAL102* nos isolados clínicos de *Candida*;
- Verificar a expressão do gene *GAL102* pelos isolados clínicos de *Candida*;
- Comparar a expressão do gene *GAL102* dos isolados de *Candida* com a capacidade de aderência e formação de biofilme;
- Traçar o perfil clínico-epidemiológico dos casos de leveduroses em portadores de câncer;
- Depositar na Micoteca URM/UFPE as cepas de leveduras isoladas e identificadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

O câncer consiste em uma desordem proliferativa de células clonais que continuam a crescer apesar de o estímulo que o desencadeou ter desaparecido. Em relação a etimologia da palavra, o câncer se refere aos tumores malignos que possuem a capacidade de invadir, destruir e metastatizar, além de causar um grande desgaste emocional e físico ao paciente (ABBAS et al. 2008). Ainda hoje essa doença gera muita repercussão no âmbito acadêmico e da saúde pública e dos pacientes, sendo que os casos que atendem a definição médica são simplesmente denominados de Câncer. Porém, cada caso apresenta suas peculiaridades, podendo exibir diferentes manifestações clínicas e abordagens de tratamento (NORONHA, 2008).

Segundo a Organização mundial da saúde, o câncer é um grave problema de saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. Esse conjunto de doenças é responsável por mais 7 milhões de óbito no mundo, ao mesmo tempo em que se observa taxas crescentes de incidência. A frequente exposição a fatores de risco ao câncer tem sido apontada como principal causa relacionada a este aumento crescente (INCA, 2014; INCA, 2017).

Estimativas realizadas pelo último GLOBOCAN, em relação ao diagnóstico de câncer no mundo, apontam para o surgimento de aproximadamente 14 milhões de novos casos da doença, com exceção do tipo não-melanoma. Esse cenário é preocupante, tendo em vista que ocorreram por volta de 8,2 milhões de mortes atribuídas ao câncer. Tomando por base esses resultados, o perfil de incidência e mortalidade de câncer correspondem 182 e 102 casos para 100.000 habitantes, respectivamente (STEWART; WILD, 2014).

Tem sido observado que a maior parcela dos casos de câncer está associada ao perfil urbano e locais mais desenvolvidos, como os casos de câncer de pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto, ou a casos associados a populações menos desenvolvidas e secundárias as infecções de diversas etiologias, como os canceres de colo do útero, estômago, esôfago e

fígado (MATHERS et al., 2003; FERLAY et al., 2015). Isso é alarmante, sobretudo porque temos observado o aparecimento de ambos os perfis citados acima no Brasil, o que pode refletir sobre o abismo observado quanto as desigualdades sociais no país.

A primeira estimativa relacionada a incidência de câncer no Brasil foi divulgada pela primeira vez em 1995. A metodologia empregada para o conhecimento desse perfil passou por modificações ao longo dos anos. Nessa perspectiva, a estimativa foi calculada a partir dos registros hospitalares das cidades de Porto Alegre, Fortaleza, Goiânia, Campinas e Belém refletindo como espelho de uma projeção nacional. Um dos vieses desse primeiro momento foi o fato de a pesquisa não contemplar os casos de mortalidade, só sendo sanado essa questão no ano de 1998 usando foram utilizados os dados regionais de incidência e mortalidade. Um fato marcante para o Brasil foi aperfeiçoamento da base de registro nacional pelo levantamento das capitais e de outras 14 localidades ocorrida no ano 2000. Essa pesquisa culminou, em 2003, com a adoção de uma base única dos casos de câncer em um cenário nacional (NORONHA, 2008).

No Brasil, fatores como o envelhecimento da população, mudanças nos padrões alimentares, exposição a gentes químicos, físicos e biológicos são as principais causas relacionadas ao surgimento de câncer. Porém, a distribuição dos tipos de canceres não é uniforme, sendo que alguns podem estar relacionados com o nível socioeconômico da população, como os canceres de colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral (BRASIL, 2006).

Devido à gravidade da doença, os pacientes acometidos de câncer vêm sendo assegurados em âmbito nacional por leis vigentes que asseguram o direito ao paciente ao tratamento, sendo este fornecido por órgãos de assistência médica mantidos pela União, pelos estados e pelos municípios. Esse direito inclui a realização de consultas, exames laboratoriais, cirurgias e a obtenção de medicamentos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 1990).

Apesar dessa ampla assistência, durante o curso do tratamento os pacientes podem exibir complicações clínicas devido a complicações clínicas

relacionadas ao quadro clínico vulnerável a que o indivíduo pode vir a adiquirir, como infecções provocadas por microrganismos. Ultimamente, as infecções fúngicas invasivas, sobretudo as causadas por leveduras, tem despertado uma grande importância uma vez que podem ocorrer em indivíduos susceptíveis, sobremaneira em portadores de neoplasias malignas. Segundo estimativas, as leveduras aparecem como a quarta causa mais comum destas infecções, apresentando altas taxas (30-60%) de mortalidade (MOLINA et al., 2012; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014; HIRANO et al., 2015; WANG et al., 2015).

2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS OPORTUNISTAS

Os fungos surgiram a 1,5 bilhões de anos e figuram como um dos primeiros microrganismos utilizados pelo homem (BUTLER, 2010). Estima-se que existam aproximadamente 8,7 milhões de espécies de fungos, sendo que apenas 600 são considerados agentes etiológicos de humanos (MAYER et al., 2013). O primeiro relato de infecção ocasionada por fungos foi conferido a Hipócrates que, no século V (a.c), observou estomatite presentes na cavidade oral de um paciente (HAZEN, 1995).

Apesar dos transtornos causados pelos fungos a saúde humana, pouca atenção foi dada a esse problema em detrimento dos graves efeitos provocados pelas infecções bacterianas presentes no final do século XIX (HAZEN, 1995). Deste modo, as infecções fúngicas em humanos só começaram a ser consideradas um sério problema a partir do século 20 (BUTLER, 2010).

Quadros infecciosos ocasionados por leveduras, ou leveduroses, podem representar uma condição crítica ao doente, principalmente as provocadas por espécies do gênero *Candida* que são conhecidas como candidíase (FURLANETO-MAIA et al., 2007). Infecções dessa natureza podem conduzir o paciente a óbito, sendo a sepse fúngica definida como uma resposta inflamatória sistêmica devido a um agente infeccioso. Ainda hoje, as infecções fúngicas invasivas constituem como uma das principais causas de

morbidade e mortalidade, sobretudo em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (MIQUELIN; REIS, 2016).

De modo geral, os pacientes críticos são alvo de preocupação constante pelos profissionais da saúde, uma vez que a resposta imunológica no hospedeiro está debilitada e incapaz de debelar o agente agressor (BURKE, 2003; ANTAS et al., 2012). Apesar de a resposta imunológica inata apresentar baixa especificidade ela corresponde ao melhor mecanismo de defesa frente as infecções fúngicas, podendo ser mediada por células e fatores humorais. O mecanismo de resposta é baseado no processo fagocitico e secreção de compostos microbicidas. Dentre as células de defesa, destacam-se as células fagocíticas, células natual killer, células dendriticas, células T Gamma/delta e células não hematopoenticas presentes na camada epitelial (ROMANI, 2004).

Taxas crescentes tem sido observada na incidência das infecções fúngicas invasivas, sobretudo nas últimas décadas. Os indivíduos imunocomprometidos representam a maior parcela dos indivíduos acometidos, seja pelo seu estado geral ou pela doença de base. Como principais comorbidades podem ser citadas as doenças hematológicas malignas, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tratamento quimioterápico, antibioticoterapia e uso prolongado de corticoides (HAN et al., 2010; MAJUMDAR; PADIGLIONE, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Nos dias atuais, várias espécies de fungos, sobretudos espécies emergentes, tem surgido como agentes etiológicos de micoses oportunistas e invasivas. Esse quadro apresenta um estado mais preocupante em si tratando de indivíduos internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (HEGGENDORNN et al, 2016). Entretanto, o pior cenário é observado em crianças que apresentam neoplasias hematológicas, uma vez que a mortalidade pode alcançar cifras de até 90% dos casos confirmados (GÓMEZ; CARDONA-CASTRO, 2016).

Os pacientes estão sujeitos a adquirirem infecções fúngicas devido a diversos fatores, como: estado geral do paciente, rompimento dos tecidos e exposição direta aos fungos, disfunção dos neutrófilos e da imunidade inata, desnutrição aguda, imunossupressão, transplantes de órgãos,

antibioticoterapia de demora, resistência antifúngica e aos procedimentos médicos invasivos a que os pacientes estão sujeitos. As infecções da corrente sanguínea representam uma importante complicação que pode conduzir o paciente a óbito, sobretudo quando acompanhado por um quadro de neutropenia severa (LEROY et al., 2009; KIM; SUDBERY, 2011; GUDIOL et al., 2016).

Os fatores intrínsecos aos pacientes não devem ser considerados como sinônimo de fator de risco, mas como elementos predisponentes ao surgimento da doença fúngica. Dentre esses fatores, pode-se citar a imunossupressão ocasionada pelo uso de cortiscosteroides, imunodeficiências hereditárias, transplantes de órgãos e tratamento antineoplásico (De PAUW et al., 2008; HIRANO et al., 2015).

Como principais fatores relacionados ao aumento na incidência de infecções fúngicas podem ser apontados a melhora nos métodos de diagnóstico e ao aumento da população de risco, sobretudo, pacientes que recebem tratamento quimioterápico (MA et al., 2013). Foi observado nas últimas décadas um aumento constante na frequência de novos casos de infecções provocadas por fungos, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos. Infecções fúngicas invasivas em pacientes críticos constitui um quadro preocupante, uma vez que figuram como a principal causa de morbidade e mortalidade (ASCIOGLU et al., 2002).

Foi observado que entre os paciente que apresentam neoplasias hematológicas malignas as infecções fúngicas invasivas corresponde a causa primaria de morte, sobretudo quando o tratamento é tardio (RUHNKE et al., 2012). Apesar das espécies de *Candida* serem um dos principais agentes de infecções fúngicas (MA et al., 2013), outras espécies de fungos filamentosos e leveduras tem sido relatados (RUHNKE et al., 2012).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, 20% das infecções hospitalares acometem os pacientes internados e apresentam até 10 vezes mais chances de adquirir infecção nosocomial (OLIVEIRA et al., 2010). Infecção nosocomial é definida como a infecção que é adquirida após o internamento e, também, a alta hospitalar. Tem estreita relação com os procedimentos

médicos invasivos, tais como cirurgias, inserção de sondas e cateteres e acesso venoso (GARNER et al., 1988; PAIVA et al., 2016). Ademais, as internações prolongadas também aumentam o tempo de permanência dos pacientes na instituição, sendo responsáveis por grande parte da taxa de mortalidade nesse setor (GUIMARÃES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; GOMES et al., 2014).

Estima-se que aproximadamente 50% dos casos de infecções nosocomiais sejam oriundos da utilização de dispositivos médicos invasivos, sobretudo, ocasionados por espécies de *Candida* (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Além disso, a permanência hospitalar prolongada tem sido um dos principais fatores relacionados ao aparecimento maior de novos casos da doença fúngica, contribuindo com uma alta taxa de incidência, próximo de 10 casos para 100.000 habitantes (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014a). Sendo que estimativas conservadoras têm demostrado que a taxa de mortalidade da candidemia é de aproximadamente 60% (HIRANO et al., 2015).

2.3 GÊNERO *Candida*

A ampla maioria dos fungos, incluindo os filamentosos e leveduras, são seres sem motilidade (DESAI; MITCHELL, 2015). Dentre as leveduras, as espécies *Candida* estão inseridas no reino Fungi, subfilo Ascomycota, Família Saccharomycetaceae (GUARRO, GENE, STCHIGEL, 1999; BUTLER et al., 2010). O gênero é caracterizado pela existência de uma célula eucariótica, podendo apresentar reprodução por brotamento (anamorfo), dando origem a células ovoides e/ou esféricas, produção de hifa e pseudohifa, ou pela produção de ascos e ascosporos (Teleomorfo) e por exibir diferentes tonalidades de branco e bege (LACAZ et al., 2002; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; NEPPELENBROEK et al., 2013). Em situações específicas, podem exibir o fenômeno de dimorfismo invertido, quando em vida parasitaria podem desenvolver filamentos (FORCHE et al., 2003).

Originalmente, o epitepo *Candida* foi utilizado com o propósito de denominar o anamorfo das leveduras presentes no gênero *Candida* (BUTLER,

2010). Sendo que a mesma levedura pode apresentar um nome específico para o anamorfo e o teleomorfo, como ocorre em *C. guilliermondii* e *Meyerozyma guilliermondii* respectivamente (MÜHLHAUSEN; KOLLMAR, 2014). O gênero é formado por um grupo heterogêneo e composto por aproximadamente 850 espécies, sendo que, destas, apenas 20 já foram isoladas como agentes de micose (ALVARES et al., 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014a; MÜHLHAUSEN; KOLLMAR, 2014).

Em indivíduos sadios, espécies de *Candida* comumente fazem parte da microbiota autóctone, sobretudo na cavidade oral, sem causar danos ao hospedeiro. Podem colonizar, ainda, a epiderme, orofaringe, arvore brônquica, regiões de mucosa, trato gastrointestinal dentre outros. Por comporem naturalmente a microbiota do ser humano as infecções fúngicas sistêmicas ocasionadas por esses microrganismos são consideradas micoses oportunistas (SCHULZE; SONNENBORN, 2009). Uma característica interessante se refere a facilidade de ocorrência de candidíase muco cutânea em infantes, sendo talvez uma das primeiras manifestações clínicas a surgirem (CARVALHO et al., 2003; PAPPAS et al., 2003).

Porém, sob determinadas condições, essas espécies podem passar do estado comensal para o de patógeno e causar infecções localizadas e/ou generalizadas. Quando isso ocorre, origina uma condição denominada de candidíase que é uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida* que podem provocar sinais e sintomas bastantes distintos. Nesse âmbito, as infecções ocasionadas por espécies de *Candida* podem provocar lesões de caráter agudo, subagudo e/ou crônico, de localização superficial a profunda (BARDEDO; SGARBI, 2010).

Merece atenção especial a candidemia, que pode ser definida pela presença de cultura positiva do sangue para *Candida s*p. de um paciente que apresente estado febril, hipotensão ou outro sinal de choque séptico (KO et al., 2010). Nesses casos, a presença de apenas uma amostra positiva acompanhada de sinais e sintomas é suficiente para se confirmar a infecção (HACHEM et al., 2008).

Tradicionalmente, são consideradas duas vias de infecções por esses agentes: a de origem endógena e a exógena, que é por fontes diversas, tendo como foco o contato com profissionais de saúde e/ou materiais hospitalares contaminados (PFALLER; DIEKEMA, 2007; TRAGIANNIDIS et al., 2013). Sob certas condições, existe a possibilidade de ocorrência de surtos clínicos de candidíase, sendo esses episódios associados a contaminações dos dispositivos médicos e, também, de alimentos (KASAHARA et al., 2014) e de medicamentos (O'DAY, 1985; KUEHNERT et al., 1998; BONASSOLI et al., 2005).

As espécies do gênero *Candida* são responsáveis por quadros clínicos diversos e de severidade variável. De especial atenção, merece destaque a candidíase invasiva, representada principalmente pelos casos de candidemia e infecção disseminada (YAPAR et al., 2014). Segundo Colombo e Guimarães (2003), a candidíase hematogênica pode ser interpretada como um amplo espectro de quadros clínicos, englobando, assim, desde episódios restritos a corrente sanguínea (candidemia) até casos onde o fungo dissemina-se para diferentes sítios corpóreos do indivíduo, podendo evoluir o hospedeiro a óbito. Para esta infecção a taxa de incidência corresponde a aproximadamente 8 casos a cada 100.000 habitantes (GEGIÉ et al., 2013).

Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico e identificação, os casos de candidíase invasiva ainda constituem um desafio. Observa-se que em menos da metade dos casos os pacientes apresentam um quadro compatível com a infecção fúngica (MOREIRA, LOPES e CARVALHO, 2004; BASSETTI et al., 2010). Sendo que o aumento na incidência das infecções por espécies de *Candida* pode estar relacionada ao uso disseminado de antibióticos de amplo espectro e pelo aumento no número de indivíduos imunocomprometidos (NEPPELENBROEK et al., 2013).

O conhecimento da epidemiologia da micose é uma área de grande interesse, uma vez que o padrão de incidência e prevalência varia consideravelmente entre as diferentes zoas geográficas e por haver dados escassos sobre a epidemiologia da candidemia na américa latina (Da MATTA et al., 2017). Assim, dados a esse respeito possibilitaram compreender que a

grande maioria dos casos de candidíase frequentemente estão associados a episódios de infecção em UTIs, ocasionados na sua grande maioria por infecções de corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* (AIKAWA et al., 2016).

Em se tratando da frequência de isolamento nas UTIs, as leveduras do gênero *Candida* correspondem a aproximadamente 80% de todos os casos das infecções fúngicas identificadas e notificadas ao Centro de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Essa situação representa um grande desafio às equipes envolvidas no atendimento dos pacientes, sobretudo devido à dificuldade de diagnóstico clínico e terapêutico das infecções nosocomiais causadas por esses agentes fungicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MOLINA et al., 2012).

Em estudo conduzido por Da Matta (2017) foi observado que *C. albicans* continua sendo a espécie mais comum nos casos de candidemia na America Latina, seguido por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Contudo, foi notado uma tendência de aumento na frequência de candidemia por *C. glabrata* na Argentina, Colômbia e Brasil.

Estudos demonstraram que a epidemiologia da candidíase passou por mudanças nas últimas décadas, sobretudo com o surgimento de espécies emergentes (PASWAN et al., 2012; YAPAR et al., 2014). De acordo com o Programa Internacional de Vigilância epidemiológica SENTRY, ocorreram 634 casos de candidemia (1987-1988) em 34 centros hospitalares, sendo 54.3% dos casos ocasionados por *Candida albicans* (PFALLER et al., 2000). Dessa forma, conhecer a origem da infecção e o agente infeccioso envolvido podem contribuir de maneira significativa para a prevenção da propagação clonal de espécies emergentes multidroga resistentes e com a administração do tratamento apropriado (COLOMBO; GUIMARAES, 2003).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2002 a 2012, a candidíase invasiva apareceu como a principal causa de infecção fúngica, com uma média anual de 5,3 casos a cada 100.000 habitantes. Os pacientes geralmente apresentam uma hospitalização demorada, sendo que o custo médio de tratamento por paciente foi de aproximadamente 47 mil dólares (STROLLO et

al., 2017). Segundo fontes da European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), existe uma escassez de estudos epidemiológicos amplos. Baseado nisso, a EORTC realizou um estudo prospectivo entre os anos de 2005 a 2009, sendo relatados 333 casos de candidemia, com uma taxa de incidência de 0,23% (CORNELY et al., 2015).

As leveduras do gênero *Candida* ainda figuram como os agentes etiológicos mais frequentes de micoses (KIM; SUDBERY, 2011). Dentre as espécies formadoras do grupo, *Candida albicans* responde por aproximadamente 50% dos casos (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014a). Porém, outras espécies têm merecido destaque, como *C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. krusei, C. guilliermondii C. dubliniensis, C. kefyr, C. lusitaniae,* dentre outras, ocasionando infecções localizadas e sistêmicas (BARBEDO; SGARBI, 2010; NEPPELENBROEK et al., 2013; YAPAR et al., 2014).

Dentre as espécies, *Candida albicans ainda* é um dos principais agentes, sendo um fungo comensal que faz parte da microbiota de humanos, sobretudo em regiões de mucosas e no trato gastrointestinal. Essa levedura apresenta dimorfismo da fase de levedura para a filamentosa, sendo a hifa capaz de se aderir, invadir os tecidos do hospedeiro e causar doença (WALTIMO et al., 2003). Seus efeitos patogênicos também podem ser mediados por genes específicos da levedura, a exemplo de *HWP1* e *ALS1* (SANDAI et al., 2016), que podem conduzir a célula fúngica a invadir os tecidos do hospedeiro e alcançar a corrente sanguínea (TONG; TANG, 2017).

De Luca et al. (2012) observaram que *Candida albicans* (70%) foi a espécie mais frequente, seguida por *C. parapsilosis* (20%) e *C. guillermondii* (10%), acometendo pacientes com desordens hematológicas malignas. Tortorano et al. (2013) observaram uma taxa de incidência de candidemia de 19,8 % nos casos de tumores sólidos e de 8,3% em pacientes com neoplasias hematológicas, destacando-se a *Candida albicans* como principal agente. Diferentemente, em um estudo da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Cancer, foi notado que dos 249 casos de candidemia, *C. albicas* foi responsável por 70% dos casos quando os pacientes apresentavam

tumores sólidos e 36% em pacientes com neoplasias hematológicas (VISCOLI et al., 1999).

Em um estudo conduzido por Hirano et al. (2015), foi observado que dentre 65 isolados clínicos, *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente (36,8%), seguida por *C. parapsilosis* (30,2%), *C. guilliermondii* (21%), *C. glabrata* (5,2%), *C. tropicalis* (2,6%) e outras (3,9%). Os autores chegaram à conclusão de que a conduta terapêutica deve ser paralela a remoção do cateter, sobretudo em idosos.

Um notório caso foi relatado por Brothers et al. (2016) em um paciente portador de mieloma múltiplo. O paciente apresentava uma ferida hiperqueratotica e hiperpigmentada de difícil cicatrização. Inicialmente, uma das hipóteses diagnósticas foi de uma infecção fúngica. Todavia, os autores concluíram que a lesão era devido a presença de carcinoma de células escamosas que estava mimetizando uma infecção fúngica corroborada pelo isolamento de *C. parapsilosis*.

Tang et al. (2014), relataram a ocorrência de 242 episódios de candidemia em portadores de neoplasias, sendo contatado uma maior prevalência nos portadores de câncer de cabeça, gastrointestinal e de pulmão. Os autores observaram que a presença de cateter, exposição previa a antibioticos de amplo espectro e o uso de drogas imunossupressoras foram os principais fatores de risco na aquisição da infecção fúngica.

Miller e Mejicano (2001) relataram um caso incomum de osteomielite provocado por *C. albicans* e uma abrangente revisão sobre o tema. No mesmo sentido, Lashof et al. (2011), fizeram uma ampla revisão sobre endolfitalmite de origem fúngica. Segundo os autores a candidemia pode provocar um extenso quadro de endolfitalmite, podendo acometer desde a camada mais superficial da membrana do olho (coriorretinite), como uma lesão mais profunda do humor vítreo (endoftalmite).

Entretanto, atualmente as espécies de *Candida* não *albicans* tem prevalecido em portadores de neoplasias, sobretudo as hematológicas. Como principais causas dessa problemática, diferenças geográficas e, sobretudo, o

uso profilático disseminado de azólicos tem sido apontada (PUIG-ASENSIO et al., 2015).

Para Wang et al. (2015) a epidemiologia da candidiase pode ser considerado como um evento dinâmico. Segundo os autores, as infecções ocasionadas pelas espécies de *C. glabrata* e *C. Krusei* passaram a predominar, sobretudo, após a profilaxia de base consistir no tratamento com fluconazol. Por outro lado, foi notado que as espécies *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* predominaram com a adoção das equinocandinas para tratamento profilático.

Em um caso recente, Ceccarelli et al. (2016) descreveram um episódio de meningite fúngica provocada por *C. tropicalis* em um indivíduo imunocompetente. Os autores relatam que o uso de voriconazol é a primeira escolha no tratamento de infecções do SNC. Todavia, apesar do tratamento adequado com voriconazol, foi notado o ganho de resistência por esse patógeno.

Recentemente, Candida *auris* tem sido apontada como um importante patógeno emergente multidroga-resistente. Paralelamente, essa espécie frequentemente é identificada erroneamente como *Candida haemulonii*, *Candida famata* e/ou *Rhodotorula glutinis* pelos sistemas automatizados. Dados levam a crer que a prevalência dessa espécie é subestimada, sendo que as infecções ocasionadas por essa espécie apresentam uma alta taxa de mortalidade (KATHURIA et al., 2015; CALVO et al., 2016).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (2017) *C. auris* surge como sério problema global que pode provocar doença grave em indivíduos hospitalizados. Apesar de infecções terem sido relatados em diversas partes do mundo (Coreia do Sul, India, Africa do Sul, Kuwait, Colombia, Venezuela e Paquistão), estudos apontam que os isolados são distintos do ponto de vista molecular.

Candida kefyr é um fungo anamorfo, hemiascomiceto holotalico, que foi inicialmente descrito como *Candida pseudotropicalis*. Essa levedura tem merecido especial atenção como agente de infecções sistemicas e de mucosas,

sendo que os dados apontam que a infecção possui origem endogena, sobretudo do intestino (KHAN et al., 2015).

Uma condição clínica importante e frequente em pacientes hospitalizados se refere aos casos de infecções do trato urinário por *Candida*. Entretanto, se verifica uma escassez de dados epidemiológicos, principalmente em pacientes com neoplasias, e sua relação com o desenvolvimento da candidíase invasiva (GEORGIADOU et al., 2013). Tem se observado que a presença de candiduria pode não vir acompanhada de sinais e sintomas clínicos (NUCCI, 2000), sendo uma condição mais relevante clinicamente em pacientes que fazem uso de cateter vesical de demora e indivíduos imunocomprometidos (REZAI et al., 2017).

É notório a dificuldade de se diferenciar colonização de doença, uma vez que não existe uma abordagem que realize a distinção em ambos os casos (MALANI; KAUFFMAN, 2007). Entretanto, em pacientes críticos, os achados laboratoriais de candiduria devem ser considerados como um importante indicador de candidemia, sobretudo em pacientes de alto risco (REZAI et al., 2017). Além disso, a utilização de cateteres de demora e o uso indiscriminado de antibióticos podem estar intimamente relacionados com o aumento na incidência da candiduria (LUNDSTROM; SOBEL, 2001).

Devido a esses paradigmas, foi sugerido que há uma relação mais estreita no sentido de infecção quando a contagem urinaria de colônias ultrapassa valores de 1.000 UFC/mL e observado a ausência de sintomas (LUNDSTROM; SOBEL, 2001; NICOLLE, 2003). Todavia, em casos extremos como os relatos de pielonefrite fúngica de origem hematogênica pode resultar em contagens relativamente inferiores a esta (KAUFFMAN; VAZQUEZ; SOBEL, 2000).

Dentre os agentes fúngicos, *Candida albicans* (50-70%) tem sido a espécie mais comum, seguida de *C. glabrata* (20%), *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (ALVAREZ-LERMA et al., 2003; TALAAT et al., 2010). De acordo com Georgiadou et al (2013), de 136 casos de candiduria em pacientes com neoplasia hematológica, *C. glabrata* (37%) foi o agente mais frequente, acompanhada por *C. albicans* (29%) e *C. tropicalis* (25%).

Em uma abordagem mais ampla, Toner et al. (2016) verificaram que de 37.537 casos de infecção do trato urinário, 96 foram episódios de candidúria ocasionados por *C. albicans* (72%), *C. glabrata* (11,46%), *C. tropicalis* (6,25%) e *C. parapsilosis* (4,16%). Este cenário representa uma taxa de incidência de aproximadamente 2,6 casos por 1.000. Ainda, foi verificado que os indivíduos jovens masculinos e mulheres em uso de cateter foram mais susceptíveis a adquirirem uma candiduria.

2.4 LEVEDURAS PIGMENTADAS

As leveduras do gênero *Rhodotorula* pertencem ao filo Basidiomycota, ordem Sporidiobolales e família Incertae sedis. São caracterizadas pela produção do pigmento Betacaroteno que confere diferentes tonalidades de bege e vermelho. Elas estão amplamente distribuídas na natureza, e podem ser isoladas com certa facilidade do meio ambiente, de alimentos e da pele humana. São estudadas, principalmente, devido ao seu potencial biotecnológico na aplicação industrial (BISWAS et al., 2001; MALISORN; SUNTORNSUK, 2009).

Essas leveduras apresentam crescimento rápido (24-48h) e as colônias podem apresentar um aspecto liso e/ou mucoso. Ao exame micromorfologico, podem ser observadas células leveduriformes ovais e esféricas e, em alguns casos, apresentar cápsula. Adicionalmente, não são leveduras fermentadoras e possuem a capacidade de degradar a ureia, ação que é promovida pela produção da enzima urease (De HOOG et al., 2002; FELL et al., 2000).

O grupo é polifilético e é composto por aproximadamente 34 espécies (BISWAS et al., 2001). Destas, *Rhodotorula mucilaginosa* é a espécie mais prevalente como patógena de humanos, seguida por *R. glutines* e *Cystobasidium minutum*, que era conhecidoa anteriormente como *Rhodotorula minuta* (WIRTH; GOLDANI, 2012). Espécies de *Rhodotolula* são importantes patógenos emergentes que tem sido frequentemente isolada como agente de micose. Essas leveduras já foram relacionadas a casos de

endocardite, peritonite, meningite e onicomicose (LOSS et al., 2011; FORÉS et al., 2012).

A principal ferramenta de identificação de leveduras, em nível de espécie, consiste na análise dos dados barcoding da região LSU do rDNA. Entretanto, tem se observado que dentre os casos de infecção por *Cystobasidium*, apenas Zhou et al. (2014) fizeram uso dessa ferramenta de identificação molecular. Ademias, os métodos de identificação de espécies fenotípicas mostra-se demorada e laboriosa, sendo que geralmente não é empregada no diagnóstico de rotina, sendo necessário a identificação de espécies de *Cystobasidium* por ferramentas moleculares (KURTZMAN, 2011; ARENDRUP et al., 2014).

Em comparação com outras espécies de *Rhodotorula*, *C. minutum* é raramente relatado. Existem apenas dois casos documentados de disseminação hematogênica descritos para pacientes com vírus da imunodeficiência humana-HIV (LEIBOVITZ et al., 1991; GOLDANI et al., 1995). Os outros relatos foram restritos a pacientes com endoftalmite (GREGORY; HALLER, 1992; PINNA et al., 2001), osteoartrite (CUTRONA et al., 2002), tuberculose multifocal (THANOS et al., 2006), onicomicose (ZHOU et al., 2014) e dois casos em pacientes com câncer (LEIBOVITZ et al., 1991; CERIKCIOGLU et al., 2005).

Kiehn et al. (1992) relataram a ocorrência de 23 casos de sepse ocasionados por *Rhodotorula* associada a CVC em um centro oncológico dos Estados Unidos da América entre os anos de 1985-1989. Apesar da alta taxa de positividade para os cateteres, em apenas um paciente foi observado amostra positiva de sangue. Dentre os pacientes, treze receberam terapia antifúngica associada a remoção do cateter, cinco receberam terapia antifúngica sem a remoção do cateter e cinco pacientes foram submetidos a apenas a remoção do cateter.

Cerikcioglu et al. (2005) descreveram um caso acometendo uma paciente portadora de câncer de útero. A paciente veio a apresentar restrições de movimento acompanhada de episódios de dor e edema. O histórico revelou estado afebril que evoluiu para episódios de taquicardia, necessitando ser

submetida a uma cirurgia na articulação do quadril. Foram retirados 200mL de material purulento da lesão, sendo obtido em cultura um isolado de *R. minuta*. Após o diagnóstico, a paciente foi tratada com sucesso com fluconazol (400mg/dia) por 75 dias.

Em relação ao perfil de susceptibilidade, ainda há controvérsias quanto ao tratamento a ser utilizado para infecções por esses agentes aos antifúngicos disponíveis atualmente, uma vez que não há *breakpoints* preestabelecidos no CLSI (ZHOU et al., 2014). Dessa forma, testes de susceptibilidade antifúngica são indispensáveis para a vigilância clínica e conhecimento indispensável sobre a epidemiologia da levedura. Devido a esse cenário, o tratamento de escolha tem sido a utilização da anfotericina B, associada ou não a flucitosina (ARENDRUP et al., 2014; HSUEH et al., 2003).

Um fator que pode limitar o tratamento do doente reside em infecções associadas a cateter. Em contraste com a extensa literatura sobre infecções relacionadas ao cateter de *Candida*, pouca informação há a respeito de biofilmes de patógenos fúngicos emergentes, como espécies de *Rhodotorula*. Assim, esses dispositivos médicos podem ser responsáveis por uma porcentagem significativa de infecções humanas (LEIBOVITZ et al., 1991; GOLDANI et al., 1995). A formação de biofilme de células fúngicas em dispositivos médicos é, portanto, um importante fator de virulência e patogenicidade (ARENDRUP et al., 2014), que em casos de infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres, a remoção do dispositivo é extremamente recomendada (HSUEH et al., 2003).

2.5 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Os sinais e sintomas exibidos durante um episódio de candidemia são inespecíficos, representados, sobretudo, por episódios febril, leucocitose e hipertermia. Todavia, esses achados clínicos são inespecíficos e apenas uma parcela dos pacientes exibirão, em algum momento, algum desses sinais durante o percurso da doença (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O diagnóstico laboratorial micológico de infecções fúngicas constitui um desafio, sobretudo no tocante a detecção e identificação rápida e precisa do agente etiológico (HIGASHI et al., 2015). Nesse âmbito, algumas amostras biológicas podem ser consideradas representativas no diagnóstico dessas infecções como sangue, liquido cefalorraquidiano e sinovial, secreção de abscesso e fragmentos de tecidos (PATEL et al., 2005). Entretanto, estima-se que os resultados falso-negativos alcancem valores de 40 a 50%, impactando diretamente a conduta clínica esperada (OLAECHEA et al., 2004). Esses dados contribuem de maneira significativa no tocante a epidemiologia e conduta terapêutica adotada (HIGASHI et al., 2015).

Em se tratando da realização de hemocultura para fungos, apesar de baixa sensibilidade, ainda é a ferramenta mais empregada no diagnóstico de candidemias (KLASTERSKY; AOUN, 2004). Assim, quando ocorrem falhas no diagnóstico pode ocorrer disseminação e infecção generalizada, resultando em um quadro de sepse. Atrelado a esses fatores, existe a necessidade do prolongamento da terapêutica resultando em elevados custos hospitalares (TEIXEIRA-LOYOLA et al., 2013).

Na maioria das vezes, o diagnóstico laboratorial de micoses tem como base a demonstração do agente etiológico na amostra clínica e o posterior isolamento do agente etiológico. Entretanto, salvo raras exceções, a simples demonstração do fungo na amostra biológica é suficiente para o fechamento do caso, como ocorre no diagnóstico de algumas infecções fúngicas sistêmicas como: (i) a paracoccidioidomicose, com a demonstração de leveduras com brotações múltiplas, (ii) coccidioidomicose, pela presença de esférulas e (iii) histoplasmose, com a presença de leveduras intracelulares (PAUW et al., 2008).

O cenário atual das infecções por espécies de *Candida* suscitou a necessidade de métodos de identificação que fossem rápidos e precisos. Paralelamente, a gravidade da infecção decorrente da resistência antifúngica e demora no inicio da terapêutica adequada é uma preocupação crescente associada ao risco de morte (COSTA et al., 2010; LIN et al., 2018). Livério et al. (2017), estudando 29 isolados de *Candida* estocados na Coleção de Cultura

de Leveduras Patogénicas da USP, concluíram que nenhum teste fenotípico, isoladamente, foi capaz de diferenciar as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Essa situação torna-se mais preocupante, sobretudo, devido ao fato de que os métodos fenotípicos isoladamente podem não ser suficientes para diferenciação dos isolados fúngicos em nível de espécie.

2.6 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

Uma propriedade inerente a levedura em causar algum efeito patogênico está relacionada com os níveis de virulência da célula fúngica e a interação com os mecanismos de defesa hospedeiro. A patogenicidade do fungo é multifatorial e mediada, sobretudo, pela capacidade de invadir o hospedeiro e driblar as defesas imunológicas, de se aderir e formar biofilme patogenicos pelo agente etiológico e pelo dimorfismo da fase leveduriforme para a filamentosa (ROMANI, 2004; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; MAYER et al., 2013). Ainda, a patogenicidade do microrganismo pode ser atribuída a alterações nos níveis de virulência dos isolados e/ou falhas no mecanismo de defesa do hospedeiro. Deste modo, patogenicidade e virulência são entendidas como a capacidade de causar doença e driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro, respectivamente. Como principais fatores de virulência, podemos destacar a produção de tubo germinativo, dimorfismo fúngico, variação fenotípica, variação genotípica, capacidade de aderência promovida pelas adesinas e formação de biofilme, produção de toxinas e exoenzimas (SOLL et al., 2003; SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

Adesão

Um importante fator de patogenicidade do gênero *Candida* está relacionado a capacidade de adesão da célula fúngica as células do hospedeiro, dispositivos médicos e superfícies inertes, a exemplo de células epiteliais bucais e da vagina, cateteres venosos, válvulas orgânicas (TRONCHIN et al. 1989; LIMA-NETO et al., 2010; MAYER et al. 2013;

WILLAERT, 2018). Para tanto, a parede celular desempenha um importante papel na adesão conferida pela presença de mananas, glucanas, sacarinas e adesinas (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998).

É notório como a levedura encontra condições propicias para se aderir as estruturas do hospedeiro, como condições ótimas de pH, temperatura, liberação de fluidos biológicos nas superfícies corpóreas deficiências imunológicas (HABASH et al., 1999; AGUIRRE et al., 1996; MOLINA et al., 2012; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014). Assim, essa etapa de colonização representa uma etapa crucial no estabelecimento e manutenção do processo infeccioso, podendo ocasionar ainda invasão tecidual e formação de biofilme (MAYER et al. 2013; WILLAERT, 2018).

Biofilme fúngico

Fatores intrínsecos a levedura são fatores chaves do potencial patogênico do microrganismo e gravidade da micose (YU et al., 2017). Dados recentes mostram que 65-80% das infecções microbianas em humanos são resultantes de biofilmes patogênicos. Apesar de o biofilme formado por espécies de *Candida* ser um dos principais fatores de virulência, ele ainda não é totalmente compreendido. Ademais, o tratamento destas infecções torna-se mais complexo devido à formação deste biofilme, que conduz a resistência a uma ampla variedade de agentes antifúngicos (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; SARDI et al., 2013; BORGHI; BORGO; MORACE, 2016).

Os biofilmes apresentam afinidade por superfícies bióticas e inertes e podem ser constituição primaria mono ou polimicrobiana, exibindo um alto nível estrutural de organização. É importante frisar, também, que os biofilmes mono-microbianos são formas incomuns na natureza, sendo natural a existência de uma comunidade plural de células vivendo em associação (DAVEY; O'TOLLE, 2000). Vários fatores têm sido elucidados quando aos mecanismos de formação do biofilme. Sabe-se que a célula fúngica utiliza-se de uma maquinaria celular refinada, conhecido por *quorum sensing* (QS), para

o controle da morfogênese, formação do biofilme e disseminação dessa estrutura complexa (KRUPPA 2008).

O biofilme apresenta uma interface bastante complexa, sendo que durante sua formação algumas etapas são tidas como fundamentais. Sendo assim, em um primeiro momento, é fundamental que a célula-mãe do biofilme possa se aderir a superfície livre. Essa célula apresenta diversos mecanismos auxiliares para que ocorra a adesão, como adesinas e interações eletrostáticas não especificas. Curiosamente, esse primeiro contato pode ser perdido e a célula aderida ser liberada. Após esse momento, a célula passará a liberar substancias mantedoras da adesão e início da formação de micro colônias que irão coalescer. Em seguida, tem-se o biofilme que apresenta uma arquitetura complexa formada por estruturas do fungo, matriz polimérica, poros e canais de água que permitem o fluxo de nutrientes e metabólitos. O último estágio do biofilme consiste no deslocamento e liberação de estruturas do biofilme, como células de leveduras, que pode ocorrer em condições desfavoráveis. Essas células livres são altamente especializadas e capazes de originar um novo biofilme (CHANDRA et al. 2001; MONROE, 2007).

Biofilmes patogênicos (BP) formados por espécies de *Candida*, em especial *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. tropicalis*, constituem um sério risco a vida do paciente. Nesse âmbito, foi observado que a composição dos dispositivos favorece a capacidade de se aderir e formar BP pela mediação das adesinas do fungo (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Biofilmes de espécies de *Candida* tem origem na adesão da superfície pelo fungo, dando origem ao crescimento e formação de uma complexa rede formada por elementos fúngicos e matrix extracelular (Figura 1). Biofilmes são capazes de evadir da resposta imunológica do hospedeiro e contra agentes antifúngicos (NEGRI et al., 2012). Esses dispositivos são um agravante a saúde do indivíduo, uma vez que podem influenciar a manutenção do processo infeccioso. Como exemplo, tem-se os casos de candidemia relacionados com a presença de cateter e confirmada pelo isolamento do agente etiológico (VISCOLI et al., 1999). Os casos de candidemia quando associados a presença de cateter de demora são uma situação preocupante. Diante dessa

problemática é sugerido que o cateter infectado seja removido e substituído por um novo dispositivo. Esse processo possui um elevado custo, prolonga o período de hospitalização e, em alguns casos, pode representar um risco a saúde do paciente (KO et al., 2010). Contudo, em situações específicas, a simples remoção do cateter aliada ao bom estado imunológico do paciente pode conduzir a cura clínica (INÁCIO et al., 2019).

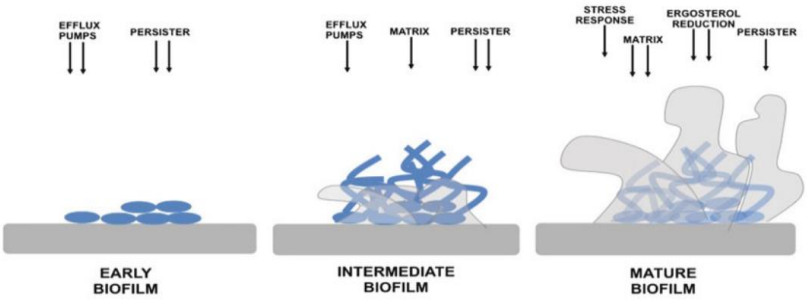
Fatores como a modulação da resposta imunológica e a capacidade de sobreviver dentro das células de defesa do organismo, a exemplo dos fagócitos, são importantes na sobrevida do agente infeccioso (CHAFFIN et al., 1998; JONG et al., 2001).

Chandra et al. (2001), ao analisar a interação de leucócitos com biofilmes formados, notaram a existência de uma resposta imunológica variada das células da linhagem mononuclear do sangue, com a produção de altos níveis das interleucinas IL-1β, IL-10 e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1). Um fato curioso constatado foi que houve efeito sinérgico na formação do biofilme ocorrido pela migração das células mononucleares do sangue, sem a ocorrência do fenômeno de fagocitose e/ou morte das células do biofilme, acarretando a sua proliferação e aumento da espessura.

Uma possível explicação para o fenômeno acima descrito pode ser fundamentada no não reconhecimento das células de levedura que compõe o biofilme. Paralelamente, a resposta humoral se mostra ineficaz, uma vez que as interações ligantes das citocinas não possuem qualquer influência na ativação de polimorfos nucleares (PMN) (KATRAGKOU et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que a célula fúngica pode ser capar de promover a regulação de genes relacionados com a adaptação oxcidativa, sobretudo a ação promovida pelo óxido nítrico (HROMATKA et al., 2005). O sequestro de ferro também assume uma importância vital para o sucesso da infecção promovida pela levedura, uma vez que essa é capaz de sequestrar ferro da transferrina (CHAFFIN et al., 1998). Além do biofilme, outros fatores têm se mostrado cruciais no escape da célula fúngica, como a expressão de genes de virulência.

Figura 1: Desenho esquemático demonstrando as etapas de formação do biofilme de *Candida* e mecanismos de resistência.



Fonte: BORGHI; BORGO; MORACE, 2016

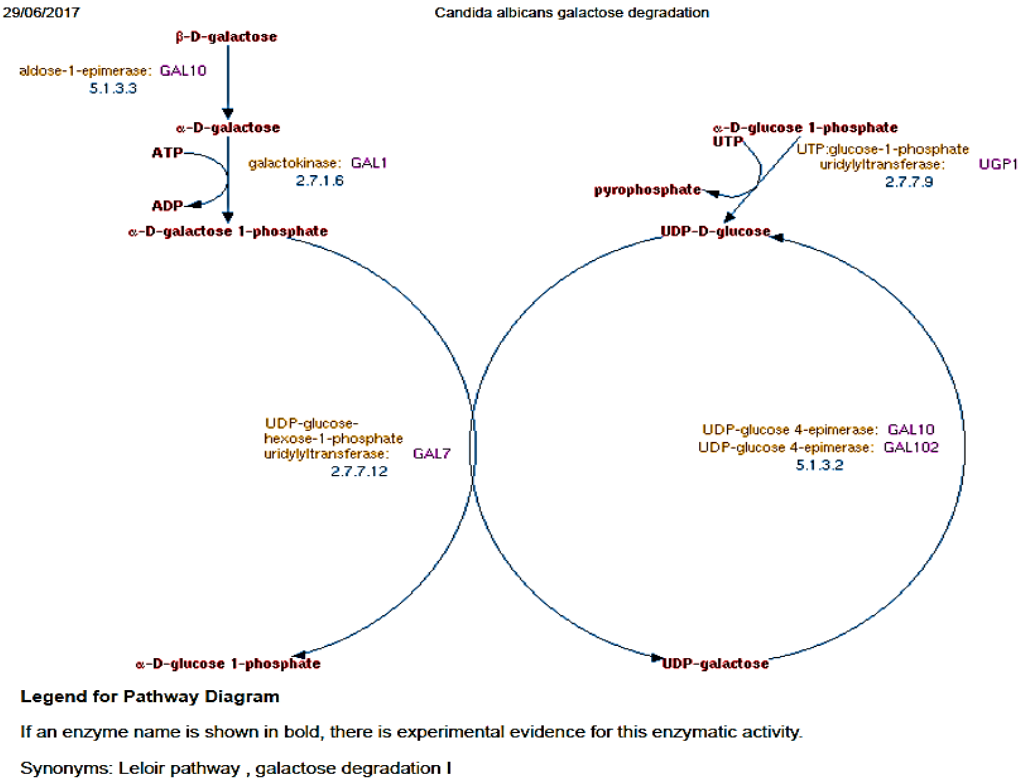
Genes de GAL

Apesar de os fatores de virulência serem modulados geneticamente, sabe-se que a sua expressão está condicionada a variantes ambientais e intrínsecos do microrganismo, como o teor nutricional, disponibilidade de oxigênio e temperatura ótima a que o fungo está exposto (LACAZ et al., 2002).

Os genes envolvidos no metabolismo da galactose (Galactoquinase, galactose-1-fosfato uridil transferase e UDP-glicose-4-epimerase) são bastante conservados, sendo que em *C. albicans* estão localizados no cromossomo 1. Nessa espécie, a galactose é metabolizada (via de Leloir) por meio das enzimas GAL, onde há a conversão da beta-D-galactose em alpha-D-glucose-1-phosphato. Entretanto, em *C. albicas* a enzima *GAL102* é responsável por converte o carboidrato alpha-D-glucose-1-phosphate em UDP-galactose, na ausência da galactose, como demonstrado na Figura 2 (*Candida* GENOME DATABASE, 2017). Uma explicação para esse fenômeno pode estar relacionada com a capacidade de expressão do gene *GAL10* através de fatores transcricionais, como o composto N-acetilglucosamina (*GlcNAc*) que também é responsável pela ativação de genes regulados pela galactose envolvidos na indução da fase micelial, como *GAL1* e *GAL7*. O componete *GlcNAc* atua diretamente na sinalização de AMP cíclico (cAMP) podendo

desencadear a formação de hifas e, modular a indução de genes necessários para catabolizar o GlcNAc (GUNASEKERA et al., 2010).

Figura 2: Via de Leloir



Fonte: *Candida* GENOME DATABASE, 2017

Ao que tudo indica, o gene *GAL10* tem um papel fundamental em *Candida*, a sendo que região putativa homóloga UDP-glucose 4-epimerase já foi descrita em *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. orthopsilosis* (NCBI, 2019).

Em modelo experimental de candidíase sistêmica, foi demonstrado que o silenciamento do gene *GAL102* resultou em uma maior sensibilidade às drogas antifúngicas e a agentes desestabilizadores da parede celular. Os biofilmes mutantes formados também se mostraram menos compactos. A análise das mananas da parede celular de isolados de *C. albicans* privados do gene *GAL102* revelou que um dos principais constituintes da manana está ausente e o componente fosfomanana conhecido por seu papel na virulência

está notavelmente reduzido. Evidenciou-se, assim, que a arquitetura, composição da parede celular e a virulência de *C. albicans* é alterada pela presença de mananas, que corresponde a 3% do peso seco do material polimérico extra-celular do biofilme (SEN et al., 2011).

As enzimas *GAL10* fazem parte do grupo de proteínas denominadas de família de cadeia curta deidratase/redutase (JORNVALL et al., 1995). Essas proteínas apresentam como característica principal a presença de um cofator rico em glicina ligado a porção motif N-terminal ao catalizador motif YXXXK (LI et al, 2006).

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida para análise ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CCS/UFPE e da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, tendo início apenas mediante sua aprovação. Esta pesquisa não trouxe riscos diretos ao paciente, sendo estes minimizados através da informação ao paciente sobre os objetivos do estudo e através de realização de procedimentos para obtenção das amostras por profissionais habilitados. Os indivíduos envolvidos direta e/ou indiretamente na pesquisa além de serem beneficiadas diretamente com o diagnóstico, também forneceram subsídios para obtenção de conhecimentos maiores sobre infecções fúngicas. Adicionalmente, foi assegurado aos centros participantes da pesquisa de que não teriam nenhum tipo de despesa material ou financeira durante o desenvolvimento da pesquisa. Os preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CONEP) e na declaração de Helsinki foram respeitados, constando as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa constam no TCLE.

Desenho do estudo

Este é um estudo observacional do tipo descritivo, que incluiu casos de micoses em pacientes portadores de neoplasias malignas atendidos no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017.

3.2 LOCAL DE COLETA

As coletas foram realizadas em pacientes portadores de neoplasias atendidos no Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas-HC/UFPE e no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP). Foram realizadas coletas de amostras biológicas a critério médico em pacientes com suspeita de infecção

fúngica. Paralelamente, foram colhidas informações clínicas a partir dos prontuários dos pacientes no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017.

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras clinicas (à critério médico) foram obtidas de pacientes com quadros oncológicos e que apresentaram hipótese diagnóstica de micoses. As amostras biológicas foram processadas para realização do diagnóstico laboratorial micológico, compreendendo a realização de exame microscópico e cultura. Este procedimento foi realizado no laboratório de Micologia Médica de Departamento de Micologia da UFPE.

Foram coletadas informações clínicas e biodemográficas a partir dos prontuários dos pacientes, sendo incluídos no estudo todos os pacientes portadores de quadros oncológicos com diagnóstico de infecção fúngica. Os dados foram coletados em fichas próprias discriminando o gênero, idade, histórico de tratamento antifúngico e mês e ano da coleta das amostras biológicas.

3.4 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico micológico foi realizado através da preparação de lâmina, quando possível, para evidenciação de estruturas fúngicas em parasitismo. Desta forma, as amostras foram preparadas a fresco. Concomitantemente, as amostras foram semeadas em meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de cloranfenicol (50mg/L), e mantidas à temperatura de 28 e 37ºC por um período de até 15 dias. Após a obtenção do agente etiológico, este foi purificado e identificado através de taxonomia clássica e molecular.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURA

Identificação presuntiva através do CHROMOAgar *Candida*

Os isolados foram repicados em SDA e incubados a 37°C por 24h. Em seguida, foi realizado um novo repique no meio seletivo/diferencial CHROMagar Candida® (Probac do Brasil, Brasil) e as placas incubadas a 37° por até 48h. As leveduras foram identificadas presuntivamente por meio da coloração e aspecto da cultura (e.g. verde: *C. albicans*; azul: *C. tropicalis*; rosa rugora: *C. krusei*; rosa lisa: *C. parapsilosis* e lilás: *C. glabrata*) (ARAÚJO et al., 2005).

Identificação clássica

As leveduras foram identificadas por meio da fenotipagem clássica baseada nas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas dos agentes etiológicos (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; De HOOG; GUARRO, 2000; DEVADAS et al., 2017).

Morfologia das células de leveduras crescidas em meio de cultura

Os aspectos morfologicos das células de levedura foram avaliadas pelo crescimento em meio sólido. Os isolados foram repicados em meio ágar Sabouraud e incubadas por 48h a 30ºC. Após o crescimento, foram confeccionadas lâminas contendo o corante azul de Aman (*Lactophenol blue*), sendo verificado os aspectos morfológicos das células de levedura (e.g. esféricas, elipsoidal, ovóide, cilíndrica) e os aspectos da cultura (LACAZ et al., 2002).

Capacidade de hidrólise da Uréia

Culturas com até 48h de crescimento foram semeadas em ágar Uréia Christensen e incubadas a 30°C por até três dias. Os tubos foram examinados a fim de verificar a mudança na alcalinidade do meio conferida pela mudança de

cor do amarelo para o vermelho, sendo este indicador da produção da enzima uréase (LACAZ et al., 2002).

Assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio

O teste para aferir a capacidade de assimilação de fontes de nitrogênio para os isolados de levedura foi realizado segundo Devadas e colaboradores (2017). Inicialmente, foi preparado 18mL de meio basal (6,75% de *Yeast Nitrogen Base* [YNB] e agar a 2%) em tubos de ensaio e 2mL de solução do carboidrato a 10%. Em seguida, a solução dos carboidratos foi dispensada separadamente no tubo de ensaio e o meio autoclavado. Após a esterilização, o meio basal contendo os açúcares foi dispensado separadamente em placas de Petri e o meio deixado em repouso até a solidificação.

Os isolados de levedura foram repicados e incubados por 24h a 37°C sendo, em seguida, preparado suspensões das células de levedura, ajustadas a 0,5 na escala de MacFarland, em tampão PBS. Em seguida, 10µL de cada suspenção de células de leveduras foram dispensados em pontos equidistantes nas placas de *Petri* contendo as fontes de carbono. As placas foram incubadas a 37°C por 48h, sendo a leitura do teste realizada pelo padrão de crescimento dos isolados no meio basal contendo os carboidratos e a fonte de nitrogênio. Como controle negativo do teste, foi utilizado meio basal isento de carboidratos e de fonte de nitrogênio. A capacidade de assimilação foi interpretada como positiva quando houve crescimento e negativa pela ausência de crescimento (Inóculo translúcido e/ou opalescente).

Zimograma

O teste para análise da capacidade de fermentação de fontes de carbono foi realizado em tubos de vidro (150mm x 12mm), contendo em seu interior tubos de Durham invertidos (50mm x 6mm). A cada tubo de ensaio foram adicionados 10mL de solução basal contendo extrato de malte (0,5%), fonte de carbono a ser testada (4%) e 100µL da suspensão de cada isolado de levedura,

com a referida suspensão ajustada a 0,5% na escala de MacFarland. Os tubos foram incubados a 30°C por até 10 dias. O teste foi acompanhado diariamente, sendo verificado os indícios de fermentação pela levedura (Formação de gás no interior dos tubos de Durham).

Identificação molecular

Para confirmação taxonômica, o DNA dos isolados foi extraído segundo Inácio et al. (2016). A massa celular foi obtida de culturas crescidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (40g/L de glicose, 18g/L de agar e 10g/L de peptona) a 37°C por 24h. Após esse período, a massa celular foi transferida para tubos de extração contendo pérolas de vidro e 500µL do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,5M, 100mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA e polivinilpirrolidona 1%). As células foram previamente congeladas a -20°C por 24h para vitrificação da parede celular. A parede celular da levedura foi rompida por agitação (5,5 m/s por 60s) em aparelho FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) e incubadas a 65°C for 10min. Em seguida, o lisado celular foi tratado com mesmo volume de solução de Clorofórmio álcool-isoamilico (24:1) e o material centrifugado a 13000g por 10min. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, sendo então adicionada mesma proporção de isopropanol gelado para precipitação do DNA a -20°C por até 30min. Após esse período, a amostra foi centrifugada (13000g por 10min), sendo o pellet de DNA lavado com etanol 70% e seco a 37°C em estufa. Ao final do processo, o DNA foi ressuspendido em 50µl de água MiliQ e mantido a 4°C até o momento das análises.

Para identificação das espécies foram realizadas reações de PCR convencional utilizado os seguintes primers espécie-específico: *Candida albicans* (CA, 5'- TCAACTTGTCACAGATTATT-3'), *C. tropicalis*, (CT, 5'-AAGAATTTAACGTGGAAACTTA-3'), *C. krusei* (CK, 5'-GATTTAGTACTACACTGCGTC A-3'), *C. glabrata* (CGLA, 5'-CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') como complemento reverso (WHITE et al., 1990; LI et al., 2003). Ainda,

foram utilizados primers para as espécies do complexo *Candida parapsilosis*, como: *C. parapsilosis* (CPAF, 5' – TTTGCTTTGGTAGGCCTTCTA - 3'; CPAR, 5' – GAGGTCGAATTTGGAAGAAGT - 3'), *C. ortopsilosis* (CORF, 5' – TTTGGTGGCCCACGGCCT - 3'; CORR, 5' – TGAGGTCGAATTTGGAAGAATT - 3') e *C. metapsilosis* (CMEF, 5' – TTTGGTGGGCCCACGGCT - 3'; CMER 5' – GAGGTCGAATTTGGAAGAATGT - 3') (ASADZADEH et al., 2009).

Para os isolados de levedura que não possuem primers espécie-específico correspondente, foi adotado o sequenciamento parcial do domínio D1/D2 da região LSU (28S) do rDNA utilizando os primers NL1 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3') (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Todas as reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 12,5 µL contendo 7,45µL de ddH2O, 1µL de cada primer (5 pmol), 1,25 µL do tampão da PCR, 0,5 µL de MgCl2 (50mM), 0,25 µL de dNTP (10mM), 0,05 µL de Taq DNA polymerase 5U (Invitrogen, Brasil) e 1µL de DNA molde.

Os parâmetros utilizados nas reações de PCR consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, realizada em 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão a 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 10 min. Ao fim do processo, as amostras foram montadas em parafilme (5µL do produto da PCR, 2µL GLB e 2 µL GelRed) e submetidas a eletroforese (100v por 20min) em gel de agarose a 1%, para quantificação dos produtos da PCR. Os produtos da PCR foram purificados por meio do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK) e os fragmentos de DNA genômico sequenciados na Plataforma de sequenciamento-LABCEN/CCB (UFPE) segundo protocolos preestabelecidos utilizados pelo laboratório parceiro.

As sequências consenso foram obtidas por meio do programa Sequencher 4.7, sendo as sequências de nucleotídeos submetidas a ferramenta BLAST do *GenBank* (*National Center of Biotechnology Information*, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para busca por sequencias similares. As sequencias obtidas nesse estudo foram alinhadas com as sequencias de

confiança depositadas no banco de dados e analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA7.

3.6 AVALIAÇÃO QUANTO À CAPACIDADE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

3.6.1 Teste de aderência às células epiteliais

Os ensaios de aderência foram baseados nos trabalhos de Kimura e Pearsall (1978), Sobel et al. (1981) e Kearns et al. (1983). As células epiteliais foram coletadas da cavidade bucal de doador jovem, clinicamente saudável. As suspensões celulares foram mantidas a baixa temperatura (4°C) em tampão fosfato (PBS), até o momento das análises.

Células epiteliais foram obtidas por meio de uma breve debridação da mucosa oral com auxílio de *swab* e, em seguida, as células foram transferidas para tampão PBS. As células foram lavadas três vezes com o mesmo tampão (2.000rpm por 5 minutos) e ressuspendidas a uma concentração final de 4 x 10^4cels/mL.

As leveduras foram semeadas em meio ágar Sabouraud suplementado com 0,5% extrato de levedura e mantidos a temperatura de 37ºC por 24h. Em seguida, foram preparadas suspensões de células de leveduras (0,5 na escala de McFarland) em tampão PBS, sendo então lavadas três vezes com o mesmo tampão (2.000 rpm por 10 minutos) e ressuspendidas a uma concentração final de 2 x 10^7 cels/mL. Após a lavagem das células de leveduras e das células epiteliais, estas foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações em função das lavagens.

Após estas etapas, as suspensões das culturas de leveduras (100µL) e das células epiteliais (100µL) foram misturadas e mantidas sob agitação durante duas horas. Após esse período, foram preparadas lâminas, coradas com azul de Amam, e realizada a microscopia ótica para avaliação da aderência das leveduras as células epiteliais. Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos onde foram avaliadas 100 células epiteliais com

relação à percentagem de sua área superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência (F) para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência (f) para adesão até 49% e sem aderência visível (0). As análises foram realizadas em triplicata para cada isolado.

3.6.2 Capacidade de formação de biofilme

O método para se avaliar a capacidade de formação do biofilme foi adaptado de Pfaller et al. (1995) e Ruiz et al (2013). As leveduras foram cultivadas em Sabouraud dextrose agar por 24h a 37°C. Após o crescimento das culturas, foram preparadas suspensões de células de levedura em 5mL de RPMI-Hepes 1640 e a turbidez ajustada a 0,5% na escala de MacFarland usando espectrofotômetro (Thermo Scientific, USA). Em seguida, 100µL de cada suspenção foi inoculada, em triplicata, em poços de placas de poliestireno de 96 poços e incubadas a 37°C por 1,5h sob rotação (75rpm). Ao fim do período, as células não aderidas as placas foram removidas através de lavagens com tampão PBS. Posteriormente, foi adicionado 200µL de RPMI-Hepes 1640 aos poços e as placas incubadas por 24 e 48h.

A atividade metabólica do biofilme foi determinada com o reagente MTT (SITTAMPALAM et al., 2004). Dessa forma, as placas contendo os biofilmes foram inoculados com 20µL do MTT-PBS, ao abrigo da luz, e incubadas por 2h a 37°C. Em seguida, o líquido presente no interior dos poços foi desprezado e adicionado 200µL de isopropanol absoluto, sendo a placa mantida em repouso por 15min. Em seguida, foram transferidos 100 µL de cada micropoço para uma nova microplaca sendo a atividade formadora de biofilme avaliada pela diferença de densidade óptica entre o biofilme formado e o poço controle, pela leitura em leitor de Elisa ajustado com comprimento de onda de 570nm.

Os ensaios para cada isolado foram realizados em triplicata, e os dados obtidos foram tratados estatisticamente por meio do programa Prism GraphPad 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Ademais, os dados foram avaliados através de análise de variância por meio da ANOVA e teste de Tukey com nível de significância $P<0,05$.

Os biofilmes foram classificados como baixa, moderada e forte atividade metabólica (BAM<0,097, MAM=0,097–0,2 e AAM>0,2) segundo Marcos-Zambrano et al., 2014b.

3.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *GAL102*

3.7.1 Detecção do gene *GAL102*

Desenho dos primers:

Foram desenhados os *primers* para os ensaios de detecção e expressão do gene *GAL102*. Para tanto, sequencias do gene de interesse de *C. albicans* (Ca22chr1A_*C_albicans*_SC5314 e *C_albicans*_SC5314_actin_ACT1) foi baixada do banco de dados do *Candida Genome Database* (http://www.candidagenome.org/). Os primers foram desenhados por meio da ferramenta *Primer-BLAST* do NCBI, utilizando os seguintes parâmetros: Tamanho dos produtos da PCR, quantidade de *primers* de interesse, temperatura de anelamento do *primer* e microrganismo alvo.

Foram realizadas buscas no banco de dados do BLASTn-NCBI para garantir a especificidade do *primer* obtido com o gene alvo do genoma de *Candida albicans*, garantindo assim que são únicos. Foram realizadas reações de PCR e qPCR para testar a eficiência dos *primers* de detecção e expressão genica, respectivamente (Tabela 1).

Ensaios de detecção do gene *GAL102*

Os isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo o meio Sabouraud Dextrose Ágar e mantidos a 37°C por 24 horas. O DNA foi extraído segundo o método proposto por Inácio et al. (2016). O DNA foi quantificado através da eletroforese em gel de agarose utilizando marcadores de peso molecular λ. O DNA após extraído foi armazenado a -20ºC até o momento das análises (SAMBROOK et al., 2001; MASSIRER et al., 2004).

Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers* desenvolvidos por Řičicová et al. (2010) e Sen et al. (2011). Além disso,

prmers adicionais foram desenhados por meio da plataforma primer-BLAST do *National Center for Biotechnology Information*-NCBI da *U.S.E National Library of Medicine*, utilizando sequências de referência (NCBI, 2019), como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Relação dos *Primers* do estudo.

Primer	**Sequência**	Autor
ACT1	F: 5'-CTCTTCTGGTAGAACCACCGGTAT-3'	Ricova et al., 2010
	R: 5'-TAAAGAGAAACCAGCGTAAATTGGA-3'	
Caput Gal10	F: 5'-GGGATCCCAACTTGACCTTAAAGG-3'	Sen et al., 2011
	R: 5'-CAGTTCATGGCAAGGGAACC-3'	
ACT1	F: 5'-GGTGATGAAGCCCAATCCAA-3'	Inácio, C.P. 2019
	R: 5'-TGGAGCTTCGGTCAACAAAA-3'	
$Gl102_{(3)}$	F: 5'-AAGTGCACCTTAATAAACGGGA-3'	
	R: 5'-CAGTTCATGGCAAGGGAACC-3'	
$Gl102_{(5)}$	F: 5'-CAGCCATTGATAGCTTGTTGTTG-3'	
	R: 5'-ACAACTGCTTGACTCTCCCA-3'	
$Gl102_{(9)}$	F: 5′- AACTTGCATGGTGGTGCAAA-3′	
	R: 5'-GGTGCACTTTTGATCGTTAGTT-3'	
RT qPCR $Gl102_{(1)}$	F: 5'-GTTTCTGCGTGGAACCAAGT-3'	
	R: 5'-GCTATCAATGGCTGTTCATATGTT-3'	
RT qPCR $Gl102_{(3)}$	F: 5'-ATGTGGTTTCTGCGTGGAAC-3'	
	R: 5'-GCTATCAATGGCTGTTCATATGTTA-3'	
RT qPCR $Gl102_{(5)}$	F: 5'-AGTGCACCTTAATAAACGGGA-3'	
	R: 5'-AGCTGACAATTTACTTAGACCTGG-3'	
RT qPCR $Gl102_{(7)}$	F: 5'-AAGTGCACCTTAATAAACGGGA-3'	
	R: 5'-AGACCTGGTACAAGTTCATTTTGA-3'	

Foram utilizados os seguintes componentes nas reações de PCR, com volume final de 12,5 µL: tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), $MgCl_2$, 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, iniciadores 0,5 µM cada, Taq DNA polimerase 0,04 U/µL (Invitrogen Life Technologies) e 20 ng de DNA. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94ºC por 4 minutos (1 ciclo), 94ºC por 30 segundos, 52ºC por 1 minuto, 72ºC por 2 minutos (35 ciclos) e extensão final a 72ºC por 5 minutos (1 ciclo).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), a 3 V/cm de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TAE (pH 8,0), sendo utilizando o marcador de peso molecular 1KB-Plus DNA lader. O gel foi visualizado em transluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

De cada espécie de *Candida* isolada, a cepa que apresentou os maiores resultados, quanto à virulência, dentre os parâmetros avaliados (aderência e formação de biofilme) e presença do gene *GAL102* foi selecionada para a análise da expressão.

3.7.2 Extração e quantificação do RNA

A extração do RNA das células do biofilme foi realizada segundo o método do H*ot Acidic Fenol*, segundo Ausubel et al. (2000). Os ensaios de formação de biofilme foram realizados em placas de poliestireno de 6 poços, sendo analisados os tempos de 1,5h, 24h e 48h. Foram utilizados 3 isolados de *Candida albicans*. Após a lavagem do biofilme com tampão PBS, em água DEPC, a matrix do biofilme formado foi removida com auxílio de *Cell Scraper* ressuspendida em tampão PBS H_2O-DEPC e transferida para tubos eppendorf de 1,5mL.

A matriz do biofilme foi concentrada por centrifugação (15.000g por 3min) a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o pellet formado foi congelado a -80°C por 30min (a amostra pode ser mantida indefinidamente nessas condições) e ressuspendido em 200µL de tampão de extração (0,5% de SDS, 10mM de Tris-Cl, pH 7.5 e 10mM de EDTA). A cada amostra foi adicionado 200 µL de fenol ácido (pH 5), sendo a suspensão vortezada por 10s e incubada a 65°C por 30min (Vortezar brevemente a cada 10min).

Ao fim do período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo por 5min e centrifugadas a 10.000g, por igual período, a 4°C. Na etapa seguinte, foi possível visualizar três fases, consistindo da fase inferior, formada por detritos, uma intermediária contendo DNA e a porção superior, contendo o RNA. Esta última fase foi transferida para tubos eppendorf limpos, sendo adicionado mesma proporção de fenol ácido e a amostra vortezada e centrifugada a 10.000g por 5min a 4°C. Novamente, foi recuperado a fase aquosa superior para tubos limpos e adicionado igual proporção de clorofórmio, sendo então a amostra vortezada e centrifugada a 10.000g por 5min a 4°C.

Ao fim do processo, a fase aquosa superior foi transferida (~ 100 µL) para tubos de 600µL, sendo adicionado 20µL de acetato de sódio, pH 6, e 480 µL de etanol absoluto a -20°C para precipitação do RNA. Os tubos foram centrifugados a 10.000g por 10min a 4°C e o pellet formado foi lavado com etanol 70% a -20°C. Por último, as amostras foram centrifugadas (10.000g por 5min a 4°C), sendo o etanol desprezado e o pellet seco por 10min a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em H_2O-DEPC e eluido a 65°C por 10min. Em seguida, a integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (1%) desnaturante (Hipoclorito de sódio a 2%) com tampão TBE 1X (Tris base 0,089M, Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M pH 8,0) utilizando o marcador 1kbPlus DNA ladder.

Após a extração, o RNA foi tratado com DNAse I (Invitrogen, Foster City, California, USA), segundo recomendações do fabricante, para eliminar resquícios de DNA na amostra. Ademais, a qualidade e a quantificação do RNA total extraído foi aferido a partir dos índices de absorbância das amostras (A_{260}/A_{280}), através de espectrofotometria em NanoDrop (Thermo Scientific). O RNA foi então mantido a -80°C até o momento das análises.

3.7.3 RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A produção do cDNA, a partir do RNA total, foi realizada através do kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (PROMEGA-Madison, Wisconsin, USA) segundo recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi conservado à – 80°C, até a realização da qPCR. Os cDNAs do gene *GAL102* com o gene constitutivo *ACT1*, foram amplificados através do sistema de amplificação *SYBR™ Green PCR Master Mix*, no aparelho ABI 7500 fast (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), em volumes finais de 12 µL, sendo os testes realizados em triplicata. Para a amplificação do cDNA, o processo seguiu com um ciclo inicial de 2 min a 95ºC, e 30 ciclos de 95ºC por 1min, 57ºC por 1 min e 72°C por 1min. A análise dos dados foi realizada pelo programa *7500 Software* v 2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA). Os parâmetros fornecidos nos ciclos C*ycle threshold* (Ct) e as curvas de

melting foram utilizadas para validação do primer e do experimento. Adicionalmente, a determinação da eficiência do primer foi aferida através da fórmula: E=Ctf/Cti x 100, sendo considerados valores ≥90%.

A expressão do gene alvo foi analisada nos tempos de 2 (Etapa de adesão) e 24-48 horas de formação do biofilme, sendo considerados os valores relativos da curva Ct (Bustin, 2000; Livak e Schmittgen, 2001). Foram efetuadas amplificações do gene *GAL102*, sendo o coeficiente de expreção avaliado em relação ao gene constitutivo e adesão celular e pela diferença dos Ct do gene alvo e do gene constitutivo (Livak e Schmittgen, 2001).

Os testes foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica, sendo o coenficiente de expressão determinado seguno o método de expressão relativa (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

No período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017 foram atendidos um total de 495 pacientes portadores de neoplasias malignas, provenientes do Hospital das Clínicas-UFPE (n=12/495 pacientes, 2,4%) e do Hospital de Câncer de Pernambuco (n=483/495 pacientes, 97,6%). Deste universo, foram incluídos no estudo um total de 41 (8,28%) pessoas por apresentaram, em algum momento do internamento hospitalar, um quadro de infecção provocado por leveduras. Esses indivíduos apresentaram varias desordens neoplásicas, destacando-se o carcinoma (n=13/41, 31,7%), adenocarcinoma (n=6/41, 14,6%), sarcoma (n=5/41, 12,2%) e leucemia (n=4/41, 9,75%) (Tabela 2).

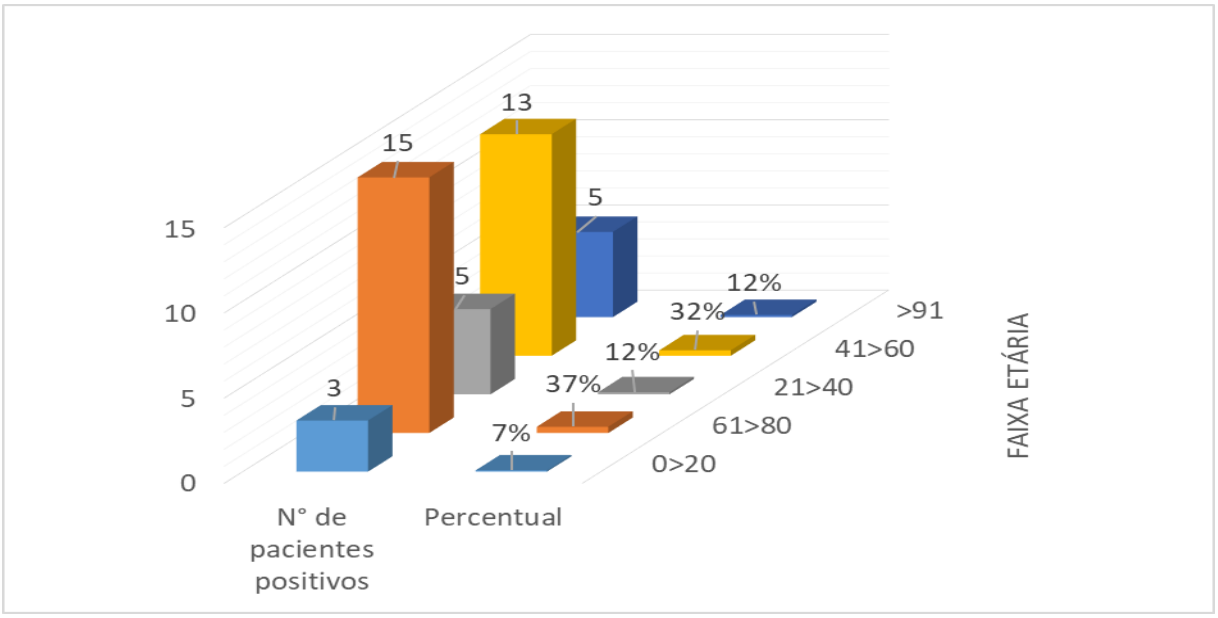
Dentre as espécies de leveduras isoladas, observou-se uma incidência maior para as espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, sendo recuperadas a partir das amostras clínicas 18 isolados de *C. tropicalis*, 17 de *C. albicans*, 4 *C. glabrata*, 4 *C. parapslosis*, 1 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa* e um isolado de *Cystobasidium minutum*. Essas espécies foram isoladas de amostras clínicas diversas, sendo obtidos a partir do sangue dos pacientes (n=20/41, 48,8%), seguidos de cateter (n=10/41, 24,4%), urina (n=5/41, 12,2%) e outros materiais biológicos (n=11/41, 26,8%) (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de leveduras isoladas de amostras clínicas de pacientes internados hospitais terciários públicos de Recife-PE, entre os anos de 2016-2017.

Espécie	Depósito Micoteca	Tipo de neoplasia	Amostra clínica
Candida tropicalis	URM7549/URM7975	Carcinoma Espinocelular	Sangue /Cateter
	URM7976	Adenocarcinoma	Urina
	URM7977/ URM7978	Adenocarcinoma	Sangue /Cateter
	URM7979/URM7980	Leucemia mielóide aguda	Sangue /Cateter
	URM7981	Sarcoma	Secreção traqueal
	URM7982	Carcinoma	Sangue
	URM7983	Carcinoma	Sangue
	URM7984	Condrosarcoma mesenquimal	Sangue
	URM7985	---	Abcesso
	URM7987/URM7986	Sarcoma	Sangue /Cateter
	URM7988	Carcinoma de células escamosas	Cateter
	URM7989	Leucemia linfoide aguda	Sangue
	URM7990	Linfoma	Escamas epidérmicas (Boca)
	URM7991	Sarcoma	Cateter
C. albicans	URM7992	Câncer de pulmão	Sangue
	URM7993	---	Secreção traqueal
	URM7994/URM7995	Fibroadenoma	Cateter/ Sangue
	URM7996	Carcinoma cel. Escamosas	Cateter
	URM7997	Carcinoma	Urina
	URM7998	Tumor perirenal	Urina
	URM7999	Adenocarcinoma	Dreno
	URM8000	---	Sangue
	URM8002	Adenoma	Liquido Pleural
	URM8003	Carcinoma de células B	Secreção traqueal
	URM8004	Carcinoma de células basais	Fragmento de tecido
	URM8005	Adenocarcinoma	Sangue
	URM8006	Cancer de próstata	Lavado bronco-alveolar
	URM8007	Cancer intestino	Escarro
	URM8008	Carcinoma	Escamas epidérmicas (Pênis)
	6129	Leucemia linfoide aguda	Sangue
C. parapsilosis	URM8010	Linfoma	Sangue
	URM8009	Leucemia Mieloide aguda	Sangue
	URM8011	Carcinoma de células escamosas	Cateter
	URM8012	Cancer do útero	Sangue
C. glabrata	URM8017	Tumor de pancreas	Urina
	URM8015	Carcinoma	Urina
	URM8014	Adenocarcinoma	Cateter
	URM8016	Carcinoma de células escamosas	Sangue
C. pelliculosa	URM8019	Osteossarcoma	Sangue
C. krusei	URM8018	Adenocarcinoma	Sangue
Cystobasidium minutum	URM7548	Carcinoma ductal infiltrante	Sangue

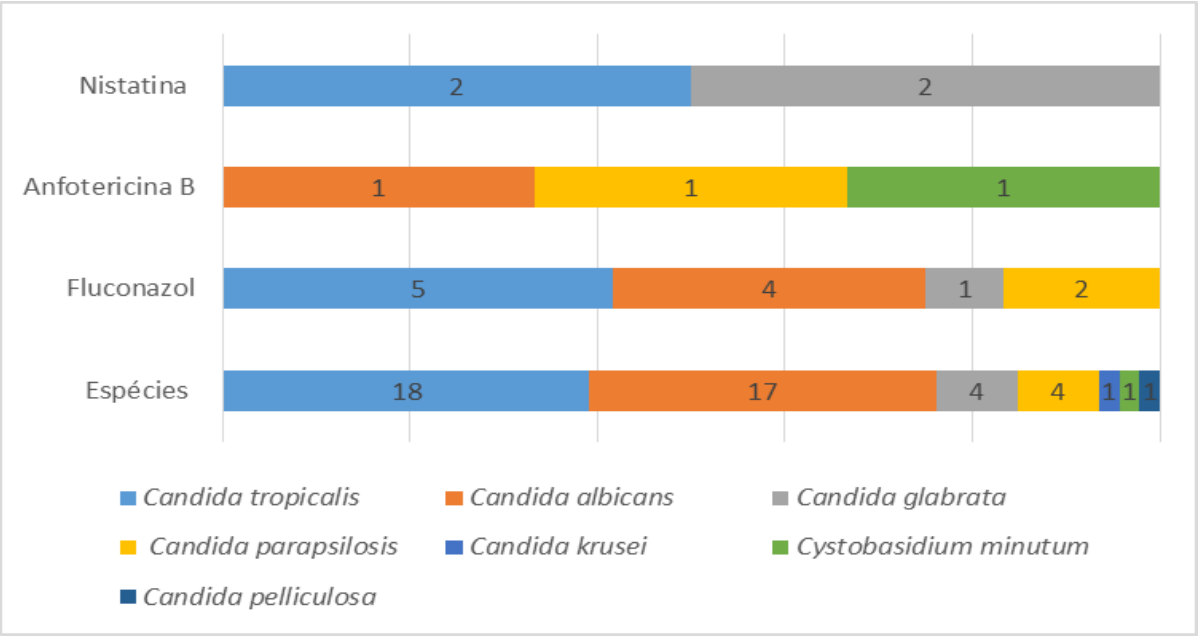
Observou-se que a 53,66% (22) dos pacientes eram do sexo feminino e 46,34% (19) sexo masculino. Desse público, houve uma grande variação de idade, sendo observado uma maior incidência de leveduroses em indivíduos de idade mais elevada, como aqueles na faixa etária de 41-60 anos (32%) e 61-80 anos (37%). A idade média dos homens foi de 54,7 anos (15 a 92 anos), enquanto que para as mulheres esse valor foi de 53,65 anos (14 a 80 anos) (Figura 3).

Figura 3: Perfil etário da população acometida por leveduroses entre os anos de 2016 e 2017.



Em relação a terapêutica antimicrobiana instituida, apenas 18 (43,9%) pacientes receberam tratamento à base de antifúngicos, sendo o fluconazol (29,26%) a droga mais utilizada (Figura 4).

Figura 4: Prevalência das espécies obtidas relacionado com o tratamento instituído para as espécies observadas.



Em nosso estudo, as infecções fúngicas acometendo os pacientes constituiram um importante fator associado a gravidade do quadro clínico do paciente. Dessa forma, nos dias atuais, o acompanhamento dos casos de infecções constitui uma ferramenta indispensável de vigilância epidemiológica, servindo de maneira substancial para a elaboração de diretrizes de combate ao câncer e de seus agravos (INCA, 2017).

Paralelamente, infecções associadas a pacientes com câncer são uma realidade desafiadora, especialmente em países subdesenvolvidos e de renda per capita baixa, como o Brasil. Ainda não se sabe os potenciais impactos que essa mudança, associada a outros fatores como tabagismo e obesidade, poderá trazer para o desenvolvimento do câncer e de infecções associadas a doença, dado que há uma enorme heterogeneidade geográfica na incidência (STEWART; WILD, 2014).

Dentre as infecções que acomentem portadores de câncer, as de etiologia fúngica, sobretudo as oportunistas, tem exibido níveis alarmantes na taxa de morbimortalidade, sobretudo quando o diagnóstico é tardio. As leveduras ainda são os principais agentes de infecções fúngicas oportunistas,

podendo ocasionar ainda quadros graves e que podem conduzir o paciente a óbito se não tratado a tempo (MOLINA et al., 2012; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014).

Os fatores predisponentes observados nos pacientes atendidos no estudo constituíram um forte indicativo para o surgimento de infecções profundas por leveduras. Desta forma, situações como o tratamento de suporte à vida, além de contribuir com a estabilização do quadro clinico, podem agir como porta de entrada e manutenção da infecção, como pela utilização de cateteres e sondas. Ainda, infecções nosocomiais são mais prováveis que ocorram devido à necessidade de permanência hospitalar prolongada e aos tratamentos instituídos, como a quimioterapia e antibioticoterapia de amplo espectro (MOLINA et al., 2012; RAMIREZ-GARCIA et al., 2014), como observado na presente pesquisa.

Ainda, vale ressaltar que em países subdesenvolvidos, a exemplo do Brasil, existe uma escassez de recursos financeiros que atendam toda a demanda do sistema (STEWART; WILD, 2014). Paralelamente, outro agravante para a alta prevalência da doença pode, também, estar diretamente relacionada com a não adoção de boas práticas direcionadas ao controle, prevenção e disseminação de agentes fúngicos (SALES-JÚNIOR et al., 2006; COLOMBO et al., 2013).

Foi observado aqui que as espécies mais frequentes, acometendo portadores de neoplasias, foram *Candida tropicalis*, seguida de *C. albicans*, *C. parapsilosis e C. glabrata*. Isso tem sido uma preocupação, tendo em vista que pode propiciar o aparecimento de espécies mais virulentas e seleção de cepas resistentes. Diferentemente, Matta e colaboradores (2017) relataram *C. albicans* como a espécie mais frequente, acompanhada de *C. parapsilosis, C. tropicalis* e *C. glabrata* são as mais comuns nas américas. Os autores em questão comentam, ainda, que existem poucos dados epidemiológicos sobre os episódios de candidemia nos países que compõe a América Latina.

Um dado importante observado na pesquisa foi que os pacientes atendidos nos centros hospitalares experimentaram em um ou mais momentos a exposição a uma ou mais drogas antifúngicas. Devido ao surgimento desse

novo paradigma, estudos têm sido direcionados para se compreender essa ruptura no padrão da incidência de infecções provocadas por leveduras. Uma explicação elegante e refinada, relacionada a exposição previa a antifúngicos, tem atraído bastante a atenção. Assim, segundo relatado por Lortholary et al. (2011), foi observado que uma recente exposição de *Candida* ao fluconazol e caspofungina está relacionada com uma menor prevalência de *Candida albicans* em detrimento de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* menos suscetíveis a esses antifúngicos, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Ainda, foi constatado que o risco de infecção estava aumentado em 4,75 vezes (*Oddes ratio*) para indivíduos com mais de 15 anos de idade. Esse panorama pode ser influenciados por vários fatores, sendo os mais preocupantes aqueles relacionados a idade, tipo de neoplasia, hospitalização em UTI, cateter venoso central e exposição prévia a drogas antifúngicas (LORTHOLARY et al., 2017).

As pesquisas que vem sendo realizadas indicam que o cenário futuro da incidência das infecções fúngicas sistêmicas é incerto. Há pouco mais de 20 anos atrás, era trivial o fato de as infecções fúngicas sistêmicas (IFSs) serem a quarta principal causa de infecção nosocomial, como apontava os dados da agencia Americana (USA) *National Nosocomial Infection Survey (NNIS)* (RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; WISPLINGHOFF et al., 2004).

Contudo, uma pesquisa realizada por Wisplinghoff et al. (2004), compreendendo um período de 7,5 anos e incluindo um total de 24.179 casos positivos de infecção, sugerem uma mudança drástica nesse sentido. Dessa forma, foi notado que o aumento na prevalência foi tão expressivo que esse grupo de microrganismos passou a ocupar a terceira posição, atrás apenas das infecções de origem bacteriana ocasionadas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Uma pesquisa realizada por Fagan et al. (2013), constatou um cenário parecido com esse. Os autores relataram taxas de incidência elevadas para infecções ocasionadas por *Candida* (0,25 a cada 1.000 habitantes), ficando em terceiro lugar quanto ao quantitativo absoluto das infecções.

Nossos dados demostraram uma expressiva variação na prevalência de *Candida*, sendo *C. tropicalis* o principal agente de infecção fúngica sistêmica

em portadores de neoplasias. Essa informação está em consonância com outros estudos realizados nesse aspecto, como em realizados por Fagan et al. (2013) e Da Costa et al. (2014). Constatou-se que os episódios de candidemia por *C. albicans* (42%) não foram os mais frequentes e que todos os pacientes apresentaram um ou mais fatores predisponentes, como a utilização de antibióticos de amplo espectro, realização de procedimento cirúrgico e doença de base. Assim, utilizar ferramentas acuradas de identificação para conhecer o agente etiológico são vitais hoje, uma vez que essas possibilitam o conhecimento da epidemiologia dos agentes envolvidos em IFSs.

Identificação dos isolados clínicos de levedura

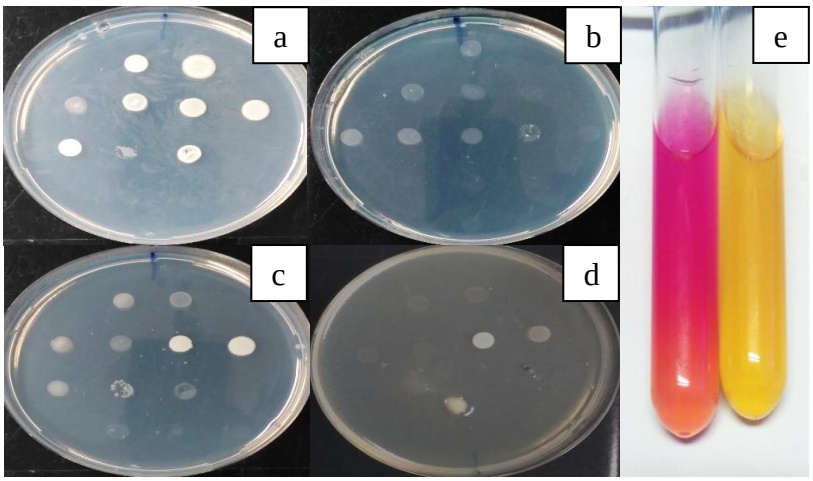
O perfil fisiológico dos agentes foi de grande valia na identificação taxonômica tradicional dos agentes. Todos os isolados, com exceção de *C. minutum*, foram urease negativos e o perfil de assimilação dos compostos nitrogenados e fontes de carbono foram compatíveis com as chaves taxonômicas típicas de cada espécie para distinção em nível de espécie (Tabela 3).

Analisando o perfil fenotípico dos isolados, foi possível realizar a identificação presuntiva de, ao menos em nível de gênero, de todos os isolados. Foi de grande valia a utilização de cepas de referência, uma vez que elas possibilitaram a comparação do perfil fenotípico entre elas e as espécies utilizadas no estudo. Dentre as espécies, o isolado de *Cystobasidium* foi o que exibiu uma característica mais distinta, tanto nos aspectos macro e micro morfológicos quanto no padrão fisiológico (Figura 5).

Tabela 3: Perfil fenotípico dos isolados de levedura avaliadas

		Espécies						
		Candida albicans	*C. tropicalis*	*C. glabrata*	*C. parapsilosis*	*C. krusei*	*C. pelliculosa*	*Cystobasidium minutum*
Cor		Branco/ creme	Creme	Creme	Branca/ creme	Creme	Branco	Rosa
Hidrólise da ureia		-	-	-	-	-	-	+
Auxanograma	N	-	-	-	-	-	+	-
	Dextrose	+	+	+	+	+	+	+
	Sacarose	+	+	-	+	-	+	+
	Rafinose	-	-	-	-	-	+	-
	Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
	Galactose	+	+	-	+	-	+	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	+
	Trealose	+	+	+	+	-	+	+
	Maltose	+	+	-	+	-	+	-
	Melizitose	+	+	-	+	-	+	+
	Amido	+	+	-	-	-	+	-
	Celobiose	-	+	-	-	-	+	+
	Xilose	+	+	-	+	-	+	+
	Arabinose	+	+	-	+	-	+	+
	Metanol	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol	+	+	+	+	-	+	+

Figura 5: Perfil fenotípico dos isolados de levedura, contendo o teste auxanográfico (a, b, c, d) e o perfil de produção da enzima uréase (e). Leveduras com capacidade de assimilar os açúcares sacarose, (a), xilose (b), rafinose (c) e amido (d) foi positiva em 48h. A assimilação foi negativas nos spots translúcidos. Em (e) pode ser visualizado a esquerda um tubo positivo do teste de produção da enzima ureia e a direita um tubo negativo. Teste realizado em duplicata.



A maioria dos isolados (n=33, 80,5%) pode ser identificada presuntivamente através do meio cromogênico CHROMOAgar *Candida*, sendo que dois isolados de *C. tropicalis* exibiram coloração esverdeada, típico de *C. albicans*, e um isolado de *C. glabrata* apresentou coloração azulada, característico de *C. tropicalis*. Em relação as espécies de *Candida* não-*C. albicans*, o perfil cromogênico das colônias de *C. parapsilosis* (4), *C. glabrata* (4) e *C. krusei* (1) serviram como direcionamento na escolha no método de identificação (Tabela 4).

Sabe-se que nos casos de co-infecção por 2 ou mais espécies, esse meio cromogênico auxilia na detecção das diferentes colônias e posterior purificação do isolado fúngico. Além disso, o uso do CHROMOAgar *Candida* pode ser utilizado como meio de cultura primário em amostras clínicas, facilitando essa detecção.

Tabela 4: Concordância entre a confirmação taxonômica, por PCR e/ou sequenciamento, e o meio cromogênico CHROMOAgar *Candida*.

Número de isolados	Confirmação taxonômica	CHROMOAgar *Candida*	Cor e aspecto da cultura
16	*Candida albicans*	15 (93,75%)	Verde/plano
17	*C. tropicalis*	15 (88,23%)	Azul/plano
4	*C. parapsilosis*	-	Branco/plano
4	*C. glabrata*	3 (75%)	Lilás
1	*C. krusei*	1 (100%)	Rosa/rugoso
1	*C. pelliculosa*	-	Branco

Nesse estudo, o meio cromogênico foi crucial para identificação presuntiva dos agentes etiológicos. Esse meio de cultura têm sido fundamental na diferenciação de espécies de *Candida*, sobretudo *C. albicans* e *C. tropicalis*. O princípio do método é baseado em mudanças de pH, provocados pelo crescimento do fungo, acarretando a viragem do meio e a decomposição de compostos presentes no meio de cultivo (ARAÚJO et al., 2005).

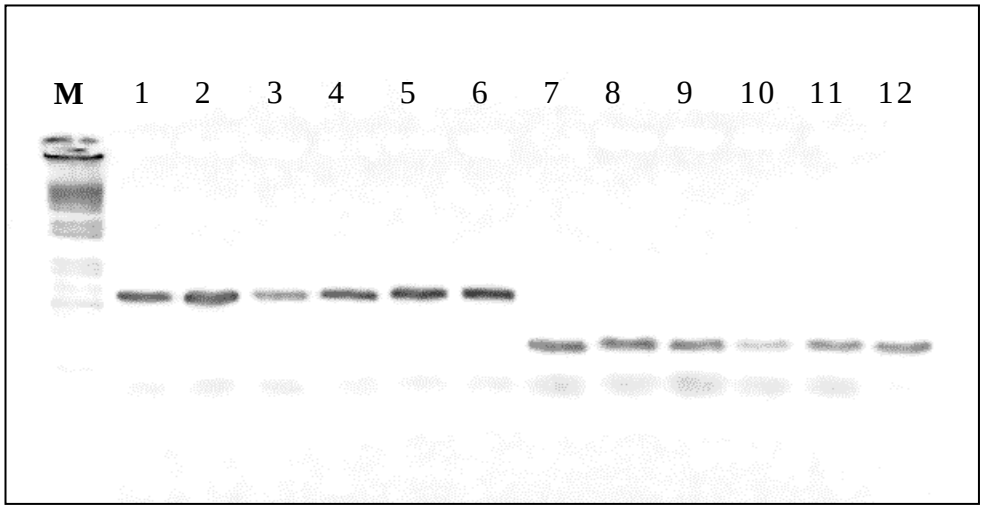
O meio cromógeno CHROMagar *Candida* foi desenvolvido para o isolamento e identificação de espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* obtidas de amostras clínicas. Ainda, possui efeito deletério no crescimento de bactérias podendo, ainda, ser considerado um meio de cultura seletivo para fungos (BECTON DICKINSON GmbH, 2014). Dado o exposto, esse meio de cultura tem sido amplamente recomendado para o isolamento e identificação precoce de espécies de *Candida*, sobretudo quando há o possível envolvimento de mais de uma espécie (SILVA et al., 2018).

Em um estudo recente, desenvolvido por Sadrossadati et al. (2018), foi observado uma alta concordância na identificação dos isolados de *C. albicans* (n=128/129, 99,2%), *C. tropicalis* (n=13/14, 92,86%) e *C. grabrata* (n=18/22, 81,81%). Ademais, o meio cromogênico foi útil, também, para a detecção de isolados de *C. albicans* (63,2%), *C. parapsilosis* (18,6%), *C. glabrata* (10,8%), *C. tropicalis* (6,9%) e *C. krusei* (0,9%) diretamente da amostra clínica dos pacientes. Um fato interessante foi o de que também

houve o aparecimento de mais de uma espécie na mesma amostra clínica, indicando a possibilidade de co-infecção. Contudo, é importante ressaltar que a utilização dessa ferramenta de identificação não dispensa o uso de ferramentas mais acuradas, como a caracterização do fungo pelo estudo do DNA (LI et al., 2003).

Todos os isolados foram confirmados taxonomicamente por meio de uma abordagem de estudo genômico do DNA. Os primers espécie-específico foram eficazes na discriminação entre as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, pela simples análise comparativa do tamanho do fragmento de DNA amplificado, que é típico de cada espécie, obtidos por meio da eletroforese em gel de agarose (Figura 6).

Figura 6: Imagem da eletroforese em gel de agarose (a) exibindo o perfil de amplificação dos isolados de *C. glabrata* (1-6) e de *C. tropicalis* (7-12). Marcador 1kb Plus DNA ladder (M).



A abordagem de identificação por PCR com o emprego de primers espécie-específicos garantiu a identificação dos isolados clínicos obtidos no presente estudo. Ainda, foi possível a obtenção de ganho de tempo decorrido entre o isolamento e identificação precisa dos agentes etiológicos. O emprego dessa abordagem é uma ferramenta eficiente, de fácil interpretação e de baixo custo na identificação das espécies de *C. albicans* (402pb), *C. tropicalis*

(149pb), *C. glabrata* (632pb), *C. parapsilosis* (379pb) e *C. krusei* (475pb) (Li et al., 2003).

Uma das possibilidades que o método de PCR possibilitou a consistiu na realização de PCR multiplex para identificação dos isolados, característica essa que garante a identificação de várias espécies, simultaneamente, baseados apenas na interpretação do padrão de bandas obtidas no gel de agarose. Essa abordagem possibilitou, também, uma economia de tempo e de reagentes, uma vez que o processo já está otimizado. De maneira semelhante, é possível diferenciar, com exatidão, as espécies do complexo de *C.* parapsilosis (C. *parapsilosis, C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) empregando PCRs convencionais (LI et al., 2003; ASADZADEH et al., 2009).

Para as demais espécies que não possuíam primer-espécie específico foi necessário realizar o sequenciamento parcial do domínio D1/D2 da região LSU do rDNA. Desta forma, *Cystobasidium minutum* foi identificado através dessa abordagem. Para essa espécie, foi obtido alto valor de *Bootstrap* por meio de perfil de comparação com outras sequências depositadas no Genbank (≥99%). Após análise evolutiva envolvendo máxima verossimilhança, foi notado que a espécie em questão apresentou alta similaridade para a espécie tipo *Cystobasidium minutum* CBS319 (Figura 7).

Em relação a isolados de *Cystobasidium*, os métodos fenotípicos para identificação de espécies do gênero são demorados, não sendo comum o emprego na rotina laboratorial diagnóstica. Na maioria dos casos é necessário o emprego de ferramentas moleculares para se chegar uma identificação correta do agente etiológico (ARENDRUP et al., 2014; KURTZMAN, 2011).

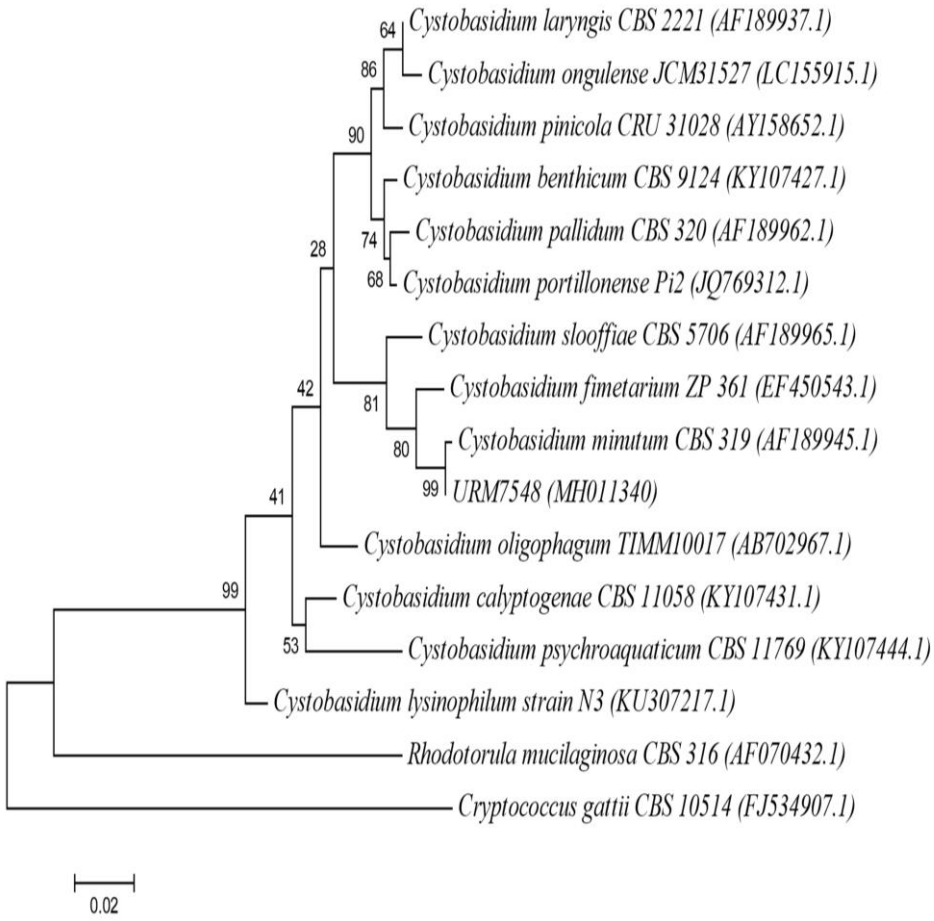
C. minutum é uma levedura rara que já foi descrita ocasionado quadros clínicos importantes em pacientes debilitados, sobretudo pacientes com câncer que fazem uso de dispositivos médicos invasivos (LEIBOVITZ et al., 1991; GOLDANI et al., 1995; ZHOU et al., 2014; YURKOV et al., 2015). O perfil de infecções da corrente sanguínea ocasionadas por essa espécie ainda é escasso e seus fatores de risco, características clínicas e dados epidemiológicos são pobremente conhecidos (LEIBOVITZ et al., 1991; GOLDANI et al., 1995; CERIKCIOGLU et al., 2005). Os principais relatos

descritos na literatura foram atribuídos a pacientes sem câncer por infecções localizadas (LEIBOVITZ et al., 1991; ARENDRUP et al., 2014). Ademais, existe uma estreita relação entre este tipo de infecção e a presença de imunossupressão (CERIKCIOGLU et al., 2005). Ainda, apesar de a incidência da doença ser baixa, elas representam importantes agentes de micoses, especialmente em indivíduos afetados por doenças malignas (HSUEH et al., 2003; SIMON et al., 2014).

Desde que foi desenvolvida, em 1983, por Kary Banks Mullis (MULLIS, 2019), a Reação em Cadeia da Polimerase vem possibilitando um grande avanço científico no estudo do DNA e RNA. Os impactos causados com o advento dessa tecnologia possibilitaram avanços significativos na biologia básica e aplicada, através do diagnóstico da biologia molecular (ERLICH, 1989). Esse é um método, também, bastante útil nos estudos envolvendo relações filogenéticas entre diferentes classes de microrganismos. Podem ser citados como principais vantagens do método, as seguintes características: A utilização de DNA total, pequenas quantidades de DNA utilizados nas reações de PCR e ambos os sentidos da fita de DNA podem ser amplificados reduzindo, desta forma, os erros de construção do DNA complementar. Essas características são uteis para a realização de técnicas mais acuradas de estudo do DNA, a exemplo do sequenciamento de regiões de interesse específicas para análises filogenéticas de um grupo ou de um microrganismo isolado (WHITE et al., 1990). Além disso, o estudo e caracterização do DNA tem possibilitado a caracterização das diferentes espécies filogenéticas permitindo, assim como a caracterização dos atributos de virulência das diferentes espécies, a exemplo da capacidade de aderência as células epiteliais humanas.

Figura 7: Análise filogenética do domínio D1/D2-região LSU de *Cystobasidium minutum*. Os números de acesso do *GenBank* aparecem entre parênteses, sendo os valores de *Bootstrap* discriminados ao lado das ramificações.

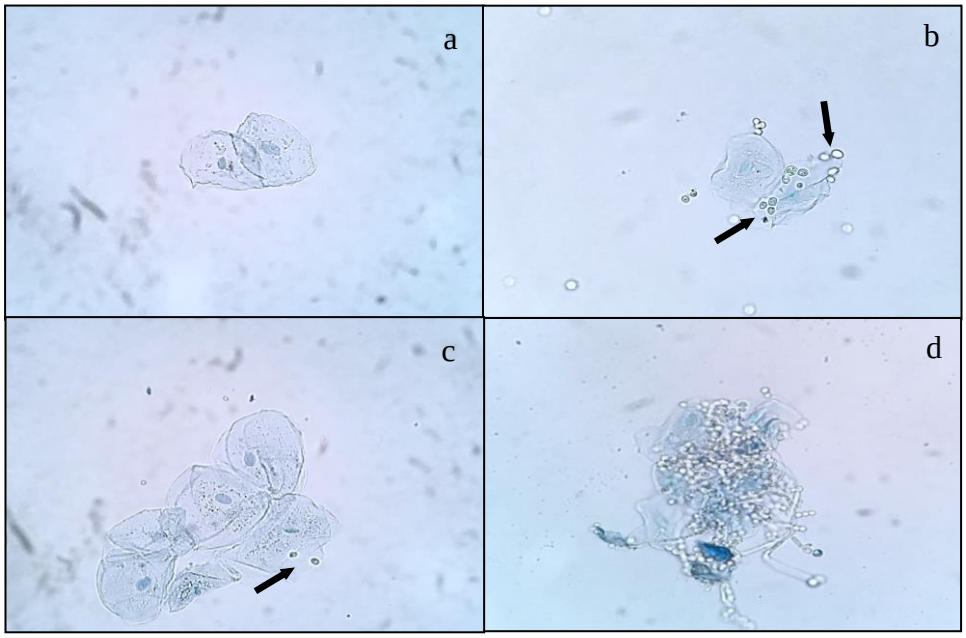
.



Ensaio de Aderência a células Epiteliais Bucais (CEB)

Com exceção do isolado URM7996 de *Candida albicans* **(**n=1/15, 6,25%), todas os demais isolados exibiram fraca aderência as CEB. De forma semelhante, os isolados das espécies de C. *tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei, C. pelliculosa* e *Cystobasidium minutum* também exibiram um baixo poder de aderência (Figura 8).

Figura 8: Exame microscópico exibindo o perfil de aderência de *Candida albicans* a células epiteliais bucais. Foram notados perfis com ausência de aderência (a), aderência fraca (b, c) e aderência forte (d) de leveduras. Aumento de 400x.



Dados da literatura sugerem que para que ocorra o processo de adesão é necessário a atuação de diversas interações entre a célula do fungo com as células do hospedeiro. Sendo assim, se faz necessário o envolvimento entre receptores celulares, moléculas de adesão do fungo e taxa de transporte do agente infeccioso para que ocorra o processo de doença (JAIN et al., 2010).

Sabe-se que a capacidade de adesão da célula fúngica é fortemente influenciado por características inerentes à superfície da célula e o ambiente onde o agente está localizado. Além disso, características elementares como hidrofobicidade e rugosidade da célula, e a expressão de genes que reflitam no surgimento de adesinas, influenciam diretamente a capacidade de adesão de *Candida* (YOSHIJIMA et al., 2010, FRADE; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011)

Verificou-se nesse estudo que a origem do substrato de isolamento não estava relacionada com a capacidade de aderência as CEB e quanto ao perfil de virulência dos agentes etiológicos. Samaranayake et al. (1994) observaram que isolados de *C. albicans* obtidos de indivíduos saudáveis e/ou pacientes que receberam transplante de medula óssea exibiram uma baixa capacidade de

adesão as células HeLa. Resultados semelhantes foram observados por Imbert-Bernard et al. (1994) em que a aderência a CEB da maioria dos isolados clínicos de *C. albicans*, provenientes de portadores do HIV, foi fraca.

Uma possível explicação para esses baixos valores de aderência as CEB pode ser o isolamento precoce do agente infeccioso nos estágios iniciais da infecção (PEREIRO et al., 1997). Outra possível explicação para a baixa aderência encontrada nos isolados clínicos desse estudo pode ser a exposição prévia a terapia antifúngica, uma vez que esta possui efeitos tóxicos a célula fúngica, o que pode reduzir substancialmente na virulência dos isolados clínicos de *Candida* (GHANNOUM, 1992).

Ainda, é possível que a manutenção de isolados de clínicos de levedura por longos períodos possam influenciar na virulência dos agentes etiológicos. Dessa forma, em um estudo realizado com isolados clínicos obtidos na coleção de Cultura Micoteca URM por Lima-Neto e colaboradores (2010) foi observado que 60% dos isolados de *C. albicans* e 25% de *C. parapsilosis* apresentaram forte aderência.

Apesar de a maioria dos isolados clínicos do presente estudo terem apresentado uma baixa aderência, a depender das condições de estresse a que a célula é exposta, essas espécies podem desenvolver/ativar outros fatores de virulência, refletindo diretamente quanto ao aspecto dual (estado comensal para o de parasitismo) do microrganismo. Nesse sentido, quando a levedura é estimulada, esta pode passar a exibir uma taxa de virulência maior não observada anteriormente (MARTIN et al., 2018), como quando as células são estimuladas a formarem biofilmes fúngicos.

Avbaliação da atividade formadora de biofilme

Foi observado que 38 isolados clínicos apresentaram grande atividade metabólica mensurada pelos valores de absorbância do MTT, similar ao observado com a cepa de referência ATCC90028. Dentre as cepas, um isolado apresentou uma elevação metabólica entre os períodos de 24h (MAM) para 48h (AAM) e 5 possuiram um decréscimo na atividade metabólica no período

de 48 (AAM) horas de formação do biofilme. O isolado URM7993 foi o único a ter valores intermediários (MAM) nos dois tempos avaliados. Adicionalmente, no tempo de 24h o biofilme dos isolados já estavam completamente formados, exibindo uma grande atividade metabólita. Essa informação está diretamente relacionada com o alto poder de virulência relacionado a formação de bofilme das leveduras estudadas (Figura 9).

Quando comparada a atividade formadora de biofilme da cepa de referencia com as espécies clínicas e os tempos de formação de biofilme, foi notado significância estatística ($p \leq 0,05$) para as espécies de *C. tropicalis* (n=17, 100%). *Candida albicans* (n=12, 75%), *C. glabrata* (n=3, 75%), *C. parapsilosis* (n=4, 100%), *C. krusei* (n=1, 100%), *C. pelliculosa* (n=1, 100%) e *Cystobasidium minutum* (n=1, 100%).

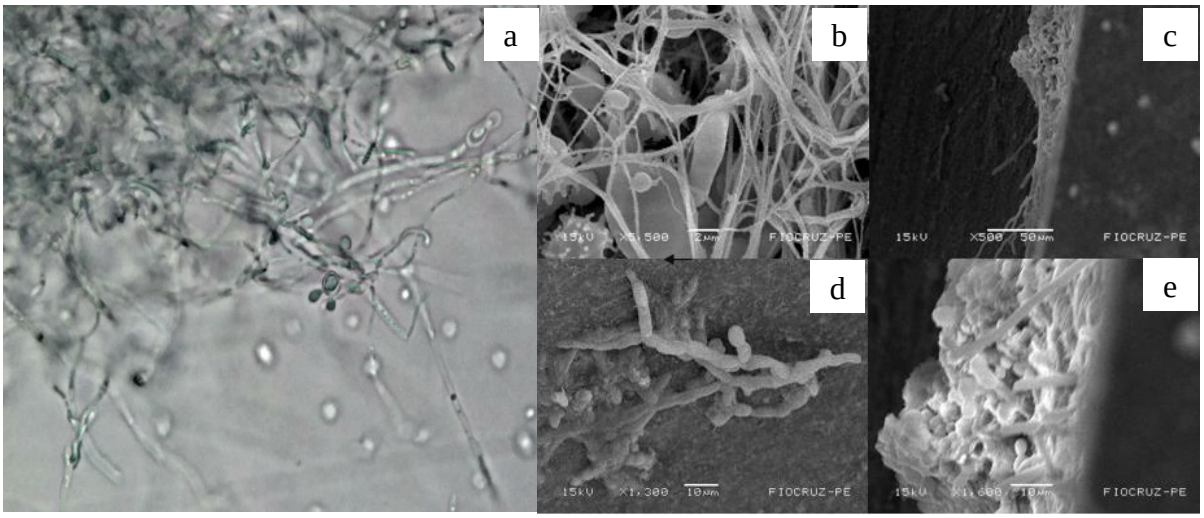
Dentre as espécies clinicas isoladas, notou-se que dois isolados de *C. tropicalis* (URM7986 e URM7987) foram mais expressivos na formação de biofilme, apresentando valores mais expressivos que a cepa controle ATCC. Curiosamente, o isolado URM7986 apresentou uma elevação metabólita expressiva de redução do MTT entre o período de 24h para 48h. Outro dado interessante se refere ao fato de o isolado URM7987 apresentar uma alta taxa de formação de biofilme, apesar de só apresentar significância estatística no tempo de 48h (Figura 10).

Em se tratado de *C. albicans*, quatorze isolados apresentaram significância estatística entre os tempos de 24 para 48h, sendo que os maiores valores de redução do MTT já foram notados nas primeiras 24h de formação do biofilme. Todos os isolados de *C. parapsilosis* exibiram relevância estatística, sendo os maiores produtores de biofilme os isolados URM8012 e URM8009. Em *C. glabrata*, o isolado URM8014 foi o melhor produtor de biofilme, tendo uma diferença significativa entre esse isolado e os outros três da espécie.

Os valores elevados de atividade metabólica dos biofilmes avaliados talvez possam ser explicados pela estruturas complexas e compactas. Dado a sua organização, essas estruturas podem constituir uma importante barreira ao tratamento e erradicação do processo infeccioso. Além disso, os biofilmes

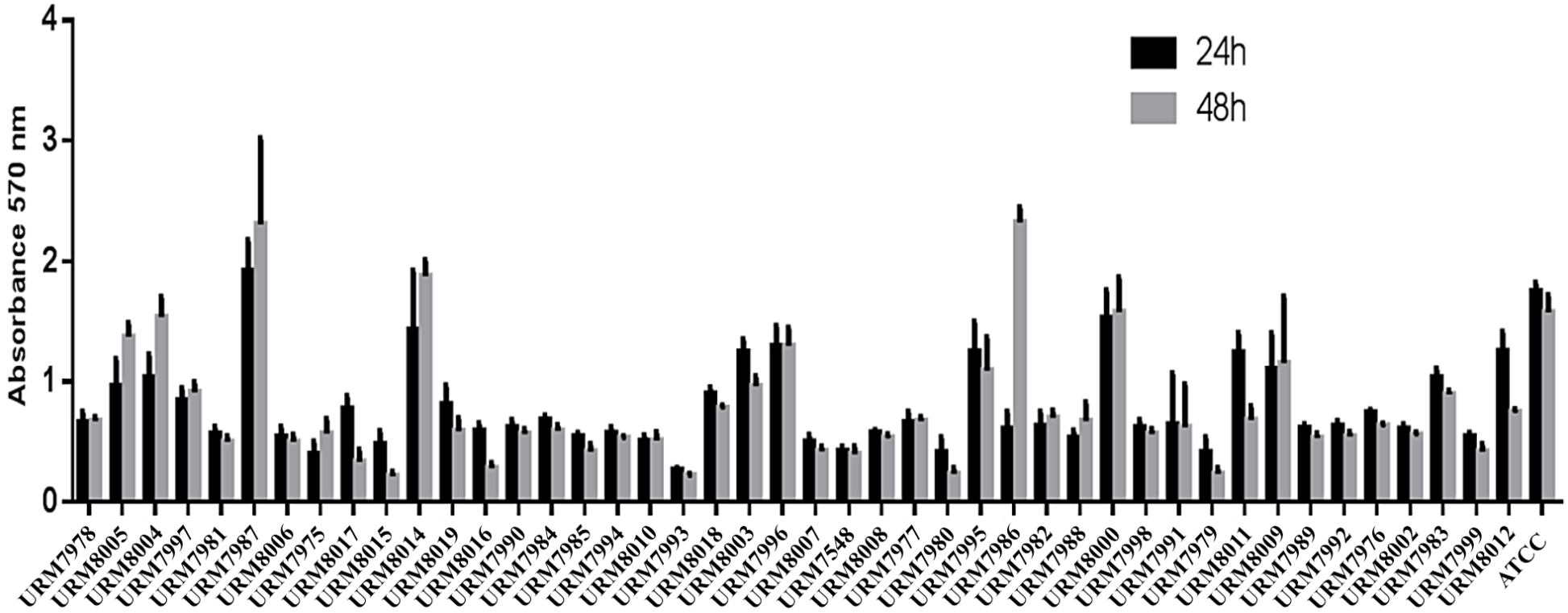
podem atuar, também, no intuito de manter a infecção, uma vez que após formado podem liberar continuamente blastosporos permitindo, assim, a manutenção da infecção fúngica (Figura 9).

Figura 9: Microscopia óptica (a) e Microscopia Eletrônica de Varredura do Biofilme de *C. tropicalis*. São evidenciadas estruturas microscópicas (matrix polimérica, filamentos milcelianos, blastoconídios e clamidoconídios) do biofilme formado em placa de poliestireno (a) e biofilme formado no lumem de cateter contaminado (b, c, d, e).



Fonte: Figuas (b,c,d,e) obtidas de Inácio et al., 2019

Figura 10: Atividade formadora de biofilme de espécies de levedura avaliada nos tempos de 24 e 48 horas. Teste de Tukey com nível de significância de 5%.



O estudo de biofilme baseado pela atividade metabólica por meio de derivados de tetrazólio fornecem informações valiosas sobre a viabilidade celular. Dentre esses compostos, o MTT [3(4,5dimethylthiazol2yl)2,5diphenyltetrazoliumbromide] é um composto de grande utilidade, uma vez que é caracterizado por apresentar carga positiva e ter um grande poder de penetração em células eucarióticas viáveis, fornecendo o perfil do metabolismo celular. Apesar de o mecanismo de redução do formazan pela célula eucariótica não ser compreendida, possivelmente o MTT é metabolizado por meio de uma reação com NADH e outras moléculas transportadoras de elétron (SITTAMPALAM et al., 2004).

A emergência de infecções fúngicas invasivas provocadas por biofilmes tem despertado uma grande preocupação. Devido a esse grave problema, numerosos estudos têm sido direcionados ao entendimento do biofilme quando ao desenvolvimento da resistência antifúngica e a sua relação com o estabelecimento da abordagem terapêutica de pacientes graves (BORGHI; BORGO; MORACE, 2016). Dessa maneira, o emprego de tecnologias refinadas para o estudo e caracterização de biofilmes de *Candida*, em nível morfológico, fisiológico e ômico, podem fornecer informações valiosas a respeito de seus mecanismos biológicos e patogênicos. Ainda, estudos nesse campo são indispensáveis na atualidade, uma vez que os biofilmes podem ser refratários aos tratamentos convencionais, contribuindo para a perpetuação do processo infeccioso (CHANDRA et al. 2001).

Similar aos nossos resultados, Yu et al. (2017) ao avaliar a capacidade de formação de biofilme de 68 isolados clínicos de *C. tropicalis,* observaram que a maioria dos isolados formaram biofilmes em superfícies abióticas e bióticas. Contudo, os isolados obtidos do sangue apresentaram menor capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno. Além disso, os autores não observaram diferenças entre os biofilmes formados após 24 horas.

Segundo Cuéllar-Cruz et al. (2012) os biofilmes são responsáveis pelo agravamento da saúde, contribuindo de maneira negativa na evolução clínica dos pacientes, sobretudo quando ocasionado por *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. tropicalis.* Inácio et al., 2019 relataram um caso de infecção

sistêmica associada a cateter por *C. tropicalis*. O paciente só obteve melhora clínica após a remoção do cateter.

Verificamos que *C. minutum* apresentou valores intermediários de formação de biofilme. Resultado parecido foi observado por Nunes et al. (2013) que, ao avaliarem a capacidade de produção de biofilme de 61 isolados de *Rhodotorula,* verificaram que *C. minutum* foi a espécie maior produtora de biofilme quando comparada isolados clínicos e ambientais de *Rhodotorula mucilaginosa, R. glutinis, R. pallida, R. dairenensis* e *R. slooffiae*.

Dentre as espécies avaliadas, os isolados de *C. tropicalis* apresentaram maior capacidade de formação de biofilme. Nossos resultados divergiram do que foi observado por Hawser e Douglas. (1994) e Kuhn et al. (2002), onde *C. albicans* apresentou uma maior capacidade de formar biofilmes quando comparada a outras espécies, como *C. tropicalis*. Entretanto, diferentemente do que foi observado pelos autores, não houve diferença quanto à formação de biofilme e a origem dos isolados clínicos. Uma possível explicação para essa questão pode ser encontrada na exposição prévia a antifúngicos e a não expressão de fatores de virulência, como adesinas e genes relacionados a adesão e formação de biofilme (PANNANUSORN et al., 2013; WILLAERT, 2018).

Detecção do gene *GAL10*

Inicialmente, para a detecção do gene *GAL102* em *Candida* foi empregado os primers propostos por Sen e colaboradores (2011), contudo, os ensaios foram positivos apenas para três isolados de *C. tropicalis* (1143, 1146 e 1543). Frente ao exposto, foi necessário realizar uma análise a partir do genoma de *Candida albicans* para se entender as razões dos resultados negativos. A partir dessas genômicas foi observado uma mutação na porção terminal 3’ na qual o primer deveria se anelar, como demonstrado na Figura 11.

Figura 11: Sequência parcial do gene *GAL102* de *Candida albicans* SC5314.

Foi necessário a obtenção de outros pares de *primers* que atendessem a finalidade de detecção do referido gene em *Candida*. Face ao exposto, foram desenhados 10 pares de primers de detecção e, destes, selecionados três pares de *primers*. A partir de uma análise na plataforma BLAST-NCBI, foi verificado uma alta taxa de similaridade de 100% para o gene *GAL102* do genoma de *C. albicans* SC5314. Os fragmentos obtidos nas reações de PCR apresentaram tamanhos de 890pb para os isolados positivos, consistentes com a informação do desenho do primer.

Posteriormente, foram realizados novos ensaios de detecção do gene GAL102, sendo constatado que o gene estava presente nos isolados de *C. albicans* (n=7, 43,75%) e *C. tropicalis* (n=3, 17,65%). Esses resultados indicam que o *primer* obtido apresentou boa especificidade com o gene alvo do estudo. Além disso, a baixa prevalência do gene *GAL102* nos isolados clínicos desta pesquisa pode sugerir que esse gene não seja tão conservado no genoma de *C. albicans* ou que exista algum correspondente homólogo, como sugerido por Sen et al. (2011). Outra hipótese sugerida está centrada na ideia de que o domínio da mutarotase pode estar fundido com o domínio UDP epimerase em *Candida* (MAJUMDAR et al., 2004). Mais provável, ainda, é que o resultado observado aqui seja devido a variações nas cepas devido a alterações nos sítios de restrição, deleção e/ou inserção nos sítios de reconhecimento do primer as regiões alvo do gene (GOTTFREDSSON, et al., 1998; REISS, et al., 1998; SOLL, 2000).

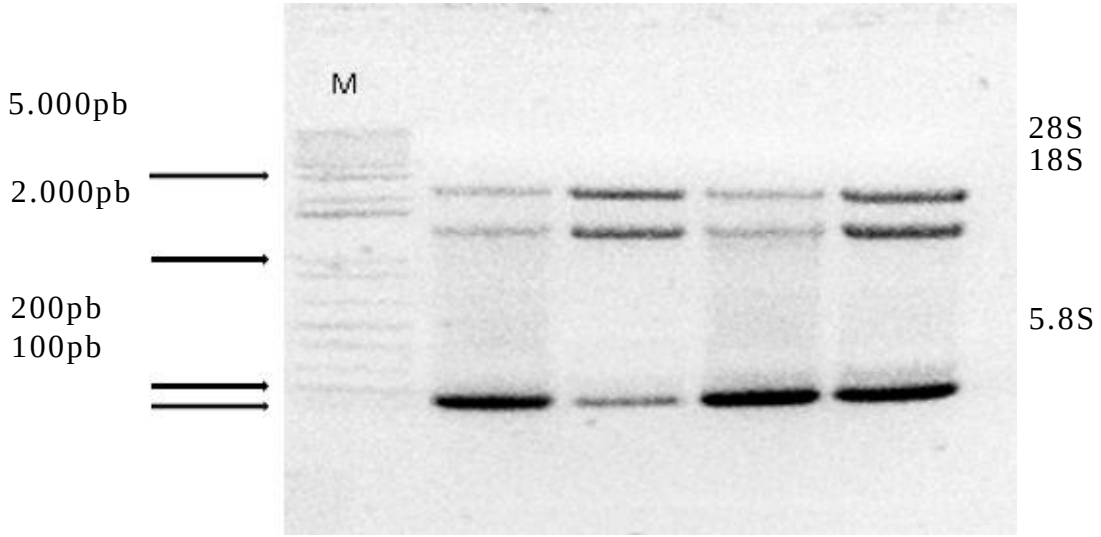
Apesar do gene *GAL102* ter sido apontado como uma região codificadora conservada no DNA de *C. albicans* (SEN et al., 2011), nossa análise preliminar contradiz essa afirmação. É possível que o gene seja pouco conservado, permitindo uma taxa de variação considerada entre isolados de uma mesma espécie. Isso pode explicar a não detecção do gene utilizando as ferramentas empregadas.

Após realizar a detecção do gene *GAL102*, três isolados de *C. albicans* foram selecionados, a partir da atividade formadora de biofilme, para serem submetidos aos ensaios de expressão relativa. Desse modo, procurou-se verificar a correlação do perfil de expressão do referido gene com a capacidade de virulência dos agentes.

Elaboração do biofilme, extração do RNA e produção do cDNA

Após a extração do RNA, os valores de densidade optica (230/260) obtidos indicaram que não houve contaminação das amostras de RNA com os reagentes utilizados para a extração. Além disso, o material genômico obtido apresentou, também, boa integridade e poucas perdas durante o processo de extração. Na imagem é possível verificar os três principais tipos de RNA ribossomal, o 28S, 18S e 5.8S (Figura 12).

Figura 12: Eletroforese desnaturante, em gel de agarose (1%), do RNA total exibindo as três bandas de RNA. Marcador 1Kb plus DNA *Ladder*.



Para se chegar a esse resultado, o método que apresentou melhor resultado foi o protocolo do H*ot Acidic Fenol*. Foi observado que o método da guanidina e de kits de extração não foram eficientes na extração de RNA de biofilme de *Candida*, resultando em pouca quantidade de RNA necessário para a elaboração do cDNA. Similarmente, outros estudos têm reportado dificuldades semelhantes para a obtenção de uma amostra de RNA satisfatória a partir de biofilmes (NOUR et al., 2010; RUMP et al., 2010). Dessa forma, para a obtenção de resultados satisfatórios na qPCR é fundamental a obtenção de um material genético que satisfaça a três características elementares: Uma grande quantidade de RNA extraído (≥1µg), grau de pureza satisfatório (relação 230/260 ~ 2-2,2) e material genético integro (BUSTIN et al., 2005; Nolan et al., 2006).

Um dos grandes problemas reportados para a extração do RNA a partir da amostra de biofilmes, pode ser devido a presença da matriz extracelular que pode corresponder em até 90% do peso do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Além disso, espécies de *Candida* possuem a capacidade de produzirem biofilmes altamente complexos e de estrutura bastante variada. Enquanto que isolados com baixa capacidade de produção de biofilme apresentam apenas células de levedura e pseudohifas em sua estrutura, cepas virulentas podem apresentar um biofilme complexo formado por uma densa matrix no biofilme, apresentando desde células de leveduras a um emaranhado denso de hifas (MUNUSAMY et al., 2017).

Em casos extremos, na ausência de um dos genes da via de leloir ou a mutação de um gene especifido, pode fazer com que a célula compense, por pressão seletiva, a ausência dos genes *GAL* (MOYRAND et al., 2008).

Expressão do gene *GAL102* não está diretamente relacionado com a formação de biofilme em *Candida*

Foi evidente que o gene *GAL102* apresentou uma concentração relativamente baixa na célula, notado pelo início da amplificação comparada ao limiar do ciclo *Threshold*. O gene *GAL102* participa ativamente durante na

elaboração da parece celular de *Candida albicans,* sobretudo nas primeiras 24 horas de desenvolvimento do biofilme. Foi verificado que, à medida que o biofilme envelhece, a expressão do gene *GAL102* entra em declínio substancial. Em termos absolutos, o isolado URM8002 foi o que mais se destacou, apresentando uma taxa de expressão 9,76X a cepa ATCC 90028 e de 1,88X ao isolado URM8005 em 24h.

Os dados obtidos aqui reforçam a hipótese de que esse gene é fundamental na virulência de *Candida*. Ao que tudo indica, por ser um gene que participa da elaboração de uma proteína estrutural da parede celular, o gene *GAL102* é superexpresso, apenas, nos momentos iniciais do crescimento celular independentemente do isolado.

Sen et al. (2011) verificaram que, em modelo experimental de candidíase sistêmica, a deleção do gene *GAL102* promove uma maior sensibilidade às drogas antifúngicas e a agentes desestabilizadores da parede celular. Os biofilmes mutantes formados também se mostraram menos compactos. A análise das mananas da parede celular de isolados de *C. albicans* privados do gene *GAL102* revelou que um dos principais constituintes da manana está ausente e o componente fosfomanana conhecido por seu papel na virulência é notavelmente reduzido, evidenciando que a atividade desta enzima afeta a composição e morfologia das mananas da parede celular e contribui para a virulência em *C. albicans*.

Contudo, os dados obtidos aqui contrastam com o que foi descrito por Sen et al. (2011). Apesar de o gene *GAL102* está estar relacionado com a elaboração da parede celular, não há evidencias significativas de que o gene esteja diretamente relacionado com a formação de biofilmes maduros. Ainda, foi provado que a deleção de homologos do gene *GAL10* de *C. albicans* não é suficiente para reduzir drasticamente a virulência da levedura (MOYRAND et al., 2008). Essa informação reforça os dados obtidos, uma vez que não foi possível relacionar que a superexpressão do gene *GAL102*, isoladamente, influencie com uma maior atividade formadora de biofilme. Isso se deve ao fato de o isolado que exibiu maiores valores de expressão absoluta (URM8002) foi o que apresentou baixa atividade formadora de biofilme.

Assim, como o referido gene tem uma influência maior na conversão da fase de levedura para a filamentosa, evidenciando que a atividade do gene *GAL102* afeta a estrutura da parede celular e resposta celular a exposição a drogas, pode contribuir para a virulência em *C. albicans* (ZNAIDI et al., 2013; SEN; SADHALE, 2019).

Outro dado que chama a atenção, é que o gene *GAL102* possui relação com outros genes não relacionados com a via de Lelor. Vandeputte et al., (2012) observaram que a deleção do gene *RCA1* promoveu uma expressão aumentada do gene *GAL102*, promovendo alterações na morfologia da célula e afetando a susceptibilidade do fungo a resistência a antifúngicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Pacientes portadores de neoplasias são severamente acometidos por infecções fúngicas, sobretudo as leveduras;
- ✓ Dentre as leveduras responsáveis pelo surgimento da candidíase invasiva, *Candida tropicalis* é o principal agente etiológico acometendo indivíduos com câncer no Nordeste do Brasil;
- ✓ Espécies emergentes e incomuns, como *Cystobasidium minutum* e *Candida pelicullosa*, podem ocasionar infecções graves em indivíduos com câncer;
- ✓ Leveduras obtidas de amostras clínicas de sítios sistêmicos, em etágios iniciais da doença, apresentam uma baixa capacidade de adesão a células epiteliais bucais;
- ✓ A atividade metabólica de Biofilmes de leveduras é variável entre isolados de uma mesma espécie;
- ✓ Biofilmes maduros são formados em 24horas;
- ✓ A expressão do gene *GAL102* está relacionada com a taxa de crescimento celular em *Candida*;
- ✓ A expressão do gene *GAL102* está relacionado com a capacidade de formação de biofilme em *Candida*;

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, Kumar V. Robins & Cotran-**Patologia Básica**. Elsevier Brasil, 2008 - 1028 páginas.

AGUIRRE, J.M. et al. Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. Gerodontology, v. 13, n. 1, p.63-67, jul. 1996.

AIKAWA, Nadia E. et al. Systemic and localized infection by *Candida* species in patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF therapy. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 6, p.478-482, nov. 2016.

ALVARES, C.A. et al. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med,** v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALVAREZ-LERMA, F. et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Intensive Care Med,** v. 29, p. 1069-76, 2003.

ANTAS, P.R. et al. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by Paecilomyces lilacinus focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. **Microbes Infect,** v. 14, n. 1, p.1-8, 2012.

ARAÚJO, C.R. et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMAgar™ *Candida*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2005.

ARENDRUP, M.C. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clin Microbiol Infect,** v. 20, Suppl. 3, p. 76–98, 2014.

ASCIOGLU, S. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. **Clinical Infectious Diseases,** v. 34, p. 7-14, 2002.

ASADZADEH, M. et al. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **J Medical Microbiol**, v. 58, n. 1, p. 745-52, 2009.

AUSUBEL, F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology - Collart MA and Oliviero S - Preparation of Yeast RNA. John Wiley & Sons Inc; ringbou edition (December 4, 2003). ISBN: 047150338X.

BASSETTI, M.; MIKULSKA, M.; VISCOLI, C. Bench-to-bedside review: Therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 14, p. 2-12, 2010.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase DST - **J bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: University press, 1139p, 2000.

Becton Dickinson GmbH. Instruções de utilização – meios em placas prontos a usar: BD™ CHROMagar™ *Candida* Medium, 2014. Obtido de: http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9113. Acesso em: novembro de 2018.

BISWAS, S.K. et al. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 1191-9, 2001.

BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts**. J Hosp Infect**, v. 59, n. 2, p. 159-62, 2005.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.

BORGHI, E.; BORGO, F.; MORACE, G. Fungal Biofilms: Update on Resistance. **Adv Exp Med Biol**, v. 931, p. 37-47, 2016.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Obtido de: http:// conselho.saude.gov.br/legislacao/lei8080_190990.htm. Acesso em: janeiro de 2019.

BROTHERS, R.P.; DAVELUY, S.D. Squamous cell carcinoma mimicking fungal infection. **IDCases,** v. 6, p. 72–73, 2016.

BURKE, J.P. Infection control - a problem for patient safety. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 651-656, 2003.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, p. 169–193, 2000.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **J Mol Endocrinol**, v. 34, p. 597-601, 2005.

BUTLER, G. Fungal sex and pathogenesis. **Clin Microbiol Ver,** v. 23, n. 1, p. 140-59, 2010.

CALVO, B. et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, v. 73, p. 369-74, 2016.

Candida Genome Database. ***C. albicans* Pathway: galactose degradation**. Obtido de: http://pathway.candidagenome.org/CALBI/NEWIMAGE?type=PATHWAY&object=GALACTMETAB-PWY&detail-level=2. Acesso em junho de 2017.

CARVALHO, L.P. at al. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 571-576, 2003.

CDC-Center for Disease Control and Prevention 2016. C**linical Alert to U.S. Healthcare Facilities** - Obtido de: https:// www.cdc.gov / fungal / diseases / candidiasis / candida-auris-alert.html. Acesso em maio de 2017.

CECCARELLI, G. et al. Voriconazole treatment of *Candida tropicalis* meningitis: persistence of (1,3)-b-D-glucan in the cerebrospinal fluid is a marker of clinical and microbiological failure: A case report. **Medicine (Baltimore),** v. 95, p. 1-5, 2016.

CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Mol Biol,** v. 62, p. 130-180, 1998.

CERIKCIOGLU, N.; TETIK, C.; MULAZIMOGLU, L. *Rhodotorula minuta*: uncommon yeast isolated as the causative agent of a right hip joint infection. **J Mycol Med**, v. 15, p. 52–55, 2005.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol,** v. 183, p. 5385–5394, 2001.

COLOMBO, A.L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CORNELY, O.A. et al. Epidemiology and Outcome of Fungemia in a Cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031). **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. 324–31, 2015.

COSTA, A.R. et al. *Candida* clinical species identification: molecular and biochemical methods. **Ann Microbiol**, v. 60, p. 105–112, 2010.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol**, v. 7, p. 755–771, 2012.

CUTRONA, A.F. et al. *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. **Am J Orthop**, v. 31, p. 137-140, 2002.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.

Da COSTA, V.G. et al. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: A 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243–250, 2014.

Da MATTA, D.A.; SOUZA, A.C.R.; COLOMBO, A.L. revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from latin american medical centers. **J Fungi (Basel),** v. 3, n. 2, pii: E24, 2017.

De HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**, 2nd edition. The Netherlands: Central bureauvoor Schimmel culture, 2000.

De LUCA, C. et al. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. **New Microbiologica**, v. 35, p. 459-468, 2012.

De PAUW, B. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clin Infect Dis,** v. 46, n. 12, p. 1813-21, 2008.

DESAI, J.V.; MITCHELL, A.P. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, p. 1-19, 2015.

DEVADAS, S.M. et al. Auxanographic Carbohydrate Assimilation Method for Large Scale Yeast Identification. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 4, p. DC01-DC03, 2017.

ERLICH, H.A. Polymerase chain reaction. **J Clin Immunol,** v. 9, n. 6, p. 437-47, 1989.

FAGAN, R.P. et al. Incidence trends in pathogen-specific central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1990-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 34, n. 9, p. 893-9, 2013.

FELL, J.W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol,** v. 50, p. 1351–1371, 2000.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, v. 5, p. 359-386, 2015.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature,** v. 8, p. 623-633, 2010.

FORCHE, A. et al. A system for studying genetic changes in *Candida albicans* during infection. **Fungal Genet Biol**, v. 39, p. 38-50, 2003.

FORÉS, R. et al. *Rhodotorula* species fungaemia causes low mortality in haematopoietic stem-cell transplantation. A case report and review. **Mycosis**, v. 55, p. e158-e162, 2012.

FORTÚN, J.; GIOIA, F. Invasive candidiasis in the neutropenic patient. **Rev Esp Quimioter,** v. 30, Suppl. 1, p. 22-25, 2017.

FRADE, J.P.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. **Mycoses**, v. 54, p. e154-e162, 2011.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2007.

GARNER, J.S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. **Am J Infect Control**. v. 16, n. 3, p. 128-40, 1988.

GEGIÉ, M. et al. The importance of serological tests implementation in disseminated candidiasis diagnose. **Coll Antropol**, v. 37, p. 157–163, 2013.

GEORGIADOU, S.P. et al. Candiduria in haematologic malignancy patients without a urinary catheter: nothing more than a frailty marker? **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 311-4, 2013.

GHANNOUM, M.A. *Candida albicans* antifungal resistant strains: studies on adherence and other pathogenicity related characteristics. **Mycoses,** v. 35, p. 131-139, 1992.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOLDANI, L.Z.; CRAVEN, D.E.; SUGAR, A.M. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. **J Med Vet Mycol,** v. 33, p. 267-270, 1995.

GÓMEZ, L.V.; CARDONA-CASTRO, N. Feohifomicosis, una infección fúngica oportunista emergente. **CES Med**, v. 30, n. 1, p. 66-77, 2016.

GOMES, A.C. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rev enferm UFPE**, v. 8, n. 6, p. 1577-85, 2014.

GOTTFREDSSON, M.; COX, G.M.; PERFECT, J.R. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. **Pathology**, v. 30, p. 405-418, 1998.

GRAVELAT, F.N. et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β-glucan from the immune system. **PLoSPathog,** v. 9, n. 8, p. 1-17, 2013.

GREGORY, J.K.; HALLER, J.A. Chronic postoperative *Rhodotorula* endophthalmitis. **Arch Ophthalmol,** v. 110, p. 1686-1687, 1992.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 454–500, 1999.

GUDIOL, C.; AGUADO, J.M.; CARRATALÀ, J. Bloodstream infections in patients with solid tumors. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 298-308, 2016.

GUIMARÃES, A.C. et al. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Rev Bras Enferm**, v. 64, n. 5, p. 864-9, 2011.

GUNASEKERA, A. et al. Identification of GIG1, a GlcNAc-induced gene in *Candida albicans* needed for normal sensitivity to the chitin synthase inhibitor nikkomycin. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 10, p. 1476–1483, 2010.

HACHEM, R. et al. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v. 112, p. 2493-9, 2008.

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

HAZEN, K.C. New and Emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HABASH, M.B. et al. The effect of water, ascorbic acid, and cranberry derived supplementation on human urine and uropathogen adhesion to silicone rubber. **Can J Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 691-4, 1999.

HAN, S.S. et al. Clinical Characteristics and Risk Factors for Nosocomial Candidemia in Medical Intensive Care Units: Experience in a Single Hospital in Korea for 6 Years. **J Korean Med Sci,** v. 25, p. 671-6, 2010.

HEGGENDORNN, L.H. et al. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, v. 2, n. 1, p. 26-47, 2016.

HIGASHI, C.M. et al. Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina,** v. 36, p. 233-242, 2015.

HIRANO, R.; SAKAMOTO, Y.; KUDO, K.; OHNISHI, M. Retrospective analysis of mortality and Candida isolates of 75 patients with candidemia: a

single hospital experience. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 199–205, 2015.

HROMATKA, B.S.; NOBLE, S.M.; JOHNSON, A.D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Mol Biol Cell,** v. 16, p. 4814-4826, 2005.

HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; HO, S.W. Catheter-related sepsis due to *Rhodotorula glutinis*. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, p. 857–859, 2003.

INÁCIO, C.P. et al. Invasive *Candida tropicalis* infection caused by catheter biofilm in a patient with tongue cancer. **Mycophatologia**, v. 184, n. 2, p. 345-346, 2019.

INÁCIO, C.P. et al. Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. **Exp Dermatol**, v. 25, p. 79-81, 2016.

IMBERT-BERNARD, C. et al. Relationship between fluconazole sensitivity of *Candida albicans* isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and CD4+ lymphocyte count. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, p. 711-6, 1994.

Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: p. 126. INCA, 2014.

Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: p. 128. INCA, 2017.

Stewart BW, Wild, CP (editors). World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer – IARC, 2014.

JAIN, P.A.; et al. Comparative study of adherence of oral *Candida albicans* isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells. **Indian J Pathol Microbiol,** v. 53, p. 513-7, 2010.

JONG, A.Y.; et al. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. **Infect Immun**, v. 69, p. 4536-4544, 2001.

JORNVALL, H. et al. Short-Chain Dehydrogenases Reductases (SDR). **Biochemistry**, v. 34, p. 6004-13, 1995.

KHAN, Z.; AHMAD, S.; AL-OBAID, K.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. *Candida kefyr* as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, p. 71-75, 2015.

KAMTHAN, M. et al. Upregulation of galactose metabolic pathway by N-acetylglucosamine induced endogenous synthesis of galactose in *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol**, v. 54, p. 15-24, 2013.

KASAHARA, K.; ISHIKAWA, H.; SATO, S.; SHIMAKAWA, Y.; WATANABE, K. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products. **FEMS Microbiol Lett**, v. 357, n. 2, p. 208-16, 2014.

KATRAGKOU, A.; CHATZIMOSCHOU, A.; SIMITSOPOULOU, M.; GEORGIADOU, E.; ROILIDES, E. Additive antifungal activity of anidulafungin and human neutrophils against *Candida parapsilosis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 66, p. 588–591, 2011.

KATHURIA, S. et al. Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 1823-1830, 2015.

KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 14-18, 2000.

KEARNS, M.; LALA, P.K. Life history of decidual cells: a review. **Am J Reprod Immunol Microbiol,** v. 3, n. 2, p. 78-82, 1983.

KIEHN, T.E.; GOREY, E.; BROWN, A.E.; EDWARDS, F.F.; ARMSTRONG. D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. **Clin Infect Dis,** v. 14, p. 841-6, 1992.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 171-7, 2011.

KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial vc cells. **Infection and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 64-68, 1978.

KLASTERSKY, J.; AOUN, M. Opportunistic infections in patients with câncer. **Annals of Oncology**, v. 4, p. 329-335, 2004.

KO, K.S.; LEE, J.Y.; SONG, J.H.; PECK, K.R. In vitro evaluation of antibiotic lock technique for the treatment of *Candida albicans*, *C. glabrata,* and *C. tropicalis* biofilms. **J Korean Med Sci**, v. 25, p. 1722–1726, 2010.

KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

KRUPPA, M. Quorum sensing and *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 52, p. 1–10, 2008.

Kuehnert, M.J. et al. *Candida albicans* endocarditis associated with a contaminated aortic valve allograft: implications for regulation of allograft processing. **Clin Infect Dis,** v. 27, n. 4, p. 688-91, 1998.

Kurtzman, C.P. Rhodotorula Harrison (1928), p 1911-1912. In Kurtzman CP, Fell JW (ed), The yeasts, a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2011.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 73, p. 331– 371, 1998.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. Tratado de micologia médica. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LASHOF, A.M.L.O. et al. Ocular Manifestations of Candidemia. **Clinical Infectious Diseases,** v. 53, p. 262–268, 2011.

LEIBOVITZ, E. et al. Disseminated fungal infections in childrens infected with human immunodeficiency virus. **Pediatr Infect Dis J**, v. 10, n. 888-94, p. 1991.

LEROY, O. et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). **Crit Care Med,** v. 37, p. 1612–1618, 2009.

LI, W.; XIN, Y.; MCNEIL, M.R.; MA, Y. *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of mycobacteria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, p. 170-178, 2006.

LI, Y.L. et al. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, p. 693, 2003.

LIN, S.; CHEN, R.; ZHU, S.; WANG, H,; WANG, L.; ZOU, J. Candidemia in Adults at a Tertiary Hospital in China: Clinical Characteristics, Species Distribution, Resistance, and Outcomes. Mycopathologia, v. 183, n. 4, p. 679-689, 2018.

LIMA-NETO, R.G.; BELTRAO, E.I.C.; OLIVEIRA, P.C.; NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. Mycoses, v. 54, n. 1, p. 23-9, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 22 DDCT method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIVÉRIO, H.O. et al. Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 59, p. 1-6, 2017.

LOSS, S.H.; ANTONIO, A.C.P.; ROEHRIG, C.; CASTRO, P.S.; MACCARI, J.G. Meningitis and infective endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent patient. **Rev Bras Ter Intensiva,** v. 23, p. 507-509, 2011.

LORTHOLARY, O. et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 2, p. 532-8, 2011.

LORTHOLARY, O. et al. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. **Intensive Care Med**, v. 43, p. 652–662, 2017.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria: A review. **Clin Infect Dis**, v. 32, p. 1602-7, 2001.

MA, C.F. et al. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. **BMC Infect Dis,** v. 13, p. 337, 2013.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-28, 2013.

MAJUMDAR, S.S.; PADIGLIONE, A.A. Nosocomial infections in the intensive care unit. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine,** v. 13, n. 204-208, 2012.

MAJUMDAR, S.; GHATAK, J.; MUKHERJI, S.; BHATTACHARJEE, H.; BHADURI, A. UDPgalactose 4-epimerase from Saccharomyces cerevisiae. A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity. **Eur J Biochem,** v. 271, n. 4, p. 753-9, 2004.

MALANI, A.N.; KAUFFMAN, C.A. *Candida* urinary tract infections: treatment options. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 5, p. 277-84, 2007.

MALISORN, C., SUNTORNSUK, W. Improved β-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal,** v. 43, p. 27-32, 2009.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J. et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 1192–1198, 2014a.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 2, p. 97-103, 2014b.

MARTIN, H. et al. Inhibition of adherence of the yeast *Candida albicans* to buccal epithelial cells by synthetic aromatic glycoconjugates, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 82-93, 2018.

MASSIRER, K.B. et al. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis C. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 5, p. 643-7, 2004.

MATHERS, C.D. et al. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. Geneva: WHO. Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54, 2003.

MILLER, D.J.; MEJICANO, G.C. Vertebral Osteomyelitis due to *Candida* Species: Case Report and Literature Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 523–30, 2001.

MIQUELIN, P.R.S.; REIS, G.R. Comparação entre as taxas de morbimortalidade de pacientes com septicemia em todos os estados da federação e o Distrito Federal. **Revista Amazônia Science & Health,** v. 4, n. 4, p. 20-24, 2016.

MOLINA, G.F.J.; LEÓN, C.; RUIZ-SANTANA, S.; SAAVEDRA, P. Assessment of candidemia-attributable mortality in critically ill patients using propensity score matching analysis. **Critical Care,** v. 16, n. 3, 1-8, 2012.

MONROE D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biol**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007.

MOREIRA, M.E.L.; LOPES, J.M.A.; CARALHO, M. **O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 564 p. 2004.

MOYRAND, F.; LAFONTAINE, I.; FONTAINE, T.; JANBON, G. UGE1 and UGE2 regulate the UDP-glucose/UDPgalactose equilibrium in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 12, p. 2069-77, 2008.

MÜHLHAUSEN, S.; KOLLMAR, M. Molecular phylogeny of sequenced Saccharomycetes reveals polyphyly of the alternative yeast codon usage. **Genome Biol Evol**, v. 6, p. 3222–3237, 2014.

MULLIS, K.B. Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction. Obtido em: www.nobelprize.org. Acesso em: janeiro de 2019.

MUNUSAMY, K.; VADIVELU, J.; TAY, S.T. A study on *Candida* biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. **Rev Iberoam Micol**, v. 35, n. 2, p. 68-72, 2017.

National Center for Biotechnology Information-NCBI. U.S. National Library of Medicine. Obtido de: www.ncbi.nlm.nih.gov / gene / ? term = UDP-glucose - 4 - epimerase+candida. Acesso em: janeiro de 2019.

NEPPELENBROEK, K.H. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Dis**, v. 20, n. 4, p. 329-44, 2014.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into Candida tropicalis nosocomial infections and virulence factors. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

Nicolle, L.E. Asymptomatic bacteriuria: When to screen and when to treat. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, p. 367-94, 2003.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMAMOTO, T. Denture plaque--past and recent concerns. **J Dent**, v. 26, n. 4, p. 299-304, 1998.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, p. 1559-1582, 2006.

NORONHA, C. Estimativa sobre novos de câncer é aliada para controle e prevenção da doença. **Rede Câncer**, p. 12-18, 2008.

NOUR, A.M. et al. Comparison of five RNA extraction methods from rabbit's blood. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, p. 448-450, 2010.

NUCCI, M. Candiduria in hospitalized patients: a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 168-172, 2000.

NUNES, J.M.; BIZERRA, F.C.; FERREIRA, R.C.; COLOMBO, A.L. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 382–389, 2013.

O'DAY, D.M. Value of a centralized surveillance system during a national epidemic of endophthalmitis. **Ophthalmology**, v. 92, n. 3, p. 309-15, 1985.

OLAECHEA, P.M. et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 323-330, 2004.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Rev Latino-Am. Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 233-9, 2010.

OLIVEIRA, R.B.; ATOBE, J.H.; SOUZA, S.A.; SANTOS, D.W.C.L. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome at a Hospital for Infectious Diseases in Brazil. **Mycopathologia,** v. 178, p. 71-78, 2014.

OLIVEIRA, T.F.L. et al. Fatores associados á pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 6, p. 630-6, 2011.

PAIVA, J.A. et al. Characteristics and risk factors for 28-day mortality of hospital acquired fungemias in ICUs: data from the EUROBACT study. **Crit Care**, v. 9, n. 20, p. 53, 2016.

PANNANUSORN, S. et al. Characterization of Biofilm Formation and the Role of BCR1 in Clinical Isolates of C*andida parapsilosis*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 4, p. 438 – 451, 2013.

Pappas, P.G. et al. A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infecioust Diseases**, v. 37, p. 634-643, 2003.

PASWAN, A.K.; RAJU, D.C.; SINGH, D.K.; KHUBA, S.; DUBEY, R.K. Isolation and distribution of *candida* species among different Clinical situations in critically ill patients: prospective Study. **International Journal of Biomedical Research**, v. 3, p. 120- 126, 2012.

PATEL, M. et al. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease,** v. 52, p. 29-34, 2005.

PAUW, B.D. et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. **Clinical Infectious Diseases,** v. 46, p. 1813–1821, 2008.

PEREIRO, M.Jr.; LOSADA, A.; TORIBIO, J. Adherence of *Candida albicans* strains isolated from AIDS patients. Comparison with pathogenic yeasts isolated from patients without HIV infection. **Br J Dermatol,** v. 137, p. 76-80, 1997.

PFALLER, M.A. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases. Practicality and costs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 312-318, 2001.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Azole antifungal drug cross-resistance: mechanisms, epidemiology, and clinical significance. **J. Invasive Fungal Infect**, v. 1, p. 74 –92, 2007.

PFALLER, M.A. et al. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 747–751, 2000.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of Candida parapsilosis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 21, p. 9–14, 1995.

PINNA, A.; CARTA, F.; ZANETTI, S.; SANNA, S.; SECHI, L.A. Endogenous *Rhodotorula minuta* and *Candida albicans* endophthalmitis in an injecting drug user. **Br J Ophthalmol,** v. 85, p. 759, 2001.

PUIG-ASENSIO, M. et al. Epidemiology and outcome of candidaemia in patients with oncological and haematological malignancies: results from a population-based surveillance in Spain. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, p. 491.e1–491.e10, 2015.

RAMIREZ-GARCIA, A. et al. *Candida albicans* Increases tumor cell adhesion to endothelial cells in vitro: Intraspecific differences and importance of the mannose receptor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2013.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): Variations in Rates of Bloodstream Infections Due to Candida Species in Seven Surgical Intensive Care Units and Six Neonatal Intensive Care Units. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 253–258, 1999.

REISS, E. et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Med Mycol**, v. 36, p. 249-257, 1998.

REZAI, M.S. et al. Successful treatment with caspofungin of candiduria in a child with Wilms tumor; review of literature. **J Mycol Med**, v. 27, n. 2, p. 261-265, 2017.

ŘIČICOVÁ, M. et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 3, p. 909-919, 2010.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2004.

RUHNKE, M. et al. Anidulafungin for the treatment of candidaemia/invasive candidiasis in selected critically ill patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 680–687, 2012.

RUMP, L.V.; ASAMOAH, B.; GONZALEZ-ESCALONA, N. Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from *Salmonella* cells. **BMC Res Notes**, v. 3, p. 211, 2010.

RUIZ, L.S. et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, p. 231–239, 2013.

SADROSSADATI, S.Z. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida* species isolated from candideamia in Iran. **Curr Med Mycol**, v. 4, n. 2, p. 14-20, 2018.

SAMARANAYAKE, Y.H.; WU, P.C.; SAMARANAYAKE, L.P.; SO, M.; YUEN, K.Y. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. **J Med Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 250-8, 1994.

SALES-JÚNIOR, J.A. et al. An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9–17, 2006

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 rd. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDAI, D.; TABANA, Y.M.; OUWEINI, A.E.; AYODEJI, I.O. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, p. 1-7, 2016.

SARDI, J.C.O., SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J. Med. Microbiol**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Dtsch Arztebl Int**, v. 106, p. 837–842, 2009.

SEN, M.; SADHALE, P.P. Identification of GAL102 encoded UDP-Glucose 4, 6 dehydratase activity, as a novel virulence factor in *Candida albicans*. Obtido de: http://search.ndltd.org/show.php?id=oai%3Aunion.ndltd.org%3AIISc%2Foai%3Aetd.ncsi.iisc.ernet.in%3A2005%2F2364&back=http%3A%2F%2Fsearch.ndltd.org%2Fsearch.php%3Fq%3Dsubject%253A%2522Biochemical%2Bcharacterization%2522. Acesso em: janeiro de 2019.

SEN, M. et al. UDP-glucose 4, 6-dehydratase activity plays an important role in maintaining cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 11, p. 1-14, 2011.

Secretaria Estadual de Saúde. Plano Estadual de Saúde (PES), Recife-PE, p. 195, 2012.

SILVA, J.J.D. et al. *Candida* species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. **Microb Pathog**, v. 124, p. 203-215, 2018.

SIMON, M.S. et al. Endocarditis Caused by *Rhodotorula* Infection. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 374–378, 2014.

SITTAMPALAM, G.S. et al., editors. **Cell Viability Assays**. Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

SOBEL, M.E.; YAMAMOTO, T.; CROMBRUGGHE, B. Ira Pastan Regulation of procollagen messenger ribonucleic acid levels in Rous sarcoma virus transformed chick embryo fibroblasts. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2678–2684, 1981.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 13, p. 322-370, 2000.

SOLL, D.R.; LOCKHART, S.R.; ZHAO, R. Mating and virulence of *Candida albicans*. **Mycologist**, v. 17, p. 64-69, 2003.

STROLLO, S.; LIONAKIS, M.S.; ADJEMIAN, J.; STEINER, C.A.; PREVOTS, D.R. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, p. 7-13, 2017.

TALAAT, M. et al. Surveillance of catheter-associated urinary tract infection in 4 intensive care units at Alexandria university hospitals in Egypt. **Am J Infect Control**, v. 38, p. 222-8, 2010.

TANG, H.J.; LIU, W.L.; LIN, H.L.; LAI, C.C. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-8, 2014.

TEIXEIRA-LOYOLA, A.B.A. et al. Ocorrência e perfil de suscetibilidade de *Candida* sp. em hemoculturas de um hospital universitário. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 46, p. 398-403, 2013.

THANOS, L. et al. Multifocal skeletal tuberculosis with *Rhodotorula minuta* co-infection. **Scand J Infect Dis**, v. 38, p. 309-17, 2006.

TONER, L. et al. *Candida* growth in urine cultures: a contemporary analysis of species and antifungal susceptibility profiles. QJM: An **International Journal of Medicine**, v. 109, n. 5, p. 325–329, 2016.

TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiol Res**, v. 198, p. 27-35, 2017.

TRAGIANNIDIS, A.; TSOULAS, C.; KERL, K.; GROLL, A.H. Invasive candidiasis: Update on current pharmacotherapy options and future perspectives. **Expert Opin. Pharmacother**, v. 14, p. 1515–1528, 2013.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.P.; ROBERT, R. Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. **Eur J Cell Biol**, v. 50, p. 285–290, 1989.

Viscoli, C. et al. Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 1071–9, 1999.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95–105, 2014.

YOSHIJIMA Y, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. **Mycoses**, v. 53, p. 221–226, 2010.

YU, S.B. et al. The Activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, v. 182, p. 459-469, 2017.

YURKOV, A.M. et al. Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f. a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchieii* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 173-185, 2015.

WALTIMO, T. et al. Examination on *Candida* spp. in refractory periapical granulomas. **Int Endod J**, v. 36, p. 643-7, 2003.

WANG, E. et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, p. 2362–2368, 2015.

WANG, Y. et al. Detection of *Candida albicans* Sap2 in cancer patient serum samples by an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of candidiasis. **Indian Journal of pathology and technology**, v. 56, n. 3, p. 243-247, 2013.

WANG, Q.M. et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 149–189, 2016.

WILLAERT, R.G. Adhesins of Yeasts: Protein Structure and Interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 119, p. 2-28, 2018.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2004.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, U.S.A.: Academic Press. p. 315-22, 1990.

ZHOU, J.; CHEN, M.; CHEN, H.; PAN, W.; LIAO, W. *Rhodotorula minuta* as onychomycosis agent in a chinese patient: first report and literature review. **Mycoses**, v. 57, p. 191-5, 2014.

ZNAIDI, S.; NESSEIR, A.; CHAUVEL, M.; ROSSIGNOL, T.; D'ENFERT, C.A. Comprehensive Functional Portrait of Two Heat Shock Factor-Type Transcriptional Regulators Involved in *Candida albicans* Morphogenesis and Virulence. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 8, p. e1003519, 2013.

APÊNDICE A - PARECER CONSUBSTANCIADO

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE Gal102 EM ESPÉCIES DE Candida ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS

Pesquisador: Rejane Pereira Neves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49802215.8.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.343.813

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, do Departamento de Micologia - CCB - UFPE, pelo aluno Cícero Pinheiro Inácio, sob a orientação da Prof.ª Dr.ª Rejane Pereira Neves.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: - Avaliar e comparar a expressão do gene gal102 da capacidade de adesão e formação de biofilme em espécies de Candida isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias malignas, atendidos em unidades especializadas na cidade de Recife-PE.

Objetivos Secundários: - Isolar e identificar leveduras provenientes de processos infecciosos de pacientes com câncer, atendidos em unidades especializadas, na cidade de

Recife - PE;

- Avaliar o grau de virulência das cepas quanto à capacidade de aderência das células de leveduras a células epiteliais humanas;
- Avaliar o grau de virulência das cepas quanto à capacidade de formação de biofilme;
- Detectar a presença do gene Gal102 dos isolados clínicos de Candida;
- Verificar a expressão do gene Gal102 dos isolados clínicos de Candida;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER-SPCC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE Gal102 EM ESPÉCIES DE Candida ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS

Pesquisador: Rejane Pereira Neves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49802215.8.3001.5205

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.412.589

Apresentação do Projeto:

A mortalidade ocasionada por neoplasias malignas constitui uma das principais causas de morte. Ao mesmo tempo, as infecções ocasionadas por fungos que acometem esse grupo de pacientes contribuem para a elevação na taxa de morbidade e mortalidade, sendo frequentemente responsáveis por quadros graves que podem conduzir o paciente a óbito. Frequentemente, as infecções em humanos são ocasionadas por biofilmes patogênicos, que quando aliados a condições predisponentes, como tratamentos invasivos pelo uso de cateter e sondas e outros dispositivos médicos, favorecem o surgimento destas infecções comumente associadas a um mau prognóstico. A parede celular desempenha um papel crucial para a formação e arquitetura do biofilme fúngico, sendo que foi demonstrado que a galactose, um carboidrato de parede celular, está associada a cepas mais virulentas. A galactose é um dos principais carboidratos presentes na parede celular de Candida albicans. Assim, é possível que o gene Gal102, recentemente relacionado ao metabolismo da galactose em C. albicans, seja um elemento crucial na integridade da parede celular e quanto à capacidade de aderência e formação de biofilmes patogênicos. Em modelo experimental de candidíase sistêmica, foi demonstrado que a deleção do gene Gal102 promoveu uma maior sensibilidade frente a agentes desestabilizadores da parede celular, contribuindo para a virulência em C. albicans. Contudo, não se sabe se a virulência variável nessa

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO

Mycopathologia
https://doi.org/10.1007/s11046-018-0316-z

MYCOPATHOLOGIAIMAGE

Invasive *Candida tropicalis* Infection Caused by Catheter Biofilm in a Patient with Tongue Cancer

Cicero Pinheiro Inácio · Paulo Sergio Ramos de Araújo · Fabio André Brayner · Luiz Carlos Alves · Dyana Leal Veras · Rejane Pereira Neves

Received: 6 December 2018 / Accepted: 28 December 2018
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract Systemic infections due to *Candida tropicalis* are conditions which can frequently lead to death. The aim of this report is to describe the death. The aim of this report is to describe the features of *C. tropicalis* biofilm in a patient with catheter-associated fungemia.

Keywords Biofilm · Cancer · *Candida* · Invasive infection · Scanning electron microscope

Several factors may influence the immune deficiency of hosts and result in a greater predisposition to fungal infections among cancerous individuals. It has been observed that fungal biofilms in medical devices represent a hazard and are considered one of the main causes of therapeutic failure. Furthermore, infections of this nature usually present a poor prognosis, especially when the diagnosis of infection is late, and result in high mortality rates. We therefore describe an atypical case of catheter-related intermittent invasive infection by *Candida tropicalis* in a patient with tongue cancer.

The yeast was isolated from the blood and catheter, and both were further identified as *C. tropicalis* by the sequence of D1/D2 domains of the ribosomal DNA using the primers NL1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′) and NL4 (5′-GTCCGTGTTTCAAGACGG-3′). Phylogenetic analysis, conducted in MEGA7, showed that the two strains clustered with the specie type of Y-12968T with a high bootstrap value (99%). After this procedure, *C. tropicalis* strain was incorporated in the URM Culture Collection (Recife, Brazil), under access number URM7549, and the newly generated sequence in the NCBI GenBank database, under access number MF197316.

The patient did not receive antifungal drugs, but improved after catheter removal. The fact that the patient presents normal values of neutrophil count and stable clinical and physical signs may have contributed to clinical improvement, even without anti-

A1 Handling Editor: Vishnu Chaturvedi.

A2 C. P. Inácio · R. P. Neves (✉)
A3 Departamento de Micologia, Universidade Federal de

Author Proof
UNCORRECTED PROOF