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

ANA PAULA SANTIAGO ROCHA

INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIAGNÓSTICO E APLICAÇÃO DA HEMOPEXINA EM MODELOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

RECIFE
2019

ANA PAULA SANTIAGO ROCHA

INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIAGNÓSTICO E APLICAÇÃO DA HEMOPEXINA EM MODELOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Médica

Orientadora: Profª. Rejane Pereira Neves
Co-orientadora: Profª Patrícia Albuquerque

RECIFE
2019

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Rocha, Ana Paula Santiago

Infecções fúngicas sistêmicas em unidade de terapia intensiva: diagnóstico e aplicação da hemopexina em modelos biológicos in vitro / Ana Paula Santiago Rocha. – 2019.

92 f.: il.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.
Coorientadora: Patrícia Albuquerque.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2019.
Inclui referências e anexo.

1. Micologia. 2. Candidíase. 3. Unidade de tratamento intensivo. I. Neves, Rejane Pereira (orientadora). II. Albuquerque, Patrícia (coorientadora). III. Título.

616.96 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2020-022

ANA PAULA SANTIAGO ROCHA

INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIAGNÓSTICO E APLICAÇÃO DA HEMOPEXINA EM MODELOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 20\02\2019

BANCA EXAMINADORA

.....
Profª. Dra. Rejane Pereira Neves (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

.....
Profª. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

.....
Dr. Luiz Nascimento Araújo Neto (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

.....
Dra. Maria Daniela Silva Buonafina (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

.....
Profª. Dra. Oliane Correia Magalhães (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICO ESTE TRABALHO À TODOS AQUELES QUE APRECIAM A GRANDE E VASTA ÁREA DO MUNDO MICOLÓGICO!

Ana Paula Rocha

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar,

Agradeço a Deus por permitir a realização de mais uma conquista e realização na minha vida profissional;

A Universidade Federal de Pernambuco por fazer parte desta grande comunidade acadêmica; bem como ao CNPQ pelo fornecimento do benefício financeiro durante o período de estudos;

A professora Rejane Pereira Neves, pela paciência, compreensão e ajuda ao longo do decorrer dessa jornada acadêmica;

Aos professores: Oliane, Armando, Reginaldo e Danielle pelas diversas ajudas e orientação ao longo deste e de outros trabalhos;

A Dra. Michelle pela contribuição na elaboração dos manuscritos, frutos desta pesquisa;

A profa. Patrícia Albuquerque (Universidade de Brasília) pela colaboração, parceira e fornecimento de insumos para finalização do projeto, bem como a Chefe do laboratório Profa. Ildynete da Silva Pereira.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular da UNB, pela ajuda e amizade durante o período que estive presente;

A estimada colega Madi pelo suporte fornecido na obtenção dos materiais;

Aos colegas do Departamento de Micologia;

Aos amigos verdadeiros do Laboratório de Micologia Médica (‘’aquele grupo’’), os quais tanto contribuíram para o amadurecimento, aprendizado, descontração e fortalecimento de uma amizade;

Ao meu esposo Rafhael pelo apoio e compreensão nos momentos fáceis e difíceis da vida; inclusive pela distância em regiões diferentes.

Aos meus pais Carmen e Watson pelo apoio, ajuda e sabias palavras nos momentos de indecisões tanto de cunho pessoal quando profissional.

Obrigada!

RESUMO

A incidência de infecções nosocomiais ou IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) por fungos tem aumentado significativamente nas últimas décadas, acarretando altos índices de mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva. Esses índices, por sua vez, se tornam mais expressivos quando tratamos de um grupo particular de indivíduos, ou seja, pacientes imunocomprometidos. Desta forma, estas infecções podem desencadear respostas imunológicas no hospedeiro, o qual necessita de células específicas para debelar o agente etiológico do processo infeccioso. Assim, o trabalho teve como objetivo determinar a atividade da hemopexina frente a neutrófilos e fungos em modelo biológico *in vitro.* Para os ensaios, foram obtidos 56 isolados fúngicos de pacientes internados em unidade de terapia intensiva de dois hospitais públicos da cidade do Recife-PE. Foi realizada a detecção da hemopexina no soro dos pacientes e indivíduos sadios, além da cultura de células dos neutrófilos para o ensaio de fagocitose *in vitro.* Os ensaios foram realizados frente a espécies de *Candida albicans, C. tropicalis, C. glabrata* e *Kodamaea ohmeri*, onde foi cauculado o índice de fagocitose (%) e, a contagem do CFU (unidade formadora de colônia), para verificação da atividade da molécula frente aos neutrófilos e fungos, em diferentes concentrações da hemopexina. Foram isoladas 17 cepas de *Candida albicans* (30,35%); 17 *C. tropicalis* (30,35%); 9 *C. parapsilosis* (16%); 7 *Cryptococcus neoformans* (12,5%); 4 *Candida glabrata* (7,14%); 1 *Kodamaea ohmeri* (8,92%); 1 *Candida norvegensis* (8,92%). A análise dos neutrófilos mostrou que dos 56 (100%) pacientes com infecção fúngica sistêmica, 42 (75%) apresentaram neutropenia. Enquanto que 14 (25%) apresentaram discreta neutrofilia. Além disso foi observado que nas diferentes concentrações empregadas da hemopexina de [0 µg/mL], [1 µg/mL], [0,5 µg/mL], [0,25 µg/mL], [0,125 µg/mL], [0,062 µg/mL], [0,031 µg/mL] e [0,015 µg/mL], a fagocitose/interação ocorreu em todas elas. Nos isolados de *Candida glabrata*, *Kodamaea ohmeri* e *Candida albicans,* foi observado que a fagocitose melhora na presença da hemopexina, a medida que a concentração aumenta, visto que os ensaios apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$). No ensaio da unidade formadora de colônia (CFU) apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) nos ensaios de fagocitose para *Kodamaea ohmeri* e *Candidia glabrata*, onde apresentaram diferenças significativa ($p<0,05$). Portanto, os níveis reduzidos de hemopexina sérica, pode ser um indicativo de quadro infeccioso em pacientes grave, culminando em um mal prognóstico para o mesmo; ademais, foi visto nos ensaios *in vitro*, que a presença da hemopexina proporcionou uma melhora na

fagocitose nos neutrófilos frente as espécies de *Candida albicans, Kodamaea ohmeri e Candidia glabrata.*

Palavras-chave: *Candida* sp. Fagocitose. Unidade Formadora de Colônias.

ABSTRACT

The incidence of nosocomial infections or IRAS (Infections Relating to Health Care) by fungi has increased significantly in recent decades, leading to high mortality rates in the Intensive Care Units. These index, in turn, become more expressive when we treat a particular group of individuals that is immunocompromised patients. Thus, these infections can trigger immune responses in the host which requires specific cells to clear the etiologic agent of the infectious process. Thus, the work aims to determine the activity of hemopexin against neutrophils and fungi in a biological model *in vitro*. For the tests 56 fungal isolates were obtained from patients admitted to an intensive care unit of two public hospitals in the city of Recife-PE. Detection of serum hemopexin from patients and healthy subjects was carried out in addition to neutrophil cell culture for in vitro phagocytosis assay. The assays were carried out against *Candida albicans, Candida tropicalis, Candida glabrata* and *Kodamaea ohmeri* species, where the phagocytosis index (%) and CFU (colony forming unit) counts were performed to verify the activity of the molecule front to neutrophils and fungi, in different concentrations of hemopexin. 17 *Candida albicans* (30.35%) were isolated; 17 *C. tropicalis* (30.35%); *C. parapsilosis* (16%); 7 *Cryptococcus neoformans* (12.5%); 4 *Candida glabrata* (7.14%); 1 *Kodamaea ohmeri* (8.92%); 1 *Candida norvegensis* (8.92%). Neutrophil analysis showed that of the 56 (100%) patients with systemic fungal infection that 42 (75%) presented neutropenia and 14 (25%) presented mild neutrophilia. In addition it was observed that at different concentrations of hemopexin of [0 μg / ml], [1 μg / ml], [0.5 μg / ml], [0.25 μg / ml], [0.125 μg / ml] , [0.062 μg], [0.031 μg] and [0.015 μg], phagocytosis and interaction occurred in all of them. In the isolates of *Candida glabrata, Kodamaea ohmeri* and *Candida albicans*, it was observed that phagocytosis improves in the presence of hemopexin, as the concentration increases, since the tests presented significant differences ($p < 0.05$). In colony forming unit (CFU) test there were significant differences ($p < 0.05$) in phagocytosis assays for *Kodamaea ohmeri* and *Candida glabrata* where they showed significant differences ($p < 0.05$). Therefore, reduced levels of serum hemopexin may be indicative of an infectious condition in severe patients, culminating in a poor prognosis for hemopexin; In addition it was found in the in vitro assays that the presence of hemopexin provided an improvement in phagocytosis in neutrophils against the species of *Candida albicans, Kodamaea ohmeri* and *Candidia glabrata.*

Key-words: *Candida* sp. Fagocitosis. Colony Forming Unit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ensaio de fagocitose. A) Cultura de células pura dos neutrófilos; B) Ensaio de Unidade Formadora de Colônias e coloração com Panótico..... 50

Figura 2 - Diluições seriadas para posterior plaqueamento em meio sólido Agar Sabouraud Dextrose..... 51

Figura 3 - Ensaio de Unidades formadoras de colônica (CFU). Contagem das colônias utilizando contador de células e marcadas com lápis piloto..... 52

Figura 4 - Isolados fúngicos obtidos a partir das amostras biológicas dos pacientes de UTI..... 53

Figura 5 - Câmara de Neubauer. A, B: Neutrófilos puros, corados com azul de Tripan, evidenciando a viabilidade após a extração. C: Neutrófilos mortos, corados pelo azul de Tripan. Objetiva (40x) 60

Figura 6 - Cultura pura de células de neutrófilos em meio RPMI 1640. Magnificação 40x..... 61

Figura 7 - Cultura de neutrófilos em meio RPMI 1640. Presença de contaminates como eosinófilos, monócitos e linfócitos na lâmica. Objetiva (40X) 61

Figura 8 - Detecção da hemopexina dos pacientes doentes que evoluíram para o óbito pelo método de Elisa-Hpx..... 62

Figura 9 - Ensaio de fagocitose da *Candida glabrata*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva 40x..... 68

Figura 10 - Ensaio de fagocitose da *Candida albicans*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva 40x..... 69

Figura 11 - Ensaio de fagocitose da *Candida tropicalis*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva 40x..... 70

Figura 12 - Ensaio de fagocitose da *Kodamaea ohmeri*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva 40x..... 71

Figura 13 - Índice de fagocitose relacionado as espécies de *Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis* e *Kodamaea ohmeri.* Os dados representam a média e o desvio padrão. Para análise o teste Dunnette foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%..... 72

Figura 14 - Contagem das unidades formadoras de colônia (CFU) para espécies de *Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis* e *Kodamaea ohmeri.* Os dados representam a média e o desvio padrão. Para análise o teste Dunnette foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%..... 73

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 – Gradientes para preparação da solução Percoll para o grupo masculino..... 48

Tabela 2 – Gradientes para preparação da solução Percoll para grupo masculino..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

IRAS Infecções relacionadas à assitência a saúde

ROS Espécies reativas do oxigênio

UTI Unidade de terapia intensiva

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótidio Fosfato

NOX NADPH oxidase

CD91/LRP lipoprotein receptor-related protein

LCR Líquido cefalorraquidiano

LBA Lavado bronco-alveolar

PCIH Programa de Controle de Infecção Hospitalar

SCIH Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

PBS Tampão fosfato salina

PCR Reação em cadeia da polimerase

NK Células naturais killer

PAMPs Padrões moleculares específicos associados aos patógenos

DAMPs Padrões moleculares associados aos danos

LPS Lipopolissacaridio

PMN Granulócitos polimorfonucleares

NETs Armadilhas extracelulares de neutrófilos

PAF Fator de ativação plaquetária

Hx\Hpx Hemopexina

MALDI-TOF Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

BHI *Brain Heart Infusion*

KOH Hidróxido de potássio

SDA Sabouraud dextrose agar

CFU Unidade formadora de colônia

IF Índice de fagocitose %

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14
1.1 OBJETIVOS..... 15
1.1.1 Objetivo geral..... 15
1.1.2 Objetivos específicos..... 16
2 REFERENCIAL TEÓRICO..... 17
2.1 UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)..... 17
2.2 INFECÇÃO FUNGICA SISTÊMICA..... 19
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... 30
2.3.1 Imunidade inata ou natural ou nativa..... 30
2.3.2 Desencadeamento do processo infeccioso..... 31
2.3.3 Migragação dos neutrófilos..... **33**
2.4 HEMOPEXINA..... **37**
2.5 MODELO BIOLÓGICO *IN VITRO*..... **38**
2.5.1 Características gerais da cultura de células *in vitro*..... **38**
2.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS..... **39**
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... **43**
3.1 ASPECTOS ÉTICOS..... **43**
3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS..... **43**
3.3 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO..... **44**
3.4 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA TAXONOMIA CLÁSSICA..... **44**
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA TAXONOMIA AUTOMATIZADA (VITEK 2 COMPACT) **44**
3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR..... **45**
3.6.1 Extração do dNa..... **45**
3.6.2 Amplificação da região ITS do rdna e reação primer espécie-específico..... **45**

3.6.3 Análise bioinformática..... **46**
3.7 DETERMINAÇÃO DO QUANTITATIVO DE NEUTRÓFILOS DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS..... **46**
3.8 DOSAGEM DE HEMOPEXINA SÉRICA NAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS..... **46**
3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO..... **47**
3.9.1 Preparação das células fúngicas..... **47**
3.9.2 Isolamento de neutrófilos de indivíduos saudáveis e cultura celular *in vitro* **47**
3.9.3 Obtenção de hemopexina **48**
3.9.4 Ensaio de fagocitose..... **48**
3.9.5 Ensaio de CFU (unidade formadora de colônias) **50**
3.9.6 Análise estatística..... **51**
4 RESULTADOS **52**
4.1 DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES INTERNADOS NAS UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA..... **52**
4.2 ANÁLISE DO QUANTITATIVO DE NEUTRÓFILOS DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS..... **57**
4.3 CULTURA DE CÉLULAS DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO*..... **58**
4.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA HEMOPEXINA NO PLASMA DOS PACIENTES E DE INDIVÍDUOS SADIOS..... **61**
4.5 ENSAIO DE FAGOCITOSE *IN VITRO*..... **65**
4.5.1 Infecção de neutrófilos humanos por leveduras *in vitro*, hemopexina e CFU **65**
5 CONCLUSÕES...... **75**
REFERÊNCIAS..... **76**
ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA..... **92**

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções nosocomiais ou Iras (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) por fungos tem aumentado significativamente nas últimas décadas, acarretando altos índices de mortalidade. Tais índices por sua vez, atingem em média 60%, sendo essas infecções mais frequente em pacientes graves internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Pereira *et al.,* 2016; Souza; Neufeld, 2016). Essa elevada incidência se deve principalmente ao maior número de pacientes imunocomprometidos, tratamentos prolongados, uso de medicamentos a longo prazo e a longos períodos de internação, sendo alvo de preocupação constante pelos profissionais da saúde (Pappas, 2006; Jung *et al*., 2015).

Espécies de *Aspergillus* e *Candida* estão entre os agentes etiológicos mais frequentemente isolados (Saene *et al*., 2009). *Candida* sp., é responsável por até 78% das infecções fúngicas, sendo o sexto patógeno mais comumente isolado em infecções adquiridas no ambiente hospitalar e a quarta maior causa de sepse (Hajjeh *et al.*, 2004; Cuéllar-Cruz *et al*., 2012; Neufeld, 2016).

Como vimos, as infecções fúngicas sistêmicas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade especialmente em indivíduos que apresentam algum tipo de deficiência do sistema imunológico, deixando-o susceptível a adquirir algum tipo de infecção fúngica oportunista (Leal Jr *et al*., 2012).

Essas infecções por sua vez, desencadeiam respostas imunológicas no hospedeiro, o qual necessita de células específicas para debelar o agente etiológico do processo infeccioso (Burke, 2003; Spiller *et al.,* 2011; Antas *et al*., 2012). Nesse processo, as células polimorfonucleares ou especificamente os neutrófilos são as primeiras células de defesa a migrarem para o local da infecção mediante a sinalização de moléculas específicas como as quimiocinas e citocinas, sendo essa resposta inflamatória, a chave para neutralizar o patógeno. De acordo com Silva *et al.* (2013) e Pliyev (2013), essas células sintetizam moléculas especificas como as Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) e Nicotinamida Adenina Dinucleótidio Fosfato (NADPH), que atuam potencializando o efeito microbicida dos polimorfonucleares (Mantovani *et al*., 2011).

Ademais, os neutrófilos produzem NADPH oxidase (NOX) que catalisa a conversão da molécula de O_2 em ânion superóxido O_2-. Indivíduos que apresentam defeitos hereditários na síntese das NOX demostram uma maior susceptibilidade a desencadear infecções microbianas. Tais infecções, ainda podem ser potencializadas pela

ação de moléculas existentes no plasma, a exemplo da hemopexina, a qual impede a migração neutrofílica para o sítio da infecção. Em contrapartida, a expressão específica das NOX pelos neutrófilos implica na destruição do patógeno (Segal *et al*., 2009; Han *et al*., 2010; Leal Jr *et al*., 2012).

A hemopexina (Hx) é uma glicoproteína plasmática com peso molecular de 60KDa, a qual apresenta elevada afinidade pelo grupamento heme na proporção de 1:1 e ligação com o receptor CD91/LRP (*lipoprotein receptor-related protein*) (Lin *et al*., 2015). Essa molécula é formada por uma cadeia simples de polipeptídios associados a 20% de carboidratos, a qual, junto com a haptoglobina e transferrina, forma o quarto grupo mais abundante de proteínas carreadoras, depois da albumina, imunoglobulinas e proteases plasmáticas. Alguns trabalhos, trazem a hemopexina como um fator adjuvante no que concerne o processo infeccioso, agravando ainda mais o estado imunológico do paciente. Porém, o real papel desta molécula no organismo ainda não está bem elucidado, principalmente quando se refere a infecções fúngicas. Considerando ainda que poucos trabalhos foram realizados até o momento no sentindo de elucidar o efeito da hemopexina em infecções fúngicas; é possível que esta molécula potencialize a susceptibilidade a estes tipos de infecções em pacientes imunocomprometidos.

O diagnóstico laboratorial micológico participa nesse contexto, como um fator importante no processo de identificação do agente etiológico que está ocasionando este processo infeccioso. Assim, o diagnóstico de uma infecção fúngica sistêmica vai depender de vários fatores como: o sitio de infecção, podendo ocorrer tanto na corrente sanguínea quanto nos órgãos sólidos; o material biológico que será submetido a análise micológica (LCR, sangue, urina, LBA e outros materiais); bem como, a técnica\método específico de coleta empregado para aquele tipo de material biológico. Além do mais, novas tecnologias aplicadas ao diagnóstico, vem sendo desenvolvidas para facilitar e diminuir o tempo de espera do resultado para o paciente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Determinar a atividade da hemopexina frente a neutrófilos e fungos em modelo biológico *in vitro.*

1.1.2 Objetivos específicos

a. Coletar amostras clínicas, principalmente sangue, em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva;
b. Isolar e identificar os fungos presentes nas amostras clínicas dos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva;
c. Determinar os níveis de neutrófilos em amostras de sangue dos pacientes e de indivíduos sadios;
d. Realizar cultura de células de neutrófilos;
e. Detectar e quantificar hemopexina no plasma dos pacientes e de indivíduos sadios;
f. Realizar ensaios biológicos *in vitro* para verificar o comportamento dos neutrófilos e hemopexina, frente a fungos;
g. Determinar a correlação dos níveis de hemopexina e contagem e atividade de neutrófilos na susceptibilidade das infecções fúngicas em pacientes de UTI.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)

Nas últimas décadas, o avanço científico e tecnológico possibilitou a utilização de novos procedimentos terapêuticos nas unidades hospitalares, aumentando e melhorando a sobrevida dos pacientes em estado crítico. Por outro lado, a realização desses procedimentos, bem como o aumento da sobrevida desses indivíduos, expõe o paciente a um maior risco de desenvolvimento de IRAS ou infecções hospitalares (Oliveira *et al*, 2010; Pereira *et al,* 2016; De Souza *et al* 2017.). No Brasil, estima-se que as infecções hospitalares sejam responsáveis por aproximadamente cerca de 45.000 óbitos e por prejuízos da ordem de bilhões de reais anualmente para os cofres públicos (Han *et al*., 2010; Almeida *et al*., 2012; Papas, 2012).

A UTI é uma área crítica, restrita, de extrema importância e destinada à internação de pacientes graves, que requerem atenção profissional especializada de forma contínua e integrada, materiais específicos e tecnologias necessárias ao diagnóstico preciso, monitorização e tratamento apropriado dos pacientes criticamente doentes. Tal setor constitui um nível de atendimento à saúde de alta complexidade dentro do hospital, atuando de forma decisiva quando há instabilidade de órgãos e risco de morte ao paciente (De Sousa *et al*., 2014; De Sousa *et al*., 2016).

As UTIs representam em média de 10 a 15% dos leitos hospitalares, cuja demanda tem crescido gradativamente em mais de 17% na última década, correspondendo à tendência crescente na complexidade dos pacientes que se internam em hospitais (Costa *et al*., 2009; De Sousa *et al*., 2014).

Segundo os dados do Ministério da Saúde, pacientes internados em UTI têm de 5 a 10 vezes mais chances de contrair uma infecção e que estas, podem representar cerca de 20% do total das infecções em uma unidade hospitalar (Lima *et al.*, 2007). Sendo assim, infecção hospitalar é a infecção adquirida após 72 horas de hospitalização, e pode também estar relacionada à realização de procedimentos invasivos como cirurgias, sondas, cateter, acesso venoso e entre outras no âmbito hospitalar (Menezes *et al*., 2016; Pereira *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; Pereira *et al*., 2016).

Para Pereira *et al.* (2016), o fato de permanecer por longos períodos no ambiente hospitalar, já é um fator de risco para o desenvolvimento de IRAS, pois leva a uma maior exposição ambiental, aumenta a probabilidade de colonização por microrganismos multirresistentes, assim como o risco de infecção cruzada.

Colombo; Guimarães (2003), consideram que infecção hospitalar pode ocorrer também, quando nesse mesmo ambiente houver o isolamento de uma ou mais espécies diferentes (emergente) de microrganismos. Assim, infecções bacterianas e, principalmente as infecções fúngicas, vem ganhando grande destaque dentro deste cenário, representando um grande desafio a equipe médica multidisciplinar, devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas no controle dessas infecções causadas por tais agentes etiológicos.

De modo geral, as infecções oportunistas são representadas por um desequilíbrio entre a microbiota normal do hospedeiro e os mecanismos de defesa, comumente observado em pacientes gravemente acometidos; influenciadas principalmente pela doença de base do paciente, sítio da infecção e agente etiológico (Guimarães *et al*., 2011; Oliveira *et al*., 2011; Althaus *et al*., 2015, De Souza *et al.,* 2017).

Somando-se a isto, outro fator relevante é a presença de microrganismos patogênicos que são amplamente selecionados, ou seja, cepas resistentes a diversos antimicrobianos (Santos, 2004; Barbedo; Sgarbi, 2010; Menezes *et al*., 2016); sendo assim, responsáveis principalmente por pneumonias e infecções da corrente sanguínea relacionados à assistência (Althaus *et al.*, 2015; Rodrigues; Pereira, 2016). Estas, por sua vez, estão entre as mais graves infecções com elevadas taxas de mortalidade na UTI (Diamantis *et al*., 2012; Gahlot *et al*., 2014; Menezes *et al*., 2016).

De acordo com Althaus *et al.* (2015), o uso de cateter venoso central (CVC), é a principal causa de infecções hematogênicas, uma vez que esses microrganismos podem colonizar (formando biofilmes) e se disseminar para a corrente sanguínea, por meio de infusões contaminadas, manipulação do cateter sem adequada técnica e movimentação da própria cânula, causando desta forma, infecção sistêmica.

A sepse é caracterizada como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em reação a um processo infeccioso já instalado. O quadro clínico da sepse inclui sinais clássicos de inflamação, disseminação no organismo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, presença de células pró-inflamatórias e entre outras (Miquelin; Reis, 2016). Desta forma, a sepse pode, dependendo da resposta do organismo evoluir para um prognóstico desfavorável, culminando em choque séptico, falência múltipla dos

órgãos e morte; sendo o diagnóstico precoce crucial para localizar o sítio da infecção (Althaus *et al.*, 2015; Menezes *et al*., 2016).

Desta forma, o diagnóstico laboratorial de uma infecção é de fundamental importância para o tratamento adequado e melhora clínica do paciente. Embora nem sempre seja fácil detectar o foco primário da infecção, esta, deve ser uma preocupação constante para a equipe hospitalar, assim como, a identificação precoce dos microrganismos responsáveis pelo quadro clínico, guiando a equipe médica para melhor escolha terapêutica (Rigatto *et al*., 2011; De Sousa *et al*., 2014; De Souza *et al*., 2017).

Diante dessa problemática, com o intuito de melhorar o monitoramento das taxas de infecção nosocomial, o Brasil dispôs sobre a obrigatoriedade dos hospitais de manterem um Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), e instituir um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), para prevenir o uso indiscriminado de antimicrobianos e germicidas, evitando a resistência e contribuindo para uma redução nos custos hospitalares (Brasil\Ministério da Saúde\ANVISA, 2013).

Todavia, é notável que a ausência de um SCIH atuante em parte dos hospitais e, a atuação de alguns profissionais exercendo a função sem conhecimento adequado das atividades, resultará em maiores taxas de infecção hospitalar, ocorrência de surtos infecciosos não detectados em UTI, surgimento de microrganismos emergentes e resistentes a diversos antimicrobianos e elevado risco ocupacional (Tosin *et al*., 2014).

Infelizmente, os pacientes hospitalizados em UTIs são mais vulneráveis a adquirir algum tipo de infecção em comparação com os demais setores do hospital. Muitos destes pacientes necessitam ser submetidos a múltiplos procedimentos invasivos e têm os mecanismos de defesa imunológicos comprometidos, o que exige o uso de antimicrobianos, especialmente, os de última geração. No geral, essas intercorrências podem contribuir no surgimento de tais infecções, especialmente por cepas multirresistentes, mesmo que a UTI seja o local ideal para o atendimento a pacientes graves recuperáveis (Oliveira *et al*., 2010).

2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS

Os fungos surgiram a aproximadamente 1,5 milhão de anos, sendo um dos primeiros microrganismos utilizados pelo homem em diversas áreas da biodiversidade (Butler, 2010). Estima-se que existam em média de 8,7 milhões de espécies de fungos, sendo que apenas 600 são considerados agentes etiológicos de doenças em humanos. O

primeiro relato de infecção de etiologia fúngica foi conferido a Hipócrates, no século V (a.c), o qual observou a presença de estomatite, conhecida popularmente como afta, presente na cavidade oral de um paciente adulto (Hazen, 1995).

Apesar da evolução das ciências médicas, antigamente, as doenças causadas por fungos ainda eram desconhecidas, tendo como foco principal apenas as doenças de etiologia bacteriana, as quais se faziam presente no final do século XIX. Desta forma, as infecções fungicas em humanos só começaram a ser notadas e consideradas como um sério problema de saúde pública a partir do século XX, devido ao aumento inesperado dos óbitos causados por esses microrganismos (Hazen, 1995).

Dentro deste cenário, observou-se que ao longo dos anos, a incidência de infecções fúngicas sistêmicas nas UTIs têm se elevado gradualmente durante as últimas décadas, sobretudo nos pacientes imunocomprometidos. Assim, podemos citar os portadores de doenças hematológicas malignas, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados, sob tratamento quimioterápico, antibioticoterapia de amplo espectro e uso prolongado de corticóides, além de outras condições clínicas importantes que podem acarretar tais infecções. Ademais, sabe-se que o tempo de permanência no ambiente hospitalar também contribui para esse elevado índice de infecções relacionadas à assistência à saúde (Han *et al*., 2010; Majumdae e Padiglione, 2012; Oliveira *et al*., 2014; Pereira *et al*., 2016).

De acordo com Stefaniake *et al.* (2001), as doenças de etiologia fúngica sistêmica, correspondem aproximadamente 20 a 30% das infecções graves em pacientes portadores de leucemia aguda e crônica, 10 a 15% pacientes com linfoma, 5% com tumores sólidos, 21 a 57% transplantados de medula óssea e 5 a 15% transplantados renais.

A realização de procedimentos invasivos frequentemente utilizados na UTIs, como o uso de tubos endotraqueais, a introdução de cateter intravascular, uso de variados tipos de sondas e a nutrição parenteral também podem contribuir para desenvolvimento de uma fungemia, pelo fato desses microrganismos formarem comunidades fúngicas, bem aderidas, no interior de superfícies inertes; além do procedimento de coleta de sangue inadequado, o qual pode favorecer a penetração do fungo através da pele e seus anexos, e atingir a corrente sanguínea (Morgon; Guirardello, 2004; Patel; Saiman, 2010; Nakamura *et al*., 2013; Gamaletsou *et al*., 2018).

Estima-se que a ocorrência de infecção hospitalar associada ao uso de cateter venoso central, esteja relacionada com aproximadamente 20% dos pacientes que fazem

uso desses dispositivos invasivos, sendo responsável em média por 38% dos óbitos (Neves-Junior *et al*., 2010).

Outros fatores de risco já vistos anteriormente, como o tempo prolongado superior a 15 dias de internação na UTI e o uso de antimicrobianos de largo espectro, principalmente quando utilizado de maneira empírica para o tratamento de uma determinada doença, também estão relacionados a um possível desencadeamento de uma infeção fúngica sistêmica em pacientes críticos (Nakamura *et al.,* 2013; Gamaletsou *et al*., 2018).

Várias espécies de fungos patogênicos conhecidos e oportunistas vem sendo isolados em pacientes como potenciais agentes etiológicos para infecções fúngicas sistêmicas, principalmente nas UTI. Espécies como *Aspergillus* spp*, Candida* spp, *Cryptococcus* sp, e menos frequente alguns fungos demáceos, estão entre os fungos possíveis de serem isolados nessas condições, porém com menos frequência do que os demais (Oliveira *et al*., 2014; Gomes; Cardona-Castro, 2016).

Sabe-se que os fungos patogênicos conhecidos são aqueles que se apresentam bem caracterizados e definidos, seus mecanismos de virulência em relação ao hospedeiro, ou seja, são passíveis de causar doença (Butler *et al.,* 2009). Em contrapartida, os fungos considerados oportunistas são aqueles que podem, algumas vezes infectar indivíduos imunocompetentes causando doença auto-limitada e ao acometer imunocomprometidos, podem causar doenças invasivas, disseminadas e até mesmo com curso clínico fatal (Kaur *et al*., 2017). Estas infecções fúngicas oportunistas por sua vez, representam um grave risco à saúde destes pacientes, pois frequentemente podem levar o indivíduo a óbito. Entre os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos nestas infecções, destacam-se as leveduras do gênero *Candida, Cryptococcus neoformans* e o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (Morschhäuser, 2010; Schwartz e Patterson, 2018.

Segundo Heggendornn *et al.* (2016), aspergilose invasiva, micose causada por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus,* apresenta uma elevada taxa de mortalidade entre 40% a 90% dos casos dependendo da condição clínica do hospedeiro e, principalmente, devido as dificuldades de um diagnóstico precoce. Todavia, quando se tratando de pacientes infantis, em especial aqueles que apresentam algum tipo de malignidade hematológica, esse valor se eleva drasticamente de 80% a 90%.

Em outra condição clínica, como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida, a incidência de aspergilose pulmonar cresceu consideravelmente,

tendo como destaque os indivíduos entre 21 a 40 anos de idade, onde esta micose obteve alta prevalência (Kaur *et al.*, 2017).

Do mesmo modo ocorre para as feohifomicoses, ou seja, infecções cujos agentes etiológicos são fungos demáceos ou melanizados, onde, tais infecções não tão frequentes, podem acometer primordialmente pacientes imunocomprometidos (Gómez; Cardona-Castro, 2016). Essa micose geralmente é causada por fungos pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota*,* os quais podem ser encontrados em qualquer ambiente como solo, água, lascas de madeiras, entre outros (Revankar, 2010).

No entanto, quando se tratando em particular de uma determinada ala hospitalar, sabe-se que a frequência maior de isolamentos nas UTIs é de leveduras do gênero *Candida*, as quais correspondem por cerca de 80% das infecções fúngicas notificadas no SCIH. Tais infecções representam, portanto, um grande desafio à equipe médica de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnóstica das infecções causadas por tais agentes etiológicos (Colombo; Guimarães, 2003; Hajjeh *et al*., 2004; Molina *et al*., 2012).

O gênero *Candida* é constituído de um grupo heterogêneo, formado de aproximadamente 200 espécies de leveduras, porém apenas uma pequena fração é considerada como agente etiológico de infecção fúngica sistêmica. Assim, o grupo que compõe as principais espécies de interesse clínico é constituído pelas espécies *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. No entanto, é frequente o relato de infecções superficiais e invasivas por espécies emergentes, como *C. dubliniensis, C. kefyr, C. rugosa, C. famata, C. utilis, C. lipolytica, C. norvergensis, C. inconspicua, C. pseudorugosa, C. metapsilosis e C. orthopsilosis* (Coleman *et al.,* 1998; Gonçalves *et a*l., 2010).

Esses microrganismos, por sua vez, podem colonizar diversos sítios corpóreos, tais como, orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, mucosa vaginal, urina, fezes, entre outros. Sabe-se, que leveduras fazem parte da microbiota do ser humano, e que, infecções fúngicas sistêmicas causadas por tais microrganismos são consideradas micoses oportunistas, uma vez que, a cepa que coloniza, posteriormente, pode tornar-se infectante (Muhhlhasen; Kollmar, 2014).

Segundo o trabalho de Schulze; Sonnenborn (2009) atribui-se a esse elevado mecanismo de ‘’ causar doenças’’, possíveis alterações no potencial de virulência desse microrganismo ou, falhas no mecanismo de defesa do hospedeiro, os quais acarretam na piora clínica do paciente, podendo culminar com a morte do mesmo.

Assim, a patogenicidade e virulência de um microrganismo, ou seja, dos fungos, são definidas pela sua capacidade de causar e determinar uma doença, mediada por diversos fatores. Dentre eles podemos citar os fatores de virulência: aderência, produção de tubo germinativo, dimorfismo (formação de micélio), variação fenotípica, variação genotípica, formação de biofilme, produção de toxinas, produção de exoenzimas (proteinase e fosfolipase), entre outros (Butler *et al*., 2009; Schulze; Sonnenborn, 2009; Doria *et al*., 2015).

Frequentemente, observamos que a grande maioria dos episódios de infecção fúngica invasiva nas UTIs são ocasionadas por *Candida* spp, se destacando principalmente nas infecções de corrente sanguínea, também conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (Aikawa *et al*., 2016; Gamaletsou *et al*., 2018).

Para Colombo; Guimarães (2003), o termo candidíase hematogênica engloba um amplo espectro de situações clínicas, desde episódios isolados de candidemia até casos onde o fungo presente na corrente sanguínea, dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro infectado, elevando a mortalidade. Esta situação merece atenção especial, já que o diagnóstico de candidemia pode ser definido pela presença de hemocultura positiva do paciente para *Candida s*p (Kol *et al.,* 2010).

De acordo com Furlaneto-Maia *et al*. (2007), a candidíase sistêmica é a principal infecção fúngica de caráter oportunista, expressando a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota natural, podendo variar desde comensalismo a doença sistêmica fatal.

Hachem *et al*. (2008), definiram que alguns sinais e sintomas eram cruciais para nortear a equipe médica para um possível quadro de candidemia, tais como: febre alta e persistente, convulsão, hipotensão ou outro sinal de sepse, sendo a detecção de apenas uma hemocultura positiva, suficiente para confirmar a infecção fúngica.

Assim, alguns estudos epidemiológicos foram realizados ao longo do tempo, com o intuito de demonstrar que a candidíase hematogênica passou por diversas mudanças nas últimas décadas, principalmente com o surgimento de espécies novas ou emergentes (Paswan *et al*., 2012; Yapar *et al*., 2014). De acordo Pfaller *et al*. (2000), nos episódios de candidemia, aproximadamente 54.3% dos casos foram ocasionados por *C. albicans* na sua totalidade.

Apesar de *C. albicans* ser considerada a causa mais comum de infecção fúngica invasivas nosocomial, o crescente número de novas espécies de *Candida* não-*C. albicans*, tem surgido como importante fonte de infecções severas. De acordo com Horn *et al.*

(2009), mais de 50% dos casos de candidemia são causados por espécies de *Candida* não-*C. albicans*, assim, outras leveduras menos comuns têm sido associadas com infecções que ameaçam a vida de hospedeiros imunocomprometidos (Teixeira-Loyola *et al*., 2013; Kullberg; Arendrup, 2015; Flores-Gonzáles *et al*., 2016).

Alguns fatores predisponentes podem contribuir para o desenvolvimento de uma candidíase sistêmica por espécies de *Candida* não-*C. albicans.* Assim, sabe-se que *C. glabrata* e *C. krusei* estão associadas ao uso prévio de fluconazol, *C. tropicalis* a quadros de neutropenia e transplantados de medula óssea, *C. parapsilosis* ao uso de instrumentos invasivos (cateter), nutrição parenteral e principalmente, em pacientes neonatos e *C. albicans* a procedimentos invasivos em UTIs e sepse (Noriega *et al*., 2008; De Sousa *et al.,* 2014).

Ademais, outras causas também corroboram para esse elevado índice de isolamento de espécies de *Candida* não-*C. albicans,* como o uso prolongado e às vezes, indiscriminado de antifúngicos de amplo espectro de ação, favorecendo assim, o surgimento de espécies multirresistentes aos medicamentos disponíveis no mercado (Cuéllar-Cruz *et al*., 2012). Em adição, ainda existem espécies que apresentam naturalmente resistência intrínseca a determinado grupo de antifúngico, como no caso *C. glabrata* a qual apresenta resistência aos compostos azólicos (Cuéllar-Cruz *et al*., 2012; Yoganathan *et al*., 2014; Flores-Gonzáles *et al*., 2016).

Nucci *et al*. (2010), observaram que *C. glabrata* tem emergido como um importante patógeno hospitalar, principalmente em países da Europa, onde é o segundo agente mais envolvido em candidemias e nos Estados Unidos, onde ocupa a terceira posição. Entretanto, na América Latina, esta espécie é responsável por 5% a 8% das infecções na corrente sanguínea. Embora menos frequente que *C. albicans*, as infecções causadas por *C. glabrata* são mais difíceis de tratar e estão associadas a altas taxas de mortalidade. Este fato se deve à maior tolerância inata deste microrganismo aos antifúngicos azólicos. Outro aspecto epidemiológico atribuído a estas leveduras deve-se a sua maior prevalência em pacientes idosos (Kolaczkowski *et al.,* 2009).

Em um trabalho realizado por Benjamin *et al.* (2010), diagnosticaram 137 casos de candidemia em recém-nascidos internados na UTI neo, dentre os quais, os agentes etiológicos isolados foram identificados como *C. albicans* (87), *C. parapsilosis* (41), *C. glabrata* (5), *C. lusitaniae* (1), *C. tropicalis* (1), *C. guilliermondii* (1).

Yoganathan *et al*. (2014), na Índia, relataram um caso incomum de infecção fúngica sistêmica em abcesso cerebral de um recém-nascido internado na UTI, causado

por *C. tropicalis.* Nesse caso, fatores predisponentes como prematuridade, baixo peso ao nascer, antibioticoterapia constante e internamento prolongado, favoreceram o surgimento de espécies emergentes. Entretanto, o diagnóstico rápido associado a correta identificação do agente etiológico é a chave para o progresso do tratamento e melhora clínica do paciente.

Em uma pesquisa realiza por Khan *et al*. (2015), relataram um episódio de candidemia por *C. kefyr* em paciente de UTI com histórico de úlcera péptica e submetida a colecistectomia e histerectomia. Segundo os autores, é possível que a infecção por *C. kefyr* possa ter tido acesso a corrente sanguínea a partir do intestino, já que essa levedura pode ser encontrada fazendo parte naturalmente da microbiota do trato gastrointestinal, devido a sua ocorrência nos laticínios. A identificação taxonômica da levedura foi realizada pelo VITEK 2 (Biomerieux®, França) e confirmada pela biologia molecular, uma vez que esse tipo de levedura não é uma espécie frequente de se isolar.

Candida. inconspicua e *C. norvegensis*, também são espécies de leveduras consideradas emergentes nas UTIs, as quais podem ser isoladas raramente em processos infecciosos invasivos. Por apresentarem características fenotípicas similares, estas são frequentemente identificadas erroneamente pelos sistemas automatizados, fazendo-se necessário a utilização de técnicas mais elaboradas como biologia molecular e MALDI-TOF (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization) para diferenciar entre essas espécies. Além do mais, *C. inconspicua* e *C. norvegensis* apresentam elevada resistência aos compostos azólicos, fazendo as equinocandinas ou a anfotericina B as drogas de escolha em episódios de infecção por este agente (Guitard *et al.*, 2013; Guitard *et al.*, 2015).

Um episódio de candidemia causada por uma levedura rara também foi relatado por Meybeck *et al*. (2016), em paciente de UTI, usuário de drogas injetáveis e portador de hepatite-C. Nesse trabalho, a levedura isolada da hemocultura foi identificada pela espectrometria de massa MALDI-TOF como *C. pulcherrima*. De acordo com os autores, *C. pulcherrima* faz parte da microbiota da cavidade oral em seres humanos, porém em casos de imunossupressão, este fungo pode apresentar comportamento oportunista, assim como as demais espécies de *Candida* não-*Candida albicans*. Os poucos casos relatados na literatura envolvendo infecção sistêmica por *C. pulcherrima,* estão relacionados com uso de cateter permanente para a nutrição parenteral. Além do mais, os sintomas inespecíficos, bem como a difícil identificação da levedura em nível de espécie, podem subestimar a sua incidência e seu papel patogênico frente a uma candidemia.

Flores-Gonzáles *et al.* (2016), noticiaram um primeiro relato de caso de infecção fúngica invasiva por uma espécie nova, *C. fabianii,* em paciente neonato. O fungo foi isolado e identificado pelos métodos automatizados e pelo MALDI-TOF, mostrando a importância do diagnóstico prévio e eficiente nesses episódios de infecções fúngicas invasivas em recém-nascido.

Descrita inicialmente em 2009, *C. auris* teve sua primeira descrição após ter sido isolada do canal auditivo externo de um paciente no Japão. A partir desse episódio, vários casos de infecções por essa levedura vêm sendo relatados, incluindo infecções de corrente sanguínea. Tais relatos foram publicados em vários países, incluindo Colômbia, Índia, Israel, Quênia, Kuwait, Paquistão, África do Sul, Coréia do Sul, Venezuela e Reino Unido (Vallabhaneni *et al.*, 2017).

Atualmente, *C. auris* tem sido apontada como um importante patógeno emergente em infecção fúngica hospitalar. Em março de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou oficialmente uma nota técnica onde relata surtos de *C. auris* em serviços de saúde da América Latina, bem como meios de transmissão e métodos de identificação do patógeno. No Brasil, ainda não foi notificado nenhum caso de infecção por *C. auris*, mas isso não significa que não tenha ocorrido, pois, como a detecção desse fungo requer métodos laboratoriais especializados, e é possível que a ocorrência dessa infecção não tenha sido identificada.

Caracterizada equivocadamente como *C. haemulonii*, *C. famata* e/ou *Rhodotorula glutinis* pelos sistemas automatizados, *C. auris*, hoje, é uma espécie emergente que apresenta um risco eminente devido às altas taxas de mortalidade que vem apresentando nas UTI, sendo considerada como uma séria ameaça à saúde pública global (Calvo *et al*., 2016).

Sarma; Upadhyay. (2017), também analisaram o perfil epidemiológico desse novo patógeno emergente, *C. auris.* Nesse estudo, mostrou que existe uma enorme dificuldade em relação a identificação automatizada desse fungo, bem como, o fato dele se apresentar resistente a todas as classes disponíveis de antifúngicos, mesmo existindo poucas cepas.

Segundo o trabalho de Garzillo *et al.* (2017), *C. parapsilosis* foi a responsável por vários episódios de candidemia em pacientes neonatos em UTI, do hospital escola da Universidade de Nápoles, na Itália. De acordo com o trabalho, o surto dessa levedura foi causado por um único clone da cepa presente na UTI, além do mais, fatores como o baixo peso ao nascer, a idade gestacional e o tempo de exposição a dispositivos invasivos, com predominância de ventilação assistida, foram as condições clínicas associadas à infecção

sanguínea por *C. parapsilosis*. Sabe-se também, que este microrganismo possui alta capacidade de produzir biofilme, sendo frequentemente encontrado colonizando as mãos de profissionais da área da saúde, cateter venoso central e solução de nutrição parenteral (Barbedo; Sgarbi, 2010).

Khadka *et al*. (2017), analisaram um total de 100 espécies de *Candida* isoladas de diversas amostras clínicas (urina, escarro, ponta do cateter, sangue, esfregaços vaginais e tubo endotraqueal) de pacientes de UTI em um hospital de ensino do Nepal. Nesse estudo, os autores observaram que *C. albicans* ainda permanece como a levedura mais isolada (56%), entretanto, detectaram que das espécies de *Candida* não-*C. albicans* identificadas nesses materiais biológicos, *C. tropicalis* foi a levedura mais isolada na urina (48%), seguida pela *C. glabrata* (14%).

Dentre as espécies de *Candida* não-*C. albicans*, *C. tropicalis* é considerada o terceiro agente etiológico mais isolado em uroculturas e é responsável por cerca de 10% dos casos de candidúria. Essa levedura tem sido relatada como uma das espécies de *Candida* mais prováveis de causar infecções hospitalares do trato geniturinário, principalmente nas UTIs (Achkar; Fries, 2010; Kaufman; Fisher, 2011).

Embora seja menos frequente, *C. guilliermondii* raramente é relatada como agente etiológico de uma candidemia, mas ao se tratar de pacientes portadores de doenças hematológicas, como no caso das leucemias, esse fungo pode apresentar um comportamento agressivo (Carvalho-Parahym *et al*., 2009; Tseng *et al.,* 2017). Outra característica atribuída a esta levedura é sua baixa suscetibilidade a antifúngicos como a anfotericina B, triazóis e equinocandinas (Colombo *et al*., 2012).

A espécie *Candida lusitaniae* é uma levedura raramente envolvida em patologias em humanos. Alguns casos, contudo, têm sido relatados tendo esta espécie presente como agente patógeno envolvido em infecções invasivas, particularmente em pacientes imunocomprometidos, com câncer ou que realizaram transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Pfaller; Diekema, 2007; Heeres *et al*., 2010).

Em uma pesquisa realizada por Strollo *et al*. (2017), nos Estados Unidos, entre os anos de 2002 a 2012, mostrou que a candidemia apareceu como a principal causa de infecção fúngica sistêmica nas UTIs, com uma média anual de aproximadamente de 5,3 casos a cada 100.000 habitantes. O fator primordial estava relacionado com o tempo prologando de internamento, sendo o custo médio por paciente de aproximadamente 47 mil dólares para o governo.

Recentemente, duas novas espécies crípticas emergentes de leveduras vêm sendo

relatada como grupo de espécies pertencentes ao complexo *Candida glabrata.* No trabalho de Xou *et al*. (2017), identificaram *C. nivariensis e C. bracarensis* de isolados clínicos humanos, onde, todos foram anteriormente identificados como *C. glabrata*. Porém, ao realizar o sequenciamento da região ITS do rDNA, descobriu-se que se tratavam de espécies filogeneticamente semelhantes a *C. glabrata strict* senso. Assim, espécies crípticas do complexo de *C. glabrata* provavelmente causem manifestações clínicas semelhantes à *C. glabrata strict* senso, é imprescindível a distinção entre elas devido as diferentes respostas aos antifúngicos*;* uma vez que a susceptibilidade tanto *C. nivariensis* quanto *C. bracarensis* têm se mostrado mais resistentes aos medicamentos, incluindo os Azoles.

Outro patógeno de grande importância médica é o fungo oportunista *Cryptococcus* sp, o qual se apresenta como uma levedura formada por uma cápsula polissacaridica, conferindo a este fungo um dos seus principais fatores de virulência contra as células de defesa do sistema imune (Nicola *et al.,* 2012). Esse fungo é cosmopolita, ou seja, pode ser encontrado em qualquer ambiente como na matéria orgânica em decomposição, solo e nas excretas de aves, principalmente de pombos (Barbosa-Junior *et al*., 2013; Pizani; Santos, 2017). A contaminação pelo *Cryptococcus* sp ocorre na maioria das vezes através da inalação de propágulos fúngicos viáveis dispersos no ambiente, sendo a infecção primária nos pulmões, com tropismo pelo sistema nervoso central, mas também podendo atingir a pele, órgãos sólidos e corrente sanguínea (Pizani; Santos, 2017).

Inicialmente, dois agentes etiológicos foram classificados como espécies distintas, *C. neoformans* e *C. gattii*, entretanto cada espécie foi separada de acordo com sua diversidade antigênica. As cepas de *C. neoformans* são dos sorotipos A e D, e as cepas de *C. gattii* são dos sorotipos B e C (Kwon-Chung *et al*., 2017). A descoberta de dois teleomorfos diferentes, um para *C. neoformans* e outro para *C. gattii*, levou ao reconhecimento de duas espécies, que foram posteriormente verificadas por dados de sequência do genoma completo de cada fungo (Kwon-Chung *et al.,* 2017).

Em relação ao potencial de causar doença que cada espécie apresenta, *C. neoformans* é comumente relatado por acometer indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV), transplantados, que fazem uso de medicamentos imunossupressores e entre outros. Já *C. gattii* é mais comum de ocorre em indivíduos imunocompetentes (Nath *et al*, 2016; Tarumoto *et al.,* 2016; Aguiar *et al.,* 2017; Inaba *et al*., 2017). No entanto, dependendo da situação imunológica do hospedeiro, ambos podem ser encontrados em qualquer

paciente e causar meningite, pneumonia e até lesões cutâneas (Hayashida *et al*., 2017). Assim, frequente são os relatos de casos de criptococcose em paciente de UTI, uma vez que estes, apresentam todas as condições propícias ao desenvolvimento desta micose.

Em um estudo epidemiológico realizado por Firacative *et al*., (2018), a América Latina representa o 3º maior número de casos de criptococcose, com uma incidência estimada de 5.300 casos por ano. Destes, o Brasil e a Colômbia foram os países com a maior incidência, entre 1.001 a 2.500 casos, seguido pela Argentina e pelo México com uma incidência de 501 a 1.000 casos (Rajasingham *et al.* 2017). Em particular, uma incidência média anual de 4,5 casos de meningite por *Cryptococcus* sp. (10^6 habitantes) foi relatada na população geral do estado do Rio de Janeiro, Brasil (Leimann and Koifman, 2008; Firacative *et al*., (2018).

Outra levedura, bem menos relatada na literatura, vem ganhando destaque como patógeno emergente nos casos de infecção fúgica sistêmica. *Kodamaea ohmeri,* anteriormente denominada de *Pichia ohmeri*, (Etchells & Bel) corresponde ao estado teleospórico (sexual) de *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* da classe Ascomycetae e família Saccharomycetaceae (Yamada *et al*., 1995). Essa levedura é amplamente utilizada na indústria alimentar para a fermentação de frutas, picles e torresmos (Shaaban *et al*., 2010; Chakrabarti, 2014; Distasi *et al*., 2015).

Nos seres humanos, *K. ohmeri* é responsável por causar vários tipos de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos (como fungemia, endocardite, celulite e peritonite) e em pacientes aparentemente imunocompetentes (Biswal, 2015; Tashiro *et al*., 2018).

Distasi *et al.* (2015), noticiaram o primeiro relato de caso de fungemia na Itália por *K. ohmeri* em paciente de 80 anos, internado na UTI, após sofrer infarto do miocárdio e outras complicações clínicas. Foi isolado após culturas sucessivas, *K. ohmeri* do sangue do paciente*,* e iniciado esquema terapêutico com fluconazol e anfotericina b, porém, o mesmo não resistiu e foi ao óbito.

Vivas *et al*. (2016), expuseram um caso de fungemia em recém-nascido (54 dias de vida), novamente por *K. ohmeri.* Nesse trabalho, o paciente apresentou doença respiratória grave, associado a choque hipovolêmico. Devido ao agravamento do quadro clínico, foi realizado culturas de sangue, onde foi isolado *K. ohmeri* e confirmado pelo diagnóstico molecular, uma vez que os equipamentos automatizados, mostraram resultados dúbios. Após iniciado tratamento com anfotericina B, o mesmo apresentou melhoras clinicas e obteve alta médica.

Kanno *et al.* (2017), no Japão, relataram um caso de infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter causada por *K. ohmeri,* em uma paciente de 58 anos de idade, com história clínica passada de artrite reumatoide e câncer de mama. Nesse trabalho, após alguns dias de internação na UTI, a paciente apresentou infecção do cateter central. O mesmo foi retirado e encaminhado ao laboratório para realização do dos exames microbiológicos, onde foi isolado *K. ohmeri* pelos sistemas automatizados (VITEK2 YST ID card) e confirmado pela biologia molecular. A paciente foi tratada com micafungina, recebendo alta após melhora clínica.

Outro caso recentemente publicado por Tashiro *et al*. (2018) foi de uma paciente de 60 anos, apresentando queimaduras graves (2º e 3ºgrau) em todo o corpo. Foi isolado a partir das lesões de pele e do sangue, *K. ohmeri e Candida krusei.* Foi iniciado tratamento com micafungina e posteriormente, modificado para anfotericina B, porém, não houve resposta aos medicamentos e a mesma, foi a óbito.

Huang *et al*., (2018), relataram um caso de um paciente de 63 anos, recém diagnosticado com câncer gástrico metastático, onde foi isolado do sangue, *K. ohmeri.* Nesse trabalho, o paciente passou por diversas recaídas, fez tratamento antifúngico com anidulafungina, porém, após a primeira sessão de quimioterapia, o mesmo foi a óbito devido à rápida progressão do câncer.

Desse modo fica claro que a identificação correta dos agentes etiológicos das infecções fúngicas, auxilia no conhecimento da epidemiologia destas micoses, uma vez que se pode detectar um episódio recorrente ou uma nova infecção por outra cepa. Os recursos laboratoriais utilizados para o diagnóstico micológico destas infecções são indispensáveis e sua capacidade em definir infecção é inquestionável. Assim, a associação das técnicas já existentes e utilizadas rotineiramente, com as técnicas mais específicas e elaboradas, contribuem para tornar esse diagnóstico ainda mais eficiente e seguro.

2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

2.3.1 Imunidade inata ou natural ou nativa

Há cerca de cem anos, Ehrlich e Metchnikoff descreveram dois mecanismos diferentes pelos quais o hospedeiro é capaz de se defender das infecções microbianas sendo: um mediado por anticorpos, conferindo um tipo de proteção denominada imunidade adaptativa, identificado por Ehrlich; e outro descoberto posteriormente por

Metchnikoff, o qual era mediado por células fagocitárias, sendo responsável pelo desencadeamento da resposta imune inata (Beutler; Poltorak, 2001).

Filogeneticamente, a resposta imune inata precede a resposta adaptativa e, isoladamente, confere proteção para a maioria das espécies animais existentes no planeta. Contudo, quando coexistentes no indivíduo, a resposta contra microrganismos invasores desenvolve-se a partir da interação desses dois braços da imunidade (Lien; Ingalls, 2002).

A resposta inata constitui a primeira linha de defesa contra as doenças infecciosas e é amplamente mediada por células da série branca, como neutrófilos e macrófagos. Tais células são capazes de fagocitar e eliminar o patógeno além de coordenar a resposta imune adicional desenvolvida pelo hospedeiro contra o microrganismo invasor (Aderem, 2003).

As interfaces entre as respostas inata e adaptativa do sistema imune são geradas quando os anticorpos, ao opsonizarem os patógenos, tornam-os suscetíveis à fagocitose pelas células do sistema imune inato e quando as células do sistema inato, após englobarem e destruírem o patógeno no interior dos fagossomos apresentam seus peptídeos a receptores das células T e B, ativando-as. Essa ativação culmina na produção de anticorpos altamente específicos contra o microrganismo invasor (Beutler; Poltorak, 2001; Aderem, 2003). A produção dos componentes humorais da resposta adaptativa confere imunidade protetora ao hospedeiro, ao passo que essa memória imunológica não é conferida pelos mecanismos de defesa da resposta inata (Aderem, 2001; Andrade *et al.,* 2016).

2.3.2 Desencadeamento do processo infeccioso

Abbas *et al*. (2015), definem o processo de resposta imune inata ou natural (nativa), como a primeira linha de defesa do corpo contra microrganismos invasores. Consiste em mecanismos de defesas celulares e bioquímicos, os quais se encontram prontos mesmo antes da infecção e, estão preparados, para responder imediatamente contra um agente ou partícula infecciosa ativa. Assim, destaca-se como os principais componentes da imunidade inata: barreiras físicas e químicas (tecido epitelial e muco), células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células dentríticas, células naturais killer (NK), sistema complemento e alguns mediadores inflamatórios.

Diante de um processo infeccioso ou injúria, o nosso organismo é plenamente capaz de recrutar e sinalizar moléculas específicas para conter ou debelar o patógeno causador da injúria tecidual. Sabe-se que a motilidade dos leucócitos, tanto dos

mononucleares quanto dos polimorfonucleares, da corrente sanguínea para os tecidos intersticiais do hospedeiro é fundamental para a reação de defesa do organismo (Silva *et al*., 2015).

Em um trabalho realizado por Nourshargh *et al*. (2016), sobre a patologia molecular do processo infeccioso, os autores observaram que a ativação da imunidade inata, bem como o recrutamento de células específicas, em particular os neutrófilos, se iniciam por padrões moleculares específicos associados aos patógenos (PAMPs), os quais são liberados pelos microrganismos invasores. Assim, PAMPs são estruturas conservadas, constitutivamente expressas na superfície dos patógenos, e reconhecidas por receptores encontrados em células do sistema imune inato como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Takeda *et al*., 2003; Rasmussen *et al*., 2009)

Existem também os padrões moleculares associados aos danos (DAMPs), derivados dos danos, das células mortas ou de estresse ambiental (Aderem, 2001). Sabe-se que existe uma grande variedade de PAMPs, os quais já foram identificados, e estes incluem 24 diferentes componentes da parede celular de bactérias, como o lipopolissacárido (LPS), lipopeptídios, peptidoglicanos e ácidos lipotecóicos, fragmentos de DNA das bactérias e lipoarabinomanans da parede celular de leveduras (Beutler; Poltorak, 2001; Lien; Ingalls, 2002; Aderem, 2003).

Sabe-se, que o desenrolar do processo inflamatório ou infeccioso necessita da ativação de receptores específicos, os quais desencadeiam uma resposta inflamatória caracterizada por vermelhidão (rubor), calor, inchaço (edema) e dor, indicando os quatro sinais básicos desse processo (Filho, 2016).

Desta forma, tudo se inicia quando os vasos sanguíneos dilatam-se e tornam-se permeáveis, levando ao acúmulo local de proteínas plasmáticas, como componentes do sistema do complemento e fatores de coagulação. Além disso, células residentes no local da infecção começam a produzir uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, culminando no recrutamento de leucócitos aos sítios da infecção. O recrutamento de leucócitos ativados aos locais de infecção é uma das funções mais importantes da imunidade inata (Janeway, 2001; Janeway; Medzhitov, 2002).

Assim, mecanismos moleculares que regulam o deslocamento, bem como a permanência dos leucócitos nos tecidos, são extremamente complexos e necessitam ser fortemente regulados, uma vez que defeitos na migração dessas células podem acarretar desordens imunológicas severas para o hospedeiro (Nourshargh *et al*. 2016).

2.3.3 Migração dos neutrófilos

O entendimento dos mecanismos de migração dos neutrófilos evoluiu consideravelmente nos últimos anos. Embora, apenas na década passada a molécula de adesão tenha sido caracterizada, atualmente, com a evolução das pesquisas, o conhecimento inclui a descrição molecular para numerosas interações entre ligantes e receptores, bem como a descoberta de novas famílias de citocinas e quimiocinas atuantes nesse longo processo (Kuijpers, 2001; Cunliffe, 2003).

Os neutrófilos são leucócitos mais abundantes no sangue periférico, correspondendo em média de 40 a 70% em condições fisiológicas normais. São do tipo granulócitos polimorfonucleares (PMN), os quais são produzidos em grande quantidade na medula óssea durante o processo de hematopoese. É justamente nesse processo, que os neutrófilos passam por diferentes estágios, que são: mieloblastos, promielócito, mielócito, metamielócito e, por fim, polimorfonuclear (Borregaard, 2010).

Essas células possuem um núcleo pleomórfico, multilobulado, citoplasma granuloso e medem aproximadamente 10 μm de diâmetro. Os neutrófilos, também são conhecidos como células terminais já que, não se diferenciam em outro tipo celular. Seu citoplasma é rico em granulações, sendo estas classificadas em primárias, secundárias e terciárias, de acordo com suas características de eletrondensidade à microscopia eletrônica, sendo assim ricos em enzimas digestivas, como hidrolases, peroxidases, fosfatases ácidas, lisozimas, entre outras (Silva, 2015; Nourshargh *et al.*, 2016). Apresentam vida média curta, de aproximadamente 8 a 12 horas na circulação sanguínea, todavia, após ativação e migração para o tecido, a vida média dessas células passa a ser de 2 a 6 dias, retardando desta forma, a apoptose (Kuijpers, 200).

Assim, essa característica associada ao fato de serem células extremamente móveis, explica em parte o porquê dos neutrófilos predominarem nas fases iniciais do processo infecioso ou inflamatório em relação às demais células. Desta forma, por serem células particularmente fagocitárias, devido a uma grande quantidade e variedade de enzimas no seu interior, o processo de fagocitose geralmente é acompanhando de uma intensa atividade metabólica pelo elevado consumo de oxigênio e consequentemente, pela produção das Espécies Reativas do Oxigênio *(ROS*). Além do mais, a degranulação e a formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) também fazem parte do processo de eliminação de patógenos (Brinkmann *et al*., 2012; Mayadas *et al.,* 2013;

Silva, 2015; Andrade *et al*., 2016).

A fagocitose representa um antigo mecanismo de adaptação celular nos organismos, de forma geral. Nos seres mais primitivos, ela é utilizada primariamente para a aquisição de nutrientes, enquanto que, em organismos superiores, ela é desempenhada por células especializadas (ex. macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), tornando-se indispensável na realização de uma grande variedade de eventos biológicos especializados como alimentação, defesa e excreção (Aderem, 2003). A fagocitose de microrganismos pelos neutrófilos é bem eficiente após a opsonização de patógenos pelas proteínas do hospedeiro, tais como a molécula C3b e C3bi do complemento (Lee *et al*., 2003).

O processo fagocítico é um mecanismo de defesa natural e essencial da resposta imune inata. O contato da célula fagocitária com o microrganismo é acompanhado de sinais que ativam processos celulares tais como rearranjo do citoesqueleto com tráfego da membrana citoplasmática, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo (Underhill; Ozinsky, 2002; Filho, 2016).

De acordo com Amaluc *et al*. (2012), os neutrófilos possuem alguns receptores específicos de quimiocina, como o CXCR4 e CXCR2, os quais são de fundamental importância para a manutenção e liberação dos neutrófilos na medula óssea, respectivamente. Por serem expressos em algumas células, como as endoteliais, estromais e osteoclastos, esses receptores fazem com que os neutrófilos fiquem retidos na medula até completarem totalmente seu processo de maturação. Quando estão prontos, os mesmos são estimulados via receptores CXCR2 e G-CSFR para serem liberados na corrente sanguínea (Silva, 2015; Swamydas *et al.,* 2016).

Assim, a sequência inicial para recrutamento dos neutrófilos é dividida em etapas, onde em cada uma dessas etapas, existe a atuação de células e evento moleculares específicos com o objetivo de conter o processo infeccioso; sendo elas: mobilização, marginação e "rolling"; adesão e transmigração (Reddy; Standiford, 2010) (Figura 1).

Mobilização

Na etapa da "mobilização'', a participação de moléculas específicas como o fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF), influencia, sob condições clínicas

normais, a liberação de granulócitos maduros pela medula óssea (Furze; Rankin, 2008). Quando, sob condições inflamatórias e/ou infecciosas, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) estimulam ainda mais a liberação de granulócitos mediada pelo G-CSF, aumentando o número e a proporção de granulócitos circulantes. Na ausência de inflamação, os neutrófilos circulam por um curto período de tempo (aproximadamente 6 horas) até serem destruídos no fígado, baço ou medula óssea (Furze; Rankin, 2008). Nas situações de inflamação, a meia-vida dos neutrófilos que migram para os sítios de avaria é prolongada por mediadores inflamatórios locais, como quimiocinas e outras moléculas capazes de direcionar a migração dessas células (Hofman, 2004).

Marginação e "Rolling"

Na etapa de marginação e rolamento, o movimento dos leucócitos em direção à periferia do vaso (marginação) permite uma interação de baixa afinidade entre tais células e o endotélio vascular ("rolling"). As principais moléculas efetoras dessas interações são chamadas de L-selectinas, expressas na superfície dos leucócitos circulantes, e de E-selectinas e P-selectinas, expressas na superfície endotelial após a ativação por quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (Muller, 2003; Borregaard, 2010; Filho, 2016).

Adesão

Nessa etapa, o mecanismo de adesão, caracterizado por interações de alta afinidade entre os neutrófilos e o endotélio vascular, é induzido a partir do contato de baixa afinidade entre tais células ("rolling") e da ativação de quimiocinas. As principais moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos (integrinas) interagem com as moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais (ICAM-1 e VCAM-2), cuja finalidade é garantir uma ligação forte entre essas células (Reddy; Standiford, 2010; Filho, 2016).

Transmigração

A etapa final do recrutamento dos leucócitos consiste na passagem dessas células através de junções estreitas no endotélio vascular em direção aos tecidos injuriados. O

processo de transmigração é guiado por gradientes de substâncias específicas capazes de induzir a migração celular. Tais substâncias atrativas podem ser componentes dos microrganismos, moléculas do próprio hospedeiro (componentes do complemento, eicosanoides, fator de ativação plaquetária (PAF) e quimiocinas). Essas substâncias servem não só para direcionar os leucócitos para determinadas regiões, como também para recrutar subpopulações específicas de leucócitos para a zona da infecção ou inflamação (Muller, 2003). Nesse caso em particular, atuam especialmente a interleucina 8 (IL-8), a qual atrai principalmente as populações de neutrófilos para os tecidos inflamados ou infectados (Bokoch,1995; Hammond *et al.,* 1995; Henkels *et al.*, 2011).

Sabe-se, que a presença de um patógeno pode induzir ativação dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos, dependentes ou não de oxigênio. Essa ativação induz alterações funcionais associadas à degranulação e liberação de enzimas neutrofílicas específicas (Borregaard *et al*., 2007). Assim, os grânulos dos neutrófilos são classificados de acordo com seu conteúdo enzimático (afinidade com corante azul A) e são formados através de um processo contínuo, onde vesículas brotam do Complexo de Golgi e se fundem, adquirindo estrutura granular (Borregaard, 2010; Silva, 2015). São reconhecidas 3 categorias de grânulos neutrofílicos:

- Grânulo Primário ou Azurofílico, que contém enzimas como a mieloperoxidase (MPO), α-defensinas e serina proteases;

- Grânulo Secundário ou Específico: contém lactoferrina, uma substância que sequestra ferro;

- Grânulos Terciários ou Gelatinosos: contêm gelatinases como a metaloproteinase-9 (MMP-9);

A produção de ROS acontece na membrana plasmática do fagolisossomo por um processo chamado *burst* (surto ou explosão) oxidativo ou respiratório. O *burst* oxidativo é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são geradas por mecanismos dependentes da mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos específicos presente no citoplasma do neutrófilo; e por mecanismos independentes da MPO. Dessa forma, o objetivo final de todo esse processo é causar danos na membrana celular do patógeno invasor e causador da injuria tecidual (Silva, 2015).

2.4 HEMOPEXINA

A hemopexina (Hx) é uma glicoproteína plasmática de fase aguda, com peso molecular de 60KDa, a qual apresenta elevada afinidade pelo grupamento heme na proporção de 1:1 e ligação com o receptor CD91/LRP (*lipoprotein receptor-related protein*), expresso nos macrófagos e principalmente nos hepatócitos (Lin *et al*., 2015; Leclerc *et al*., 2016). Essa molécula é sintetizada no fígado, sistema nervoso, músculo esquelético, retina e rim (Bahadori *et al*., 2017). A hemopexina é formada por uma cadeia simples de polipeptídios de 439 aminoácidos associados a 20% de carboidratos, a qual, junto com a haptoglobina e transferrina, forma o quarto grupo mais abundante de proteínas carreadoras, depois da albumina, imunoglobulinas e proteases plasmáticas (Bahadori *et al*., 2017).

A função da hemopexina (Hx) consiste basicamente em capturar o grupo heme e transportá-lo na forma do complexo (Hx-hm), e assim, evitando lesões oxidativas causadas pelo grupamento heme livre ou a perda do heme pelo organismo (Delanghe; Langlois, 2001; Tolosano; Altruda, 2002; Lin *et al*., 2015). Além disso, em vários estudos *in vivo*, já foi demonstrado o papel da hemopexina como um depurador de heme da circulação em modelos animais de hemólise intravascular e administração de heme utilizando camundongos deficientes para esta molécula (Tolosano e Altruda, 2002).

Contudo, segundo a literatura, existem outras vertentes quanto a atividade da hemopexina, a qual está envolvida no bloqueio da migração dos neutrófilos durante o processo infecioso, agravando o quadro clínico do hospedeiro, devido à baixa imunidade mediada por células. Entretanto, o funcionamento real desse mecanismo ainda não está completamente elucidado, se fazendo necessários mais estudos acerca dessa problemática (Delanghe; Langlois, 2001; Bakker *et al*., 2005; Mauk *et al*., 2011).

Em trabalhos realizados, onde foram observadas algumas das possíveis atuações da hemopexina endógena (de forma sistêmica), essa molécula apresentou comportamento positivo. Leclerc *et al*. (2016), mostraram que a o aumento dos níveis de hemopexina no sistema nervoso central, se mostrou benéfico para a prevenção de possíveis episódios de hemorragia intracerebral. Nesse estudo, verificaram que o heme livre após uma hemorragia, pode ocasionar danos cerebrais irreversíveis e deficiência neurológica permanente, uma vez que a hemopexina presente nesse local é insuficiente para conter a quantidade de ferro livre no cérebro.

2.5 MODELO BIOLÓGICO *IN VITRO*

2.5.1 Características gerais da cultura celular *in vitro*

- **Culturas de células de neutrófilos**

Modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos, de forma geral, como a materialização e representação simples de uma parte da realidade a ser estudada (Ferreira *et al*., 2003). Desta forma, o constante desenvolvimento de modelos experimentais vem se tornando importante na medida em que estes, auxiliam na melhor compreensão dos fenômenos naturais. No caso do vasto universo das ciências médicas em particular, a realização desses modelos permite o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos seus efeitos em nível celular (Ferreira *et al*., 2005).

Dentro desse contexto, existem diversos modelos biológicos experimentais que são frequentemente utilizados como culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e os estudos anatômicos, geralmente realizados em cadáveres de seres humanos (Ferreira *et al*., 2005).

No modelo biológico (cultura celular) *in vitro,* o cultivo de células é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas (*in vitro*) em laboratório e independente do organismo que a originou. As células mantidas em culturas não estão mais organizadas em tecidos, crescendo em recipientes estéreis, usualmente placas e frascos plásticos e descartáveis e mantidas sob pressão, temperatura e meio de cultivo adequado (Freshney, 2005). Entretanto, deve-se ter cuidado ao manusear essas culturas, uma vez que, a utilização de materiais inadequadamente esterilizados ou manipulação incorreta, podem resultar em uma possível contaminação do material.

Desta forma, dependendo do tipo de cultivo que se está empregando em um determinado experimento, convencionou-se a denominar uma cultura celular como primária, quando suas células são diretamente obtidas de um tecido humano ou animal. Já, as linhagens celulares contínuas ou permanentes, por outro lado, são aquelas nas quais as células sofreram imortalização e adquiriram a capacidade de se multiplicar ilimitadamente em cultura. Comparadas às culturas primárias, experimentos empregando

células de linhagens contínuas tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos, oferecendo maior reprodutibilidade e fidelidade dos dados (Freshney, 2006).

Outro fator importante envolvendo o cultivo celular é que nem todos os tipos celulares existentes, o profissional consegue manusear, bem como cultivar em condições extracorpórea *(in vitro).* Assim, algumas células como os neutrófilos, são extremamente delicadas e difíceis de manusear devido a facilidade destas células em se ativarem ao menor movimento empregado. Além de que, possuem tempo de vida muito curto, dificultando o cultivo celular e a realização de determinados tipos de experimentos, como teste de fagocitose. Contudo, para a realização de testes com uma abordagem molecular e genética, essas células são mais apropriadas para determinada atividade (Amaral *et al.,* 2011; Mayadas *et al*., 2014).

Outro avanço primordial nos estudos sobre cultura celular, foi a cultura de células em 3D, a qual já é utilizada a algum tempo. Essa técnica fornece um ambiente tridimensional importante para se estudar a arquitetura de um tecido normal ou maligno e suas complexas interações célula-célula e célula-ambiente. O microambiente formado permite uma integração de sinais mediados por ambas às interações que assim modelam o comportamento fenotípico das células, incluindo a polaridade celular, fatores secretados, proliferação, adesão e sobrevivência (Mueller-Kliese, 1997; Amaral *et al.,* 2011).

2.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS

O diagnóstico de um paciente com suspeita de infecção fúngica, requer atenção especial por parte da equipe médica e colaboradores. Assim, o diagnóstico clínico surge como a primeira ferramenta para a hipótese diagnóstica de infecção, e quando associado a outros métodos de diagnóstico analítico, entra em consonância com o objetivo de confirmar o agente etiológico de uma determinada doença (Garzillo *et al.,* 2017).

O diagnóstico laboratorial micológico de uma infecção fungica sistêmica vai depender do sitio de infecção, podendo ocorrer tanto na correte sanguínea quanto nos órgãos sólidos. Assim, fragmentos de tecidos, sangue, LCR, urina, líquido pleural, aspirado bronco-alveolar e entre outras amostras biológicas, podem ser utilizadas como materiais para pesquisa fungica (Teixeira-Loyola *et al*., 2013). Desta forma, as amostras clínicas enviadas ao laboratório são processadas, através da realização da microscopia

direta do fungo (exame direto) e concomitantemente a cultura, cujo objetivo final é o isolamento do agente etiológico em meio sólido específico (Oliveira *et al*., 2014).

A depender do tipo de material biológico, se faz necessário utilizar soluções contrastantes (como o hidróxido de potássio – KOH) ou corantes específicos para facilitar a visualização do material, como a tinta nanquim ou azul de metileno. Em outros casos, o material biológico também pode ser visto a fresco, sem necessitar, portanto, de alguma substância clarificante ou corante. No isolamento do fungo em meio de cultura, frequentemente utiliza-se Ágar Sabouraud Dextrose (DAS) suplementado com antibiótico (Cloranfenicol), já que é um meio de cultivo rico, facilitando o crescimento e desenvolvimento do fungo; e evitando crescimento de microrganismos indesejados. Assim, o material cultivado deve ser mantido em temperaturas especificas, visto que cada fungo, apresenta uma temperatura ideal para crescimento.

Tratando-se particularmente de infecção de corrente sanguínea ou fungemia, a hemocultura atua de forma crucial nesse diagnóstico, sendo considerada como padrão-ouro, mesmo, apresentando baixa sensibilidade (Garzillo *et al.,* 2017).

Assim, com o objetivo de otimizar o diagnóstico, novas tecnologias foram e vem sendo desenvolvidas para facilitar e diminuir o tempo de espera do resultado para o paciente. A incorporação de técnicas moleculares e proteômicas associadas com as técnicas já disponíveis vêm contribuindo significativamente para o diagnóstico com alta confiabilidade, eficácia e precisão, culminando na escolha da melhor terapia antifúngica e no melhor prognóstico para o paciente (Oliveira *et al*., 2014).

Ferreira *et al*. (2015), avaliaram separadamente a eficácia de dois métodos de diagnóstico para aspergilose invasiva: o EIA-GM® (Platelia®*Aspergillus* imunoensaio), já disponível comercialmente no mercado, e a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Nesse trabalho, os pesquisadores analisaram a relação especificidade\sensibilidade desses dois testes e observaram que o Nested-PCR se apresentou melhor nesse quesito para a detecção de *Aspergillus*, se contrapondo ao teste de imunensaio, uma vez que, este pode apresentar resultados falso-positivos pois o epítopo detectado pelo anticorpo monoclonal utilizado no teste Platelia EIA-GM®, está contido também em outros antígenos e em algumas espécies fúngicas semelhantes.

Pfaller *et al*. (2015), analisaram a eficácia do T2MR e T2Candida como novas tecnologias de diagnóstico para identificação rápida de leveduras do gênero *Candida* em casos de infecção fúngica sistêmica. Esse método é baseado em um tipo de ressonância magnética, que permite detecção altamente sensível diretamente em amostras complexas,

como sangue, em pacientes suspeitos de sepse. Nesse trabalho, os autores observaram que de fato, o uso desses painéis foi eficiente e preciso na identificação algumas espécies de *Candida* sp, devido a rapidez e facilidade da análise, uma vez que, o material utilizado foi a própria hemocultura, sem necessitar, portanto, do isolamento do fungo em meio de cultivo sólido.

Zervou *et al*. (2016), desenvolveram um trabalho onde utilizaram um painel de identificação T2*Candida* de ressonância magnética (T2Dx) para o diagnóstico de candidemia, onde o tempo médio de identificação era menos de 5 horas. Essa nova plataforma é totalmente automatizada e foi recentemente aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA. Nesse estudo, o painel é capaz de detectar cinco espécies de *Candida* spp. (*C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei e C. glabrata*). Além do mais, ainda tem a possibilidade de combinar a ressonância magnética com o diagnóstico molecular, para amplificação do material genético e, posterior leitura no equipamento.

Muitos trabalhos utilizando estudos proteômicos vêm sendo publicados como uma nova proposta de diagnóstico rápido para episódios de infecção fungica. A espectrometria de massas (MALDI-TOF) consiste num sistema no qual o material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa contendo uma matriz polimérica. Esse material é irradiado com um laser, o qual vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector. Conforme a molécula em análise, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente. Assim, esses resultados obtidos são colocados em um gráfico, fornecendo vários picos e, para cada espécie analisada, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece os resultados (Benagli *et al*., 2011; Pasternak, 2012).

Fraser *et al*. (2017), identificaram por meio do MALDI-TOF, fungos agentes etiológicos de micetoma por grão negro. Nesse trabalho, observaram que dos 51 isolados de fungos demáceos utilizados para os testes, a espectrometria de massa MALDI-TOF identificou com precisão todos os isolados do teste, com 100%, 90,4% e 67,3% dos isolados alcançando LogScores maiores que 1,8, 1,9 e 2,0, respectivamente.

Livério *et al*. (2017), estudando 29 isolados de *Candida* obtidos de pacientes pediátricos com HIV, concluíram que nenhum teste fenotípico, isoladamente, foi capaz de diferenciar as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*; mostrando a importância da realização de métodos mais específicos de identificação entre essas espécies. Nesse

trabalho, ficou claro que os métodos genotípicos são indispensáveis para a identificação conclusiva e a diferenciação entre essas espécies de *Candida.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida para análise junto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CCS/UFPE e as atividades se iniciaram apenas mediante sua aprovação (CAEE: 51544815.0.0000.5208). Todos os indivíduos envolvidos na pesquisa participaram, apenas, depois de consentirem com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este estudo está condicionado à Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que roga sobre a ética da pesquisa envolvendo seres humanos, além de garantir a privacidade do sujeito envolvido na pesquisa. Quanto aos riscos iminentes aos pacientes, estes, foram os mínimos possíveis, uma vez todo procedimento de coleta de material biológico foi realizado por profissional devidamente habilitado para a realização dos procedimentos. Em relação ao constrangimento por parte do paciente ou familiares, estes foram intermediados por uma psicóloga do corpo médico, a qual explicava brevemente a importância do projeto na contribuição no diagnóstico.

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As coletas foram realizadas em pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva de dois grandes hospitais da cidade do Recife – PE (Hospital das Clínicas e Hospital Agamenon Magalhães), de acordo com solicitação médica. Foram coletadas amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecção fúngica. Materiais como urina, sangue, LBA, escarro, ponta de cateter foram enviados ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para a realização do diagnóstico laboratorial micológico.

Nas amostras para hemocultura, foram obtidas principalmente três amostras de sangue venoso, as quais foram coletadas assepticamente por procedimento específico e seguindo os padrões de biossegurança pré-estabelecidos. Nesse tipo de material biológico, o procedimento foi realizado através de punção venosa e posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion*-BHI para crescimento do microrganismo e posterior realização do diagnóstico laboratorial micológico.

3.3 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO

Após a obtenção das amostras clínicas, foram preparadas lâminas diretas sem adição de corante ou clarificante e, quando necessário, as preparações eram clarificadas com hidróxido de potássio a 20% (KOH), coradas com Giemsa ou contrastada com tinta da China; dependendo do tipo do material biológico analisado. Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar-SDA (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol (antibiótico) contido em placas de Petri, e mantidas à temperatura de 28º C e 37º C por até 15 dias para isolamento do agente etiológico. Após o surgimento das primeiras colônias, estas, foram purificadas e preparadas para posterior identificação pela taxonomia clássica, automatizada e molecular.

3.4 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA TAXONOMIA CLÁSSICA

Para identificação dos isolados foi realizada primeiramente a purificação dos mesmos, onde foram colocados fragmentos da colônia já crescida anteriormente em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2 mL foram retirados e semeados por esgotamento na superfície do meio SDA com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias crescidas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio SDA (Col *et al*., 2009; Mímica *et al*., 2009). Após serem obtidas culturas puras, estas foram identificadas pela taxonomia clássica, através das características macroscópicas, microscópicas e bioquímicas de acordo com Barnnet *et al.*, 2000 e De Hoog *et al*., 2000. Nesta etapa, foram observadas características macroscópicas como coloração da colônia, aspecto da colônia (viscosa ou seca) e formação de bordas irregulares. Já, nas características microscópicas observamos a morfologia das células (globosas, ovaladas, elípticas), tamanho das células e produção de filamento.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA TAXONOMIA AUTOMATIZADA (VITEK 2 COMPACT)

Para análise automatizada, foram preparadas suspensões através da transferência de colônias das leveduras para 3,0 ml de solução salina (solução aquosa a 0,45% a 0,50% de NaCl, pH 4,5 a 7,0) estéril (Sigma). A turvação foi ajustada de acordo com a escala (1,80 - 2,20) de McFarland. As suspensões das leveduras foram colocadas no cassete

junto com os respectivos cartões de identificação e postas no aparelho de vácuo integrado. Em seguida, o cassete contendo as suspensões foi colocado manualmente no equipamento (Vitek2® Compact, bioMérieux) na câmara de vácuo. Os resultados obtidos foram transportados para um sistema óptico de reação de leitura, o qual é conjugado ao computador onde os dados foram transferidos e processados. Os cartões inoculados, vedados e incubados foram mantidos a 35,5 ºC + 1,0 ºC (Mondelli *et al.,* 2012).

3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.6.1 Extração do dNA

Para identificação molecular, os isolados clínicos foram repicados em placas contendo SDA adicionado de cloranfenicol e mantidos a 37°C por dois a cinco dias para obtenção de crescimento fúngico. Posteriormente, a massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro para extração de tamanhos variados, e o DNA, foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Goes-Neto (2005).

3.6.2 Amplificação da região ITS do rDNA e reação com *primer* espécie-específico

Para a amplificação do rDNA das regiões ITS_1, ITS_2 e subunidade 5.8S do rDNA foram utilizados os *primers* universais, ITS_4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') e ITS_5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3"), além de *primers* espécie-específicos. Para um volume final de reação de 25 µl foi utilizado um tampão (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl) 25 mM; $MgCl_2$, 1,5 mM; dNTP, 0,2 mM; 12,5 pmols do *primer; Taq* DNA polimerase, 1,25U e 25ng de DNA. As regiões de ITS-rDNA foram amplificadas utilizando um termociclador (MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95ºC, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 50ºC e 1 minuto e 30 segundos a 72ºC. Os produtos de amplificação obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE 1X (pH 8,0), a 3 $V.cm^{-1}$, constrastado com Gel*red* por 30 minutos e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e, em seguida fotografado. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen Life Technologies).

3.6.3 Análise bioinformática

As sequências obtidas após o processo foram editadas, invertidas e ligadas para sua devida análise usando-se as ferramentas do EXPASY. Sequências de nucleotídeos, foram submetidas a uma busca por similaridade no GenBank (National Center of Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) usando-se os programas BLASTN ou BLASTX. O domínio conservado foi analisado com auxílio da função CD-Search do PSI-Blast e o alinhamento comparativo com o programa CLUSTAL-X, considerando a similaridade com E-value superior a e^{-10}. Segmentos informativos foram analisados fenoticamente e filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA e PAUP para plataforma Windows, para posterior interpretação.

3.7 DETERMINAÇÃO DO QUANTITATIVO DE NEUTRÓFILOS DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

Para determinação do número de neutrófilos tanto dos pacientes quanto dos indivíduos sadios, foi coletado (assepticamente) em um tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) por meio de punção venosa, 4 mL de sangue e em seguida, levado ao analisador hematológico Cell Dyn Ruby 50-100k (Abbott Diagnostic) para quantificação celular. Esse equipamento baseia-se na tecnologia MAPSS (Dispersão Polarizada Multiangular), onde oferece leituras ópticas com precisão de laser para a leucometria com contagem diferencial, realizando identificação precisa para cada tipo celular. Valores de referência 40% – 70% ou 1800 a 10.000 cel\mm^3.

3.8 DOSAGEM DE HEMOPEXINA SÉRICA NAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

A detecção da hemopexina foi realizada utilizando a metodologia de Janz *et al*., 2013, onde o soro dos pacientes e indivíduos sadios, congelados a -20° graus em freezer comum, foi posteriormente descongelado para realização da dosagem da hemopexina sérica pelo kit de Elisa (AssayMax Human Hemopexin ELISA) (Sigma). Essa técnica se baseia em uma reação de imunoensaio enzimático por competição que detecta a presença da hemopexina em menos de 2 horas nas amostras biológicas. A dosagem da hemoxina sérica *(*Beta-1B-glicoproteina) foi realizada em microplacas de poliestireno contendo 96

poços revestidos internamente com anticorpos policlonais contra a hemopexina humana (Hpx-hm). A hemopexina padrão e as amostras dos indivíduos competiram por uma hemopexina biotinilada presa ao anticorpo imobilizado no fundo da placa e pela estreptavidina-peroxidase. Posteriormente, todo material não ligado foi removido por lavagens sucessivas com tampão de lavagem, e um substrato da enzima peroxidase foi adicionado e logo em seguida, a reação enzima-substrato foi finalizada com adição da solução stop (ácido sulfúrico), visualizada através da intensidade da cor fornecida ao final da reação e, pelo espectrofotômetro a 450 nm de absorbância.

3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

3.9.1 Preparação das células fúngicas

As células fúngicas utilizadas em todo experimento foram cultivadas em meio Sabouraud dextrose ágar (líquido) e mantida sob agitação no Incubator Shaker (Edison, USA) a 37°graus por 12 horas para crescimento da massa celular. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para retirada do meio líquido e novamente ressuspendidas em PBS para posterior diluições e contagens. Para a contagem das células, foi utilizada uma câmara de Neubauer e um contador manual celular, cujo objetivo era obter uma concentração final de $1x10^7$ cel/mL.

3.9.2 Isolamento de neutrófilos de indivíduos saudáveis e cultura celular *in vitro*

O processo de isolamento dos neutrófilos foi realizado seguindo o protocolo de Aquino *et al*. (2016), utilizando o método Percoll de separação. Nesse processo, foram utilizadas três soluções específicas (HBSS 10x, HBSS 2x, HBSS 1x e Percoll) (Sigma, St. Louis, USA), para montagem do gradiente de separação Percoll. Para a preparação do gradiente de separação, foi levado em consideração o gênero do doador e, a partir deste momento, foi preparada duas soluções distintas com diferentes densidades, sendo uma para o doador feminino (58% e 70%) ou, para o masculino (60% e 70%).

Trabalhamos com cultura pura de células primárias de neutrófilos, diretamente obtidas no tecido sanguíneo do doador. O cultivo foi realizado em câmara exclusiva para manuseio de polimorfonucleares; as células foram mantidas em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640, e incubadas na estufa de atmosfera de 5% CO_2 a 37ºC para

aderência.

Tabela 1: Gradientes para preparação da solução Percol

Reagentes	58%	70%
Percoll 100%	6960 µL	8400 µL
HBSS 10%	1200 µL	1200 µL
Àgua Mili-Q	3840 µL	2400 µL

*Doador do gênero feminino

Tabela 2: Gradientes para preparação da solução Percol

Reagentes	60%	70%
Percoll 100%	7200 µL	8400 µL
HBSS 10%	1200 µL	1200 µL
Àgua Mili-Q	3600 µL	2400 µL

*Doador do gênero masculino

3.9.3 Obtenção de hemopexina

Para o início dos ensaios *in vitro,* foi adquirida uma hemopexina comercial liofilizada (Hx) (Sigma/Merk), a 10 mM e usada nas concentrações de: [0 µg\mL], [1 µg\mL], [0,5 µg\mL], [0,25 µg\mL], [0,125 µg\mL], [0,062 µg\mL], [0,031 µg\mL] e [0,015 µg\mL] no teste de fagocitose. A hemopexina liofilizada foi previamente ressuspendida em PBS, e mantida estocada congelada a – 20º C para posterior utilização. No momento dos ensaios, a hemopexina foi descongelada previamente e utilizada junto ao meio RPMI nas placas de 96 poços para realização dos testes.

3.9.4 Ensaio de fagocitose

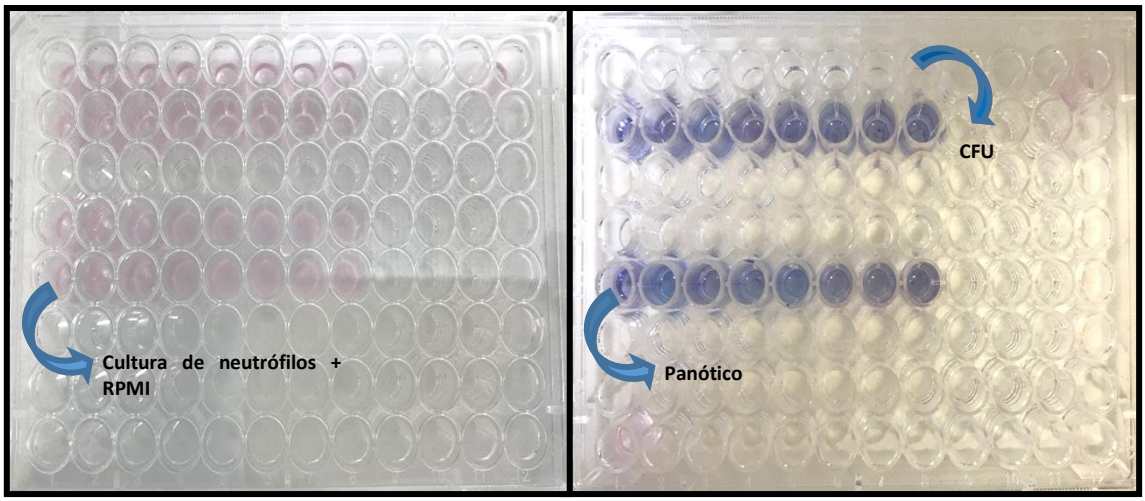
Os ensaios *in vitro* da fagocitose foram realizados segundo a metodologia adaptada de Aquino *et al*. (2016), onde 50 µl de células de neutrófilos ($5x10^4$ cel/ml) foram pipetados no fundo da placa de 96 poços e em seguida, levados à estufa de Co_2 por 2 horas para manutenção das condições celulares e fixação das células no fundo da placa. Após o tempo decorrido, a placa foi retirada e adicionado em cada poço, as diferentes concentrações da hemopexina e novamente, a placa foi levada para incubação por mais 1

hora, para interação entre a hemopexina com os neutrófilos.

Logo em seguida, a placa foi retirada da incubadora, removido 50 µl da suspenção presente em cada poço, para em seguida, ser adicionado novamente 50 µl da suspensão fúngica, previamente padronizada na concentração de $1x10^7$ cel/mL, sobre a suspenção de neutrófilos. Novamente a placa foi incubada na estufa de Co_2 por 30 mim, para finalização do processo de interação e, posterior visualização no microscópio invertido AxioVision (Zeiss). Para visualização, os poços foram corados com Panótico (Newprov) (álcool - 15s, eosina - 17s e hematoxilina - 10s), para evidenciar cada estrutura presente (Figura 1).

Os resultados do ensaio foram analisados através de imagens capturadas com auxílio do microscópio, em campos distintos de cada poço, e posteriormente, cada imagem foi analisada utilizando um programa de contagem (ImageJ), devendo-se obter ao final: o número de neutrófilos em toda imagem, o número de neutrófilos que interagiram/fagocitaram e a quantidade de células fúngicas para cada neutrófilo que fagocitou. Em seguida, foi feito um índice fagocítico (%), entre a relação do total de leveduras fagocitadas sobre o número de neutrófilos que fagocitaram, e o resultado obtido em porcentagem e, analisados no Graphpad Prism.

Figura 1: Ensaio de fagocitose. A) Cultura de células pura dos neutrófilos; B) Ensaio de unidade formadora de colônias e coloração com panótico.



3.9.5 Ensaio de CFU (unidade formadora de colônias)

O ensaio de CFU foi realizado utilizando metodologia adaptada de Nicola e

Casadevall (2012). Após a realização do ensaio de fagocitose em placas 96 pocos, retirou-se 100 µl do líquido do poço e foi depositado em um eppendorf original de 2 mL. Em seguida, foi adicionado 100 µl de água destilada gelada no poço onde foi retirado o líquido para lisar os neutrófilos. Em seguida, foi retirado 100 µl de água destilada e depositada no eppendorf original, totalizando ao final 200 µl. O poço foi lavado 3x com PBS (100 µl), para coleta de material residual ainda presente. Novamente, o líquido das 3 lavagens foi recolhido no eppendorf original, totalizando ao final 500 µl.

Foram realizadas 3 diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000), para posterior plaqueamento em meio Agar Sabouraud (Figura 2). Após as respectivas diluições, foi retirado 50 µl do líquido de cada eppendorf e colocado em placas contendo meio SDA e adicionado cinco pérolas de vidro e, em seguida a placa foi agitada vigorosamente para misturar as pérolas com o líquido presente. Por fim, foram retiradas as pérolas e, as placas foram incubadas por 24 horas na estuda a 36º C, para no dia seguinte ser realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (Figura 3). As colônias foram contadas com auxílio de um contador de células manual, e marcadas com lápis piloto para identificação e posterior análise dos dados utilizando analisados no Graphpad Prism.

Figura 2: Diluições seriadas para posterior plaqueamento em meio sólido Agar Sabouraud Dextrose.

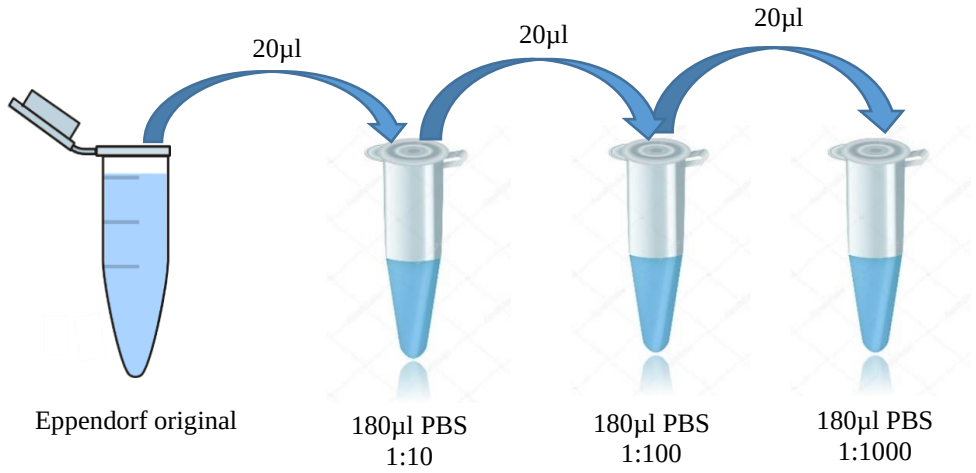
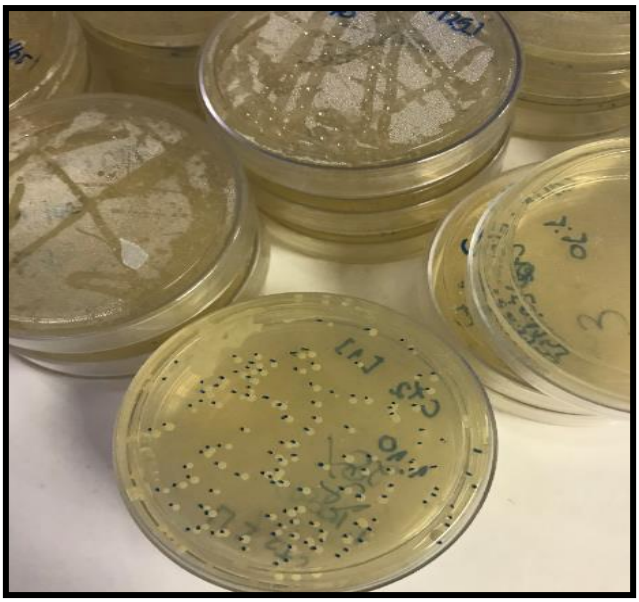


Figura 3: Ensaio de Unidades formadoras de colônica (CFU). Contagem das colônias utilizando contador de células manual.



3.9.6 Análise estatística

Todos os testes *in vitro* foram realizados em duplicata. O teste estatístico realizado para todos os testes foi a análise de variância (ANOVA), e foram seguidos por testes post hoc apropriados em experimentos com múltiplos grupos (testes de comparação múltipla não paramétricos de Dunnett). Foi considerado significativo os parâmetros que tiveram $p<0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism®, versão 7.02 (San Diego, CA, EUA, 2016).

4 RESULTADOS

4.1 DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES INTERNADOS NAS UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Foram analisados um total de 240 pacientes, durante um período de 14 meses, com suspeita de infecção fúngica sistêmica, variando entre idade e gênero. Todos os pacientes foram oriundos de UTI de dois hospitais públicos da cidade do Recife - PE, tendo seu tempo de permanência variado entre 1 e 5 meses de internamento. Desses pacientes, apenas 56 tiveram diagnóstico confirmatório para infecção fúngica sistêmica no Laboratório de Micologia Médica da UFPE, predominando infecção de corrente sanguínea (fungemia). Foi observado um maior quantitativo de pacientes do gênero masculino em detrimento ao feminino, com faixa etária superior a 60 anos.

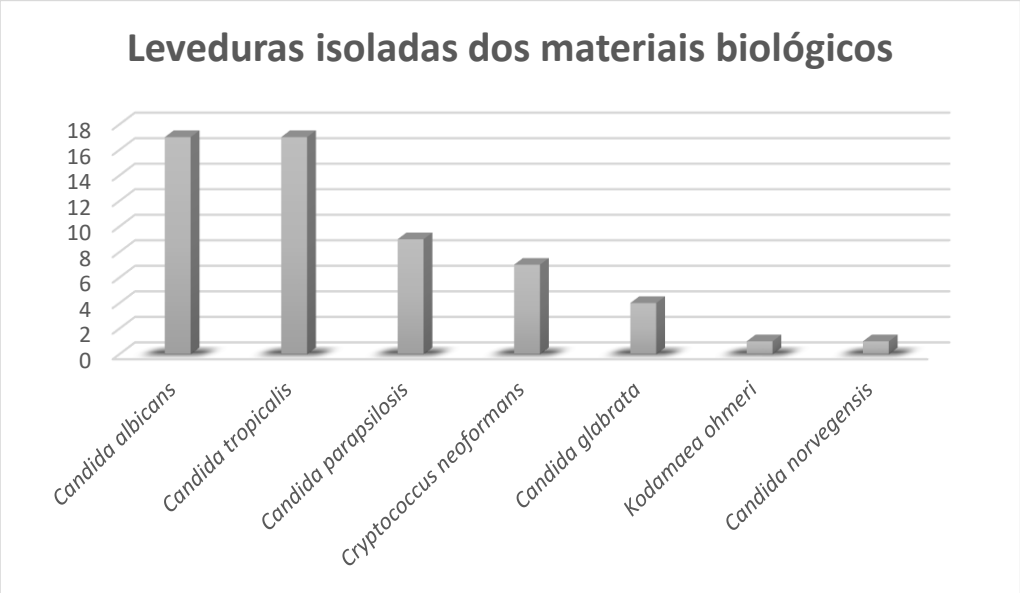
A maioria dos pacientes internados apresentava doença de base como o vírus do HIV, diabetes melittus\hipertensão, ou faziam uso de medicamento imunossupressor. Dos pacientes analisados, a maioria fazia uso de cateter venoso central e sonda de nutrição parenteral. A maioria dos pacientes apresentaram um quadro compatível com neutropenia, diante dos resultados do leucograma. Quanto aos materiais biológicos coletados, foram analisadas amostras de hemocultura (sangue), líquor (LCR), líquido pleural, lavado broncoalveolar (LBA), urina, secreção traqueal, liquido de abcesso hepático, escamas epidérmicas e em menor quantidade, fragmento de tecido. Sidrim *et al.* (2004) afirmaram que para a realização de um correto diagnóstico laboratorial, a colheita e manipulação dos materiais biológicos deve ser feita de forma adequada, para não ocasionar resultados falsos positivos para o paciente.

A partir do exame direto (microscopia direta) e do isolamento em meio de cultura sólido (SDA) do material biológico, obtivemos um total de 56 isolados fúngicos, sendo estes 17 *Candida albicans* (30,35%); 17 *C. tropicalis* (30,35%); 9 *C. parapsilosis* (16%); 7 *Cryptococcus neoformans* (12,5%); 4 *Candida glabrata* (7,14%); 1 *Kodamaea ohmeri* (8,92%); 1 *Candida norvegensis* (8,92%) (Figura 6). Esses isolados foram identificados inicialmente pelo CHROMagar *Candida*, em seguida identificados pelo VITEK 2®, onde foi realizada a assimilação de fontes de carbono por meio da automação e, para confirmação da espécie encontrada, foi realizada a análise da região LSU do rDNA fúngico, e também a utilização de *primer* espécie-específico.

O CHROMagar *Candida* (Difco, França), é um meio sólido e diferencial para identificação de algumas espécies de Candida e tem sido útil, particularmente, na

identificação prévia de *C. albicans, C. tropicalis* e *C. krusei* em cultura primária de espécimes clínicos. Entretanto, apesar desse meio de cultura favorecer um conhecimento antecipado de uma determinada espécie de levedura, deve-se ter cautela na sua utilização, uma vez que a interpretação equivocada, pode levar ao erro no diagnóstico do paciente. Por isso, a importância de associar com outros métodos de identificação, como molecular e MALDI-TOF, afim de confirmar o agente etiológico da doença.

Figura 4: Isolados fúngicos obtidos a partir das amostras biológicas dos pacientes de UTI.



Infecções fúngicas sistêmicas causadas por espécies de *Candida* estão entre as principais causas de óbito no âmbito hospitalar, em particular nas UTIs. *Candida albicans* é o microrganismo com maior frequência de isolamento em amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecção fúngica (Cuéllar-Cruz *et al*., 2012). Porém, devido a diversos fatores como principalmente o uso profilático de antifúngicos, o perfil epidemiológico dessas cepas de *C. albicans* vem mudando gradualmente para espécies de *Candida* não-*C. albicans*, dando lugar às espécies emergentes. Uma das razões dessa mudança de perfil epidemiológico, se deve ao fato de que algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* apresentarem resistência natural a antifúngicos do tipo azólicos, e, é devido a essa resistência natural que se faz importante diferenciar as espécies, para a correta utilização da terapêutica, e assim evitar a resistência de outras possíveis espécies.

Para Arendrup (2013), as infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida*, se destacando principalmente *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis* e *C. tropicalis,* estão entre as doenças mais comuns no mundo, principalmente quando se tratando das infecções de corrente sanguínea ou candidemia. Esses dados corroboram com os nossos achados, uma vez que, as infecções de corrente sanguínea predominaram na maioia dos pacientes acometidos na UTI.

Foi observado que houve um maior isolamento de cepas de *C. albicans*, seguido por cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente. De acordo com Althus *et al*. (2015), *C. albicans* continua sendo a principal espécie mais frequentemente descrita e isolada em casos de infecções hospitalares em diversos países, principalmente nas UTIs, respondendo por aproximadamente 52% dos casos. Tais achados corroboram com os trabalhos de Mariette *et al*. (2016), onde um grupo de pacientes de UTI diagnosticados com malignidade hematológica, também apresentaram na sua totalidade, infecção fúngica sistêmica por *C. albicans* (46–56%). Pappas *et al.* (2018), também confirmaram que espécies de *C. albicans*, ainda permanecem como levedura mais comum, contudo, a prevalência desse fungo pode variar de acordo com localização geográfica da região.

Em outra pesquisa de Mellinghoff *et al* (2018), os autores relataram que a *C. albicans* continua a ser a mais prevalente das espécies de *Candida* sp. causando doenças tanto em adultos, quanto em populações pediátricas e jovens, acometendo aqueles pacientes em estado grave. Entretanto, os autores observaram mudanças quanto ao perfil epidemiológico dessa espécie e, um aumento no diagnóstico de candidemia por espécies de *Candida* não-*C. albicans* nesse grupo acometido. Foi obtido um caso de candidemia por *C. tropicalis* em paciente jovem, puerpéria e portadora do vírus H1N1, que apresentou desfecho clínico fatal, devido as complicações obtidas ao longo do internamento na UTI.

Schwartz e Patterson (2018), também observaram uma mudança gradual em relação ao perfil epidemiológico das espécies de *Candida* não-*C. albicans, e* perceberam que a prevalência de tais espécies estava fortemente ligada as condições de doença do indivíduo (portador do vírus do HIV, diabético etc.) e ao nicho ecológico do microrganismo.

Neste contexto, outras espécies de *Candida* não-*C. albicans* ganharam destaque a alguns anos devido a mudanças no perfil epidemiológico em algumas regiões. *Candida tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. krusei*, estão entre as leveduras que apareceram isoladas nos casos de infecção fúngica sistêmica em pacientes críticos (Pappas *et al*., 2018). Foi observado que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis,* tiveram uma

maior prevalência em detrimento as demais espécies. Possivelmente, seu aparecimento possa estar relacionado ao fato de que a maioria dos pacientes que apresentaram diagnóstico confirmatório para essas leveduras, foram os pacientes neutropênicos e também, os pacientes que apresentavam algum tipo de dispositivo médico invasivo como sondas e cateter venoso central.

Cleveland *et al.* (2015) e McCarty *et al*. (2016), relataram que nos Estados Unidos e no Noroeste Europa, a segunda espécie mais comum é geralmente é *C. glabrata,* sendo mais frequente em indivíduos com idade superior a 60 anos e transplantados. Porém, na América Latina, sul da Europa, Índia e Paquistão, *C. parapsilosis* e/ou *C. tropicalis* são muito mais frequente do que *C. glabrata.* Esses achados respaldam nossos dados, uma vez que essas duas espécies também tiveram maior presença nos casos de candidemia e, em menor número, *C. glabrata.*

Desta forma, embora menos frequente que *Candida albicans*, as infecções causadas por *C. glabrata* são mais difíceis de tratar e estão associadas a altas taxas de letalidade. Este fato se deve à maior intolerância inata deste microrganismo aos antifúngicos azólicos. Outro aspecto epidemiológico atribuído a estas leveduras deve-se a sua maior prevalência em pacientes idosos (Hooper *et al*., 2018). No nosso caso, dos quatro pacientes com idade variando entre 65-80 anos, todos foram diagnosticados com *C. glabrata,* além de serem diabéticos.

O trabalho de Koutserimpas *et al*. (2018), se assemelha ao nosso, uma vez que, os autores relataram um caso raro de infecção óssea por *C. glabrata* em paciente idosa (68 anos), submetida a uma artroplastia total. Nesse caso, a paciente por ter sido diagnoticada precocemente, favoreceu a resolução do tratamento antifúnfico, onde foi utilizada anidulafungina como droga de escolha para terapêutica.

Em outra publicação de Shi *et al*. (2018), *Candida glabrata* foi protagonista no episódio de candidemia em paciente jovem de 26 anos, diagnosticada com pancreatite aguda grave. Segundo os autores, apesar da *C. glabrata* ser uma levedura menos frequente do que *C. albicans,* tem-se observado um aumento gradual em isolamentos desse fungo nas UTIs, principalmente em pacientes que sofreram procedimentos invasivos. Tais dados divergem um pouco dos nossos achados, pois a maioria dos pacientes acometidos eram pacientes idosos com idade superior a 65 anos.

Outra levedura de extrema importância médica é *Cryptococcus neoformans.* Foi obtido sete isolados (12,5%) desta levedura, sendo a maioria dos pacientes acometidos portadores do vírus do HIV em estado avançado. Nascimento *et al.* (2017), relataram que

a criptococcose é a segunda infecção fúngica sistêmica mais freqüente, envolvendo pacientes HIV positivo. Essa micose apresenta alta letalidade mesmo com o uso de drogas antifúngicas utilizadas rotineiramente no tratamento. Foi observado que os pacientes diagnosticados com criptococcose, foram tratados com anfotericina B e fluconazol; porém, devido ao estado crítico e avançado da doença, alguns evoluíram para o óbito.

No presente trabalho, observamos o isolamento de espécies que até então raramente tinham sido descritas na literatura como potenciais agentes de candidemia em pacientes imunossuprimidos. Foi obtido um caso de *Candida norvegensis,* em paciente crítico, diabético e positivo para o vírus do HIV. Nesse episódio, o mesmo foi tratado com anfotericina B, uma vez que o uso do fluconazol, se mostrou ineficaz no tratamento da candidemia. Provavelmente, essa espécie deve apresentar algum tipo de resistência aos azólicos, tornando a resolução do tratamento inviável para o paciente. Desta forma, nosso trabalho se assemelha com o trabalho de Sanclemente *et al.* (2015), onde um estudo de suscetibilidade antifúngica frente a isolados de *C. norvegensis*, mostrou 41% de resistência das cepas ao fluconazol. Para Krcmery *et al*. (2002), a anfotericina B tem sido considerada como tratamento de escolha nos casos de infecção por *C. norvegensis.*

Kodamaea ohmeri, levedura emergente, apesar de ser pouco relatada na literatura como agente de micose sistêmica, vem ganhando destaque nos casos de fungemia em pacientes críticos. Neste trabalho, foi obtido um isolado clínico de *K. ohmeri* de paciente idoso aparentemente imunocompetente, porém, o mesmo apresentava como fatores predisponentes diabetes mellitus e hipertensão, além de outros agravos como problemas respiratórios. Tais achados corroboram com os dados de Shaaban *et al*. (2010), Kanno *et al.* (2017) e Tashiro *et al.* (2018), onde diabetes, cirrose, hepatite b, tumores malignos, intubação são considerados como fatores de risco para uma possível infecção sistêmica por *K. ohmeri*.

Assim como nos relatos de Huang *et al*. (2018), *K. ohmeri* é uma levedura oportunista, que apresenta um potencial elevado de causar uma fungemia, principalmente em pacientes que apresentam algum tipo de neoplasia. Os autores citaram também, a importância de estudos epidemiológicos recentes, acerca de novos casos envolvendo leveduras emergentes.

Diante desta problemática, foi possível observar que a junção de uma correta identificação, o conhecimento e o estudo de espécies emergentes se faz de extrema importância para a saúde pública, devido a possíveis surtos de microrganismos altamente patogênicos e sua resistência aos antimicrobianos disponíveis.

4.2 ANÁLISE DO QUANTITATIVO DE NEUTRÓFILOS DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa contra microrganismos diversos. Estas células fagocíticas migram para os locais onde se encontram esses patógenos invasores e os erradicam por fagocitose, explosão oxidativa e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Urban, Nett, 2018). Se tratando do paciente, e dependendo do tipo de comprometimento imunológico que o mesmo apresenta, os níveis relativos e absolutos dos neutrófilos podem estar alterados para mais ou para menos, sinalizando o tipo de processo infecioso que o acomete.

Sabe-se, que o número normal de leucócitos no sangue pode variar dependendo da idade e sexo do indivíduo, além do mais, alguns laboratórios podem utilizar formas diferentes de mensurar as células brancas, fazendo com que os valores de referência possam variar discretamente nos equipamentos. A neutropenia geralmente é assintomática até que a infecção se desenvolva. A febre é, com frequência, a única indicação de um processo infeccioso em instalação. Os sintomas podem se desenvolver, mas, em geral, são discretos (Dale, 2016). Uma neutropenia é definida como a contagem de neutrófilos absoluto < 500 cells/mm^3 (Phikulsod *et al*., 2017). Assim, a neutropenia é classificada em graus de acordo com o número absoluto de neutrófilos: leve, com número de neutrófilos entre 1.000 e 1.500/mm^3; moderada, com número de neutrófilos entre 500 e 1.000/ mm^3; e grave, com número de neutrófilos abaixo de 500/mm^3 (Alvarez *et al*., 2014).

Neste trabalho, obteve-se que dos 56 (100%) pacientes com infecção fúngica sistêmica, 42 (75%) apresentaram os níveis dos neutrófilos inferior (neutropenia), quando comparado aos valores de referência. Os indivíduos que apresentaram neutropenia, as demais células brancas também demonstraram alteração quando ao quantitativo no leucograma. O eritrograma e o plaquetograma, também apresentaram alterações como anemia e plaquetopenia, respectivamente. Em contrapartida, 14 pacientes (25%), apresentaram os índices acima dos valores de referência compatível com uma discreta neutrofilia.

Provavelmente, por serem pacientes geralmente em estado crítico, submetidos a tratamentos oncológicos, transplantados, portadores do vírus do HIV, ou que fazem uso de antibióticoterapia de amplo espectro por longos períodos, desenvolvem quadros de neutropenia de moderado a grave. Diante desta condição, esses pacientes costumam

desenvolver algum tipo de infecção fúngica por espécies de leveduras como *Candida* spp. Desta forma, nossos dados se assemelham com o trabalho de Alvarez *et al.* (2014), ao analisar a condição clínica de pacientes graves de UTI, onde observaram que indivíduos neutropênico, apresentaram risco aumentado de desenvolver quadros infecciosos invasivos por espéceis de leveduras do gênero *Candida.*

Foi observado também no trabalho de Phikulsod *et al*. (2017), analisando pacientes que apresentavam quadros diversos como quimioterapia, neoplasias e HIV, todos apresentaram algum tipo de infecção fúngica sistêmica e superficial; e quando observado o número de neutrófilos, este estavam reduzidos significativamente. Pelo fato dos pacientes graves apresentarem quadros clínicos diversos que culminaram em uma possível neutropenia, provavelmente essa condição possa ter favorecido a aquisição de uma infecção sistêmica por leveduras, e em alguns casos, levando o paciente a óbito. Sabe-se que sepse bacteriana ou fúngica causa um efeito devastador, desregulando a atividade metabólica dos neutrófilos, uma vez que altera a produção de proteínas específicas fundamentais na regulação e manutenção dessas células (Shen *et al.,* 2017).

Para Stern *et al*., (2019), indivíduos com câncer que desenvolveram neutropenia grave, apresentaram risco elevado de desenvolver algum tipo de infecção fúngica sistêmica. Tal situação, decorre pelo fato de que o paciente já esta debilitado devido a quimioterapia constante, bem como submetidos a procedimentos invasivos; além do uso profilático de outras medicações para tratar infecções secudárias.

Desta forma, foi observado que os 42 pacientes que apresentaram neutropenia de moderada a grave, demonstraram maior dificuldade quanto a resolução da infecção sistêmica, uma vez que não estavam respondendo corretamente aos tratamentos realizados. Já os pacientes que mantiveram seus níveis discretamente acima do valor de referência, tiveram evoluções satisfatórias quanto ao sanar da doença.

Quanto a análise dos níveis leucocitários dos indivíduos sadios, estes, apresentaram seus níveis de neutrófilos dentro dos valores de referência. Dos 56 indivíduos saudáveis que se propuseram em doar o sangue voluntariamente, apenas sete apresentaram uma discreta neutropenia, mas com nenhuma característica aparente que indicasse um tipo de infecção. Em contrapartida, 49 indivíduos tiveram os níveis dos neutrófilos dentro dos valores estabelecidos de 1800 a 10.000 cel\mm^3.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO*

Nesse estudo, foi observado que a realização da cultura de células de neutrófilos requer cuidados específicos, atenção e principalmente delicadeza ao manusear essas células. Sabe-se, que nem todas as células são possíveis de se cultivar *in vitro,* pois necessitam de meios e condições específicas para manutenção da homeostase, além de que, podem perder suas características fenotípicas, necessitando de marcadores específicos para identificação. Os testes iniciais para cultivo celular de neutrófilos foram acompanhados de alguns contratempos (contaminação por bactérias e fungos), o aparecimento de outras linhagens celulares, e até mesmo, a perda de um grande volume de neutrófilos na separação das camadas celulares.

Para Capes-Davis *et al*. (2010), além da contaminação microbiana, há também a contaminação cruzada, em que, linhagens celulares são contaminadas quando uma linhagem diferente é erradamente introduzida na cultura, por exemplo, pelo compartilhamento inapropriado de reagentes, pipetas, ponteiras, pela manipulação de múltiplas culturas ao mesmo tempo sem os devidos cuidados e, principalmente pela higienização inadequada do fluxo lâminar após o uso. Por isso, a importância de se ter um local asséptico e exclusivo para o trabalho de cultura de células.

Foi observado que o uso de seringa de coleta de sangue heparizada, foi fundamental para um bom processo de extração celular. Desta forma, os dados se adequam ao trabalho de Aquino *et al.* (2016), onde o uso da seringa além de evitar o processo de ativação precoce, ainda permite que a coleta possa ser realizada de modo controlado, afim de fazer com que o sague se misture por completo com heparina da seringa e no bizel, evitando posteriormente a formação de coágulos indesejados, e assim inviabilizando o procedimento.

Os neutrófilos são células frágeis, que se ativam (desgranulam) com facilidade e principalmente por possuírem um tempo de vida curto (fora do corpo) de no máximo 8-10 horas, quando mantidas nas condições ideais. Nossos dados estão de acordo com Mayadas *et al.* (2014), no qual demonstraram através de experimentos *ex vivo,* um tempo de vida curto entre 8-10 horas no máximo para os neutrófilos, mesmo mantidos nas condições preconizadas. Assim, como foi observado em nossos testes preliminares, os neutrófilos apresentaram um tempo de vida de no máximo 10 horas em meio de cultivo apropriado. O acompanhamento da viabilidade celular foi feito utilizando o corante Azul de Tripan, com observações frequentes na microscopia óptica utilizando câmera de Neubauer (Figura 7).

Para Borregaard (2010), os neutrófilos são células sensíveis, que apresentam tempo de vida média (*in vitro*) também de aproximadamente 8-10 horas. Devem ser mantidos em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal a 10% (Figura 8). Ademais, cuidados extras devem ser tomados, pois além de se ativarem com facilidade, são células que não suportam mudanças bruscas de pH, temperatura e estresse mecânico (Figura 9).

De acordo com Silva *et al*. (2015), os neutrófilos possuem um papel fundamental no desencadeamento da reposta imunológica, porém, ainda se precisa de estudos mais aprofundamentos diante desta problemática. Entretanto, o fator limitante ainda é a dificuldade do cultivo *in vitro* dessas células, pelo fato de possuírem um tempo de vida muito limitado e um tratamento laborioso de isolamento.

Segundo a literatura, o RPMI é o meio mais utilizado para para tal finalidade, pois é um meio completo, rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos, que possibilitam as condições nutricionais necessárias para uma boa viabilidade celular. Além do mais, muitos desses nutrientes possuem atividade antioxidante, neutralizando a formação de radicais livres produzidos durante o processo de manutenção celular. Outra opção que pode ser utilizada sem prejuízo, é o meio Hanks-gel (HBSS Ca^{+} e Mg^{++}), um meio de solução salina que também serve para manter as células em condições normais de cultivo.

Bruns *et al.* (2010), também fizeram o uso do meio RPMI para manutenção e cultivo de neutrófilos, entretanto, a suplementação foi feita com 5% de soro bovino fetal. Os autores apontam que não observaram diferenças significativas quanto a redução do reagente de suplementação no cultivo, ou seja, as células apresentaram o mesmo tempo de vida útil e a mesma atividade. Optamos por não fazer uso do soro bovino fetal, já que iriamos trabalhar com leveduras que poderiam filamentar, como *Candida albicans* e desta forma, causar algum dano no neutrófilo ao decorrer do processo de fagocitose (Lohse *et al.,* 2017). Desta forma, não foi observado nenhum prejuízo nos ensaios quanto a não utilização do soro bovino na cultura de células.

Figura 5: Câmara de Neubauer: A,B: Neutrófilos puros, corados com azul de Tripan, evidenciando a viabilidade após a extração. C: Neutrófilos mortos, corados pelo azul de Tripan. Objetiva (40x).

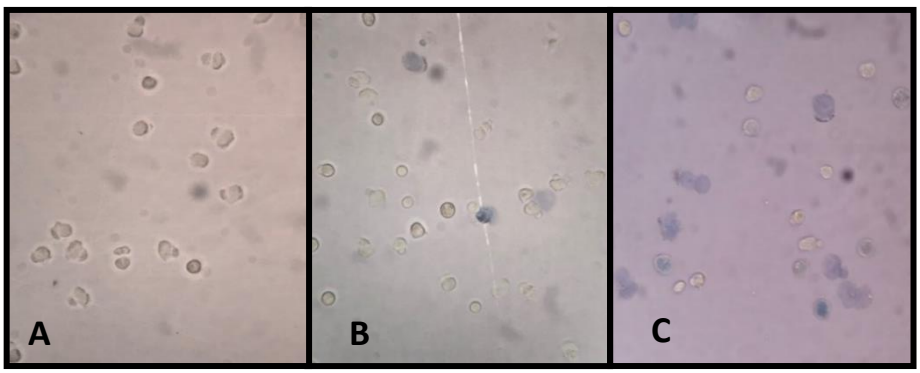


Figura 6: Cultura de neutrófilos em meio RPMI 1640. Objetiva (40x).

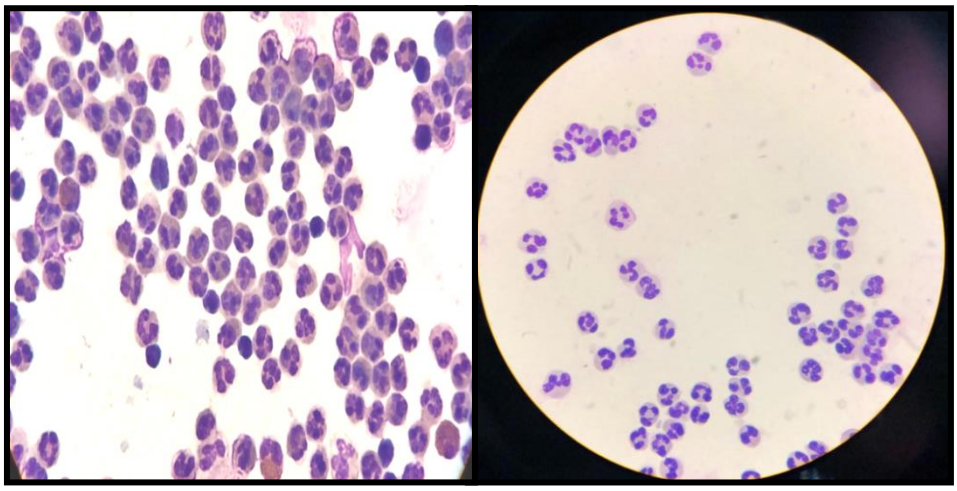
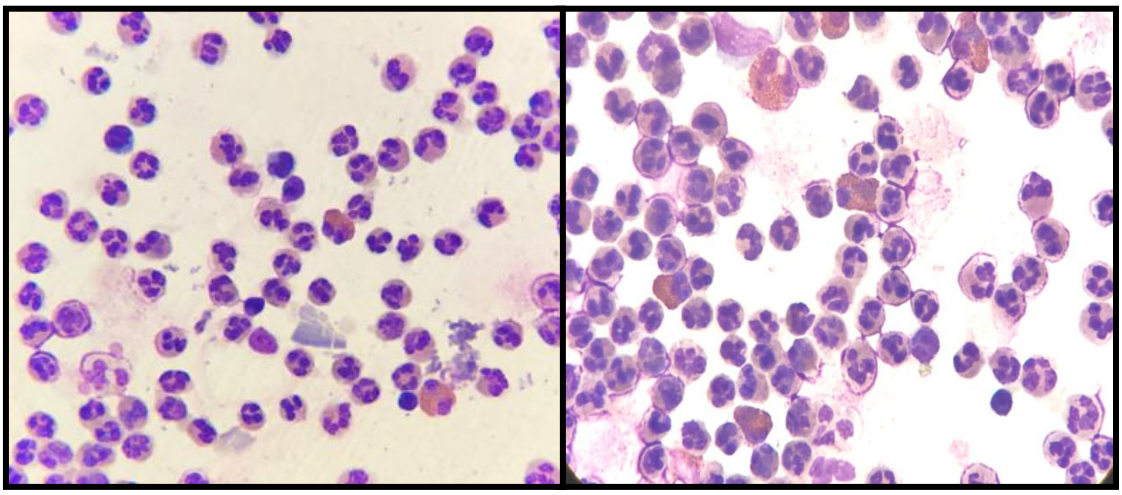


Figura 7: Cultura de neutrófilos em meio RPMI 1640. Presença de contaminates de eosinófilos, monócitos e linfócitos na lâmica. Objetiva (40X).



4.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA HEMOPEXINA NO PLASMA DOS PACIENTES E DE INDIVÍDUOS SADIOS

Durante a hemólise, a hemoglobina e o heme liberados pelas hemácias promovem o estresse oxidativo, a inflamação e trombose dentro do organismo. A hemopexina é uma glicoproteína plasmática de fase aguda, de aproximadamente 60 KDa com uma alta afinidade pelo grupamento heme, cuja função é de previnir tanto as lesões oxidativas ocasionadas pelo heme livre, como também a perda de heme pelo organismo (Tolosano e Altruda, 2002). Dessa forma, a melhor função caracterizada da hemopexina é a eliminação do heme no nível sistêmico, que consiste no transporte do heme para o fígado,

onde é catabolisado ou usado para a síntese de hemoproteínas, e assim, prevenindo as lesões endoteliais e teciduais no organismo, bem como possíveis danos em nível neurológico (Tolosano *et al*., 2010).

Contudo, segundo a literatura, existem outras vertentes quanto à atividade da hemopexina no organismo, a qual está envolvida no bloqueio da migração dos neutrófilos durante a fagocitose, agravando o quadro clínico do hospedeiro, devido à baixa imunidade mediada por células no processo de infecção. Esse mecanismo por sua vez, não esta relacionado a sua atuação como sequestrador do heme, e sim, sugerindo uma nova atividade da hemopexina que ainda é pouco esclarecida (Delanghe; Langlois, 2001; Suzuki e Namiki, 2004; Bakker *et al*., 2005; Mauk *et al.,* 2011).

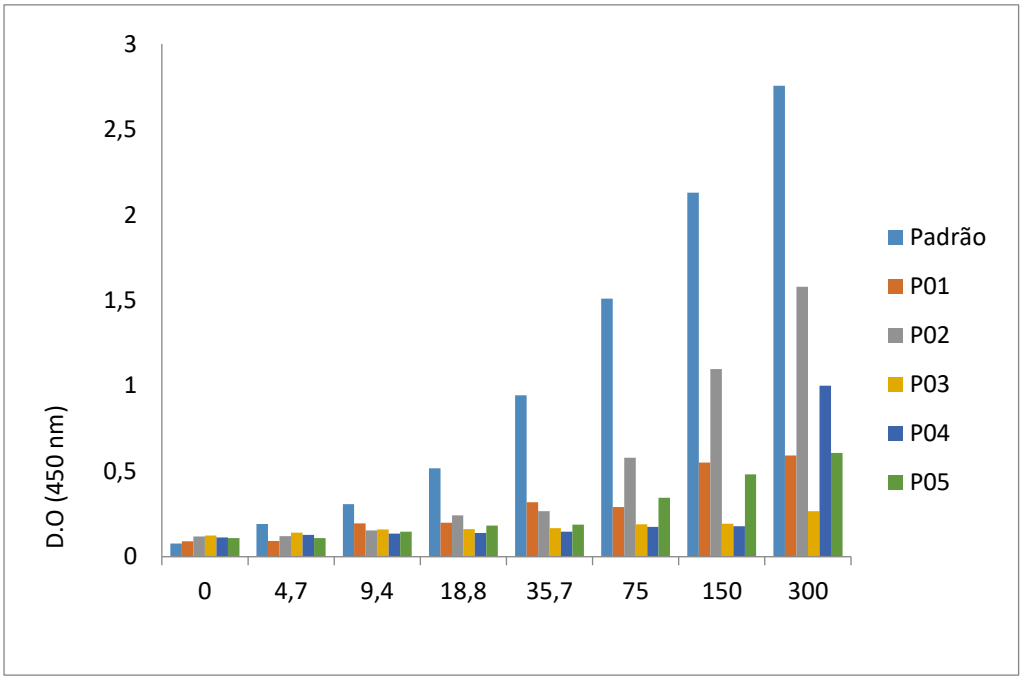
Adicionalmente, Tolosano *et al*. (2010), observou que hemopexina apresenta um duplo papel, uma vez que atua na sua grande maioria como ação protetora em diversas parte do organismo, mas também, pode apresentar atuação prejudicial em outras a atividades. Desta forma, a hemopexina pode ser importante na promoção e regeneração em locais de lesão nervosa, mas também, pode contribuir de forma negativa em alterações na filtração glomerular, causando problemas renais.

Dos 56 pacientes com infecção fungica sistêmica internados na UTI, foi coletado o sangue e, posteriormente separado o soro para realização da dosagem da hemopexina pelo teste de Elisa-Hpx. As amostras biológicas foram mantidas congeladas em freezer (-20º C) para preservação dos analítos. Assim, dos 56 soros, apenas 6 foram utilizados nos testes para detecção da hemopexina, uma vez que, foi preferido utilizar menos amostras biológicas, mas em compensação, dosar essas amostras nas várias concentrações que preconiza o teste. Ademais, os pacientes responsáveis por essas amostras, evoluíram para óbito de modo abrupto, provavelmente devido a piora do quadro clínico, sendo mais um motivo para escolha desse material biológico para análise. Adicionalmente, os níveis de hemopexina de seis indivíduos saudáveis foram dosados e estavam dentro dos valores de referência (0,56 – 1,21 ng\mL).

Foi observado que após o descongelamento dos soros, apenas um apresentou uma aparência lipêmica (presença de gordura), e desta forma, a sua utilização poderia inviabilizar a realização\leitura do teste; os demais soros foram dosados. Assim, a análise do resultado do teste de detecção da hemopexina foi observado visualmente, através da mudança de cor nos poços da placa e por espectrofotômetria. Os cinco pacientes foram dosados frente as concentrações de [0 ng\mL], [4,7 ng\mL], [9,4 ng\mL], [18,8 ng\mL], [35,7 ng\mL], [75 ng\mL], [150 ng\mL] e [300 ng\mL] e os resultados foram expostos na

Figura 8.

Figura 8: Detecção da hemopexina dos pacientes doentes que evoluíram para o óbito pelo método de Elisa-Hpx.



Diante dos dados, foi observado que os pacientes (P01 – P05) que foram a óbito, apresentaram os índices abaixo do padrão; evidenciando que os níveis de hemopexina nesses pacientes estavam reduzidos em relação aos valores de referência para essa molécula. Desta forma, pode-se atribuir o óbito, a falha na defesa primária mediada pelos neutrófilos, no entanto, essa afirmativa deve ser analisada com cautela, visto que pacientes de UTI na sua grande maioria, apresentam uma condição clínica de moderada a grave, devido a presença de outros processos infecciosos e inflamatórios, tratamentos invasivos e principalmente, o uso constante de antibióticos.

Diante disso, os dados obtidos se assemelham com Jung *et al*., (2015), em um estudo clínico com 142 pacientes de UTI que foram em decorrência de sepse grave. Nesse trabalho, os pesquisadores dosaram a hemopexina de todos os indivíduos, e observaram que nos pacientes que foram à óbito, os níveis de hemopexina estavam significativamente reduzidos, quando comparado aos sobreviventes; sugerindo que os níveis reduzidos dessa molécula, pode estar associado ao mau prognóstico na sepse grave aos pacientes, devido a consições gerais que se encontram.

Para Andrade *et al*. (2017), a presença de material lipêmico no soro de pacientes devido ao acúmulo de lipopreteinas, é uma das principais causas de interferências na análise laboratorial. Ainda, de acordo com os autores, são poucas as dosagens bioquímicas (eletrólitos) que podem não sofrer interferência dos lipídios, mas ainda assim, é preferível sempre a utilização de amostras livre desse material gorduroso.

Galeazzi e Merisio (2016), também observaram que a presença de lipídios no soro pode interferir drasticamente a leitura de determinado analíto, uma vez que dosagens de moléculas específicas para detecção de anemias ou, outras doenças de cunho hematológico, podem sofrer forte influência e fornecer resultados falso positivos no diagnóstico para o paciente.

De Oliveira *et al.* (2011), observaram que o congelamento do material biológico a -20º C para uso a longo prazo, pode ser uma alternativa eficaz para realização de dosagens de interesse, pois o congelamento causa mínimos efeitos sobre a maioria dos analitos. Contudo, deve-se evitar vários congelamentos e descongelamentos de uma amostra, já que isso pode afetar a estabilidade de várias substâncias, especialmente as enzimas.

Tolosano *et al*. (2010), em experimentos realizados *in vivo*, mostrou que a hemopexina é uma molécula importante para evitar danos celulares causados pelo estresse oxidativo, principalmente o grupo heme. Porém, poucas são as informações a cerca da atuação dessa molécula diretamente na clínica do paciente, assim como, os reais problemas que a sua presença ou ausência poderiam ocasionar no indivíduo com um processo infeccioso seja de etiologia fúngica ou bacteriana.

Krikken *et al*. (2010), ao estudar a função *in vivo* e *in vitro* da hemopexina, observaram que a presença dessa molécula afetava a barreira de filtração glomerular nas cobaias, levando a uma proteinúria transitória. *In vitro*, perceberam que a hemopexina atuava diretamente na permeabilidade da barreira da filtração glomerular, causada pela degradação do glicocálix, além, de destruir os podócitos do epitélio renal.

Já nos ensaios de Lin *et al*. (2016), os autores observaram que a administração de hemopexina poderia prevenir tanto o dano tecidual, quanto a letalidade em modelos experimentais em ratos, pelo fato dessa molécula capturar o heme livre no organismo. Contudo, levantamentos foram questionados quanto ao excesso de hemopexina pode ser prejudicial ao organismo, devido a sua atividade como protease, bem como, seu efeito na quimiotaixa dos neutrófilos em um estudo a parte.

4.5 ENSAIOS DE FAGOCITOSE *IN VITRO*

4.5.1 Infecção de neutrófilos humanos por leveduras *in vitro,* hemopexina e CFU

Sabe-se que a falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso é um evento determinante para alta taxa de mortalidade ocasionada por uma sepse, tanto de origem bacteriana quanto fúngica (Spiller *et al.*, 2011). Porém, esse complexo mecanismo ainda não foi completamente elucidado, uma vez que ocorre a participação de moléculas tanto de forma positiva, quanto negativa na falência da migração dos neutrófilos (Urban e Nett, 2018).

Neste estudo foi utilizada uma hemopexina liofilizada para avaliar sua atividade como um dos mediadores da fase inicial da falência da migração de neutrófilos, no processo de fagocitose *in vitro* por espécies de leveduras. Foi utilizado nos ensaios uma proporção de 1:5 de células (um neutrófilo para cinco células de leveduras).

Desta forma, foi visualizado no teste de fagocitose *in vitro,* que nas diferentes concentrações empregadas da hemopexina, obteve-se respostas visuais diferentes quanto a fagocitose/interação dos neutrófilos com as células de leveduras nas concentrações de [0 μg/mL - 0,015 μg/mL]. As células foram contadas utilizando o programa ImageJ, em campos distintos, para melhor visualização da interação. Os ensaios foram realizados com *Candida glabrata* (Figura 9), *Candida albicans* (Figura 10), *Candida tropicalis* (Figura 11) *e Kodamaea ohmeri* (Figura 12).

Foi observado que nas diferentes concentrações empregadas da hemopexina, a fagocitose\interação ocorreu em todas elas, independente da concentração utilizada. Também não houve diferença em relação ao potencial fagocítico quanto às espécies de fungos utilizadas (*Candida albicans, C. tropicalis, C. glabrata e Kodamaea ohmeri)* no ensaio, visto que todas tiveram o mesmo comportamento frente aos neutrófilos e hemopexina. Não foi observada mudanças quanto à morfologia das células de leveduras causada pela hemopexina.

No nosso estudo *in vitro,* foi visualizado que a hemopexina exerceu atividade favorável à migração dos neutrófilos, melhorando de alguma forma a competência dessas células na fagocitose frente aos fungos testados. Esses achados divergem em relação ao estudo de Spiller *et al.* (2012), *in vivo,* onde autores demonstraram que a hemopexina purificada administrada por via intravenosa em camundongos submetidos à sepse bacteriana, inibiu a migração de neutrófilos para o foco infeccioso e aumentou a taxa de mor-

talidade nesses camundongos em aproximadamente 90%. Em contrapartida, os camundongos deficientes para hemopexina e submetidos à sepse grave, tiveram um significativo aumento no número de neutrófilos no foco infeccioso e o aumento em torno de aproximadamente 40% na taxa de sobrevida, quando comparados com os demais.

No trabalho de Lin *et al*. (2016), avaliaram a atividade da hemopexina *in vitro*, frente a *Escherichia coli*, com monócitos humanos, e *in vivo* com neutrófilos de ratos, como bloqueador da migração do neutrófilos na fagocitose. Nesse estudo, entretanto, foi visto que a molécula não apresenta a capacidade de causar falência da migração dos neutrófilos e nem em monócitos, inferindo que a sua presença no organismo pode ser um favor favorável na resolução do processo inflamatório em indivíduo em estado crítico, devido a uma maior competência dessas células de defesa.

Após a análise das imagens e contagem das células (neutrófilos totais, os neutrófilos que fagocitaram e a quantidade de leveduras fagocitadas), foi realizado o índice de fagocitese (%), cujo o objetivo é correlacionar o número total de leveduras internalizadas pelo número de neutrófilos que tenham pelo menos uma levedura internalizada.

Desta forma, foi observado microscopicamente no ensaio com *Candida glabrata, C. albicans. C. tropicalis e Kodamaea ohmeri*, que a fagocitose ocorreu em todas as concentrações da hemopexina, visto que em cada neutrófilo internalizou\aderiu no mínimo 3 a 12 células de leveduras, mostrando sua elevada capacidade fagocítica. Destacamos também a formação de Nets (armadilhas celulares) pelos neutrófilos frente ao isolado de *C. glabrata*, como uma outra alternativa eficaz de eliminação do patógeno.

Esses achados corroboram com Urban e Nett (2018), onde os autores afirmaram que algumas espécies de leveduras apresentam a capacidade de estimular os neutrófilos a produzirem essas ferramentas de defesa. As Nets são fibras de DNA formadas com proteínas nucleares (histonas), granulares e citoplasmáticas. Desta forma, espéceis de *Candida abicans, C. glabrata, Criptococcus* sp. *Aspergillus* sp. e outros, possuem moléculas (citocinas) e mecanismos que estimulam a formação das NETs e assim, potencializando o efeito ‘’killer’’ dos neutrófilos, contribuindo para a captura e inativação de diversos microrganismos.

Song *et al*. (2019), demonstaram que as Nets são mecanismos letais e eficazes na eliminação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, vírus e parasitas, sendo o processo conhecido como NETosis. Entretanto, o acúmulo excessivo dessas Nets *in vivo*, também pode estar associado a algumas patologias, como a formação de biofilmes bacterianos, doenças autoimunes e até câncer.

Em relação ao índice fagocítico do isolado de *Candida glabrata*, foi visto numericamente que a medida que a concentração da hemopexina decai, o índice diminui discretamente, até a concentração de [0,125 µg\mL], onde provavelmente, ocorreu uma estabilização da molécula e o índice fagocítico permaneceu constante nas demais concentrações, mostrando que houve uma diferença significativa para o índice de fagocitose nas concentrações inicias de [1 µg/mL - 0,25 µg/mL].

Diferentemente foi observado com o isolado de *Candida tropicalis,* onde em todas as concentrações [1 µg/mL - 0,015 µg/mL], o índice de fagocitose diminuiu discretamente, evidenciando uma redução gradativa dessa molécula, e assim, podendo prejudicar a capacidade fagocítica dos neutrófilos. Contudo, estatisticamente, o isolado de *Candidia tropicalis* não apresentou variação significante para o índice de fagocitose nas concentrações de hemopexina testadas, mostrando que a diferença de concentração da molécula não interfere no ensaio.

Em relação ao isolado de *Candida albicans,* foi visto que o índice de fagocitose aumentou gradativamente a medida que as concentrações da hemopexina aumentava, mostrando que a presença dessa molécula potencializava o efeito microbicida dos neutrófilos. Desta forma, podemos inferir que a hemopexina possa atuar de várias maneiras sob o neutrófilo, tais como a nível de membrana plasmática (através de receptor específico da fração Fc), por meio de receptores da família das integrinas, através da imunoglobulina IgG, já que essa imunoglobulina age com a função de opsonização do microrganismo, nos receptores do sistema complemento, ou diretamente nos grânulos primários e secundários, e assim deixando a fagocitose mais eficaz.

Sabe-se que naturalmente, os neutrófilos apresentam aptidão no combate aos microrganismos invasores, através do reconhecimento por receptores específicos, produção de espécies reativas do oxigênio (burst oxidativo), englobamento por pseudópodes e, principalmente a formação de Nets (Pillay *et al*., 2013; Silva *et al.,* 2015). Provavelmente, pelo fato da hemopexina possuir receptor específico de CD91\LRP expresso na membrana celular, este possa ter afinidade com alguns dos receptores de membrana do neutrófilo (TLRs 1 e 2 ou NLRs) fazendo com que essa ligação ative os fagócitos para eliminação do patógeno (Lin *et al.,* 2012). Outra possibilidade, é a ligação na fração Fc do neutrófilo, fazendo com que a molécula sofra mudança conformacional, permitindo a interação Fc-HPX e assim, potencializando a ação microbicida desse fagócito.

Nos isolados de *Kodamaea ohmeri e Candida albicans,* foi observado que a fagocitose também melhora na presença da hemopexina, mostrando que esses ensaios apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) para a fagocitose. Por ser um ensaio pioneiro onde os neutrófilos são tratados com hemopexina em diferentes concentrações (*in vitro*) e, frente a isolados fúngicos distintos, podemos inferir que de fato, a presença da molécula contribuiu na migração dos neutrófilos, melhorando consequentemente a fagocitose. Desta forma, pensando na clínica do paciente crítico, os ensaios *in vitro,* sugerem que a ausência ou até mesmo a redução dos níveis séricos de hemopexina no organismo, podem levar a uma deficiência no processo de fagocitose, bem como na competência inata atribuída aos neutrófilos como células com poder ‘’killer’’. Este problema reflete em uma maior suceptibilidade do paciente em adquirir algum tipo de infecção microbiana, devido a falha na defesa imunológica e assim, podendo leva-lo ao óbito.

Quanto a contagem das unidades formadoras de colônia víaveis (CFU), foi visualizado que *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Kodamaea ohmeri*, houve um aumento discreto do CFU a medida que diminui a concentração da hemopexina. Provavelmente, pelo fato dos neutrófilos aumentarem sua competência fagocítica na presença da hemopexina; uma maior quantidade de fungo foi internalizada (morta), mostrando que a medida que a concentração da molécula diminui, ocorre uma maior liberação de leveduras vivas e consequentemente, o aumento da contagem de fungos nesse índice. No entanto, essa diferença não foi visualizada do ponto de vista estatístico para as espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis,* diferentemente da *Kodamaea ohmeri* e *Candidia glabrata*, onde apresentaram diferenças significativa ($p<0,05$).

Figura 9: Ensaio de fagocitose da *Candida glabrata*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva (40x).

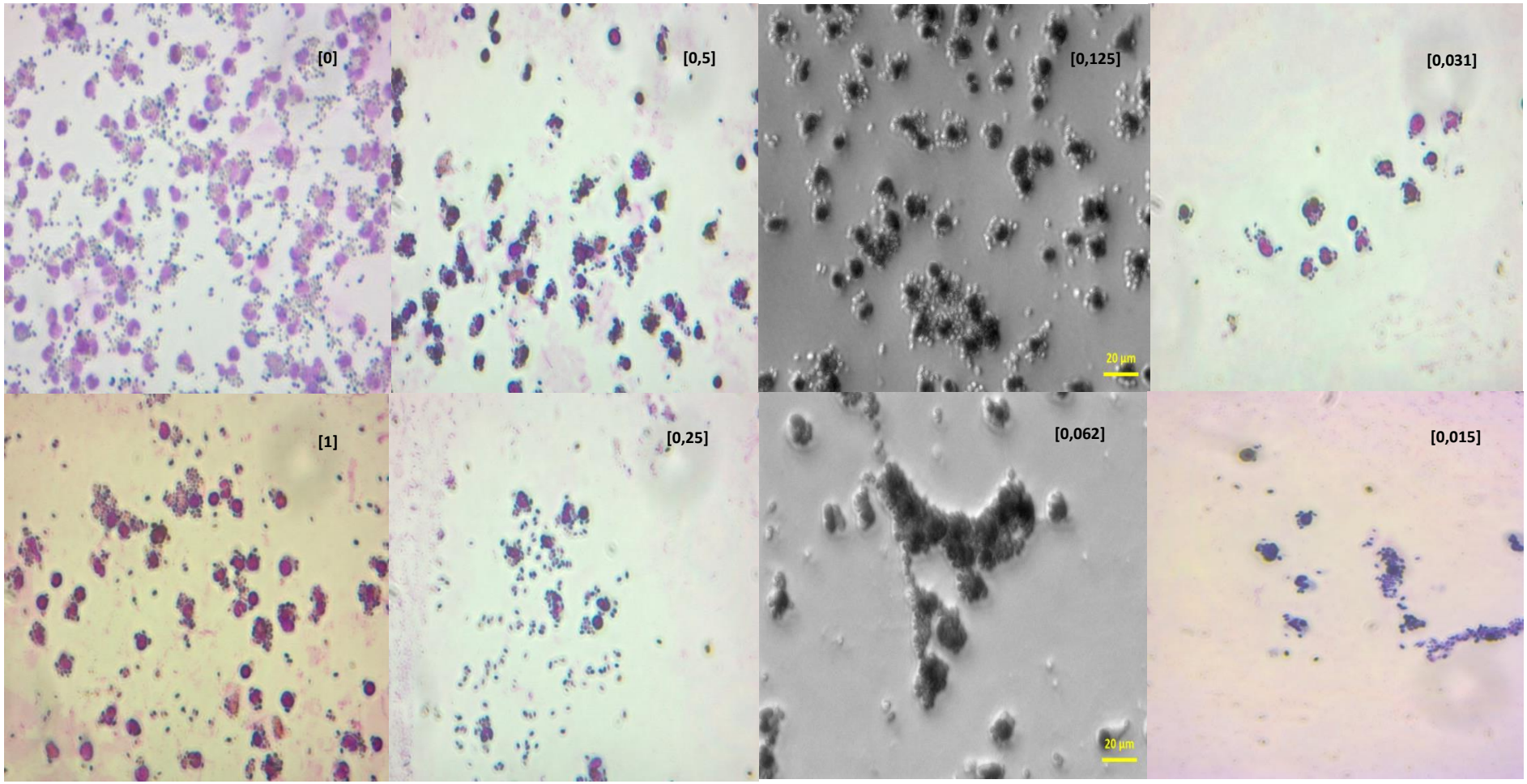


Figura 10: Ensaio de fagocitose da *Candida albicans*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva (40x).

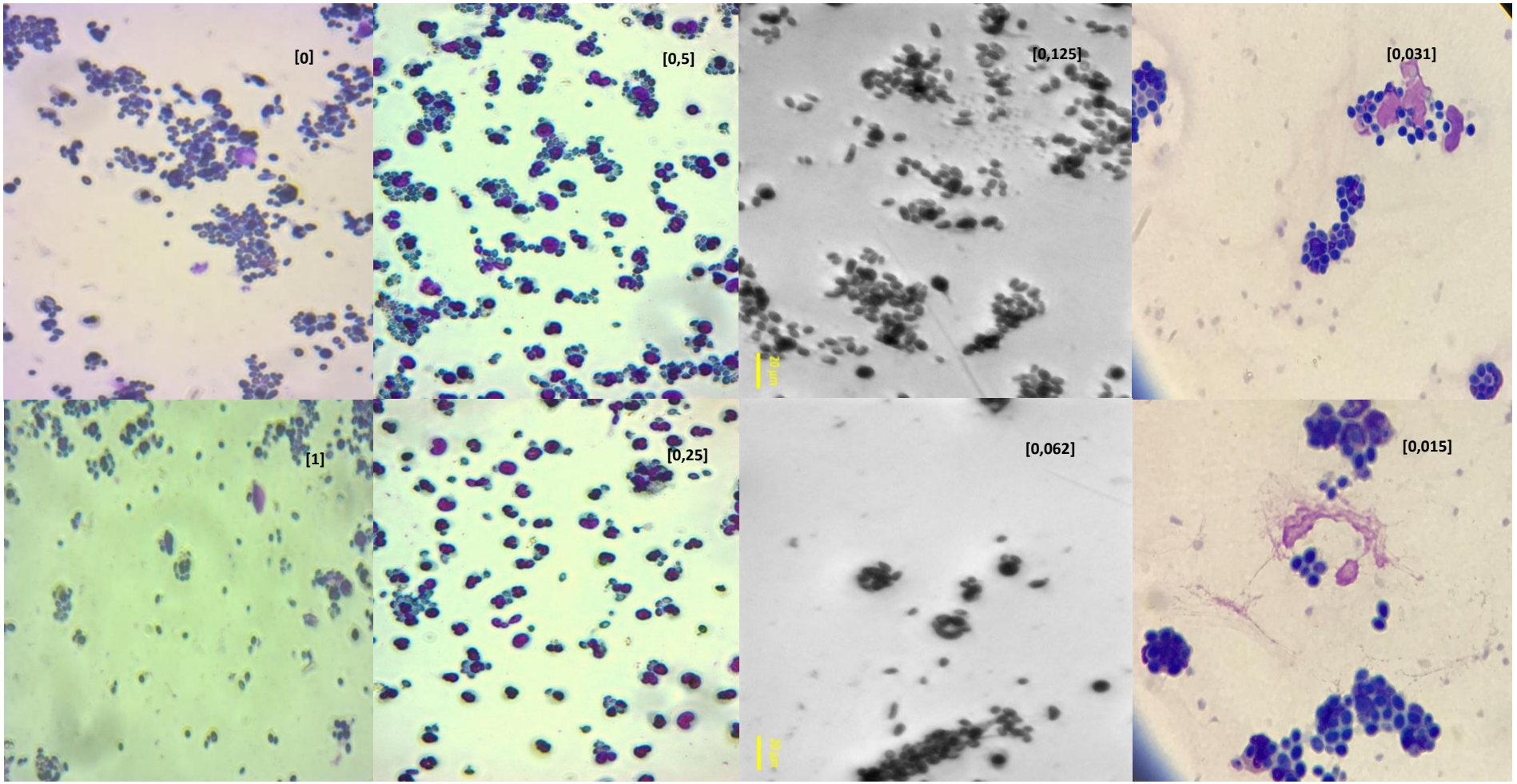


Figura 11: Ensaio de fagocitose da *Candida tropicalis*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva (40x).

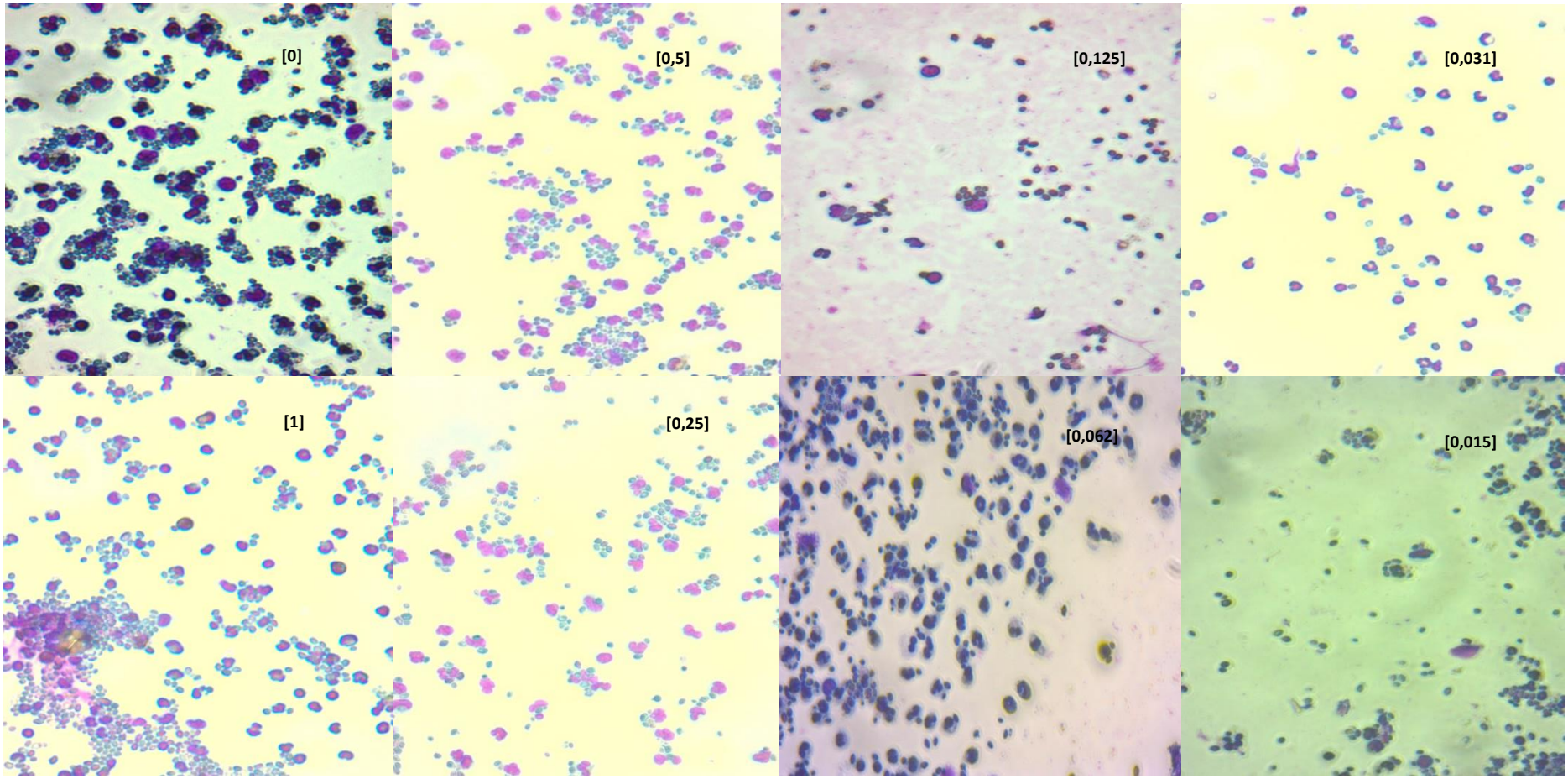


Figura 12: Ensaio de fagocitose da *Kodamaea ohmeri*. Observar o comportamento dos neutrófilos, fungo frente a hemopexina em diferentes concentrações [0] a [0,015]. Objetiva (40x).

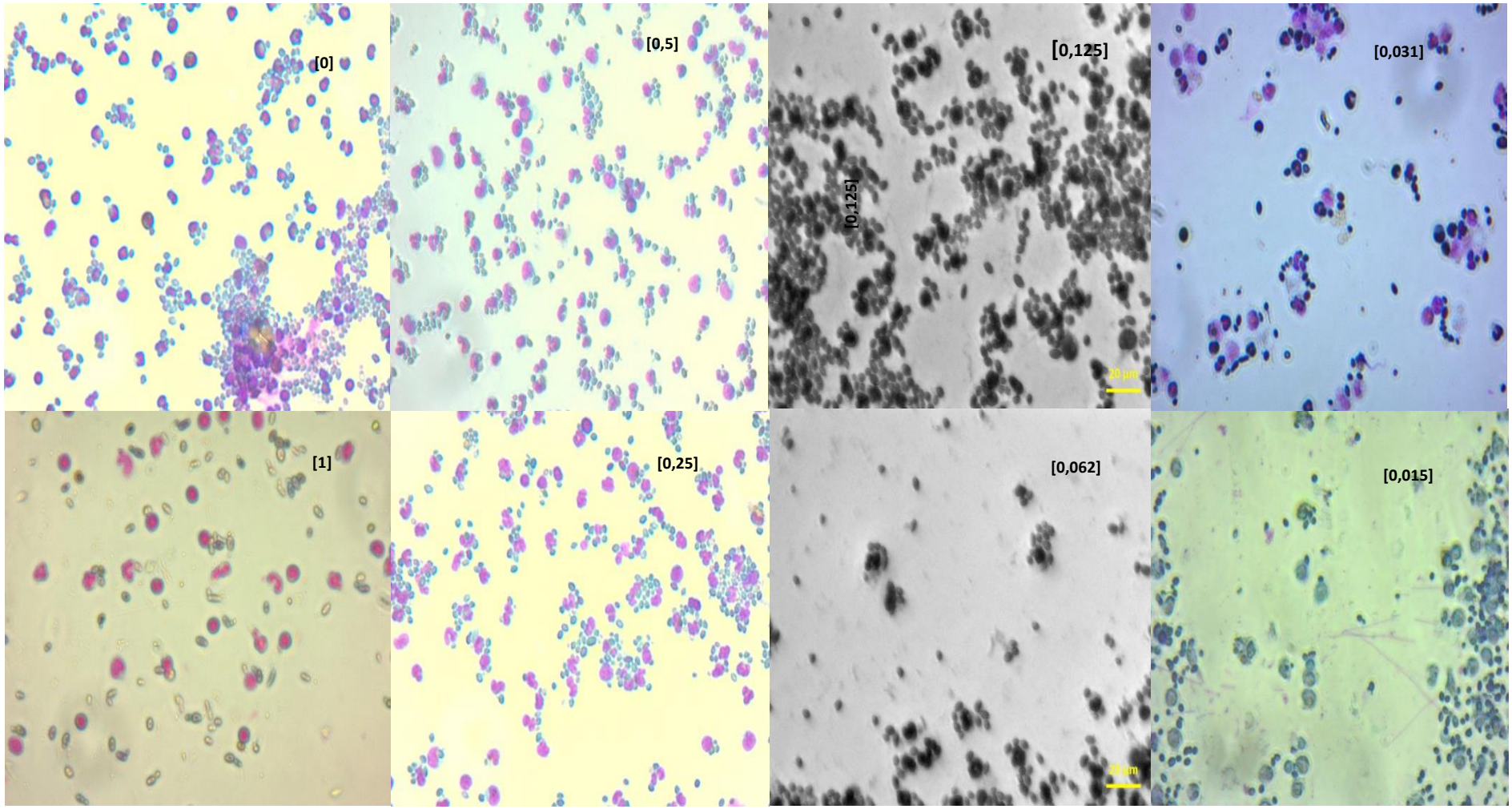


Figura 13: Índice de fagocitose relacionado as espécies de *Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis* e *Kodamaea ohmeri.* Os dados representam a média e o desvio padrão. Para análise o teste Dunnette foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%.

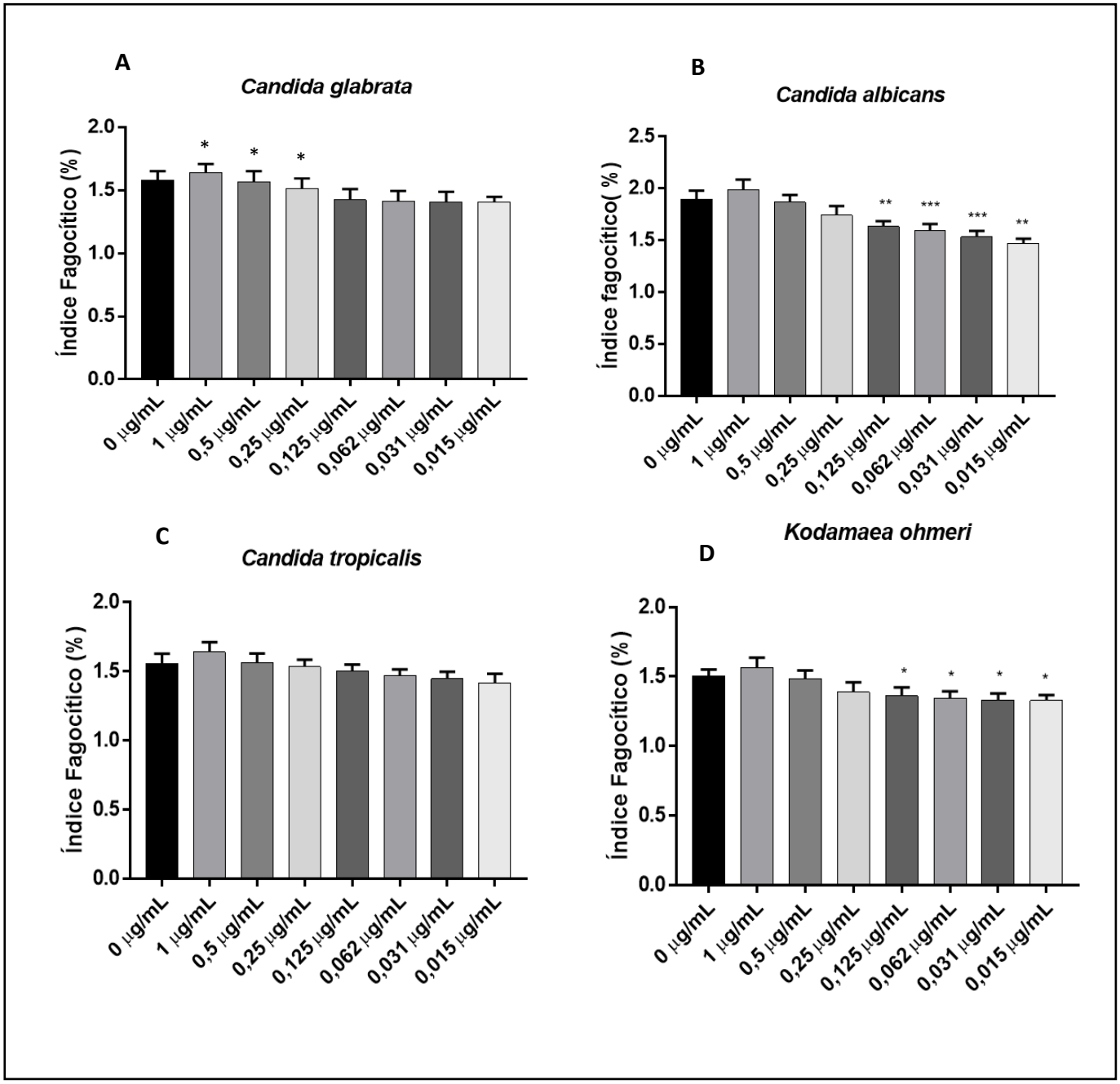
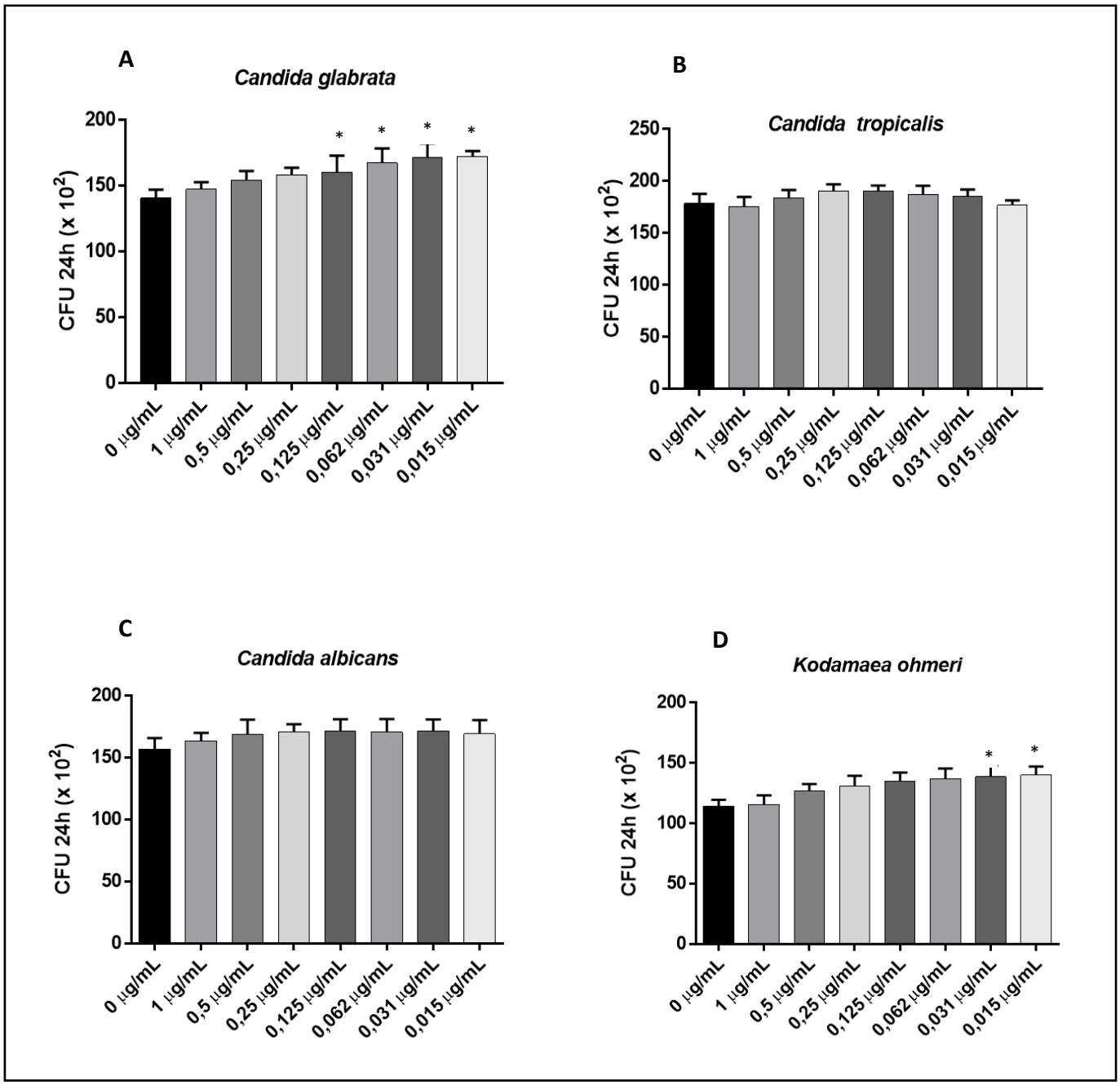


Figura 14: Contagem das unidades formadoras de colônia (CFU) para espécies de *Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis* e *Kodamaea ohmeri.* Os dados representam a média e o desvio padrão. Para análise o teste Dunnette foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%.



5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa pode-se concluir que:

- A realização de levantamentos epidemiológicos sobre uma determinada comunidade microbiana na UTI é extremamente relevante para identificação de possíveis surtos, bem como, para o conhecimento de novas espécies;
- Técnicas automatizadas de identificação, associada a identificação molecular são metodologias aplicáveis e confiáveis para identificação de espécies de leveduras do gênero *Candida, Criptococcus* sp.; além de espécies emergentes como *Kodamaea ohmeri;*
- As espécies mais prevalentes de leveduras isoladas de pacientes críticos de UTI, foram *Candida albicans, C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.
- Espécies emergentes como *Kodamaea ohmeri* e *Candida norvegensis* vem surgindo como importantes agentes etiológicos de micose sistêmica em pacientes grave, internado em Unidade de Terapia Intensiva;
- Níveis reduzidos de hemopexina sérica pode ser um indicativo de quadro infeccioso, culminando em um mal prognóstico para o paciente grave;
- A presença da hemopexina *in vitro*, proporcionou uma melhora na fagocitose nos neutrófilos, frente as espéceis de leveduras testadas, inferindo que a molécula pode apresentar atividade pró-fagocitose.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2015. Imunologia celular e molecular. *Elsevier* Brasil.

Achkar, J.M., Fries, B.C. 2010. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*. 23(2):253-73.

Aderem, A. 2001. Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. *Critical Care Medicine*. 29(7):S16-S18.

Aderem, A. 2003. Phagocytosis and the Inflammatory Response. *The Journal of Infectious Diseases*. 187(2): S340-S345.

Aikawa, N.E., Rosa, D.T.A., Del Negro, G.M.B., Moraes, J.C.B., Ribeiro, C.M., Saad, C.G., Silva, C.A., Bonfá, E. 2016. Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes hematológicos em terapia anti-TNF. *Rev. b r a s. r e u m a t o l*. 56(6):478–482.

Aguiar P.A.D.F., Pedroso R.S., Borges A.S., Moreira T.A., Araújo L.B., Röder D.V.D.B. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2017; 59:e13.

Almeida, JR.J.N., Motta, A.L., Rossi, F., Abdala, E., Pierrotti, L.C., Kono, A.S.G., Diz, M.D.P.E., Del Negro, G.M.B. 2012. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Medical Mycology*. 67:1229-1231.

Althaus, V.A., Regginato, A., Bossetti, V., Schmidt, J.C. 2015. Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifúngicos de uso hospitalar. *Saúde e Pesquisa*. 8(1):7-17.

Alvarez, P.A., Berezin, E. N., Mimica, M.J. 2014. Etiologia das infecções em crianças com neutropenia febril pós-quimioterapia. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*; 59(1):40-2.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D, Zychlinsky, A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*. 30. 459-489.

Andrade, F.F.D., Penaforte, C.L., Veloso, C.A. 2016. Molecular mechanisms of neutrophil extracellular traps formation and their role in innate immunity. *Arq. Ciênc. Saúde*. 23(2):03-08.

Arendrup, M.C. 2013. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* Nov;60(11):B4698.

Antas, P.R.Z., Brito, M.M.S., Peixoto, E., Ponte, C.G.G., Borba, C.M. 2012. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces*

lilacinus focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes and Infection*. 14(1): 1-8.

Andrade, N.N.A., Oliveira, M.V; Souza, C.L. Procedures to minimize interference of hypertriglyceridemia in laboratory exams of lipemic samples in acute pancreatitis: a case report. *J Bras Patol Med Lab*, v. 52, n. 2, p. 103-106, April 2016.

Aquino EN, Neves AC, Santos KC, Uribe CE, Souza PE, Correa JR, Castro MS, Fontes W. 2016. Proteomic Analysis of Neutrophil Priming by PAF. *Protein Pept Lett:* 23(2):142-51. DOI: 10.2174/0929866523666151202210604.

Barbedo, L.S., Sgarbi, D.L.S. 2010. Candidíase. DST. *J Bras Doenças Sex Transm*. 22(1): 22-38.

Bahadori,M ., Amiri, F. , Movahed, M., Roushandeh, A.M, Roudkena, M.H. 2017. Establishment of Stable Chinese Hamster Ovary Cell Line Capable of Expressing Human Recombinant Hemopexin: A Promising Therapeutic Modality Against Hemolytic Anemia.; 4(2): 13360.

Barbosa-Junior AM. et al. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. *J Bras Patol Med Lab*. 2013; v.49, n.3, p.160-168.

Bakker, W.W., Borghuis, T., Harmsen, M.C., Berg, A.V.D., Kema, I.P., Niezen, K.E., Kapojos, J.J. 2005. Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney International*. 68: 603–610.

Benjamin, D.K., Stoll, B.J., Gantz, M.G. et al. 2010. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors and clinical judgment. *Pediatrics*. 126(4): 865-873.

Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M., Petrini, O. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*. 6(1): e16424.

Biswal, D. 2015. *Kodameae ohmeri* – An Emerging Yeast: Two Cases and Literature Review. *Journal of clinical and diagnostic research.* doi:10.7860/jcdr/2015/11586.5661.

Bokoch, G.M. 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 86: 1649-1660.

Borregaard, N. 2010. Neutrophils from marrow to microbes. *Immunity.* 33(5): 657– 70.

Borregaard, N., Sorensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology*. 28(8):340–5.

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

Butler, G. 2010. Fungal sex and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:140–159.

Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. (2013–2015). Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Bleutler, B., Poltorack, A. 2001. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Critical Care Medicine*. 22(7):S2-S6.

Butler, G., Rasmussen, M.D., et al. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. *Nature*. 459: 657-662.

Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 198(5):773-83.

Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Aimanianda, V., Nietzsche, S., Thywißen, A., Gunzer, M. (2010). Production of Extracellular Traps against Aspergillus fumigatus In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. PLoS Pathogens, 6(4), e1000873. doi:10.1371/journal.ppat.1000873.

Carvalho-Parahym, A.M.R., Melo, L.R.B., Morais, V.L.L., Neves, R.P. 2009. Candidiasis in pediatric patients with cancer interned in a university hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 321-324.

Calvo, B., Melo, A.S.A., Perozo-Mena, A., Hernandez, M., Francisco, E.C., Hagen, F. 2016. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *Journal of Infection*.73: 369-374.

Capes-Davis, A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, et al. 2010. Check your cultures! A list of crosscontaminated or misidentified cell lines. International journal of cancer. Jul 1;127(1):1-8.

Coleman, D.C., Rinaldi, M.G., Haynes., K.A, Rex, J.H., Summerbell RC, Anaissie, E.J., Li, A., Sullivan, D.J. 1998. Importance of Candida species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol*. 36 (l1): 156-65.

Colombo, A.L., Guimarães, T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(5):599-607.

Colombo, A.L., Guimarães, T., et al. 2012. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*. 16(1):S1-S34.

Costa, S.C., Figueiredo, M.R.B., Schaurich, D. 2009. Humanização em Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI): compreensões da equipe de enfermagem. *Interface (Botucatu)*.13(1): 571-580.

Cunliffe, R.N. 2003. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol Immunol*. 40(7): 463-467.

Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C., Ruiz-Baca, E. 2012. Candida species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol*. 7(6), 755–771.

Chakrabarti A. 2014. Epidemiological study of a large cluster of fungaemia cases due to *Kodamaea ohmeri* in an Indian tertiary care centre. Clin. *Microbiol. Infect*; 20:O83–O89.

Cleveland, A. A. et al. 2015. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of Candida resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS ONE* 10, e0120452.

Dale, D.C. How I diagnose and treat neutropenia. *Curr Opin Hematol.* 2016 Jan; 23(1): 1–4.

Delanghe, J. R. e M. R. 2001. Langlois. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta*, v.312, n.1-2, Oct, p.13-23.

De Sousa, M.A., Medeiros, N.M., Carneiro, J.R., Cardoso, A.M. 2014. Hemoculturas positivas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital escola de Goiânia – GO, entre 2010 e 2013. *Estudos Goiânia*. 4(3):627-635.

De Sousa AFL, Oliveira LB, Moura MEB. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. Rev. Pre. Infec e Saúde. 2016;2(1-2):11-7.

De Sousa MAA, Nascimento GCN, Bim FL. Infecções hospitalares relacionadas a procedimentos invasivos em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. Rev Pre Infec e Saúde. 2017;3(3):49-58.

De Oliveira, F., Falbo, M., Sandini, I., & Ishiy, L. (2011). Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(2), 717–722.

Diamantis, S., Rioux, C., Bonnal, C., Farfour, E., Papy, A., et al. 2012. Suitability of initial antibiotic therapy for the treatment of bloodstream infections and the potential role of antibiotic management teams in improving it. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 31(7):1667-1671.

Distasi, MA., Del Gaudio, T., Pellegrino, G., Pirronti, A., Passera, M.,Farina, C. (2015). Fungemia due to Kodamaea ohmeri : First isolating in Italy. Case report and review of literature. Journal de Mycologie Médicale, 25(4), 310–316.

Doria, A.C.O.C., Santos, T.B., Figueira, F.R., Sorge, C.D.P.C., Bernardes, R.C., Batista, A.C.S., Sônia Khouri, S. 2015. Comparative study of blood cultures and catheters which were positive for yeast of the genus *Candida* from hospital origin. Revista Univasp. v. 21, n. 38. ISSN 2237-1753.

Ferreira LM, Ferreira LRK. 2003. Experimental model: historic and conceptual revision. Acta Cir Bras.;18:1-3.

Ferreira, LM, Hochman B, Barbos MVJ. 2005. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir. Bras. vol.20 suppl. 2 São Paulo.

Ferreira, A.B., Assunção, C.B., Silveira, T.T.S., Acaiah, R., Freire, A.T.F., Saliba, J.L., Figueiredo, S.M., Rocha-Silva, F., Caligiorne, R.B. 2015. Diagnosis of invasive aspergillosis: Application of Polymerase Chain Reaction Techniques (PCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Galactomannan (EIA-GM®). *Rev Med Minas Gerais*. 25(3): 393-39.

Filho, G. Br. 2016. Livro Bogliolo Patologia. 9ª Edição.

Furlaneto-Maia, L., Specian, A.F.L., Wilnerzon, D.S.T., Oliveira, M.T., Furlaneto, M.C. 2007. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Scientiarum Health Science*. 29: 33-37.

Furze, R.C., Rankin, S.M. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 125: 281-288.

Flores-González, J.C., Guerrero-Lozano, I., Pérez-Guerrero, J.J., Hernández-González, A.., Galán-Sánchez, F., Quintero-Otero, S., Rubio-Quiñones, F., Pantoja-Rosso, S. 2016. Primer caso de infección fúngica invasora por *Candida fabianii* en un paciente pediátrico no neonatal. 33(11), 48-50.

Fraser, M., Borman, A.M., Johnson, E.M. 2017. Rapid and robust identification of the agents of black-grain mycetoma by MALDI-ToF massspectrometry. *Journal Clin Microbiol*. 7.00417-17.

Freshney, R. I. 2005. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5°ed. New York: Wiley-Liss,.Ch.1, Introduction. pp 01-09.

Freshney, R. I. (2006) Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/0471741817.ch1 . Inc pp 03-22.

Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2011; 52: 427-31.

Firacative, C., Lizarazo, J., Illnait-Zaragozí, M. T., & Castañeda, E. (2018). The status of cryptococcosis in Latin America. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 113(7). doi:10.1590/0074-02760170554

Gamaletsou MN, Walsh, TJ, Sipsas, NV. Invasive fungal infecctions in paitients with hematological malignanes: emergence of resistente pathogens and new antifungal therapies. Turk J Haematol. 2018 Mar; 35(1): 1–11.

Galeazzi, V.R., Merisio, P.R.. 2016. Assessment of sICAM-1 levels in patients with sickle cell disease. RBAC.48(3):229-34.

Gahlot, R., Nigam, C., Kumar, V., Yadav, G., Anupurba, S. 2014. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 4(2):162-7.

Garzillo, C., Bagattini, M., Bogdanović, L., Di Popolo, A., Lula, V.D., Catania, M.R., Raimondi, F., Triassi, M., Zarrilli, R. 2017. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. *Italian Journal of Pediatrics*. 19:43(1):10.

Gómez, L.V., Cardona-Castro, N. 2016. Feohifomicosis, una infección fúngica oportunista emergente. *Rev CES Med*. 30(1): 66-77.

Gonçalves, S.S., Amorim, C.S., Nucci, M., Padovan, A.C., Briones, M.R., Melo, A.S., Colombo, A.L. 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of Candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*.16 (7): 885-7.

Góes-Neto, A., Loguercio-Leite, C. & Guerrero, R.T. (2005) DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18: 19–32.

Guitard, J., Angoulvant, A., Letscher-Bru, V., L'Ollivier, C., Cornet, M., Dalle, F., Grenouillet, F., Lacroix, C., Vekhoff, A., Maury, E., Caillot, D., Charles, P.E., Pili-Floury, S., Herbrecht, R., Raffoux, E., Brethon, B, Hennequin, C. 2013. Invasive infections due to *candida norvegensis* and *candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Medical mycology*. 51, 795–799.

Guitard, J; Atanasova, R., Brossas, J.Y., Meyer, I., Gits, M., Marinach, C., Vellaissamy, C., Angoulvant, A., Mazier, D., Hennequina, C. 2015. *Candida inconspicua* and *Candida norvegensis*: New insights into identification in relation to sexual reproduction and genome organization. *J. Clin. Microbiol*. 53(5):1655-1661.

Guimarães, A.C., Donalisio, M.R., Santiago, T.H.R., Freire, J.B. 2011.Óbitos associados à infecção hospitalar ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 64(5):864-9.

Inaba A, Okada A,Yoshida T, Itoyama S, Nakai T, Hisada T, Takano H. 2017. Disseminated Cryptococcosis with Rapidly Growing Lung Nodules in an End-stage Renal Disease Patient. Intern Med. 56: 377.

Jônatas Bussador do Amaral, Paula Rezende-Teixeira, Vanessa Morais Freitas, and Gláucia Maria Machado-Santelli. Tissue Engineering Part C: Methods. November 2011, 17(11): 1097-1107. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0260.

Mariette C, Tavernier E, Hocquet D, Huynh A, Isnard F, Legrand F, Thiébaut A. (2016). Epidemiology of invasive fungal infections during induction therapy in adults with acute lymphoblastic leukemia: a GRAALL-2005 study. Leukemia & Lymphoma, 58(3), 586–593.

Hachem, R., Hanna, H., Kontoyiannis, D., Jiang, Y., Raad, I. 2008. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer*. 112(11):2493-9.

Hajjeh, R.A., Sofair, A.N., Harrison, L.H., Lyon, G.M., Arthington-Skaggs, B.A., Mirza, S.A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Benjamin, L.E., Sanza, L.T., Huie, S., Yeo, S.F., Brandt, M.E., Warnock, D.W. 2004. Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1519-1527.

Hammond, M.E.W., Lapointe, G.R., Feucht, P.H., Hilt, S., Gallegos, C.A., Gordon, C.A., Giedlin, M.A., Mullenbach, G., Tekamp-Olson, P. 1995. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *The Journal of Immunology*. 155: 1428-1433.

Han, S.S., Yim, J.J., Yoo, C.G., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Lee, S.M. 2010. Clinical characteristics and risk factors for nosocomial candidemia in medical intensive care units: experience in a single hospital in Korea for 6 years. *Journal Korean Med Sci*. 25: 671-6.

Hazen, K.C. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 462-478.

Hayashida, M. Z., Seque, C. A., Pasin, V. P., Enokihara, M. M. S. e S., & Porro, A. M. (2017). Disseminated cryptococcosis with skin lesions: report of a case series. Anais Brasileiros de Dermatologia, 92(5 suppl 1), 69–72.

Heeres, J., Meerpoel, L., Lewi, P. 2010. Conazoles. *Molecules*. 15(6): 4129-88.

Henkels, K.M., Frondorf, K., Gonzalez, M.E., Doseff, A.L., Gomez-Cambronero, J. 2011. Il-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by janus kinase 3 (jak3). 585(1): 159–166.

Heggendornn, L.H., Gomes, S.W.C., Silva, N.A., Varges, R.G., Póvoa, H.C.C. 2016. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. *Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA*. 2(1):26-47.

Hofman, P. 2004. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Current Drug Targets Inflammatory Allergy*. 3:1-9.

Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., Marr, K.A., Pfaller, M.A., Chang, C.H., Webster, K.M. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical Infectious Disease*. 48:1695-1703.

Huang, J. P., Tsai, K.-J., & Lin, J. (2018). Unusual fungemia in a patient with metastatic gastric cancer. Journal of Cancer Research and Practice.

Janeway, C.A., Jr. 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 3(13): 1167-71.

Janeway, C.A.,Jr., Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 20:197216.

Jung, D.S., Farmakiotis, D., Jiang, Y., Tarrand, J.J., Kontoyiannis, D.P. 2015. Uncommon Candida Species fungemia among Cancer Patients, Houston, Texas, US. *Emerging Infectious Diseases.* 21 (11): 1942-50.

Jung, J. Y., Kwak, Y. H., Kim, K. S., Kwon, W. Y., & Suh, G. J. (2015). Change of hemopexin level is associated with the severity of sepsis in endotoxemic rat model and the outcome of septic patients. Journal of Critical Care, 30(3), 525–530. doi:10.1016/j.jcrc.2014.12.009.

Kaur, R., Mehra, B., Dhakad, M.S., Goyal, R., Dewan, R. 2017. Pulmonary aspergillosis as opportunistic mycoses in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients: Report from a tertiary care hospital in North India. *Int J Health Sci (Qassim)*. 11(2):45-50.

Kaufman, C., Fisher, J. 2011. Candida urinary tract infections: diagnosis. *Clin Infect Dis*. 52: 452–6.

Kanno, Y., Wakabayashi, Y., Ikeda, M., Tatsuno, K., Misawa, Y., Sato, T., Yotsuyanagi, H., et al. (2017). Catheter-related bloodstream infection caused by Kodamaea ohmeri : A case report and literature review. Journal of Infection and Chemotherapy, 23(6), 410–414.

Krcmery, V., & Barnes, A. J. (2002). Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. Journal of Hospital Infection, 50(4), 243–260.
Khan, Z., Ahmad, S., Al-Obaid, K., Joseph, L., Chandy, R. 2015. *Candida kefyr* as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. 25, (1): 71-75.

Khadka, S., Sherchand, J.B., Pokhrel, B.M., Parajuli, K., Mishra, S.K., Sharma, S., Shah, N., Kattel, H.P., Dhital, S., Khatiwada, S., Parajuli, N., Pradhan, M., Rijal, B.P. 2017. Isolation, speciation and antifungal susceptibility testing of Candida isolates from various clinical specimens at a tertiary care hospital, Nepal. *J Infect*. 24;10 (1):218.

Ko1, K.S., Lee, J.Y., Song, J.H., Peck, K.R. 2010. In vitro evaluation of antibiotic lock technique for the treatment of *Candida albicans, C. glabrata, and C. tropicalis* Biofilms. *Korean Med Sci*. 25:1722-1726.

Kolaczkowski, M., Kolaczkowska, A., Sroda, K., Ramalhete, C., Michalak, K., Mulhovo, S., Ferreira. M.J. 2009. Substrates and modulators of the multidrug transporter CDR1p of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. *Mycoses*. 53:05–310.

Koutserimpas, C., Samonis, G., Velivassakis, E., Iliopoulou-Kosmadaki, S., Kontakis, G., & Kofteridis, D. P. (2018). Candida glabrata prosthetic joint infection, successfully treated with anidulafungin: A case report and review of the literature. Mycoses, 61(4), 266–269.

Kuijpers, T.W. 2001. Neutrophils. *Encyclopedia of life Science\nature Publishing group*.

Kullberg, B.J., Arendrup, M. C. 2015. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 373:1445-1456**.**

Krikken, J. A., Van Ree, R. M., Klooster, A., Seelen, M. A., Borghuis, T., Lems, S. P. M., … Bakker, S. J. L. (2010). High plasma hemopexin activity is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Transplant International, 23(8), 805–812.*

Lange, L.A., Galgowski, C., Roncalio, A.C., Sehnem, F., et al. (2018). Evaluation of the quality and the stability of human samples for analysis and storage in biorepository. RBAC. *2018;50(1):50-6.*

Leimann BC, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994-2004. Cad Saude Publica. 2008; 24: 2582-92.

Lin, T., Maita, D., Thundivalappil, S.R., Riley, F.E., Hambsch, J., Marter, L.J.V., Christou, H.A., Berra, L., Fagan, S., Christiani, D.C., Warren, H.W. 2016. Hemopexin in severe inflammation and infection: mouse models and human diseases. *Critical Care*. 19:166.

Lin T, et al. (2012) Identification of hemopexin as an anti-inflammatory factor that inhibits synergy of hemoglobin with HMGB1 in sterile and infectious inflammation. *J. Immunol*. 189:2017–22.

Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*. 5 (14):1299–1306.

Leclerc, J. L., Santiago-Moreno, J., Dang, A., Lampert, A. S., Cruz, P. E., Rosario, A. M., Doré, S. 2016. Increased brain hemopexin levels improve outcomes after intracerebral hemorrhage. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 38(6), 1032–1046.

Leal Jr, S.M., Vareechon, C., Cowden, S., Cobb, B.A., Latgé, J.P., Momany, M., Pearlman, E. 2012. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. J Clin Invest. 122(7):2482–2498.

Lien, E., Ingalls, R.R. 2002. Tool-like receptors. *Critical Care Medicine*. 30(1):1-6.

Lima, E.M., Andrade, D., Haas, J,V. 2007. Avaliação Prospectiva da Ocorrência de Infecção em Pacientes Críticos de Unidade de Terapia Intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 19 (3): 342-347.

Livério, H.O., Ruiz, L.S., Freitas, R.S., Nishikaku, A., Souza, A.C., Paula, C.R., Domaneschi, C. 2017. 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*. 59: 1-6.

Lin, T., Liu, J., Huang, F. et al. (2016). Purified and Recombinant Hemopexin: Protease Activity and Effect on Neutrophil Chemotaxis. *Mol Med*, 22:22-31, 2016.

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2017). Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. *Nature Reviews Microbiology, 16(1), 19–31.*

Majumdar, S.S., Padiglione, A.A. 2012. Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 13: 204-208.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 11(8):519-531.

Mauk, M. R., Smith, A., & Grant Mauk, A. (2011). An alternative view of the proposed alternative activities of hemopexin. *Protein Science,* 20(5), 791–805.

Mayadas, T.N., Cullere, X., Lowell, C.A. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology*. 9:181-218.

McCarty, T. P. & Pappas, P. G. 2016. Invasive candidiasis. J. Infect. Dis. Clin. North Am. 30, 103–124 .

Mellinghoff, S. C., Cornely, O. A., & Jung, N. (2018). *Essentials in Candida bloodstream infection. Infection.* doi:10.1007/s15010-018-1218-1.

Menezes, J.M.R., Porto, M.L.S., Pimenta, C.L.R.M. 2016. Profile of bacterial infection in a hospital environment. *Rev. Ciênc. Méd. Biol*. 15(2): 199-207.

Meybeck, A., Deconinck, L., Pradier, M., Patoz, P., Melliez, H., Senneville, E. 2016. Community acquired fungemia caused by *Candida pulcherrima*: diagnostic contribution of MALDI-TOF mass spectrometry. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials***.** 15**:**14.

Miquelin, P.R.S., Reis, G.R. 2016. Comparison between the morbidity and mortality rates of patients with septicemia in all federation states and the Federal Distrito. *Revista Amazônia Science & Health*. 4: 420-24.

Molina, J.R., Rojas, R., Serrano, J., Gómez, P. 2012. Invasive fungal diseases in children with hematological malignancies and stem cell transplant recipients. *Journal of Hematological Malignancies*. vol. 2: No. 4.

Morgon, F.H., Guirardello, E.B. 2004. Validação da escala de razão das necessidades de familiares em unidade de terapia intensiva. *Revista Latino Americana de Enfermagem*. 12: 198-203.

Morschhäuser, J. 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 47: 94–06.

Muller, W.A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunology*. 24: 327-334.

Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. The American journal of physiology. Oct;273(4 Pt 1): C1109-23

Mühlhausen, S., Kollmar, M. 2014. Molecular Phylogeny of Sequenced *Saccharomycetes*Reveals Polyphyly of the Alternative Yeast Codon Usage. Genome Biol Evol. 6(12): 3222-3237.

Nakamura, H.M; Caldeira, S.M; Avila, M.A.G. 2013. Incidence of fungic infections in surgery patients: a retrospective approach. *Rev. SOBECC*. 18(3): 49-58.

Nath R, Laskar B, Ahmed J, Subhalakshmi DS, Timung L, Saikia L. 2016. *Cryptococcus neoformans var. grubii*: infection in HIV seronegative patients from northeast India: Report of two cases with review of Literature. Mycopathologia: 181:315–321.

Neves-Junior, M.A., Melo, R.C., Goes-Junior, A.M.O., Protta, T.R., Almeida, C.A., Fernandes, A.R., Petnys, A., Raboni, E. 2010. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. *J Vasc Bras*. 9(1):46-50.

Nicola, A. M., Albuquerque, P., MARTINEZ, L. R., DAL-ROSSO, R. A., SAYLOR, C., DE JESUS, M., NOSANCHUK, J. D., Casadevall, A. (2012). Macrophage Autophagy in Immunity to Cryptococcus neoformans and Candida albicans. Infection and Immunity. v. 80, p. 3065-3076.

Noriega-Iriondo, M.F., Vázquez-Elizondo, G., Carrillo-Esper, R. 2008. El espectro de la candidiasis en la Unidad de Terapia Intensiva. *Revista de Investigación Médica Sur.* 15: 3.

Nourshargh, S., Renshaw, S.A., Imhof, B.A. 2016. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends in Immunology.* 37: 5. 273-286.

Nucci, M., Queiroz-Telles, F., A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 51(5): 561-70.

Oliveira, A.C., Kovner, C.T., Silva, R.S. 2010. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. *Revista Latino-Americana de Enfermagem.* 18(2):233-9.

Oliveira, T.F.L., Gomes-Filho, I.S., Passos, J.S., Cruz, S.S., Oliveira, M.T., Trindade, S.C., et al. 2011. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. *Rev Assoc Med Bras*. 57(6):630-6.

Oliveira, R.B., Atobe, J.H., Souza, S.A., Santos, D.W.C.L. 2014. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a hospital for infectious diseases in Brazil. *Mycopathologia*. 178:71-78.

Paswan, A.K., Raju, D.C., Singh, D.K., Khuba, S., Dubey, R.K. 2012. Isolation and distribution of candida species among different Clinical situations in critically ill patients: prospective Study. *International Journal of Biomedical Research*. 3(02):120-126.

Pasternak, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. 2012. *Einstein (São Paulo)*. 10 no.1.

Pappas, P.G. 2012. Micafungin for candidiasis. *Mycoses*. 55:8–12.

Pappas, P.G. 2006. Invasive candidiasis. *Infectious Diseases Clinic of North America*. 20: 485-506.

Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. Nature Reviews Disease Primers, 4, 18026.

Patel, J.S., Saiman, L. 2010. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact, and prevention including antibiotic stewardship. *Clin Perinatol*. 37:547–563.

Pereira, F., Fernandes, F., Das Chagas, A.N.S., Freitas, M.M.C., Barros, L.M., Caetano, J.A. 2016. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. *Vigilância sanitária em debate*. 4(1):70-77,70.

Pizani AT, Santos MO. Criptococose em pacientes HIV positivos: revisão sistemática da literatura. Revista Saúde Uni Toledo. 2017; 01(01): 90-106.

Pliyev, B.K., Shepelev, A.V., Ivanova, A.V. 2013. Role of the adhesion molecule CD99 in platelet–neutrophil interactions. 91(5): 456-461.

Pfaller, M.A., Jones, N., Doer, V., Sader, S., Messer, A., Houston, S. Coffman, R.J. H., and the sentry participant group. 2000. Bloodstream infections due to candida species: sentry antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44(3):747–751.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Review*. 20:133–163.

Pfaller, M.A., Wolk, D.M., Lowery, T.J. 2015. T2MR and T2Candida: Novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol*. 11 (1), 103-117.

Phikulsod P, Suwannawiboon B, Chayakulkeeree M. 2017. Invasive fungal infection among febrile patients with chemotherapy-induced neutropenia in thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. Vol 48 No. 1.

Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. Lancet Infect Dis. 2017; 17(8): 873-81.

Rasmussen, S. B., L. S. Reinert e S. R. 2009. Paludan. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *Apmis.* 117 (5-6): 323-37.

Reddy, C.R., Standiford, T.J. 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current Opinion in Hematology*. 17: 18-24.

Revankar, S.G., Sutton, D.A. 2010. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev*. 23(4):884-928.

Rigatto, O., Diament, D., Reinaldo Salomão, R. et al. 2011. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico – abordagem do agente infeccioso - diagnóstico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 23 (11): 134-44.

Rodrigues, C.N., Pereira, D.C.A. 2016. Infections to assistance to health occurred at an Intensive Care Unit. *Rev. Investig. Bioméd*. 8:37-47.

Robert B. Ashman (ed.), Leucocytes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 844, DOI 10.1007/978-1-61779-527-5_14,Springer Science+Business Media, LLC 2012.

Saene, V.H.K., Damjanovic, V., Pizer, B., Petros, A.J. 2009. Fungal infections in ICU. Infect Dis Clins North Amer 41: 337-340.

Sanclemente, G., Marco, F., Cervera, C., Hoyo, I., Colmenero, J., Pitart, C., Moreno, A. (2015). Candida norvegensis fungemia in a liver transplant recipient. Revista Iberoamericana de Micología, 32(2), 115–117.

Sarma, S., Upadhyay, S. 2017. Current perspective on emergence, diagnosis and drug resistance in *Candida auris*. *Infect Drug Resist*. 7(10):155-165.

Santos, N.Q. 2004. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enfermagem*. 13 (23): 64-70.

Sega, B.H. 2009. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 360:1870-1884.

Silva, I.C. 2015. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 7: 35-46.

Silva, É. P. da, Torres, M. de M., Cruz, T. P. P. S. da, & Mendonça, A. J. 2017. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento sobre amostras de soro e plasma caninos na análise da enzima alanina aminotransferase (ALT). *Ciência Animal Brasileira,* 18(0). doi:10.1590/1089-6891v18e-33785.

Silva, A. C. R. A., Almeida, B.F.M., Soeiro, C.S., Ferreira, W.L., Lima, V.M.F, Ciarlini, P.C. 2013. Estresse oxidativo e aumento da apoptose em neutrófilos de cães com azotemiapré-renal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(1): 163-170.

Souza, M.D., Neufeld, P.M. 2016. Nosocomial fungal infections correlated to *Candida* spp.: Incidence and species distribution in the metropolitan region of Rio de Janeiro. *Vigil. sanit. Debate*. 4(4):97-110.

Schwartz IS, Patterson, TF. 2018. The Emerging Threat of Antifungal Resistance in Transplant Infectious Diseases. *Curr Infect Dis Rep*, 20: 2.

Shaaban H, Choo HF, Boghossian J, Perez G. 2010**.** Kodamaea ohmeri fungemia in an immunocompetent patient treated with micafungin: case report and review of the literature. *Mycopathologia*. Oct;170(4):223-8.

Shi, R., Zhou, Q., Fang, R., Xiong, X., & Wang, Q. (2018). Severe acute pancreatitis with blood infection by Candida glabrata complicated severe agranulocytosis: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 18(1).

Schulze, J., Sonnenborn, U. 2009. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int*. 106(51-52): 837–842.

Song, Y., Kadiyala, U., Weerappuli, P., Valdez, J.J. et al. (2019). Antimicrobial Microwebs of DNA–Histone Inspired from Neutrophil Extracellular Traps. Adv. Mater. 2019, 1807436.

Spiller, F., Costa, C., Souto, F.O., Vinchi, F., Mestriner, F.L.A.C., Laure, H.J., Alves-Filho, J.C., Freitas, A., Rosa, J.C., Ferreira, S.H., Altruda, F., Hirsch, E., Greene, L.J., Tolosano, E., Cunha, F.Q. 2011. Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 183. 922–931.

Stefaniake, M.J., Zaucha-Prazmo, A., Kaczanowska, K., Kowalczyk, J.R. 2001. The problem of mycotic infections in children with onco-haematological diseases. *Case Reports and Clinical Practices Review*. 2: 135-139.

Stern A, Carrara E, Bitterman R, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Early discontinuation of antibiotics for febrile neutropenia versus continuation util neutropeniaresolution in people with cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Jan 3;1:CD012184. doi: 10.1002/14651858.CD012184.

Strollo, S., Lionakis, M.S., Adjemian, J., Steiner, C.A., Prevots, D.R. 2017. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002–2012. *Emerging Infectious Diseases*. 23(1): 7–13.

Suzuki, K., Namiki, H. erum hemopexin: suppressive effect on neutrophil functions and prospect of clinical application to autoimmune diseases. *Japanese Journal of Clinical Medicine*, 01 Mar 2004, 62(3):577-586.

Swamydas, M., Luo, Yi., Dorf, M.E., Lionakis, M.S.L. 2016. Isolation of mouse neutrophils. *Curr Protoc Immunol*. 110 (3): 20.1–3.20.15.

Takeda, K., T. Kaisho e S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21: 335-76.

Tashiro, A., Nei, T., Sugimoto, R., Watanabe, A., Hagiwara, J., Takiguchi, T., … Kamei, K. (2018). Kodamaea ohmeri fungemia in severe burn: Case study and literature review. Medical Mycology Case Reports, 22, 21–23.

Tarumoto N, Sakai J, Kodana M, Kawamura T, Ohno H, Maesaki S. Identification of disseminated Cryptococcosis using Maldi-Tof MS and clinical evaluation. Med Micol. 2016; 57: 41-46

Tashiro, A., Nei, T., Sugimoto, R., Watanabe, A., Hagiwara, J., Takiguchi, T., … Kamei, K. (2018). Kodamaea ohmeri fungemia in severe burn: Case study and literature review. Medical Mycology Case Reports, 22, 21–23.

Teixeira-Loyola, A.B.A., Fernandes, A.P., Barbosa, C.C., Mattozo, J.M.A, Adenilza C. Silva, A.C., Schreiber, A.Z. 2013. Occurrence and susceptibility profile of *Candida* sp in blood cultures from a university hospital. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 46(4): 398-403.

Tseng, T.Y., Chen, T.C., Ho, C.M., Lin, P.C., Chou, C.H., Tsai, C.T., Wang, J.H., Chi, C.Y., Ho, M.W. 2017. Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: An experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.015.

Tosin, M.M., Moreira, R.V., Silva, J.X., Filho, M.R. 2014. Análise microbiana de amostras de líquido traqueal em pacientes da UTI de um hospital público do DF, coletadas por enfermeiro. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*. 2: 153-160.

Tolosano, E., Altruda, F. 2002. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol*. 21(4):297-306.

Tolosano, E., Fagoonee, S., Morello, N., Vinchi, F., & Fiorito, V. (2010). Heme Scavenging and the Other Facets of Hemopexin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), 305–320.

Underhill D.M., Ozinsky, A. 2002. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annuals Reviews of Immunology*. 20: 825-852.

Vallabhaneni, S., Kallen, A., Tsay, S., Chow, N., Welsh, R., Kerins, J., Kemble, S.K et al. 2016. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus—United States. *American Journal of Transplantation*. 17: 296–299.

Vivas, R., Beltran, C., Munera, M. I., Trujillo, M., Restrepo, A., & Garcés, C. (2016). Fungemia due to Kodamaea ohmeri in a young infant and review of the literature. Medical Mycology Case Reports, 13, 5–8.

Yapar, N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*.10: 95–105.

Yamada Y, Suzuki T, Matsuda M, Mikata K. 1995. The phylogeny of *Yamadazyma ohmeri* (Etchells et Bell) Billon-Grand based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Kodamaea* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci BiotechnolBiochem* .; 59 : 1172 – 1174.

Yoganathan, S., Chakrabarty, B., Gulati, S., Kumar, A., Kumar, A., Singh., Xess, I. 2014.*Candida tropicalis* brain abscess in a neonate: An emerging nosocomial menace. *Ann Indian Acad Neurol*. 17(4): 448–450.

Xou X., Xiao, M., Chen, S.C.A., Wang, H., Yu, S.H., Fan, X., Kong, F., Xu, Y.C. 2017. Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Multi-Center Chinese Collection of Yeasts. *Front. Microbiol*.19.

Zervou, F.N., Zacharioudakis, I.M., Kurpewski, J., Mylonakis, E. 2016. T2 magnetic resonance for fungal diagnosis. *Human Fungal Pathogen Identification*. 1508: 305-319.

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CEP - CCS - UFPE

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

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFECÇÕES FÚNGICAS SISTÊMICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: DIAGNÓSTICO E APLICAÇÃO DA HEMOPEXINA EM MODELOS BIOLÓGICOS IN VITRO.

Pesquisador: Rejane Pereira Neves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51544815.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.409.132

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de doutorado apresentado pela aluna Ana Paula Santiago Rocha, ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA, sob a orientação da Profª Rejane Pereira Neves.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: