



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Micologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE INIBIDOR DE
CICLOXIGENASE E FLUCONAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ENDOCARDITE POR ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis***

RECIFE - PE

2017

FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE INIBIDOR DE
CICLOXIGENASE E FLUCONAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ENDOCARDITE POR ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis***

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

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

RECIFE-PE

2017

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

Santos, Franz de Assis Graciano dos

Avaliação da atividade anti-biofilme de inibidor de cicloxigenase e fluconazol em modelo experimental de endocardite por espécies do complexo *Candida parapsilosis* / Franz de Assis Graciano dos Santos. – Recife: O Autor, 2017.

81 f.: il.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2017.

Inclui referências

1. Fungos 2. Leveduras I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Título.

579.5

CDD (22.ED.)

UFPE/CCB-2017-195

FRANZ DE ASSIS GRACIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE INIBIDOR DE CICLOXIGENASE
E FLUCONAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOCARDITE POR
ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis***

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

Aprovada em: 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym
Faculdade Frassinetti do Recife

A Deus,
Aos meus pais Francisco de Assis e Maria José

AGRADECIMENTO

À Deus pelo dom da vida, sabedoria e amor, por me guiar e se fazer presente em cada detalhe de minha vida.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Maria José, pelo amor, carinho, paciência e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Serei eternamente grato a vocês.

Aos meus irmãos, Franklin e Filêmon, pela amizade e incentivo nesta caminhada, pelos exemplos de amor e pela presença contínua em minha vida.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves, pela acolhida, pela paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidos.

Aos professores da micologia médica: Prof^o. Dr^a Oliane Magalhães e Prof. Dr. Armando Marsden. Obrigado pela disponibilidade e carinho prestados e por todo o conhecimento que me foi transmitido.

Aos queridos amigos de perto e de longe, em especial a Jeaninne, Jéssica, Iris e Brena, vocês são um grande presente que recebi, obrigado pela amizade e carinho constantes.

Ao amigos da Micologia médica: Adryelle Ertênia, Carlos, Nadja, Ildy, Heloisa, Rafael, Tatiana, Audilene, Cícero, Raquel e Débora, pelos momentos de apoio, amizade e descontração.

À Melyna, Michellangelo, Pamella, Ana Paula e Daniela obrigado por tudo, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa, sou grato por vocês serem mais que amigos, mas verdadeiros irmãos, os levarei para sempre comigo.

Aos membros da banca Prof^a Dr^a Danielle Macêdo, Prof^a Dr^a Ana Maria Parahyn, Prof^a Dr^a Carolina Maria e Prof Dr Reginaldo Gonçalves, obrigado pelas contribuições e conhecimento que me foi transmitido.

Ao Núcleo de Cirurgia Experimental pelo suporte oferecido para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao serviço de Microscopia Eletrônica do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami).

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Micologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pela oportunidade de crescer profissionalmente através da minha formação, apoio e participação em pesquisas.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

Certamente que a bondade e a misericórdia do
Senhor me seguirão todos os dias da minha vida.

Salmos 23:6

RESUMO

Os biofilmes microbianos são comunidades de microrganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície que produzem substância polimérica extracelular, a formação de biofilme é relevante devido à contínua liberação de microrganismos que o compõe, os quais mostram fenótipo diverso daquele encontrado na forma planctônica. *Candida parapsilosis*, atualmente dividida em três espécies distintas, apresentam notória capacidade de formação de biofilmes em cateteres e outros dispositivos implantados. Assim, este trabalho teve objetivos determinar a ação antifúngica e antibiofilme *in vitro* e *in vivo*, isolada e sinérgica, de fluconazol e ácido acetilsalicílico frente a modelo experimental de endocardite por espécies do complexo *C. parapsilosis*. Os isolados foram revisados e caracterizado morfolologicamente e por técnicas proteômicas. Assim, 20 isolados fenotipicamente classificados como *C. parapsilosis* foram reclassificados. A atividade antifúngica das drogas foi determinada seguindo as condições descritas no documento M27-S4 do *Clinical Laboratory Standards Institute*. A Concentração Inibitória Fracionária (FIC) foi avaliada através das combinações de Ácido Acetilsalicílico, fluconazol e Anfotericina B, usando o método de diluição chequerboard. Na sequência Os testes de aderência foram baseados nos trabalhos de Kimura e Pearsall, 1978. Os biofilmes foram preparados usando-se o modelo de placa de microtitulação e quantificados por metodologia colorimétrica do ensaio de redução de hidróxido de tetrazolium (XTT) para avaliação da viabilidade celular, antes e após tratamento. Adicionalmente, empregou-se o uso de microscopia eletrônica de varredura para observação da arquitetura dos biofilmes do complexo *C. parapsilosis*. O desafio experimental e avaliação clínica, seguiu o modelo murino neutropênico descrito por Craig e Andes 2008 e foi usado para gerar candidíase disseminada e com consequente endocardite. As técnicas proteômicas empregadas distinguiram os isolados como *C. parapsilosis* stricto sensu (80%), *C. metapsilosis* (10%) e *C. orthopsilosis* (10%), das quais 100% foram capazes de formar biofilme, mesmo apresentando fraca adesão as células epiteliais. Testes de sensibilidade frente aos agentes antifúngicos (fluconazol e anfotericina B) demonstraram que todas as cepas do complexo *C. parapsilosis* foram sensíveis. Ácido acetilsalicílico e Fluconazol apresentaram ação sinérgica frente a todas cepas testadas, padrões de antagonismo e de indiferença foram observados quando utilizado fluconazol e anfotericina B, e ácido acetilsalicílico e anfotericina B. O ensaio de redução de XTT demonstrou que todas os isolados formaram biofilmes independente das suplementações e em todos tempos testados. Na atividade anti-biofilme podemos observar uma redução significativa na formação de biofilme por espécies do complexo *C. parapsilosis*, quando utilizado fluconazol e ácido acetilsalicílico de forma combinada. No desafio experimental, a cepa selecionada para modelo de infecção foi a URM 7434 *C. orthopsilosis*, por apresentar melhor produção de biofilme, menores CIMs, melhor resposta ao tratamento proposto e melhor resposta aos testes pilotos *in vivo*, os grupos de tratamento, principalmente os que fizeram uso de fluconazol e ácido acetilsalicílico de forma combinada conseguiram debelar a infecção no sétimo dia de tratamento, sem apresentar recidiva até 28º dia de sobrevida. Neste sentido o conhecimento acerca das espécies do complexo *C. parapsilosis*, além da expressão dos fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica, norteiam e viabilizam a conduta terapêutica adequada para tratamento e cura.

Palavras-chave: Leveduras. Candidemia. Ácido Acetilsalicílico. Prostaglandinas.

ABSTRACT

Microbial biofilms are microorganisms communities irreversibly adhered to a surface that produce extracellular polymeric substance, the formation of biofilm is relevant due to the continuous release of microorganisms that compose it which show phenotype different from that found in the planktonic form. *Candida parapsilosis*, currently divided into three distinct species, have a remarkable ability to form biofilms in catheters and other implanted devices. The aim of this study was to determine the antifungal and antibiofilm action *in vitro* and *in vivo*, isolated and synergistic with fluconazole and acetylsalicylic acid against an experimental model of endocarditis by *C. parapsilosis* complex. The isolates were reviewed and characterized morphologically and proteomic techniques. Thus 20 isolates phenotypically classified as *C. parapsilosis* were reclassified. The antifungal activity of the drugs was determined following the conditions described in document M27-S4 of the Clinical Laboratory Standards Institute. Fractional Inhibitory Concentration (FIC) was evaluated by the combinations of Acetylsalicylic, fluconazole and amphotericin B using the dilution method checkerboard. The adhesion tests were based on the work of Kimura and Pearsall, 1978. Biofilms were prepared using the microtiter plate model and quantified by tetrazolium hydroxide reduction (XTT) colorimetric methodology for viability evaluation before and after treatment. In addition, scanning electron microscopy was used to observe the architecture of the *C. parapsilosis* complex biofilms. The experimental challenge and clinical evaluation followed the murine neutropenic model described by Craig and Andes 2008 and was used to generate disseminated candidiasis and with consequent endocarditis. The proteomic techniques used in this study distinguished *C. parapsilosis* *stricto sensu* (80%), *C. metapsilosis* (10%) and *C. orthopsilosis* (10%), 100% of which were able to form biofilms, Epithelial cells. Sensitivity tests against antifungal agents (fluconazole and amphotericin B) demonstrated that all strains of the *C. parapsilosis* complex were sensitive. Acetylsalicylic acid and fluconazole showed synergistic action against all strains tested patterns of antagonism and indifference were observed when using fluconazole and amphotericin B and acetylsalicylic acid and amphotericin B. The XTT reduction assay showed that all isolates formed biofilms independent of supplements and at all times tested. In the anti-biofilm activity we can observe a significant reduction in biofilm formation by species of *C. parapsilosis* complex, when used fluconazole and acetylsalicylic acid in combination. The experimental challenge, the selected strain for the infection model was URM 7434 *C. orthopsilosis* because it presented better biofilm production, lower MICs, better response to the proposed treatment and better response to *in vivo* pilot tests treatment groups, especially Who used fluconazole and acetylsalicylic acid in combination, were able to control the infection on the seventh day of treatment, without relapse up to the 28th day of survival. In this sense, the knowledge about the species of the *C. parapsilosis* complex, in addition to the expression of the virulence factors and the antifungal sensitivity profile, guide and enable the appropriate therapeutic management for treatment and cure.

Key words: Yeast. Candidemia. Acetylsalicylic Acid. Prostaglandins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** (A) Aspecto macroscópico mostrando colônia branca com bordos irregulares e textura cremosa em cultura pura; (B) Microscopia da cultura apresentando células de leveduras ovais e hialinas de *Candida parapsilosis* no 3º dia de crescimento em meio ágar Sabouraud Dextrose. **Pág. 48**
- Figura 2.** (A) Assimilação de fontes de carbono (D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L-lactose, S-sacarose, G-galactose) e (B) nitrogênio (S-sulfato de amônio, N-nitrato de potássio) por *Candida parapsilosis* **Pág. 48**
- Figura 3.** (A) Teste de urease Negativo e (B) fermentação das carbono (D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L-lactose, S-sacarose, G-galactose T - trealose) por *Candida parapsilosis* **Pág. 48**
- Figura 4.** Resultados das leveduras identificadas pelo MALDI Biotyper. Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1. **Pág. 49**
- Figura 5.** Plano espectral proteico de leveduras clínicas do Complexo *Candida parapsilosis*, obtido em Smartbean Autoflex III Bruker Daltonics. A) *Candida parapsilosis stricto sensu* URM 7446. B) *Candida orthopsilosis* URM 7434. C) *Candida metapsilosis* URM 7427. Fonte: Software MALDI Biotyper™ versão 3.1. **Pág. 50**
- Figura 6.** (A) Isolado de *Candida Orthopsilosis* URM 7434, apresentando fraca aderências as células epiteliais (B) Isolado de *C. albicans* apresentando um forte padrão de aderência **Pág. 53**
- Figura 7.** Formação de biofilme em superfícies de polipropileno. C: controle negativo; 1+: biofilme fraco; 2+/ 3+: biofilme moderado; 4+: biofilme forte **Pág. 54**
- Figura 8:** Atividade oxidativa de biofilme do Complexo *Candida parapsilosis* em diferentes tempos de incubação e suplementação **Pág. 55**
- Figura 9:** Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida metapsilosis*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 56**
- Figura 10:** Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida orthopsilosis*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 57**
- Figura 11:** Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida parapsilosis stricto sensu*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 58**
- Figura 12:** Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. metapsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24 horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO) **Pág. 60**

Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. orthopsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24 horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO) **Pág. 61**

Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. parapsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24 horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO) **Pág. 61**

Figura 15. Perfil de sensibilidade de Fluconazol. (64-0,125 µg/ml) frente a isolado *Candida orthopsilosis* URM 7434. **Pág. 63**

Figura 16. Perfil de sensibilidade de Fluconazol e Ácido acetilsalicílico frente *Candida orthopsilosis* URM 7434 **Pág. 67**

Figura 17: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida metapsilosis*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 68**

Figura 18: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida orthopsilosis*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 69**

Figura 19: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida parapsilosis stricto sensu*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT. **Pág. 70**

Figura 20. (A) Exame direto dos fragmentos de tecidos cardíaco com várias células de leveduras ovais e hialinas aderidas ao tecido (B) Macroscopia de *Candida* sp. em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos cardíaco. Colônias com bordas lisas; e coloração creme. (C) Cultura pura de *Candida orthopsilosis*. **Pág. 72**

Figura 21. Cultura sem desenvolvimento fúngico em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos cardíaco, após tratamento combinado de Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico **Pág. 72**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio por leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*. **Pág. 46**
- Tabela 2.** Temperatura de crescimento de leveduras clínicas de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*. **Pág. 47**
- Tabela 3.** Aderências as células epiteliais e formação de biofilme de isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* **Pág. 52**
- Tabela 4.** Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis* **Pág. 62**
- Tabela 5.** Teste de tabuleiro de xadrez (Fluconazol e Ácido acetilsalicílico) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis* **Pág. 64**
- Tabela 6.** Teste de tabuleiro de xadrez (Fluconazol e Anfotericina B) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*. **Pág. 65**
- Tabela 7.** Teste de tabuleiro de xadrez (Anfotericina B e Ácido acetilsalicílico) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*. **Pág. 66**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Problematização	15
2.	OBJETIVO	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3.	PROCEDIMENTO METODOLÓGICOS	18
3.1	Autenticação dos isolados de leveduras estocados na micoteca URM	18
3.2	Ensaio da morfogênese: formação e inibição de tubo germinativo	21
3.3	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	22
3.4	Tabuleiro de xadrez	23
3.5	Teste de aderência às células epiteliais	24
3.6	Ensaio qualitativo do biofilme	25
3.7	Ensaio quantitativo do biofilme	25
3.8	Avaliação anti-biofilme de fluconazol e inibidor de cicloxigenase - ácido acetilsalicílico	26
3.9	Microscopia eletrônica de varredura	27
3.10	Atividade antifúngica <i>in vivo</i>	27
4.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
4.1	Infecções fúngicas	30
4.2	Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	31
4.3	Fatores de virulência	32
4.4	Aderência	33
4.5	Biofilmes	34
4.6	Endocardite	37
4.7	Terapia antifúngica (drogas padrão)	38
4.8	Sensibilidade antifúngica das drogas utilizadas no tratamento da candidemia	41
4.9	Inibidores de ciclooxigenase	42
5.	ANÁLISE DOS RESULTADOS	45
5.1	Revisão taxonômica morfofisiológica dos isolados clínicos de <i>C. Parapsilosis</i>	45
5.2	Perfil proteico por Maldi TOF MS de leveduras clínicas do complexo <i>Candida Parapsilosis</i>	48
5.3	Aderência às células epiteliais e qualificação dos biofilmes	51
5.4	Ensaio para redução XTT - quantificação de biofilmes por leveduras clínicas do complexo <i>Candida Parapsilosis</i>	54
5.5	Análise da morfologia de biofilmes formados sobre a superfície do látex siliconizado por meio de microscópio eletrônico de varredura (Mev)	59
5.6	Teste de sensibilidade antifúngica <i>In vitro</i>	62
5.7	Teste de sensibilidade Antifúngica <i>In vitro</i> Tabuleiro de Xadrez	64
5.8	Ensaio para redução XTT – efeito anti-biofilmes de isolados do complexo <i>Candida Parapsilosis</i>	68
5.9	Modelo de experimental de endocardite - atividade antifúngica <i>In Vivo</i>	72
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A	81

1. INTRODUÇÃO

Os biofilmes são considerados a principal forma de crescimento celular de micro-organismos, a exemplo dos fungos, particularmente das leveduras. São complexas populações de agregados de células associadas à superfícies abióticas ou naturais, envoltas por uma matriz extracelular. Nesta condição, os microrganismos expressam fenótipos diferentes tanto no agregado quanto nas células em suspensão denominadas células planctônicas (Finkel; Mitchell, 2011; Fanning; Mitchell, 2012). Ademais, desempenha um papel fundamental na evasão às respostas imunológicas do hospedeiro, continuidade da infecção e desenvolvimento de resistência. A estrutura do biofilme inclui estágios sequenciais de formação constituídos por adesão, crescimento celular e maturação (Dominic et al., 2007; Aparna; Yadav, 2008; Golia et al., 2011).

Os fatores que os mantêm viáveis incluem nutrientes, moléculas de *quorum-sensing* e superfície de contato, caracterizado por intensa cooperação metabólica constituindo desta forma condições de patogenicidade (Finkel; Mitchell, 2011; Fanning; Mitchell, 2012). Um amplo espectro de fungos de importância médica como as espécies de *Candida*, particularmente *C. parapsilosis* podem produzir biofilmes e estabelecer infecções clínicas graves (Di Bonaventura et al., 2006; Finkel; Mitchell, 2011; Cordeiro et al., 2013). Ademais, tais estruturas conduzem a quadros clínicos crônicos e de alta refratariedade terapêutica, apresentando-se até cem vezes mais resistentes às drogas antifúngicas do que as células planctônicas (Fiori; Van Dijck, 2012; Costa et al., 2013).

Na formação de biofilmes por fungos em dispositivos médicos ocorre maior risco de desenvolvimento de infecções e refratariedade terapêutica, constituindo assim, alto índice de mortalidade, sobretudo em imunodeprimidos (Martinez; Fries, 2010). Embora historicamente *C. albicans* seja a espécie mais relacionada a este fator patogênico, mudanças pouco estudadas e esclarecidas têm ocorrido, contribuindo para o aumento na proporção de infecção por espécies *Candida* não-*Candida albicans*. As razões para essa mudança no padrão de distribuição das espécies ainda não foram completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas com o potencial de virulência destes microrganismos (Tamura et al., 2007; Bassetti et al., 2011). Contudo, o cenário atual indica que tal mudança está implicada em condições de risco para a formação de biofilmes como uso de válvulas cardíacas prostéticas e cateteres de inserção central, utilizados como conduta terapêutica em diversos quadros clínicos, a exemplo das deficiências cardíacas (Ramage et al., 2009; Mohammadi et al., 2013).

Os constituintes da parede celular, como mananas e galactomananas (polissacarídeos hidrofílicos) assumem papel fundamental nos primeiros estágios de formação destas estruturas ao exercerem ação de adesinas. Tal etapa é seguida pela proliferação das células sobre a superfície e produção de matriz exopolimérica com coesão intercelular. Assim, caracterizando um processo sequencial e definindo comunidades dinâmicas destas leveduras. Ademais, há uma preferência dos microrganismos em permanecer como comunidades estruturadas e não como células planctônicas (Bink et al., 2011).

Na virulência o biofilme é um dos atributos mais importantes, constituindo alguns dos requisitos para o estabelecimento de infecção, colaborando para o aumento da resistência a drogas antifúngicas como fluconazol, uma droga comumente utilizada no tratamento de candidíase (Costa et al., 2013). Ainda, na formação de biofilmes por *Candida* tem sido atribuído papel importante às prostaglandinas, constituintes do processo inflamatório. Neste sentido, o uso de inibidores da enzima cicloxigenase, a qual participa da biossíntese das prostaglandinas e presentes nos medicamentos anti-inflamatórios, pode contribuir na ação anti-biofilme em *C. albicans* (Abdelmegeed; Shaaban, 2013).

Adicionalmente o aumento da resistência intrínseca dos biofilmes de *Candida* comumente observado no tratamento às infecções ocorre, devido à ação combinada de diferentes mecanismos como a expressão aumentada de bombas de efluxo, alteração na composição de esterol da membrana, difusão limitada de moléculas de antifúngicos através da matriz extracelular e presença de fragmentos de biofilmes persistentes capazes de tolerar elevadas concentrações dos antifúngicos (Seneviratne et al., 2008; Bink et al., 2011). Certamente, condições do hospedeiro estão envolvidas nos processos infecciosos, entretanto, a interação com o fungo também é, sem dúvida, controlado pela expressão de fatores de virulência a exemplo da capacidade de adesão às células do hospedeiro, formação de biofilmes, a morfogênese, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e produção de hemolisinas as quais favorecem a adaptação e a patogênese (Yenişehirli et al., 2010; Halliwell et al., 2012).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Os biofilmes microbianos são definidos como comunidades de microrganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície que produz substância polimérica extracelular e que exibem um estado metabólico distinto ao do crescimento planctônico correspondente, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células. O biofilme particularmente, por leveduras, traz importantes repercussões clínicas, uma vez

que vem sendo verificado um aumento da resistência à terapia antifúngica e a habilidade das células dentro de biofilmes de resistir às defesas do sistema imune do hospedeiro.

Ainda tem observado o envolvimento das prostaglandinas, constituintes do processo inflamatório, na gênese do biofilme de *Candida*, representando um importante fator de virulência promovendo inicialmente colonização seguindo com doença crônica, neste sentido, o uso de inibidores da enzima ciclooxigenase, a qual participa da biossíntese das prostaglandinas e presentes nos medicamentos anti-inflamatórios, pode contribuir na ação anti-biofilme quando associado a um antifúngico.

Desta forma, a justificativa deste trabalho está fundamentada pela necessidade da oferta de um tratamento anti-biofilme adequado, sobretudo no uso de dispositivos terapêuticos, contribuindo para minimizar e evitar infecções fúngicas por espécies do complexo *C. parapsilosis* em pacientes criticamente doentes como nos casos de cardiopatias graves.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a ação antifúngica *in vitro* e *in vivo*, isolada e sinérgica, do fluconazol e ácido acetilsalicílico frente modelo experimental de endocardite por *C. parapsilosis*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Obter e revisar taxonomicamente culturas de leveduras do complexo *C. parapsilosis* isoladas de amostras clínicas invasivas depositadas na Micoteca URM da UFPE previamente estocada como *C. parapsilosis*;
- b) Demonstrar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* por isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*;
- c) Determinar o potencial antifúngico *in vitro* de fluconazol e ácido acetilsalicílico frente isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*;
- d) Analisar o grau de atividade oxidativa (redução de XTT) nos biofilmes de isolados complexo *C. parapsilosis*, antes e após tratamentos com fluconazol e ácido acetilsalicílico;
- e) Comprovar a ação de *C. orthopsilosis* no modelo experimental de endocardite;
- f) Determinar a ação antifúngica *in vivo*, isolada e sinérgica, de fluconazol e ácido acetilsalicílico frente modelo experimental de endocardite por *C. orthopsilosis*.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Autenticação dos isolados de leveduras estocados na micoteca URM

Foram solicitadas 20 isolados de leveduras clínicas de *C. parapsilosis* mantidas na coleção de culturas micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os isolados foram autenticados taxonomicamente seguindo os protocolos propostos por Barnett, *et al.* (2000) e Hoog, *et al.* (2000) através de critérios morfofisiológicos, além da proteômica por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Germany) (Pulcrano et al., 2013).

TAXONOMIA MORFOLÓGICA

Morfologia das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido - a forma das células vegetativas como critério taxonômico foram verificadas através de lâminas contendo fragmentos da cultura (crescimento em meio ágar Sabouraud) corados com azul de Aman (lactofenol blue) e observadas quanto as diferentes morfologias (esferoidais, subglobulosa, elipsoidal, ovóide, cilíndrica, botuliforme, alongada, apiculada, ogival ou lunata). Para visualização das características das células vegetativas, material de cultura jovem foi inoculado em 30 mL de extrato de malte e após 2-3 dias de incubação a 25±3 °C, a cultura foi examinada. O comprimento e a largura das células foram medidas e os valores obtidos da medição de pelo menos 20 células foram determinados. (Lodder, 1970).

Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo - para verificar a formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidiosporos foram realizadas culturas em placa de acordo com a técnica de Dalmau (1929), na qual 3 mL de Ágar-fubá (CornMeal agar) foi depositado em lâmina contida sobre um suporte de vidro em forma de U dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo-se duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. Para evitar a dessecação do meio, o procedimento foi realizado em câmara úmida, acrescentando-se 2 mL de água destilada esterilizada na placa durante o período de incubação do teste. A visualização das estruturas através de microscopia foi feita após 24h, 48h e 72h (Lodder, 1970).

Formação de balistosporos - as amostras de leveduras foram semeadas em placa de Petri contendo 10mL de ágar fubá. Em seguida, outra placa contendo ágar malte foi invertida sobre ela e vedada. A preparação foi incubada por até 15 dias a 20 °C. Se houver a produção de balistosporos, estes germinarão formando colônias na placa do ápice (Carmo-Souza; Phaff, 1962).

Crescimento em meio líquido - as leveduras foram semeadas em extrato de malte e incubadas a 25 ± 3 °C durante 10 dias. Ao fim deste período foi avaliada a formação de sedimento, anel, ilhota ou película pela massa celular crescida (Lodder, 1970).

Crescimento em meio sólido - as amostras foram cultivadas em ágar malte e após 3 dias de incubação a 25 ± 3 °C, a textura da colônia foi analisada (mucóide, friável, coesa, butirosa ou seca) (Lodder, 1970).

Características dos ascos e ascosporos - as amostras foram cultivadas em ágar Gorodkova a 25 ± 3 °C por 15 dias. Ao fim deste período foi avaliada a produção de ascos e ascósporos, bem como suas características taxonômicas (Barnett et al., 2000).

Fermentação de fontes de carbono (Zimograma) - para a realização do teste, tubos longos de 150 por 12mm, contendo tubos menores de Durham invertidos de 50mm x 6mm foram preenchidos com solução de extrato de malte a 0,5% acrescida das fontes de carbono que foram testadas na concentração de 4%. Serão utilizadas 47 fontes de carbono. Em seguida, será adicionado 100µL da suspensão de leveduras ajustada de acordo com a escala 0,5% de MacFarland. Os tubos foram incubados a 25°C por 10 dias e observados diariamente para verificar a produção de dióxido de carbono (Barnett et al., 2000).

Assimilação de fontes de carbono (Auxonograma) - para o teste, foram realizadas suspensões de cada espécie de levedura em água com extrato de levedura (YE) de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, foi realizado *pour plate* em meio isento de carboidratos. Após solidificação, foram adicionadas fontes de carbono e o meio foi incubado a 25°C por três dias, sendo realizada leitura diária para verificar em quais fontes de carbono houve crescimento da levedura, caracterizando a sua capacidade assimilativa de acordo com (Barnett et al., 2000).

Utilização oxidativa de fontes de nitrogênio foi realizada suspensão do microrganismo em água com extrato de levedura de acordo com a escala 0,5 de MacFarland e em seguida, foi realizado *pour plate* em meio isento de fontes de nitrogênio. Após solidificação, foram adicionadas fontes de nitrogênio e o meio incubado a 25 °C por três dias, com observações diárias para verificar em quais fontes houve crescimento da levedura (Barnett et al. 2000).

Crescimento a elevadas temperaturas - as leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento em diferentes temperaturas. Para isto, as amostras foram semeadas em placas contendo meio ágar malte e posteriormente incubadas a 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C e 45 °C segundo Barnett et al. (2000) e Looder (1970).

Hidrolise da Uréia - as amostras com até 48h de crescimento foram semeadas em meio Caldo Uréia R/ DIFCO e incubadas a 37°C. Os tubos serão examinados a cada meia hora por até quatro horas a fim de verificar a mudança de cor (amarelo para vermelho), indicando produção de uréase (BARNETT et al., 2000).

IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex, BrukerDaltonics, Bremen, Germany).

O cultivo e manutenção dos isolados foram realizados em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *Escherichia coli*, utilizadas como calibrante, foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). Nas análises *Trichophyton rubrum* foi incorporado como um controle externo sendo cultivado em YEPD. Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas antes da análise pelo MALDI TOF MS.

Fragmento de células (cerca de 50µg) foi diretamente transferido do meio de cultura para os anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético (TFA) e levemente misturado. Para *E. coli* a adição da solução matriz foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico. Todas

as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a $+5^\circ\text{C}$ (Putignani *et al.*, 2011; Veen *et al.*, 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5 α com conhecido valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da, foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. A identificação através do software Biotyper™ é baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

3.2 Ensaio da morfogênese: formação e inibição de tubo germinativo

O ensaio será realizado seguindo Chaves *et al.*, (2007), no qual as células de leveduras do complexo *C. parapsilosis* serão crescidas “overnight” em meio NGY (30°C - 200 rpm). A absorbância da densidade óptica do crescimento será determinada em espectrofotômetro à 600 nm. O valor da absorbância obtido na leitura das amostras deve estar compreendido entre 0,8 e 1,2, o que corresponde a uma concentração aproximada de 2×10^8 células/mL. As células de leveduras serão padronizadas para 1×10^6 células/mL, o que corresponde a 50 μL do crescimento compreendido entre 0,8 e 1,2 de absorbância.

Para a indução do tubo germinativo, o volume total da suspensão de leveduras será inoculado em caldo YPD adicionado de Soro Fetal Bovino, em concentração de 20% (4 mL YPD líquido, 1 mL SFB) e incubadas sob agitação mecânica à temperatura de 37°C a 200 rpm, por um período de até 3h de incubação. Posteriormente, 500 μL da suspensão serão adicionados a igual volume de formalina a 10% em PBS em tubos de microcentrifugação com capacidade de 1,5 mL, mantidos a 4°C em dois diferentes intervalos de tempo, 1h e 3h de incubação e posterior leitura microscópica.

As amostras retiradas com 1h de incubação serão observadas 100 leveduras em microscopia óptica (400x de magnificação; CX21, Olympus) para a determinação da porcentagem da formação de tubos germinativos. Para as amostras incubadas por um

período de 3h, as células também foram observadas da mesma forma previamente descrita, para o cálculo do índice de morfologia: às células esféricas de leveduras que apresentavam morfologia de blastoconídio será atribuído o valor IM=1, células apresentando diâmetro com o dobro do comprimento, IM=2, células com aparência de pseudo-hifas, IM=3 e hifas longas de lados paralelos, I.M=4. Para a determinação do índice de morfologia foi empregada a fórmula:

3.3 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro*

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento M27-S4 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para controle de qualidade, linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo protocolo padrão foram incluídas, como a cepa *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 (CLSI, 2012).

Preparação dos antifúngicos

Os agentes antifúngicos utilizados foram a anfotericina B desoxicolato (Bristol-Myers Squibb) diluída em Dimetil-sulfóxido e fluconazol (Pfizer), preparado em água deionizada. Concentrações diferentes destes antifúngicos foram preparadas nos intervalos de 0,03 a 16 µg.mL⁻¹ para anfotericina B, e 64 – 0,125 µg/ml para fluconazol.

Meio de cultivos

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) a concentração final de 0,165 mol.L⁻¹ e pH 7,0. O meio de cultura foi esterilizado por filtração a vácuo em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Preparação do inóculo

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura testada, realizado em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), foi preparada uma suspensão de inóculo inicial em 5ml de salina esterilizada 0,145mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Esse procedimento fornece uma concentração padrão de levedura contendo 1x10⁶ a 5 x 10⁶

células por mL, seguida de diluição de 1:100 e posteriormente de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão com meio RPMI 1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$.

Teste de sensibilidade *in vitro*.

Para o teste de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços com tampas (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35°C por 24 e 48 horas para fluconazol e anfotericina B, respectivamente, a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para a anfotericina B, considerou-se a CIM o poço que exibisse 100% de inibição no crescimento, e para fluconazol, a CIM com 50% de inibição quando comparado ao controle positivo. Para anfotericina B, CIM's $>1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ representa resistência do isolado e, para fluconazol, CIM's $\geq 64.\text{mL}^{-1}$.

3.4 Tabuleiro de xadrez

Combinações de fluconazol e ácido acetilsalicílico, anfotericina B e ácido acetilsalicílico, e fluconazol e anfotericina B foram testados em duplicado utilizando o método anteriormente descrito. O inóculo inicial foi preparado como descrito para a teste de sensibilidade antifúngica. As leituras foram determinadas visualmente. Os resultados foram lidos aos 24 e 48 h. Para avaliar a interações dos antifúngicos, a concentração inibitória fraccionada (FIC) foi calculada para cada combinação

Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FIC) O Índice de Concentração Inibitória Fracionária foi avaliado através da combinação de Ácido Acetilsalicílico / fluconazol / Anfotericina B usando o método de diluição chequerboard (Pfaller et al, 1989; Lewis et al., 2002). O FIC foi calculada para cada agente por dividindo a concentração de inibição de cada antifúngico quando utilizados em combinação pelo seu valor de CIM. Valores FIC foram em seguida, adicionado em conjunto para definir a interação da combinação. O sinergismo foi definido FICI $<0,5$ = Sinergismo; FICI >4 = Antagonismo; FICI > 1 = Indiferente; FICI $>0,5$ = Aditivo

3.5 Teste de aderência às célula epiteliais

Os testes de aderência foram baseados nos trabalhos de Kimura e Pearsall (1978), Sobel et al. (1981) e Kearns et al. (1983). As células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de doador jovem, clinicamente são e isento de cáries. Em todas as etapas relacionadas aos testes de aderência foi utilizado o tampão fosfato (PBS) como descrito em Villela et al. (1973). As suspensões celulares obtidas foram mantidas em banho de gelo, a fim de evitar alterações celulares.

Cultivo das amostras

1ª Etapa

Os isolados de *Candida* foram semeados no meio ágar Sabouraud adicionado de 0,5% extrato de levedura e mantidos a temperatura de 30°C durante 72h. Após este período, as células de leveduras foram suspensas em 2ml de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes a 1.580 rpm por 10 minutos e resuspendidas para uma concentração final de 2×10^7 cels/mL.

A remoção das células epiteliais foi realizada através de suave escarificação da mucosa da cavidade oral com auxílio de swab e, em seguida, foram suspensas em 7ml de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes e re-suspendidas para uma concentração final de 4×10^4 cels/mL.

Depois de lavadas, as células de leveduras e as células epiteliais foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações em função das lavagens.

2ª Etapa

Após a obtenção das suspensões de culturas de *Candida* e das células epiteliais da cavidade oral foi procedida mistura e homogeneização. Em seguida, agitadas durante duas horas e posteriormente realizada a microscopia, através de preparação em lâmina com azul de metileno. Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos observados (Villela et al., 1973) onde foram avaliadas 100 células epiteliais com relação à percentagem de sua área superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência (F) para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência (f) para adesão até 49% e sem aderência visível (0).

Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata para cada isolado. A média e o desvio padrão dos três distintos experimentos foram determinados e análise estatística foi

calculada através do programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc.). A relação entre os fatores de virulência (aderência às células epiteliais e produção de biofilme) foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Valor de *P* igual ou abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo (BETH; ROBERT, 1990).

3.6 Ensaio qualitativo do biofilme

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método visual descrito por Pfaller et al. (1995). Os isolados foram semeados no meio ágar Sabouraud contido em placas de Petri e mantidas a 35°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada uma suspensão em salina com concentração final de 10⁶ UFC/mL. Dessa suspensão, 20µl serão inoculados em 180µl de ágar Sabouraud líquido contido nos poços das microplacas, mantidas a 35°C por 24h sem agitação. Em seguida o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada e sobre estes, adicionado o corante safranina para realização de avaliação de acordo com a intensidade da coloração.

Interpretação: fraca coloração, foram lidos como (1+); coloração mediana (2+ a 3+) e fortemente corados (4+) representando aderência fraca, moderada e forte, respectivamente

3.7 Ensaio quantitativo do biofilme

Preparação das suspensões de *Candida parapsilosis*.

A formação de biofilme (característica de virulência) foi avaliada em isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis* cultivados aerobicamente a 37°C/ 18h, em Sabouraud Dextrose Agar. Suspensões foram preparadas em caldo *Yeast Nitrogen Base*-YNB (Difco) suplementado com 50 mM de glucose. Após 18 h de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 3200 rpm por 4 minutos em seguida foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e ressuspensas em YNB suplementado com glucose a 100 mM. As células foram ajustadas em espectrofotômetro 530 nm para uma concentração final de 10⁷ células/ml.

Formação de Biofilme

Da suspensão celular, 100 µL foram colocados nos poços das placas de microdiluição de fundo chato contendo 96 poços (Techno Plastic Products, Switzerland), as quais foram mantidas a 37°C por 1,5 h a 75 rpm (fase de adesão). Em seguida o conteúdo foi aspirado e os poços lavados duas vezes com tampão PBS para remoção das células não aderidas. Para a fase de formação de biofilme, 200 µL de meio YNB suplementado com

glicose a 100 mM recém-preparado foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas a 37°C a 75 rpm. Após 24 h de incubação, o meio foi aspirado e foram realizadas duas lavagens com PBS com adição de 200 µL de YNB. Nos diferentes períodos de tempo, os biofilmes serão quantificados utilizando o ensaio de redução de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5-[(phenylamino) carbonyl] -2H- hidróxido de tetrazolium (XTT-Sigma). Todos os ensaios foram repetidos seis vezes em duas ocasiões distintas.

Ensaio para redução do XTT (atividade oxidativa)

Os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, 158 µL de PBS isentos de glicose e com diferentes concentrações (200, 100 e 50mM) de glicose e 40 µL de XTT (1mg/ml) e 2 µL de menadiona (0,4mM) foram transferidos para cada poço das placas, as quais foram cobertas com folha de alumínio e incubadas em escuro a 37 ° C por 1,5h , 3 h e 4,5 h. Da solução, 100 µL foram transferidos para novas placas e avaliadas pela mudança colorimétrica lidas a 492 nm através do leitor de microplacas (Spectra- MAX 340 ; Molecular Dispositivos Ltd., Sunnyvale, CA, EUA).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) com o nível de significância de $\alpha = 0,05$. As variáveis dependentes (tempo de incubação e desenvolvimento de biofilme) e independentes (atividade oxidativa) foram analisadas estatisticamente. ANOVA foi utilizado para testar a hipótese nula quando não houve diferenças entre os tratamentos. O teste de Tukey HSD foi utilizado após ANOVA para comparações.

3.8 Avaliação anti-biofilme de fluconazol e inibidor de ciclooxigenase - ácido acetilsalicílico

3.8.1 Efeito anti-biofilme por fluconazol e ácido acetilsalicílico

A susceptibilidade dos isolados clínicos de *Candida* frente ao fluconazol e ácido acetilsalicílico (10 mM, 5 mM e 1 mM), isolada e combinada, foi avaliada através do método de microdiluição CLSI M27S4 (Pfaller et al., 2002). O inóculo teve uma concentração de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ células/ml e em seguida, as células foram inoculadas em diluições em série de duas vezes cada droga, com controles positivo e negativo. As placas, após incubadas a 37°C por 48h, foram lidas para determinação das concentrações

inibitórias mínimas (MICs). Seguindo as etapas para formação de biofilme (descrito anteriormente), 100 µl de cada concentração de ácido acetilsalicílico (10, 5, e 1 mM) e fluconazol (isolados e combinados) foram adicionados no período de adesão (1,5h) e sua ação anti-biofilme avaliada nos períodos de biofilme (24, 48 e 72h).

O teste de redução de XTT foi realizado ao final de cada período e avaliado o efeito isolado e sinérgico das drogas. Foram incluídos nos testes controles (positivo e negativo), bem como a cepa de referência *Candida parapsilosis* ATCC® 22019.

3.9 microscopia eletrônica de varredura

Para a avaliação dos estágios de formação do biofilme por leveduras do complexo *C. parapsilosis*, os discos de silicone em que os biofilmes foram formados foram examinados com 24 e 48h por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um equipamento da marca FEI (Quanta 200 FEG). O processamento das amostras seguiu o protocolo proposto Duarte et al. (2003).

Os biofilmes formados nos discos de cateter foram fixados em glutaraldeído a 2,5% com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por duas horas. Após a fixação, os discos foram lavados com tampão Cacodilato 0,1 M três vezes por 10 minutos para a retirada de todo o fixador. Após esta etapa foi realizada a pós-fixação na proporção 1:1 Ósmio 2% + tampão Cacodilato 0,1M por 30min, o que permite um maior contraste do material. Foram realizadas duas lavagens por 10 min em tampão Cacodilato 0,1M e água destilada. Posteriormente as amostras foram submetidas à desidratação seriada com acetona, na concentração de 30%,50%,70%,90% e 100% durante 5 minutos e submetidas a secagem ao ponto crítico. A montagem do material foi feita em “stubs” de metal contendo fita de carbono e tinta de prata (que servem como condutor de elétrons) e em seguida, metalizadas através do bombardeamento com ouro.

3.10 Atividade antifúngica *in vivo*

Animais

Para realização dos ensaios, o projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Pernambuco. Foram analisada através de um modelo de endocardite experimental em *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) convencionais com oito a 12 semanas de idade, pesando 250g, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do CCS/UFPE.

Água e ração comercial (Purina, Rio de Janeiro, RJ) foram oferecidas ad libitum e os animais foram mantidos em biotério convencional sob condições específicas de assepsia.

Preparação do inóculo de leveduras

O inóculo foi preparado em solução salina fisiológica a partir da cultura de *C. parapsilosis* com 24 horas de crescimento em meio Sabouraud Dextrose Ágar. A preparação foi ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm e densidade óptica de 0,01, o que corresponde a uma concentração de $1,6 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias/mL.

Desafio experimental e avaliação clínica

O modelo murino neutropênico foi usado para se atingir candidíase disseminada (Craig e Andes 2008). Será induzida neutropenia nos animais (contagem de células polimorfonucleares, $<100/\text{mm}^3$) pela injeção de ciclofosfamida (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, IN) subcutaneamente 4 dias antes da infecção fúngica (150 mg/Kg de peso corporeo), 1 dia antes da infecção (75 mg/Kg) e 2 dias após a infecção (75 mg/Kg). A contagem total de leucócitos no sangue dos animais imunossuprimidos (IS) em comparação aos imunocompetentes (IC) foi realizada para confirmar a imunossupressão. Inicialmente os animais foram anestesiados com cetamina-xilazina. Em seguida foi realizado a inoculação da suspensão fúngica 10^7 UFC, injetado através da veia femoral em 42 animais, a fim de alcançar a vegetação fúngica. Decorrido 48 horas após a infecção, três ratos foram sacrificados para verificação da extensão da doença. (Marchetti et al., 2000; Hernández-Cañaveral et al., 2009).

Grupos experimentais – tratamentos anti-biofilme

O tratamento isolado e associado com fluconazol e ácido acetilsalicílico foram iniciados 12 horas após a indução da endocardite e candidemia. Foram utilizados sete grupos experimentais: controle positivo com imunossupressão; controle positivo sem imunossupressão; controle negativo; tratado com fluconazol; tratado com ácido acetilsalicílico; tratamento combinado (fluconazol e ácido acetilsalicílico); e tratado apenas com Anfotericina B. Os fármacos foram administrados por via intraperitoneal para anfotericina B e por técnica de gavagem para o ácido acetil salicílico e fluconazol, durante sete dias consecutivos após o desafio experimental, em concentração a ser determinada pelos testes *in vitro*.

A eficácia do tratamento foi avaliada através do prolongamento da taxa de sobrevivência dos animais e pela ausência ou diminuição do biofilme formado no cateter após o sacrifício. Para estudo de sobrevivência, os animais foram observados diariamente por 28 dias e posteriormente eutanasiados para retirada e avaliação micológica e histopatológica da vegetação.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Infecções Fúngicas

Desde de 1980, os fungos têm emergido como uma das principais causas de doenças humanas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e pacientes hospitalizados com doenças subjacentes graves, resultando por muitas vezes em índices elevados de morbidade e mortalidade. Entre os fungos, destacam-se as leveduras predominantemente as do gênero *Candida* (Pfaller e Diekema, 2007).

As leveduras do gênero *Candida* se apresentam como comensais em humanos colonizando a pele e as superfícies mucosas, como as do trato gastrointestinal e trato urogenital. Além da limitação dos nutrientes, essas leveduras estabelecem uma relação de competição com as bactérias da microbiota, desta forma, exercem uma pressão seletiva, o que resulta na eliminação dos microrganismos menos adaptados, tendo então um equilíbrio entre as populações microbianas nos tecidos colonizados (Pam et al., 2012).

Nas alterações no sistema imunológico, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos comensais da microbiota, conduzindo a debilidade os quais podem causar infecções superficiais em pessoas saudáveis e, sistêmicas graves, em pacientes críticos. O estabelecimento das micoses está mais associado ao sistema imunológico debilitado do paciente do que com a virulência das leveduras. No ambiente hospitalar esses microrganismos são considerados oportunistas e responsáveis por cerca de 80 a 90% das doenças fúngicas (Colombo; Guimaraes, 2003; Hobson, 2003).

É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 160 espécies de *Candida*, cerca de 20 são reconhecidas como patógenos humanos. As principais espécies de interesse médico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Nos últimos anos tem se observado um aumento na frequência de infecções da corrente sanguínea por cepas de *Candida* não-*Candida albicans* (Giannini; Melhem, 2000; Pappas et al., 2003; Passos et al., 2007).

O isolamento das espécies fúngicas varia de acordo com a região, onde na América do Norte a espécie mais isolada é a *C. albicans* seguida de *C. glabrata*. Na Europa, Austrália, América Latina e Ásia as espécies mais isoladas são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na Índia, a maior prevalência é por espécies de *C. tropicalis* (Xiao et al., 2014). O aumento de espécies do gênero *Candida*, está relacionado às condições do parto, prematuridade e suas consequências, presença de equipamentos invasivos e uso de

Antibióticos de amplo espectro; porém, o maior e principal fator é a colonização prévia por estas leveduras. (Giolo; Svidzinski, 2010; Miranda et al., 2012)

4.2 Complexo *Candida parapsilosis*

Em 1928 em Porto Rico, Ashford isolou pela primeira vez a partir das fezes diarreicas de um paciente *Candida parapsilosis* como uma espécie de *Monilia* que era incapaz de fermentar maltose, (Ashford et al., 1928). A espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para distingui-lo do isolado mais comum, *Monilia psilosis*, conhecido na atualidade como *Candida albicans*. Inicialmente *C. parapsilosis* foi identificada em 1940 como o agente de um caso fatal de endocardite em um usuário de drogas intravenosas (Joachim; Polayes, 1940). Neste sentido foi possível estabelecer a associação da introdução exógena de *C. parapsilosis* por meio dos instrumentos médicos invasivos e soluções de hiperalimentação. Em 2004, *C. parapsilosis* foi separado em três grupos de I a III, estudos baseados no Multilocus Sequence Typing (MLST) sugeriram que os grupos II e III desta levedura *C. parapsilosis* constituíssem novas espécies. Então a redefinição em três espécies distintas sendo *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente, mantendo o grupo I e *C. parapsilosis* stricto sensu. Assim, o complexo *C. parapsilosis* passou a ser formado por *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Com isso, a distinção entre as três espécies apenas é possível por meio de análises genômicas (Tavanti et al., 2005) e proteômicas (Yaman et al., 2012).

Mesmo assim, *C. parapsilosis* stricto sensu, ainda é responsável pela grande maioria dos doença clínica, e poucos laboratórios de microbiologia médica distingue entre essas espécies, especialmente os que fazem uso de sistemas comerciais de identificação, os quais, não são suficientes para diferenciá-las.

Em microscopia *C. parapsilosis* apresentam células ovais, redondas, ou cilíndricas. Quando cultivadas em meio de Sabouraud dextrose, as colônias são brancas, cremosas, brilhantes e lisas ou enrugadas. Ao contrário *C. albicans* e *C. tropicalis*, que pode existir em múltiplas formas morfogenéticos, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeira. Em agar de farinha de milho foram observados pseudohifas identificadas por microscopia de luz (Laffey et al 2005). Evidências mostram que formação de pseudohifas por *C. parapsilosis* está relacionadas a um conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, o que causa mudanças significativas para morfologia celular (Kim et al 2006).

C. parapsilosis é tipicamente um comensal da pele humana, e a sua patogenicidade é limitado pelo tegumento intacto. É notória sua capacidade de crescimento em nutrição parenteral e de formação de biofilmes em cateteres e outros dispositivos implantados, para disseminação nosocomial e para a persistência no ambiente hospitalar (Clark et al 2004). Apesar de por muitas vezes *C. parapsilosis* ser considerado menos virulento do que *C. albicans*, são as espécies de *Candida* com o maior aumento em incidência desde 1990. Dentre os estudos que avaliam a virulência do complexo *C. parapsilosis*, observa-se que a *C. metapsilosis* tem sido a espécie que possui menor invasão e a menor prevalência em infecções humanas, enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* stricto sensu são capazes de invadir, colonizar e infectar de forma mais grave o hospedeiro. Das três espécies, a *Candida parapsilosis* é o patógeno mais frequente em infecções invasivas. É importante ressaltar que o complexo *C. parapsilosis* é considerado o segundo agente de candidemia mais importante na América Latina (Gonçalves et al., 2010; Bertini et al., 2013; Cordeiro et al., 2014).

De maneira geral, a versatilidade em se adaptar a diferentes habitats e a capacidade de formar biofilme são os principais fatores atribuídos à virulência da espécie (Giolo e Svidzinski, 2010; Silva et al., 2013; Xiao et al., 2014). A formação de biofilmes é um sistema fortemente regulado e depende da sinergia da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o curso da infecção. O biofilme é regulado por um sistema de comunicação denominado quorum sensing, o qual depende da sinergia de expressão que é utilizado para controlar algumas características, como sobrevivência e determinantes de patogenicidade (Mcdougald et al., 2012).

4.3 Fatores de Virulência

A patogênese da doença fúngicas invasiva é facilitada por um número expressivo de fatores de virulência, como a capacidade do fungo em se aderir as células hospedeiras, a formação de biofilme, a secreção de enzimas hidrolíticas, incluído proteases, fosfolipases, lipases entre outras. Assim a detecção de tais fatores contribui tanto para prevenção para o diagnóstico e tratamento. No entanto algumas espécies a exemplo de *C. parapsilosis* têm dados insipientes quanto ao potencial de virulência e patogenicidade, sobretudo acerca da aderência e formação de biofilme.

4.4 Aderência

A capacidade de aderir firmemente em diferentes superfícies, incluindo células e matriz extracelular do hospedeiro e superfícies abióticas (cateteres intravascular e vesical, válvulas cardíacas e próteses dentárias) é uma importante característica detectada em algumas espécies de *Candida* (Tronchin et al. 2008; Silva et al. 2011; Bliss et al. 2012; De Groot et al. 2013; Mayer et al. 2013). Então, na candidíase, o mecanismo de adesão durante o processo desencadeia uma endocitose e penetração ativa das leveduras nas células do hospedeiro, ocorrendo uma agressão tecidual e maior capacidade de disseminação (Zhu & Filler 2010; Mayer et al. 2013).

Raros relatos indicam que colonização e infecção por *C. parapsilosis* são dependentes da capacidade de adesão as células e tecidos dos hospedeiros, particularmente em superfícies mucosas. Em dispositivos médicos a adesão facilita a formação de biofilme, adicionalmente a hidrofobicidade da superfície celular tem sido associada com a aderência inicial de *C. parapsilosis* em superfícies (Panagoda et al. 2001), e a produção de muco a aderência a cateteres de poliestireno (Branchini, et al 1994).

O primeiro estudo de grande escala comparando a adesão de *C. albicans* e *C. Parapsilosis* (12 e 24 isolados, respectivamente) mostrou uma maior avides, de 20,6% de *C. parapsilosis* para células epiteliais (BEC) e uma maior adesão de 143,7% ao material acrílico (Panagoda et al. 2001). Em contraste, outros estudos menores atribuíram uma tendência de 80% a 95% de adesão para *C. albicans* a BEC versus *C. parapsilosis*; Estes estudos usaram apenas um único isolado de *C. parapsilosis*, tornando a relevância de suas descobertas questionável (Barrett-Bee et al 1985; King et al, 1980).

No entanto, o grande número de células aderentes de *C. parapsilosis* relatado anteriormente pode ser um resultado de co-aderência Entre as células de levedura que causam agregados de superfícies epiteliais, um traço observado mais frequentemente para este fungo do que para *C. albicans*. Além disso, há uma variação intra-espécies significativas na aderência. Embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo, os isolados superficiais de *C. parapsilosis* tiveram 51,5% maior avides por BEC do que isolados sistêmicos (Panagoda et al. 2001). Além disso as estirpes de *C. parapsilosis* com patogenicidades semelhantes num experimento de infecção vaginal variou nas suas capacidades em aderir ao material acrílico (Cassone, et al, 1995).

4.5 Biofilmes

A formação de biofilme pelos microrganismos é um importante fator de proteção para seu desenvolvimento, onde se observa relações simbióticas e uma maior capacidade de viabilidade em ambientes hostis (Davey & O'toole 2000). A associação de células de *Candida* formando biofilme é uma das principais contribuições para a virulência destas leveduras, pelo fato de apresentar maior resistência ao tratamento antifúngico, favorecer uma evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além da competitividade com outros agentes infecciosos (Trofa et al. 2008; Silva et al 2009; Martinez & Fries 2010; Silva et al. 2012; Costa et al. 2013; Mayer et al. 2013). A importância destas características reflete em um aumento da taxa de morbidade e mortalidade, quando o processo doença está relacionado com a produção de biofilme pelo fungo (Cuéllar-Cruz et al. 2012; Sardi et al. 2013).

Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas, desde que Van Leeuwenhoek analisou os “animáculos” na placa de seus próprios dentes, no século XVII, mas a teoria geral da predominância do biofilme não foi promulgada até 1978 (Costerton; Lappin-Scott, 1995). Assim os biofilmes microbianos são definidos como comunidades de microrganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície que produzem substância polimérica extracelular e que exiba um estado metabólico distinto ao do crescimento planctônico correspondente, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (Lindsay; Holy, 2008).

A capacidade das leveduras do gênero *Candida* em aderir, infectar e causar doença é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados. (Suzuki, 2009; Pannanusorn et al., 2013).

O processo de adesão das leveduras no substrato, evento que precede a formação do biofilme, consiste primeiramente em interações inespecíficas, e em seguida ocorre uma adesão específica mais forte pela ação de proteínas adesinas presentes na parede celular fúngica (Blankenship & Mitchell 2006; Ramage et al. 2006; Seneviratne et al. 2008; Cuéllar-Cruz et al. 2012). Neste estágio inicial observa-se que o gene BCR1 (biofilm and cell wall regulator 1) é um fator regulatório de transcrição de genes de adesinas e proteínas de parede celular das leveduras (ALS1, ALS3, HWP1) (Pannanusorn et al. 2014; Singaravelu et al. 2014). A família ALS (Als 1 e Als 3) participa da

coagregação das células de leveduras, enquanto que o gene HWP1 codifica adesinas presentes na superfície de hifas (Nobile et al. 2008). Esta primeira etapa pode ainda ser influenciada por genes responsáveis pela aderência em superfícies abióticas, como EAP1 (enhanced adherence to polystyrene) e o CSH1 (cell surface hydrophobicity 1) que está relacionado com a hidrofobicidade de superfície celular (Costa et al. 2013).

A matriz extracelular mantém a integridade da estrutura do biofilme, sendo constituído principalmente por carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas. A produção destes constituintes é influenciada pelo substrato, pH, oxigênio e espécie envolvida na formação do biofilme (Blankenship & Mitchell 2006; Silva et al. 2011; Cuéllar-Cruz et al. 2012; Sardi et al. 2013). A matriz extracelular, produzida por células sésseis, é um componente do biofilme que influencia na virulência das espécies de *Candida* por sua capacidade de restrição na entrada de agentes antifúngicos utilizados no tratamento da doença (Douglas 2003; Al-Fattani & Douglas 2006; Blankenship & Mitchell 2006; Martinez & Fries 2010; Da Silva et al. 2012; Mathé & Van Dijck 2013). A presença da matriz extracelular, no entanto não é um fator isolado, outras características associadas, como taxa de crescimento das células, expressão de genes que conferem resistência ou presença de células persistentes que são capazes de escapar à ação de antifúngicos e reconstituir novamente o biofilme, determinam um fenômeno multifatorial para o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (Uppuluri et al. 2009; Martinez & Fries 2010; Mathé & Van Dijck 2013; Taff et al. 2013).

A etapa de dispersão ocorre pela liberação de células de leveduras da estrutura do biofilme, que pode resultar na formação de novos biofilmes ou propagar para outros tecidos do hospedeiro. Algumas características importantes como a reversão de hifas para leveduras, novos reguladores de transcrição específicos para esta fase como Ume6, Pes1 e Nrg1 (reguladores de dispersão), que reduzem ou aumentam a liberação de células e uma elevada capacidade de aderência e filamentação quando comparada com células planctônicas são observadas nesta fase (Finkel & Mitchell 2011).

Durante a formação do biofilme de *Candida*, ocorre um sistema de comunicação intercelular conhecido como quorum sensing, que modula o desenvolvimento, permitindo crescimento e dispersão das células de leveduras (Hogan 2006; Martinez & Fries 2010). Algumas moléculas deste sistema de comunicação, como tirosol e farnesol, são importantes na formação do biofilme. Enquanto tirosol promove a formação de hifas e biomassa na fase inicial do biofilme, o farnesol inibe a formação de hifas, impedindo o crescimento do biofilme e permitindo a dispersão das células para outros locais

anatômicos no hospedeiro humano (Ramage et al. 2009; Ten Cate et al. 2009; Martinez & Fries 2010; Finkel & Mitchell 2011; Cuéllar-Cruz et al. 2012; Costa et al. 2013).

Os mecanismos de formação de biofilme são similares entre as espécies de *Candida*. No entanto, algumas características específicas de acordo com a levedura envolvida, como morfologia celular (Figura 19), tipos de substrato e fontes de nutrientes podem ser observadas (Seneviratne et al. 2008; Costa et al. 2013). Biofilme de *C. glabrata* formado em superfície de silicone quando na presença de urina produz uma biomassa mais intensa comparado com biofilme de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, entretanto na presença de caldo Sabouraud dextrose, observa-se um escasso desenvolvimento do biofilme de *C. glabrata* comparado às outras espécies (Silva et al. 2009; Silva et al. 2010). Em meios com altas concentrações de lipídios e glicose *C. parapsilosis* facilmente consegue formar biofilme (Nosek et al. 2009). A formação de biofilme de *C. albicans* pode ocorrer na superfície de qualquer material médico hospitalar, enquanto o de *C. tropicalis* ocorre principalmente em cateter de látex e de silicone (Silva et al. 2009; Negri et al. 2010; Cuéllar-Cruz et al. 2012).

A geração de biofilme por *C. albicans* está associado com a troca dimórfica de crescimento de levedura para hifas, a estrutura do biofilme é formada por duas camadas distintas: uma camada fina de levedura basal e uma camada mais densa de hifa (Baillie et al, 1999). Em contraste, as estirpes de *C. parapsilosis* produzem um biofilme quantitativamente menor e estruturalmente menos complexo que os de *C. albicans* (Kuhn et al, 2002). A formação do biofilme é precedida pela aderência aos tecidos ou dispositivos médicos, resultando em uma mudança morfologia e comportamental do microrganismo. Os biofilmes de *C. parapsilosis* podem ocorrer em diversos dispositivos médicos, incluindo dispositivos venosos centrais e cateteres, hemodiálise e cateteres de diálise peritoneal, próteses intracardiacas e articulações protéticas (Ramage et al 2006).

Na ausência de anticorpos específicos, a matriz do biofilme bloqueia a ativação do complemento, ao passo que se os anticorpos estiverem presentes, a matriz polimérica, geralmente os torna ineficazes. Tem sido demonstrado que a matriz do biofilme também é capaz de inibir a quimiotaxia e degranulação de polimorfonucleares e macrófagos, sendo também capaz de deprimir a resposta linfoproliferativa de monócitos ativadores policlonais (Mah; O'toole, 2004).

Existem muitos dados que demonstram a resistência das espécies de *Candida* formadoras de biofilme, aos antifúngicos (d'enfer 2006). Apesar de sua estrutura menos complexa, biofilmes de *C. parapsilosis* apresenta resistências aos antifúngicos

convencionais tais como a anfotericina B, e os compostos azólicos, semelhante aos biofilmes de *C. albicans*. Pesquisas adicionais sobre a atividade dos agente antifúngicos frente aos biofilmes, ainda são necessárias afim de reduzir as recidivas das infecções relacionadas ao uso de cateter, afim de reduzir o número de procedimentos cirúrgicos necessários em casos clínicos, tais como endocardite e artrite (Katragkou et al 2007; Ruzicka et al 2007).

4.6 Endocardite

Endocardite Infecciosa é uma doença que vem se modificações desde sua descoberta, tanto na concepção diagnóstica, como na detecção de seus agentes causadores, passando pelos métodos diagnósticos com a evolução dos ecocardiógrafos e terminando no tratamento clínico ou cirúrgico. É uma doença resultante da colonização de fungos, vírus e mais comumente de bactérias no endotélio e nas válvulas cardíacas previamente comprometidas causando inflamação e danos (Krebs, 2007).

A mortalidade da endocardite infecciosa, mesmo com as condições atuais de abordagem, varia de acordo com o organismo infectante, sendo ainda maior quando envolve portadores de próteses valvulares ou associa-se a complicações como insuficiência cardíaca, formação de abscessos, estes considerados embolizantes, podem predispor a fenômenos embólicos sistêmicos e cerebrais. A maior parte dos doentes acometidos por endocardite infecciosa possui alguma condição cardíaca que é considerada de risco para desenvolvimento desta doença (Machado, 2011).

A endocardite infecciosa pode aparecer repentinamente e chegar a ser mortal em poucos dias (endocardite infecciosa aguda) ou pode desenvolver-se gradualmente e de forma quase despercebida ao longo de semanas ou de vários meses (endocardite infecciosa subaguda) (Portugal, 2009)

As endocardites fúngicas compreendem 1,3% a 6% de todos os casos de endocardite infecciosa, e sua incidência tem aumentado ao longo das duas últimas décadas como resultado de melhorias no diagnóstico, devido aos melhores sistemas de cultura, o uso de ultrassom transesofágico e o aumento da intensidade das terapias médicas que predispõem pacientes a infecção fúngica (Garzon et al 2007, Pierrotti et al, 2002). Espécies de *Candida* são responsáveis por 94,1% dos casos endocardite fúngicas, muitos dos quais se desenvolve após cirurgia cardíaca (Otaki et al 1992), e *C. parapsilosis* está associada com 17% dos casos, identificados, tornando-se a segunda espécie mais

comuns após *C. albicans* (Garzon et al 2007). De 56 casos endocardite por *C. parapsilosis* revisto em 1992, 50% dos pacientes tinha um histórico de uso de drogas intravenosas relacionados com a infecção e 60% tinham uma doença valvular preexistente (Weems,1992). Atualmente, os fatores predisponentes mais comuns para estabelecimento da endocardite por *C. parapsilosis* incluem próteses valvulares (41/72, 57,4%), uso de drogas intravenosas (12/72, 20%), nutrição parenteral endovenosa (6,9%), cirurgia abdominal (6,9%), imunossupressão (6,4%), o tratamento com antibióticos de amplo espectro (5,6%), e doença valvular anterior (4,8%) (Garzon et al 2007). A endocardite por *C. parapsilosis* muitas vezes surge no cenário da fungemia, pois os tecidos danificados são mais propensos a infecção (Cancelas et al, 1994). O tecido cardíaco mais comumente infectado é a válvula aórtica (56,9%), seguido pela válvula mitral (29,1%), válvula tricúspide (4,1%), parede ventricular (2,8%), e a válvula pulmonar (1,4%) (Garzon et al 2007).

A taxa de mortalidade e frequência de difusão de paciente acometido por endocardite por *C. parapsilosis* são semelhantes àquelas atribuídas à fungemia por *C. albicans* (Weems,1992). Em geral, a mortalidade varia entre 41,7% a 65% (Weems,1992; Gacser et al, 2005) e o tratamento ideal para endocardite por *Candida* permanece indeterminada. A corrente taxa de mortalidade documentada para os pacientes tratados clinicamente por agentes antifúngicos é 53,3% (Garzon et al 2007), que se encontra diminuída de quando comparado ao 78% em 1992 (Weems,1992).

4.7 Terapia Antifúngica (Drogas Padrão)

Atualmente, três grupos principais de antifúngicos têm sido utilizados na prática clínica no manejo de infecções sistêmicas por espécies de *Candida*: a) os poliênicos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; b) os triazólicos, sendo seus principais agentes o fluconazol e voriconazol; e c) as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulaungina e micafungina (Pappas et al., 2009).

Poliênicos

Os poliênicos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces*, sendo representado pela anfotericina B. Devido ao amplo espectro de ação (leveduras, fungos filamentosos e dimórficos) e à sua atividade fungicida, a anfotericina B ainda é considerado o antifúngico de primeira linha para o tratamento de diversas infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados (Walsh et al., 2008; Pappas et al., 2009). A anfotericina B se liga de maneira irreversível ao ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, resultando na formação de poros e, posteriormente, na lise da célula fúngica (Odds et al., 2003).

Entre os isolados de *Candida*, a ocorrência de resistência secundária à anfotericina B ainda é considerada pouco frequente (Da Matta et al., 2007; Pfaller; Diekema, 2007; Pfaller et al., 2010). Contudo, alguns casos de resistência à terapia com anfotericina B têm sido documentados (Nolte et al., 1997; Krogh-Madsen et al., 2006). A espécie de *Candida* com maior documentação em relação à resistência a este fármaco é *C. lusitaniae*. Apesar dos estudos mostrarem que isolados de *C. lusitaniae* apresentam baixa frequência de resistência “*in vitro*” (Favel et al 2003; Zaoutis et al., 2005; Chen et al., 2009; Pfaller et al., 2010)

Embora seja considerada um antifúngico de amplo espectro de atividade, a anfotericina B apresenta alta toxicidade para o hospedeiro. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral ocasionado pelo uso deste fármaco, fator que tem limitado sua utilização clínica (Mohr et al., 2005; Pasqualotto, 2008; Pappas et al., 2009). Com o objetivo de diminuir a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B (desoxicolato), diversas formulações lipídicas deste composto (lipossomal, complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) encontram-se atualmente disponíveis para o tratamento de candidemia, apresentando menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B desoxicolato (Bowden et al., 2002; Wingard, 2002; Pfaller et al., 2010). Entretanto a grande maioria dos hospitais públicos brasileiros, devido ao alto custo das demais formulações, tem à sua disposição apenas a anfotericina B desoxicolato para tratamento das infecções fúngicas invasivas.

Outros fármacos também são utilizados no tratamento de candidemia, como os triazólicos, os quais apesar de exibirem menores efeitos colaterais vêm apresentando o desenvolvimento de graus variados de resistência.

Triazólicos

Os triazólicos são antifúngicos totalmente sintéticos, constituindo a maior classe de agentes antifúngicos. O mecanismo de ação dos triazólicos se dá pela inibição da atividade da enzima 14- α -lanosterol-demetilase (codificada pelo gene *Erg11*), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, componente fundamental à integridade da membrana celular de células fúngicas (Odds et al., 2003). Ao contrário da anfotericina B, a atividade dos triazólicos contra espécies de *Candida* é fungistática (Pfaller et al., 2010).

Entre os triazólicos, fluconazol e voriconazol são os únicos compostos empregados na terapia das infecções da corrente sanguínea por *Candida*, sendo também considerada a terapia padrão para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal (Pappas et al., 2009). Em ensaios clínicos bem controlados, fluconazol mostrou uma eficácia comparável à da anfotericina B desoxicolato para o tratamento de candidemia (Malik et al., 1998), apresentando como vantagem, menores índices de toxicidade quando comparado à anfotericina B.

De forma geral, a resistência de *Candida* ao fluconazol é relativamente baixa entre os isolados de corrente sanguínea, porém sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas (Pfaller; Diekema, 2006; Pfaller; Diekema, 2007; Pfaller et al, 2010). Em uma revisão de Pfaller et al. (2007) foram analisados os resultados de testes de sensibilidade ao fluconazol de 13.338 amostras de *Candida*. Nesta pesquisa, foi observada que a resistência ao fluconazol entre esses isolados está representada principalmente por *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentaram resistência em 9% e 40% dos isolados, respectivamente.

Uma nova geração de triazólicos, entre eles o voriconazol e posaconazol, foi desenvolvida a partir de modificações químicas introduzidas nas moléculas do fluconazol e itraconazol, respectivamente. O voriconazol e posaconazol são os principais representantes desta segunda geração dos azólicos, apresentando atividade antifúngica contra as diferentes espécies de *Candida*, incluindo isolados intrinsecamente resistentes ao fluconazol, como *C. glabrata* e *C. krusei* (Johnson; Kauffman, 2003; Pfaller et al, 2006; Sabatelli et al., 2006; Guinea et al., 2008; Pfaller et al, 2010).

4.8 Sensibilidade antifúngica das drogas utilizadas no tratamento da candidíases invasivas

O estudo da susceptibilidade a antibióticos pode ser usado na descoberta de novas drogas, em estudos epidemiológicos, na definição de novas terapias para o combate das infecções causadas por microrganismos patogênicos, sobretudo as de etiologia fúngica. Alguns fungos não possuem resposta adequada às terapias consideradas de escolha e podem requerer o uso de novos compostos com atividade antifúngica, uma vez que a continuidade do tratamento com as drogas clássicas induz o desenvolvimento de resistência e elevado grau de toxicidade (Rex et al., 2001; Walsh et al., 2004; Pfaller et al., 2010).

Apesar de serem consideradas menos invasivas e virulentas que as cepas de *C. albicans*, algumas espécies *Candida* não- *Candida albicans* tem menor sensibilidade aos antifúngicos comumente usados (Krcmery; Barnes, 2002). Fato este de relevância, pois se descreve um aumento na incidência de espécies *Candida* não- *Candida albicans* na etiologia da candidemia (Pfaller et al., 1999; Sandven, 2000; Colombo; Guimaraes, 2003; Bonfietti et al., 2012).

Acredita-se que o maior índice de isolamento de *C. glabrata* nos EUA e de *C. parapsilosis* no Brasil e em outros países se deve ao uso do fluconazol de forma empírica e em terapias profiláticas (GALBAN; MARISCAL, 2006). O extenso tempo de utilização destes agentes promove uma pressão seletiva sobre as populações de leveduras (LIN et al., 2005). Pfaller et al. (1999) identificaram que 2,9% dos isolados europeus eram resistentes ao fluconazol, seguido de 2,5% das cepas dos EUA, 2,4% na América Latina e 1,6% no Canadá.

A maior parte dos relatos de resistência das leveduras é atribuída ao fluconazol, com cepas isoladas de pacientes com imunodeficiência humana (HIV) ou que anteriormente foram tratados com antifúngicos azólicos (Galban; Mariscal, 2006; Pfaller et al., 2010). O fluconazol é eficaz contra as variadas espécies de *Candida*; contudo, *C. krusei* possui resistência intrínseca ao fluconazol, ao passo que *C. glabrata* pode apresentar-se com sensibilidade reduzida a tal fármaco. Assim, relatos que as candidemias causadas por *C. krusei* e *C. glabrata* experimentaram significativa emergência são justificados (Pappas et al., 2009).

A identificação da espécie de *Candida* envolvida nos casos de candidemia e o conhecimento do uso prévio de antifúngicos são de fundamental importância, pois pode sugerir a provável resistência *in vitro* ao fluconazol e a outros fármacos. A anfotericina B

constitui-se num recurso extremo para o tratamento de infecções fúngicas, sendo a resistência a esse fármaco ainda pouco frequente. Contudo, existem relatos de isolados de *Candida não-albicans*, principalmente *C. krusei*, em que tal fenômeno é identificado (Pappas et al., 2009).

A sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos pode não predizer o sucesso da terapia, mas a possibilidade de uma droga ou sua concentração falharem é observado quando uma cepa é resistente. Existem vários fatores que além da susceptibilidade *in vitro* influenciam no tratamento: a farmacocinética e farmacodinâmica do medicamento em questão, o grau de debilidade do paciente, o potencial de virulência do patógeno e a acessibilidade do fármaco ao local de infecção. Uma boa resposta imunológica do paciente é de grande valia visto que os azólicos não são fungicidas, mas fungistáticos (Tapia et al., 2003).

4.9 Inibidores de Ciclooxigenase

As doenças cerebrovasculares e as cardiopatias coronárias estão entre as principais causas de mortalidade. Pode-se considerar especialmente preocupante a elevada morbidade associada a essas enfermidades, que, juntamente com o aumento progressivo da idade da população, representa significativo custo humano e econômico, em níveis individual e social. Por outro lado, uma elevada mortalidade pré-hospitalar, em casos agudos, sinaliza para uma possível deficiência nos tratamentos de urgência (Hoeftler, 2004).

A partir do início da década de 1970, passou-se a dar maior importância ao papel da agregação plaquetária no desencadeamento da trombose arterial – responsável por síndromes isquêmicas agudas – e no desenvolvimento de doença arterial oclusiva.

Os antiagregantes plaquetários são úteis na prevenção de eventos vasculares oclusivos (infarto do miocárdio e acidente cerebrovascular) e na redução da mortalidade por essas causas em pacientes com predisposições de risco, tais como: infarto do miocárdio, acidente cerebrovascular, ataque isquêmico transitório, angina estável e instável. (Hoeftler, 2004)

Basicamente, todos os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) não-seletivos para a ciclooxigenase II apresentam propriedades antiagregantes. Contudo, até o momento, apenas o ácido acetilsalicílico apresenta evidências suficientes de utilidade terapêutica, principalmente no que diz respeito a inibição da síntese de prostaglandinas (HARRIS et al 2002).

As prostaglandinas são pequenas moléculas biológicas lipídicas que estão incluídas nas respostas da modulação do sistema imunológico do hospedeiro (HARRIS et al 2002).

Em sistemas de mamíferos, o ácido araquidônico, formado por clivagem de fosfolípidos, é convertido em prostaglandina H₂ (PGH₂) pelas isoenzimas de ciclooxigenase (COX), COX-1 e COX-2. Isto é pensado que a COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos do corpo, enquanto a COX-2 é principalmente uma enzima indutível envolvidos na regulação da inflamação (DANNHARDT et al, 2001). Prostaglandina sintases subsequentemente converter PGH₂ numa série de prostaglandinas, incluindo PGI₂, PGF₂, PGD₂ e PGE₂ (HARRIS et al 2002).

Sabe-se que as prostaglandinas são produzidas por fungos patogênicos bem como por células de mamífero (Noverr et al, 2002). Tanto *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* secretam prostaglandinas de novo ou via conversão do ácido araquidônico exógeno (Noverr et al 2003).

O tratamento das infecções por *C. albicans* ou *C. neoformans* com o inibidor da COX indometacina reduziu significativamente as dos organismos e da produção de prostaglandinas, sugerindo que uma enzima COX essencial pode ser responsável para a síntese de prostaglandinas fúngicas (Noverr et al 2003). Um lípido da série PGE, possivelmente PGE₂, foi purificado a partir de ambos os agentes patogênicos fúngicos. Isto formação de tubo germinativo por *C. albicans* e também biologicamente ativos em células de mamíferos (Noverr et al 2003).

O papel das prostaglandinas na biologia fúngica é desconhecido. Eles podem funcionar como reguladores da expressão gênica, como células animais. No entanto, a produção de prostaglandina também representa um importante fator de virulência promovendo colonização e infecção crônica. Uma vez que a colonização envolve um biofilme, determinamos os efeitos de uma variedade dos inibidores de COX na formação de biofilmes por *C. albicans*, tanto os ensaios quantitativos quanto a microscopia eletrônica de varredura. Todos os inibidores testados são classificados como não esteroidais anti-inflamatórios (AINEs), que estão entre a terapêutica mais amplamente utilizada, principalmente para a dor e inflamação, especialmente artrite. Estes fármacos bloqueiam especificamente a biossíntese de prostaglandinas de mamíferos por inibindo uma ou ambas as isoenzimas COX, COX-1 e COX-2. OS inibidores COX etodolac, Diclofenac e, em particular, a aspirina diminui drasticamente a produção de biofilme por

C. albicans, também alguns inibidores de COX bloqueiam completamente a formação de hifas por biofilmes. (Dannhardt et al, 2001).

.

5. ANALISE DOS RESULTADOS

5.1 Revisão taxonômicas morfofisiológicas dos isolados clínicos de *C. parapsilosis*

As leveduras foram revisadas e identificadas através das características morfofisiológicas como aspectos macroscópico e microscópio, perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de fontes de carbono, produção de urease e temperatura de crescimento (Figuras 1, 2 e 3) (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio por leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*.

Isolados	Fontes de Carbono e Nitrogênio													Hidrolise Uréia
	Dex	Sac	Mal	Lac	Gal	Ter	Raf	Xil	Ara	Met	Mel	Nit	Sul	
URM 6408	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7425	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7426	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7427	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7428	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7429	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7430	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7431	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7432	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7433	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7434	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7443	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7444	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7445	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7446	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7447	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7448	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7449	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7450	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7451	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
URM 7452	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
ATCC 96144	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>C. metapsilosis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
ATCC 96139	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>C. othopsilosis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
ATCC 22019	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-

(Dex) Dextrose; (Raf) Rafinose; (Mal) Maltose; (Lac) Lactose; (Sac) Sacarose; (Gal) Galactose; (Ter) Trealose; (Met) Melicitose; (Mel) Melibiose; (Sul) Sulfato de Amônio; (Nit) Nitrato de Potássio; (+) Positivo; (-) Negativo.

A taxonomia de leveduras é extremamente complexa, tendo em vista a metodologia clássica atualmente utilizada para a classificação de espécies, que utiliza características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para definir espécie (DE HOOG et al., 2000). Em muitos casos, os taxonomistas têm grandes dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou gênero, neste trabalho o padrão morfológico e fisiológico foi padrão para todas as cepas (tabela 1).

Após a realização da identificação os isolados foram confirmados como *C. parapsilosis*, todas as leveduras clínicas foram capazes de crescer tanto a temperatura ambiente (30°C) como a 37°C, temperatura considerada compatível ao estado de parasitismo, destaque para quatro isolado que cresceram em temperatura de 40°C (tabela 2). Nos casos de fungos contaminantes tal adaptação poderia não ser observada e esta característica pode ser acrescida como um dado de patogenicidade em todos os isolados.

Tabela 2. Temperatura de crescimento de leveduras clínicas de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*.

Isolados	Temperaturas de crescimento (°C)						
	25°C	30°C	35°C	37°C	40°C	42°C	45°C
URM 6408	+	+	+	+	+	-	-
URM 7425	+	+	+	+	-	-	-
URM 7426	+	+	+	+	-	-	-
URM 7427	+	+	+	+	+	-	-
URM 7428	+	+	+	+	-	-	-
URM 7429	+	+	+	+	-	-	-
URM 7430	+	+	+	+	-	-	-
URM 7431	+	+	+	+	-	-	-
URM 7432	+	+	+	+	-	-	-
URM 7433	+	+	+	+	-	-	-
URM 7434	+	+	+	+	+	-	-
URM 7443	+	+	+	+	-	-	-
URM 7444	+	+	+	+	-	-	-
URM 7445	+	+	+	+	-	-	-
URM 7446	+	+	+	+	-	-	-
URM 7447	+	+	+	+	-	-	-
URM 7448	+	+	+	+	-	-	-
URM 7449	+	+	+	+	+	-	-
URM 7450	+	+	+	+	-	-	-
URM 7451	+	+	+	+	-	-	-

URM 7452	+	+	+	+	-	-	-
ATCC 96144	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-
ATCC 96139 <i>C. othopsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-
ATCC 22019 <i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-

Figura 1. (A) Aspecto macroscópico mostrando colônia branca com bordos irregulares e textura cremosa em cultura pura; (B) Microscopia da cultura apresentando células de leveduras ovais e hialinas de *Candida parapsilosis* no 3º dia de crescimento em meio ágar Sabouraud Dextrose.

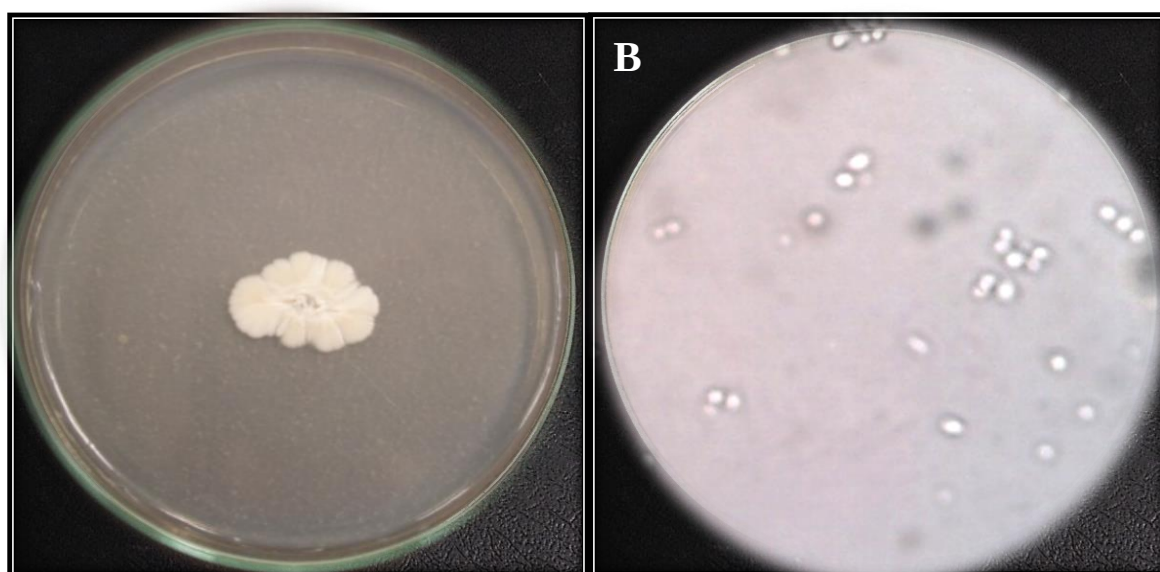


Figura 2. (A) Assimilação de fontes de carbono (D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L-lactose, S-sacarose, G-galactose) e (B) nitrogênio (S-sulfato de amônio, N-nitrato de potássio) por *Candida parapsilosis*

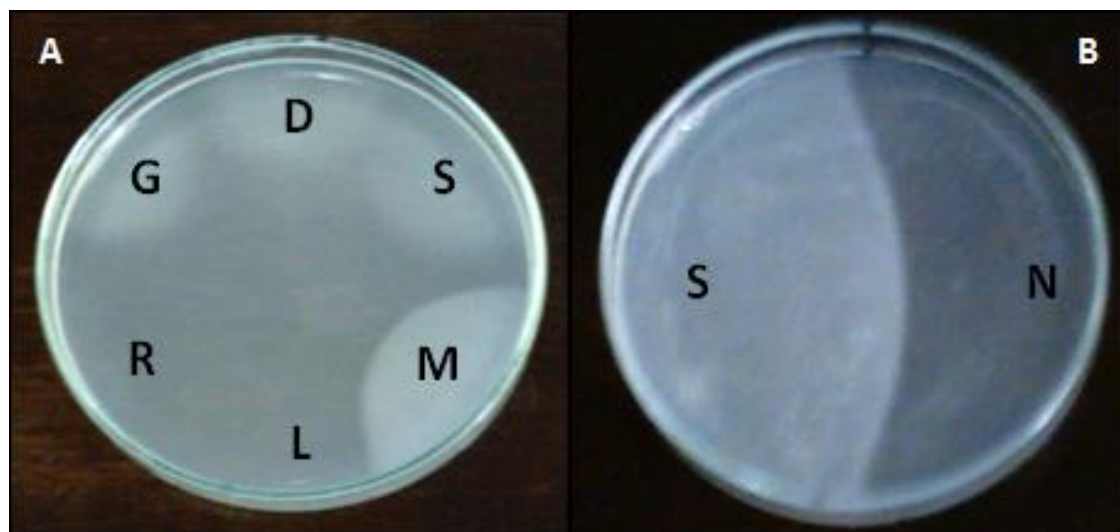
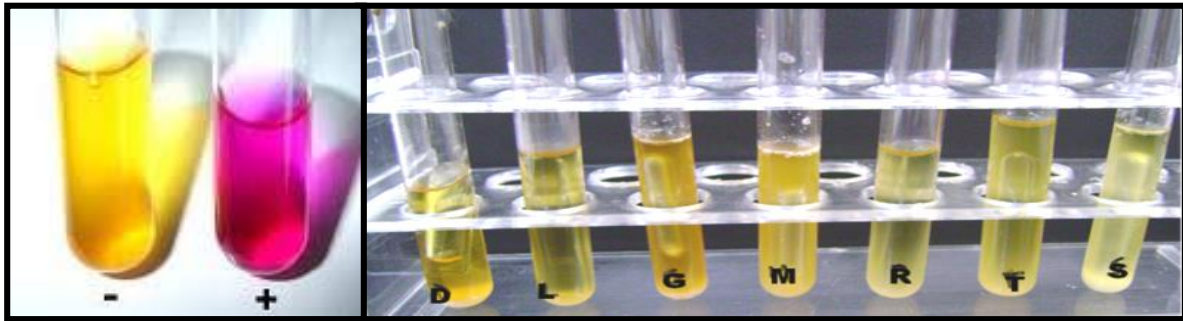


Figura 3. (A) Teste de urease Negativo e (B) fermentação das fontes de carbono (D-dextrose, R-rafinose, M-maltose, L-lactose, S-sacarose, G-galactose T - trealose) por *Candida parapsilosis*



5.2 Perfil proteico por maldi tof ms de leveduras clinicas do complexo *Candida parapsilosis*

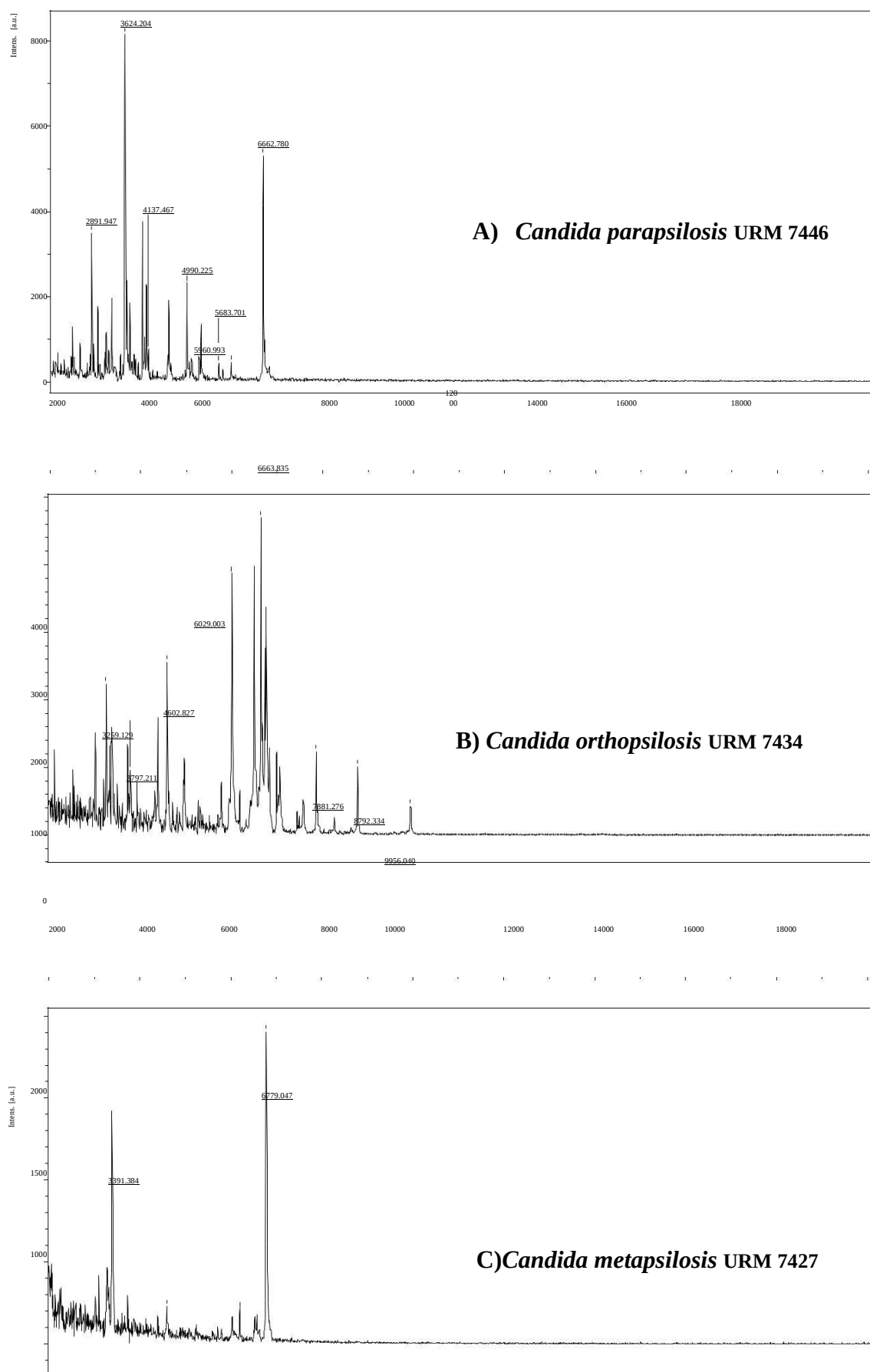
A identificação por MALDI-TOF MS ocorreu através dos espectros obtidos que foram analisados por um algoritmo, o qual comparou os espectros brutos com os espectros da base de dados Biotyper™ versão 3.1, (Bruker Daltonics, Germany/USA), que identificou em nível de espécie as 20 leveduras separando as três espécies do complexo, com valores de registro (score) ≥ 2.0 . (Figura 4).

Figura 4. Resultados das leveduras identificadas pelo MALDI-MS Biotyper. Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1.**Bruker Daltonik MALDI Biotyper**
Classification Results

(++) A				
URM 7426 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.194</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.194</u>
URM 7427 (++) A	<i>Candida metapsilosis</i>	<u>2.215</u>	<i>Candida metapsilosis</i>	<u>2.215</u>
URM 7428 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.164</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.164</u>
URM 7429 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.186</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.186</u>
URM 7430 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.2</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.2</u>
URM 7431 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.197</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.197</u>
URM 7432 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.217</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.217</u>
URM 7433 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.004</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.004</u>
URM 7434 (++) A	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.089</u>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.089</u>
URM 7443 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.052</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.052</u>
URM 7444 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.017</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.017</u>
URM 7445 (++) A	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.193</u>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.193</u>
URM 7446 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.085</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.085</u>
URM 7447 (++) A	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.089</u>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<u>2.089</u>
URM 7448 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.196</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.196</u>
URM 7449 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.099</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.099</u>
URM 7450 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.154</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.154</u>
URM 7451 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.186</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.186</u>
URM 7452 (++) A	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.143</u>	<i>Candida parapsilosis</i>	<u>2.143</u>

Os picos espectrais das leveduras do complexo *Candida parapsilosis* possuem padrão espectral semelhante dentro de cada espécie do complexo, com algumas diferenças no *fingerprint* proteico, o que diferencia espectralmente uma das outras, conforme observado na Figura 5.

Figura 5. Plano espectral proteico de leveduras clínicas do Complexo *Candida parapsilosis*, obtido em Smartbean Autoflex III Bruker Daltonics. A) *Candida parapsilosis stricto sensu* URM 7446. B) *Candida orthopsilosis* URM 7434. C) *Candida metapsilosis* URM 7427. Fonte: Software MALDI Biotyper™ versão 3.1.



A identificação rápida e correta das espécies de *Candida* é de grande importância para a sobrevivência dos pacientes e principalmente para implementação de medidas eficazes para o controle da doença. A espectrometria de massas tem sido proposta como uma alternativa econômica para os métodos convencionais de identificação. Estudos têm mostrado que o MALDI-TOF MS permite a identificação rápida e precisa de culturas de leveduras a partir da extração proteica do isolados clínicos, mostrando concordância com a identificação convencional (MARTINES-LAMAS et al., 2011).

O MALDI-TOF MS tem sido descrito como uma ferramenta de identificação rápida e precisa para bactérias e fungos em laboratórios de microbiologia clínica. Alguns estudos demonstraram o desempenho de MALDI TOF MS para a identificação de espécies de *Candida*. Em um estudo realizado por Pulcrano et al. (2012), foi avaliado 82 leveduras, isoladas de infecções da corrente sanguínea, sendo todas as leveduras identificadas a nível de espécie. Na pesquisa realizada por Yaman et al. (2012), foram identificadas 281 leveduras isoladas a partir de culturas de sangue.

Em nosso estudo, o procedimento para a realização do teste por MALDI-TOF MS, foi concluído a partir da extração proteica, para exposição das proteínas ribossomais, tendo assim uma melhor identificação, sendo possível separar o complexo *C. parapsilosis* o qual compreende três espécies fenotipicamente iguais mas genotipicamente diferentes.

5.3 Aderência às células epiteliais e qualificação dos biofilmes

Quanto à capacidade de adesão as células epiteliais e formação de biofilme, os 20 isolados apresentaram aderência fraca e foram capazes de formar biofilmes de intensidades variadas. (Tabela 3) (Figuras 6 e 7)

Tabela 3. Aderências as células epiteliais e formação de biofilme de isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis*

Isolados	Aderência	Biofilme Qualitativo	
		Agitação	Estático
URM 6408	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7425	Fraca	Forte	Forte
URM 7426	Fraca	Forte	Forte
URM 7427	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7428	Fraca	Forte	Forte
URM 7429	Fraca	Forte	Forte
URM 7430	Fraca	Forte	Forte
URM 7431	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7432	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7433	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7434	Fraca	Forte	Forte
URM 7443	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7444	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7445	Fraca	Forte	Forte
URM 7446	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7447	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7448	Fraca	Moderado	Moderado
URM 7449	Fraca	Fraco	Fraco
URM 7450	Fraca	Fraco	Fraco
URM 7451	Fraca	Forte	Forte
URM 7452	Fraca	Forte	Forte
ATCC 96144	Fraca	Moderado	Moderado
<i>C. metapsilosis</i>			
ATCC 96139	Fraca	Fraco	Fraco
<i>C. othopsilosis</i>			
ATCC 22019	Fraca	Fraco	Fraco
<i>C. parapsilosis</i>			

A aderência de *Candida* às células epiteliais é uma das principais características patogênicas do gênero. Estudos têm mostrado que há variações na aderência de diferentes espécies de *Candida*, que podem explicar por que algumas espécies colonizam as

superfícies mucosas mais frequentemente do que outros. Em nosso estudo, as cepas de *C. parapsilosis* apresentaram fraca aderências quando comparada com espécies de *C. albicans* ($P < 0,01$). Esta constatação está em conformidade com observações de Repentigny et al. 2007, que também observou que *C. albicans* era mais aderente que *C. parapsilosis*.

Melo et al. (2011) compararam a produção de biofilme de diferentes espécies de leveduras isoladas em diferentes materiais, as amostras de *C. parapsilosis* não foram grandes produtoras de biofilme, uma vez que a escala de classificação de produção de biofilme ficou da seguinte forma: *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. parapsilosis*. Ao compararem com outras espécies, Hawser e Douglas (1994), demonstraram que *C. parapsilosis* não foi a maior espécie produtora de biofilme, pois outras espécies produziram significativamente mais biofilme, como *C. albicans*. Estes dados apoiam nossos achados.

Kuhn et al. (2002), também demonstraram que *C. albicans* produziu mais biofilme que outras leveduras, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*. Estatísticas confirmam nossos estudos onde *C. albicans* produziu biofilmes mais fortes que as espécie *Candida* não-*C. albicans*, apresentando assim um fatores de virulência superior. Em contrapartida em nosso estudo *C. parapsilosis* apresentou padrões elevados de biofilmes forte a moderado, expressando um fator de virulência elevado.

Figura 6. (A) Isolado de *Candida Orthopsilosis* URM 7434, apresentando fraca aderências as células epiteliais (B) Isolado de *C. albicans* apresentando um forte padrão de aderência.

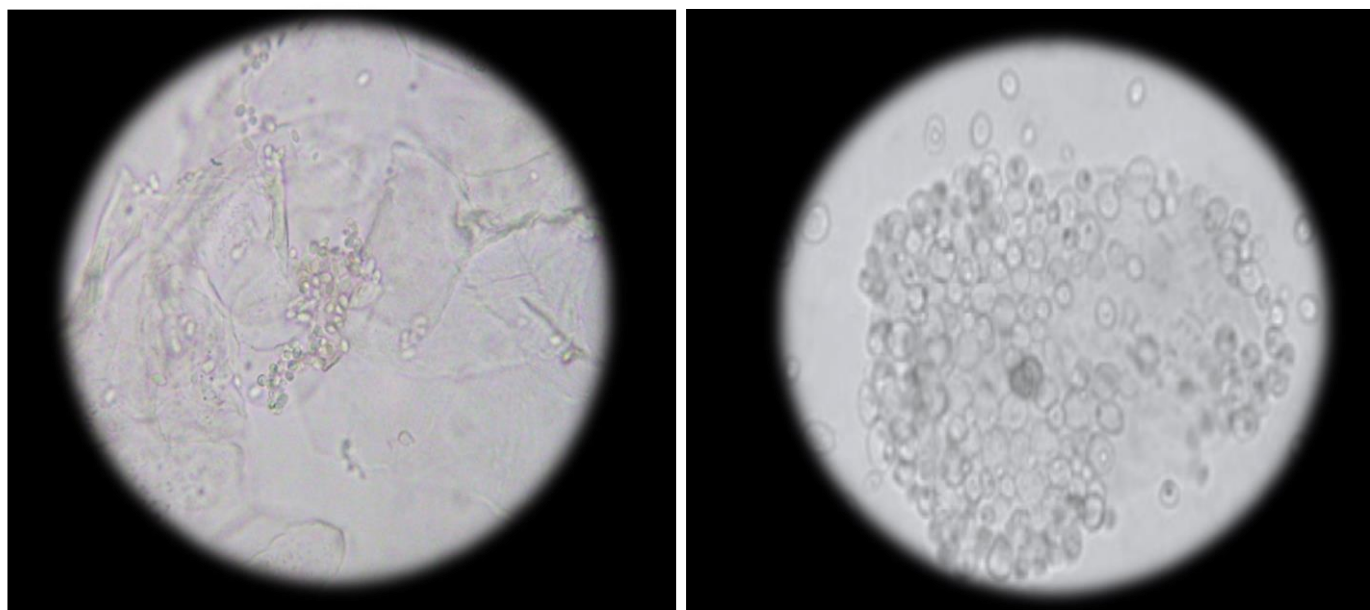
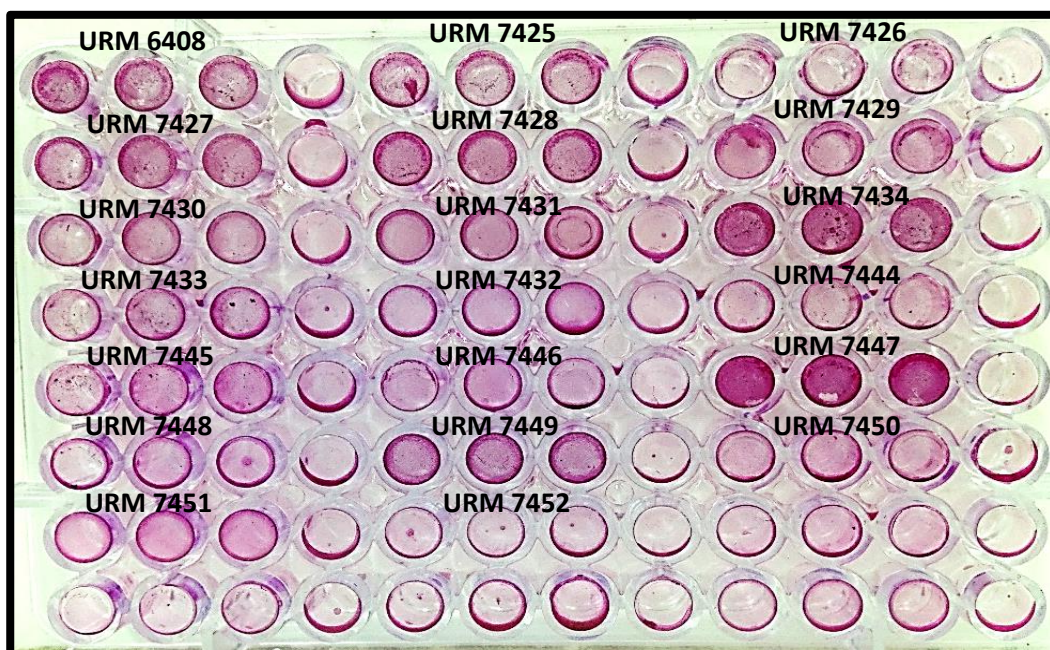


Figura 7. Formação de biofilme em superfícies de polipropileno. C: controle negativo; 1+: biofilme fraco; 2+/ 3+: biofilme moderado; 4+: biofilme forte



5.4 Ensaio para redução xtt - quantificação de biofilmes por leveduras clínicas dos complexo *Candida parapsilosis*

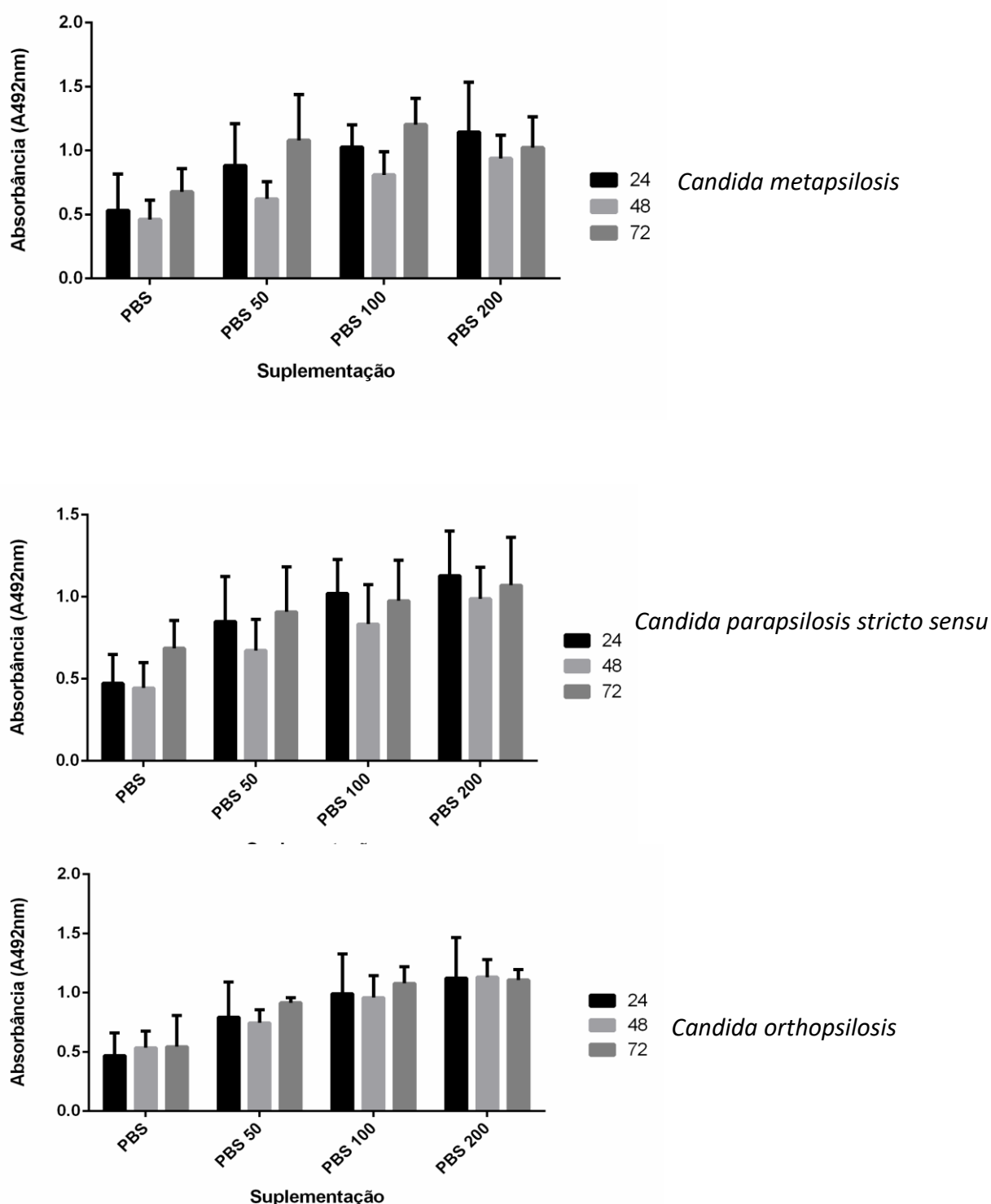
Mukherjee et al. (2005) apontaram o uso do ensaio do XTT como uma importante ferramenta para quantificação de células em biofilme. Outros autores utilizaram o ensaio para quantificar células viáveis de *Candida* spp. em biofilme (Chandra et al. (2001a), Chandra et al. (2001b), Chandra; Mukherjee; Ghannoum, 2008).

De acordo com Altman (1976) os ensaios colorimétricos de viabilidade celular são importantes ferramentas no estudo da atividade de células eucarióticas, principalmente as técnicas envolvendo o uso de sais de tetrazólio. A quantificação do biofilme de *Candida* spp. baseada na atividade metabólica envolve a conversão do XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- [(phenylamino)carbonyl]-2Htetrazolium) ao produto formazan, pela enzima desidrogenase mitocondrial. O formazan é solúvel em água, podendo ser facilmente mensurado no sobrenadante celular. Essa característica é importante, pois permite o estudo de biofilmes intactos, assim como examinar a sua suscetibilidade a drogas, sem rompimento de sua estrutura (ALTMAN, 1976; KUHN et al., 2002b). A técnica de redução do sal de tetrazólio (XTT) é mais fácil de ser empregada, por ser menos laboriosa e fornecer resultados mais rapidamente, apesar de apresentar um custo elevado.

A quantificação por meio de cultura, utilizando método microbiológico convencional, é mais trabalhosa e demorada, porém apresenta custo mais baixo que o anterior.

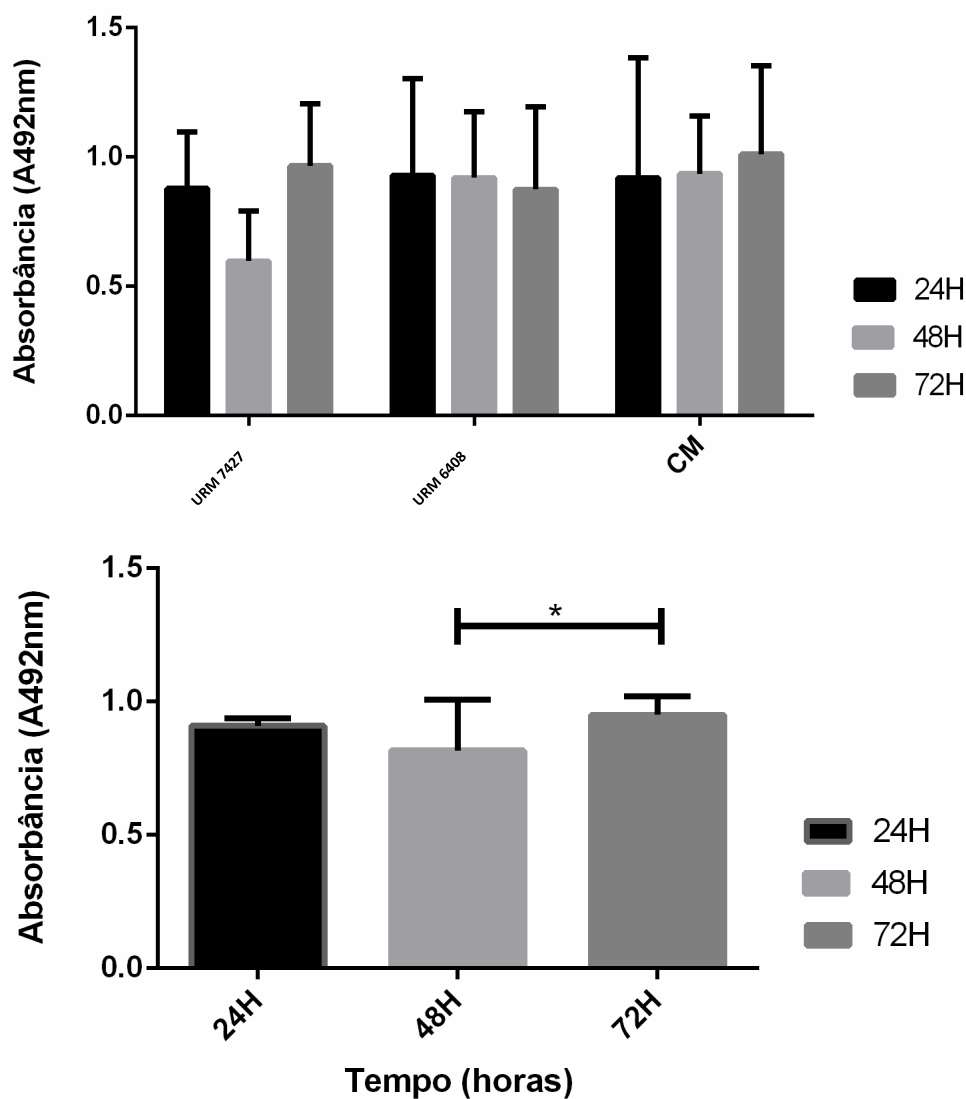
Em nossos estudos a análise inicial para as diferentes suplementações de glicose demonstrou que as cepas de todas espécies do complexo *C. parapsilosis* aumentaram a biomassa e a atividade metabólica em todos os tempos testados. Os resultados do presente estudo mostraram que a adição de glicose aumentou a detecção dos formazanos, pela redução de XTT em comparação com controles sem qualquer adição, dados também observados por Silva et al, 2008 em seu estudo por espécies de *Candida* spp

Figura 8: Atividade oxidativa de biofilme do Complexo *Candida parapsilosis* em diferentes tempos de incubação e suplementação



Quanto ao melhor tempo de formação de biofilme para cepas de *C. metapsilosis*, há uma significação estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tempo de 48 e 72 horas após a fase de adesão, apresentando maior atividade metabólica das células nesse período, demonstrando *in vitro* que se for iniciada uma terapia antifúngica antes desses períodos possivelmente poderemos debelar a infecção.

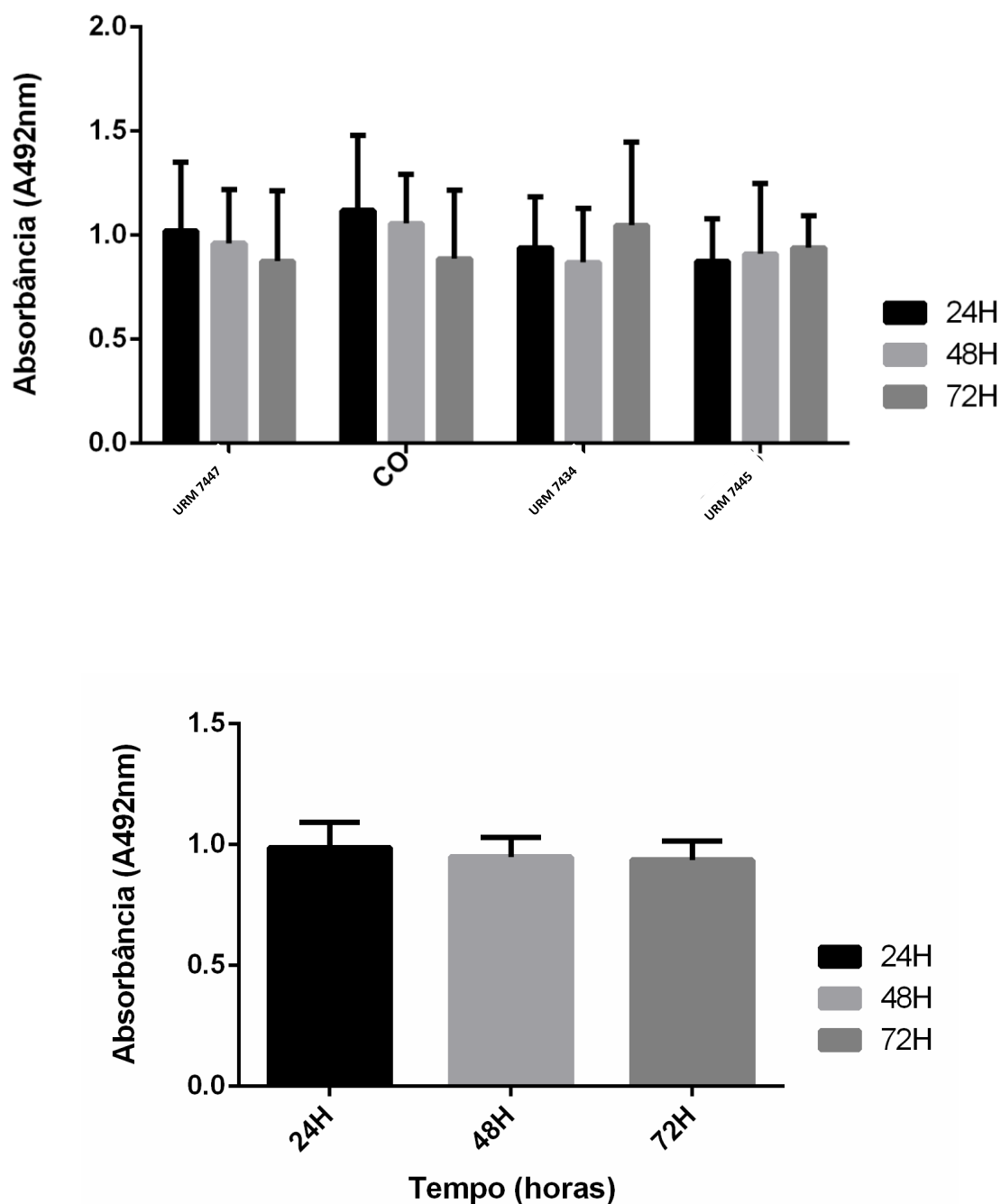
Figura 9: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida metapsilosis*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.



* (Teste de Tukey $p < 0,05$)

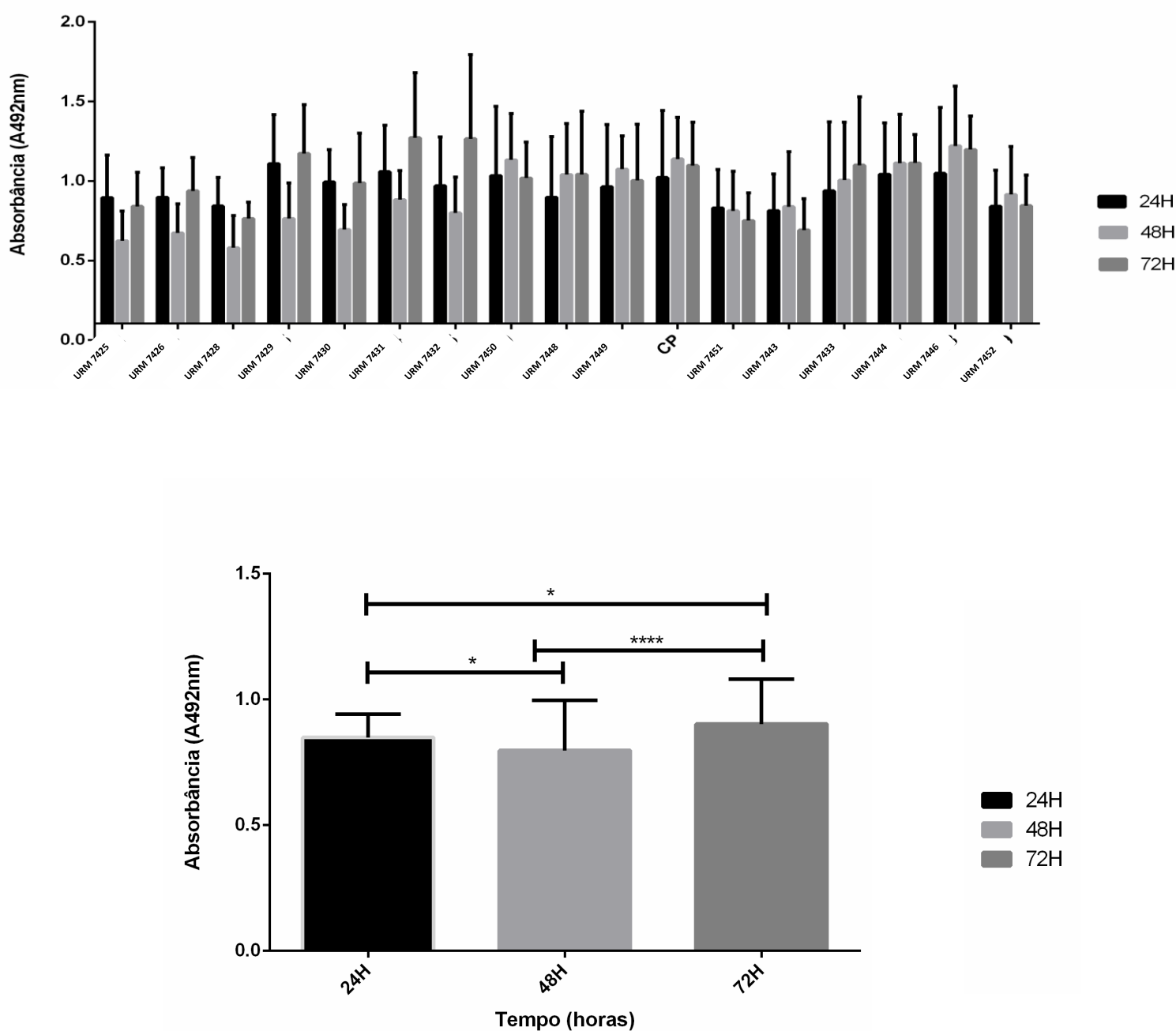
Em nosso estudo foi observado que cepas de *C. orthopsilosis* independeram do tempo para formação de biofilmes, sendo todos os tempos analisados considerados ótimos para formação de biofilme após a fase de adesão, apresentando assim um potencial de virulência elevado.

Figura 10: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida orthopsilosis*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.



Já as cepas *C. parapsilosis stricto sensu* apresentou significância estatística entres os tempos de 24, 48 e 72 horas ($p < 0,05$) e extrema significância entres os tempos de 48 e 72 horas ($p < 0,001$), sendo esses últimos como melhores tempos de formação de biofilmes após adesão.

Figura 11: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida parapsilosis stricto sensu*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.



* (Teste de Tukey $p < 0,05$)

*** (Teste de Tukey $p < 0,001$)

Pequenas variações nas atividades metabólicas do biofilme formado na superfície de poliestireno foram detectadas entre os isolados testados do complexo *C. parapsilosis*. Os resultados refletem, provavelmente, as diferenças fisiológicas entre os isolados e confirmam o relato de Lattif et al., (2010), que todas as espécies do complexo *C. parapsilosis* formam biofilmes equivalentes.

5.5 Análise da morfologia de biofilmes formados sobre a superfície do látex siliconizado por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV)

No presente estudo foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a topografia da superfície e a arquitetura formada pelos biofilmes do complexo *C. parapsilosis*.

Chandra et al, 2008, avaliaram a formação de biofilme de *Candida* spp. sobre discos de cateter de silicone em 6, 24 e 48 horas, por microscopia eletrônica de varredura observaram a presença de blastoconídeos nas primeiras horas, hifas a partir de 24 horas e um biofilme constituído de densa rede de hifas e blastoconídeos a partir de 48 horas, caracterizando o biofilme maduro. Nossos padrões diferiram do estudo de Chandra et al 2008, para espécie de *C. metapsilosis* no tempo de 24 horas, foram observadas presença de blastoconídeos, a partir de 48 horas apresentaram pseudohifas e o biofilme maduro formado com 72 horas (Figura 12). *C. orthopsilosis* apresentou em 24 horas foram observados blastoconídeos, em 48 horas formação de pseudohifas e presença de uma massa amorfa recobrendo a superfície de alguns dos elementos que constituem o biofilme, no tempo de 72 horas apresentava um biofilme maduro sendo compostos por uma densa rede de leveduras, tubos germinativos, pseudohifas. A matriz de polissacarídeo extracelular estava visível na superfície de algumas das formas morfológicas da levedura. (Figura 13) e *C. parapsilosis* apresentou no tempo de 24 horas blastoconídeos e tubos germinativos e nos tempos de 48 e 72 horas foi observado um biofilme espesso com presença de matriz extracelular. (Figura 14).

Evidências crescentes demonstram que a natureza química do material do cateter desempenha um papel importante na patogênese das infecções relacionadas com dispositivos médicos, e, a maioria destes é feitos de PVC. Rotrosen et al., (1983), observaram que *C. albicans* adere ao PVC mais rapidamente do que à teflon. Além disso, infecções causadas por *C. parapsilosis* têm sido associadas com a capacidade de proliferar

em altas concentrações de glicose e formar biofilme em material plástico (TROFA et al., 2008; PFALLER; MESSER; HOLLIS, 1995). Nossos resultados demonstraram que espécies do complexo *C. parapsilosis* são propensas à formação de biofilme em material siliconado e em superfície de polipropileno. Sendo capazes de em 24h demonstrar plena adesão a superfície, em 48h início do arranjo e diferenciação e em 72h consolidação da matriz.

Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. metapsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO)

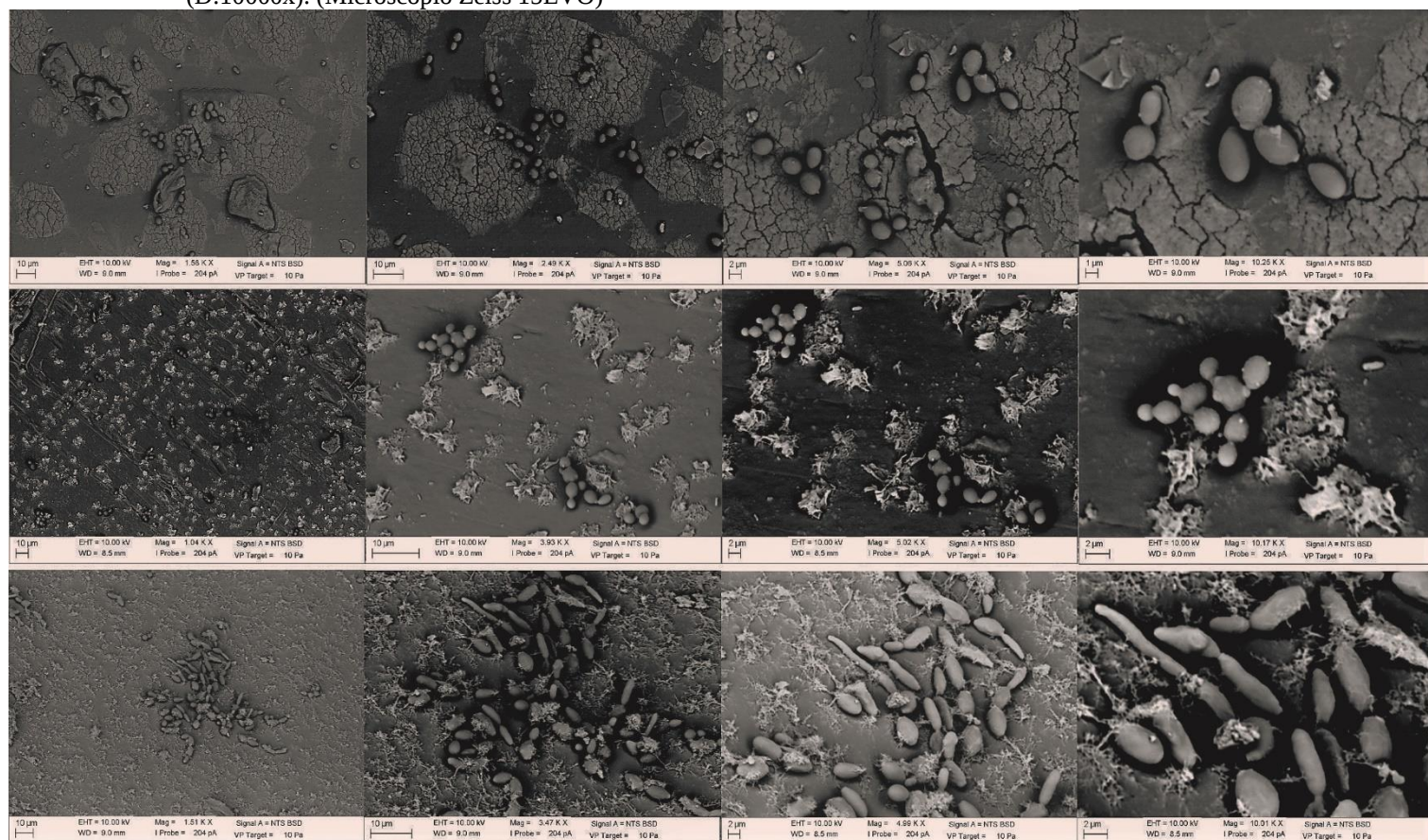


Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. orthopsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO)

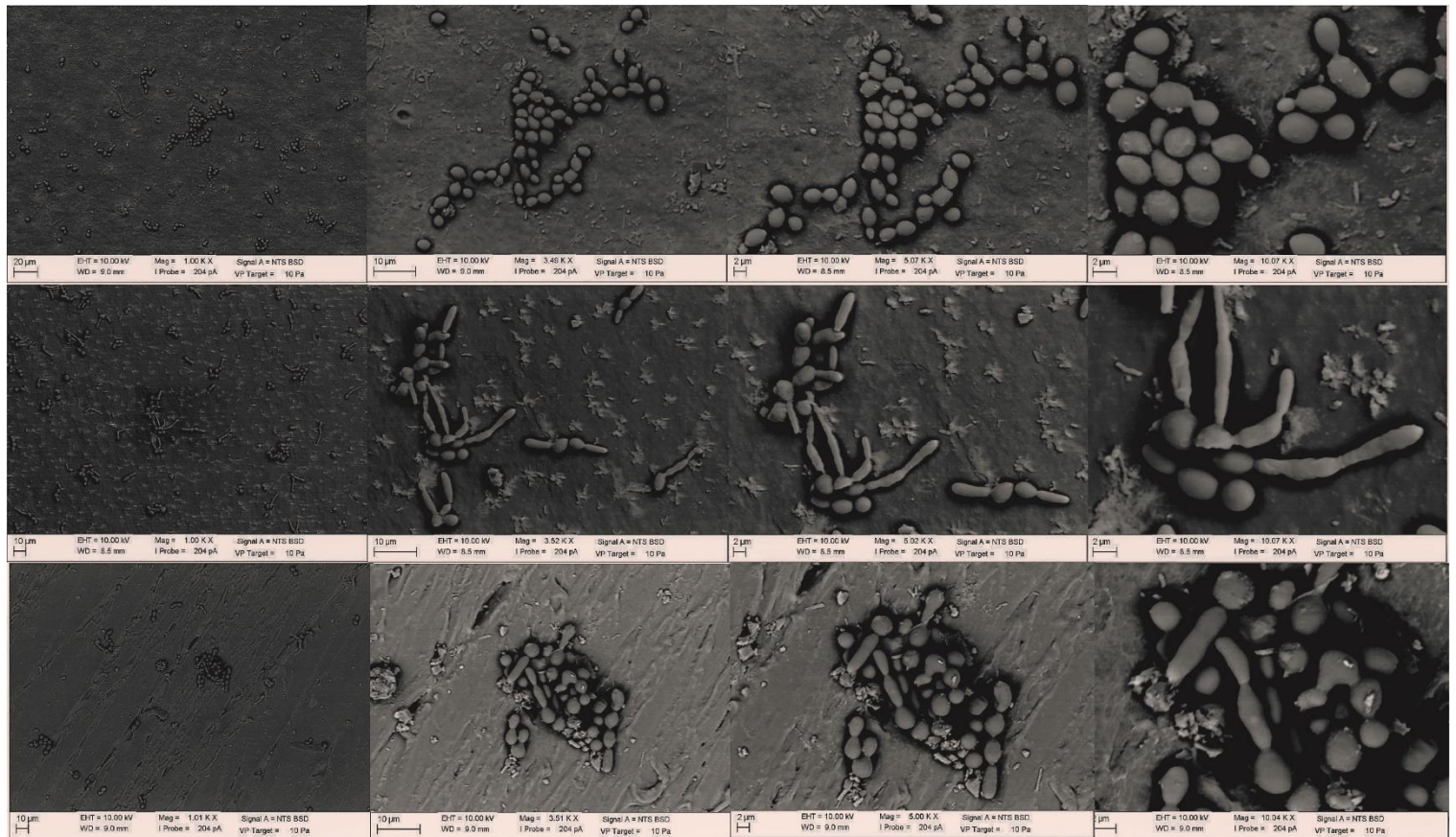
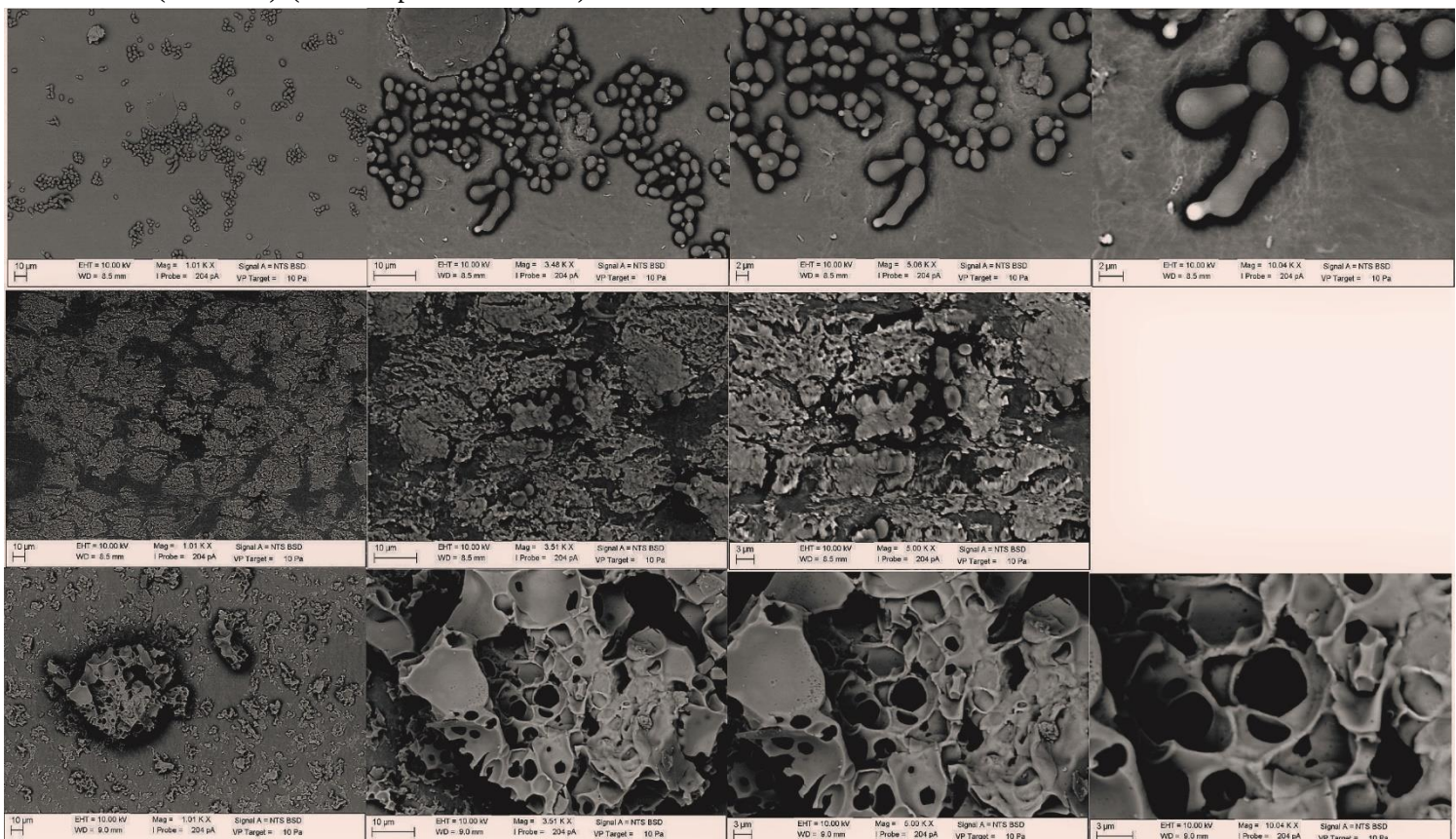


Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *C. parapsilosis* na superfície de cateter siliconizado com 24horas; 48 horas e 72 horas de crescimento: a (A:1000x); (B: 3000x); (C: 5000x); (D:10000x). (Microscópio Zeiss 15EVO)



5.6 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro*

No que se refere ao perfil de suscetibilidade, diversos antifúngicos, incluindo os azólicos e os poliênicos, apresentam atividade contra cepas do complexo *C. parapsilosis*. (Cappelletty et al 2007).

Em nossas análises, todas as cepas do complexo *C. parapsilosis* testadas (100%) foram sensíveis frente a fluconazol e Anfotericina B. Todas as cepas tiveram inibição da fase filamentosa pelo Ácido Acetilsalicílico. O breakpoint com sua respectiva CIM de cada levedura se encontra sumarizado na Tabela 5. Todos os testes de sensibilidade foram realizados em duplicata para cada levedura.

Tay et al, (2009), em um estudo com 25 cepas de do complexo *C. parapsilosis*, observaram que a resistência ao fluconazol não foi detectada. Corroborando com os dados apresentados neste presente estudo (figura 15).

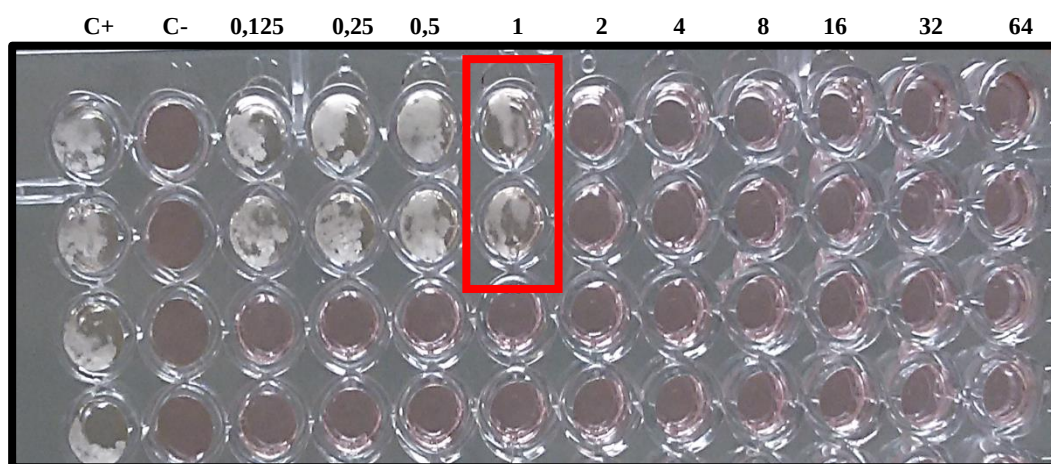
Já em um estudo realizado por Chen et al, 2012 observaram uma resistência ao fluconazol em isolados de *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis sensu stricto*. Gomez-Lopez et al. (2008) mostraram valores de CIM para este agente antifúngico $> 4 \mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis sensu stricto* e *C. metapsilosis*, enquanto Silva et al. (2014) detectaram CIM de $16 \mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis sensu stricto*. Dados que não são sustentados em nossos estudos onde os CIM variaram de $0,125 \mu\text{g/mL}$ à $1 \mu\text{g/mL}$.

Para anfotericina B, segundo alguns pesquisadores, entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, apenas *C. parapsilosis sensu stricto* apresenta resistência a anfotericina B (Bourgeois et al. 2010; Cuenca-Estrella et al. 2010; Sardi et al. 2013). Embora Lockhart et al. (2008) tenham relatado CIM $>1 \mu\text{g/mL}$ para as três espécies, eles observaram que a proporção de *C. parapsilosis sensu stricto* resistente à anfotericina B foi maior do que para *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Dados que diferem dos nossos estudos, onde nenhuma cepa de *C. parapsilosis sensu stricto* apresentou CIM >1 .

Tabela 4. Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*

Isolados	Sensibilidade Antifúngica		
	Anfotericina B (Poliênio)	Fluconazol (Azólico)	Ácido Acetilsalicílico
URM 6408	1 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7425	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7426	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	5mM
URM 7427	0,25 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7428	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7429	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7430	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7431	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7432	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7433	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7434	0,125 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7443	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	5mM
URM 7444	0,25 µg/ml	2 µg/ml	5mM
URM 7445	0,5 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7446	0,5 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7447	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	5mM
URM 7448	1 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
URM 7449	0,25 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7450	0,25 µg/ml	2 µg/ml	5mM
URM 7451	0,25 µg/ml	1 µg/ml	5mM
URM 7452	1 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM
ATCC 96144 <i>C. metapsilosis</i>	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	5mM
ATCC 96139 <i>C. othopsilosis</i>	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	5mM
ATCC 22019 <i>C. parapsilosis</i>	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	5mM

Figura 15. Perfil de sensibilidade de Fluconazol. (64-0,125 µg/ml) frente a isolado *Candida othopsilosis* URM 7434.



5.7 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* tabuleiro de xadrez

Ácido Acetilsalicílico e Fluconazol apresentaram ação sinérgica frente a todas as cepas do complexo *C. parapsilosis*, sendo estas consideradas sensíveis na combinação testada, não foram observados padrões de antagonismo para drogas teste (Tabela 5) (Figura 16). O *breakpoint* com sua respectiva CIM de cada levedura se encontra sumarizado na Tabela 6. Todos os testes de sensibilidade foram realizados em duplicata para cada levedura.

Abdelmegeed et al, (2013), em estudo realizado com inibidores da ciclooxigenase observou a ação sinérgica destes, quando utilizado o fluconazol em isolados *Candida albicans* resistentes ao fluconazol de forma isolada. Padrão que foi confirmado em nosso estudo.

Tabela 5. Teste de tabuleiro de xadrez (Fluconazol e Ácido acetilsalicílico) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*

Isolados	Sinergismos Fluconazol / Ácido Acetilsalicílico			
	Fluconazol µg/ml	Ácido Acetilsalicílico mM	FICI* µg/ml	
URM 6408	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7425	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7426	0,03	5	0,06	Sinérgico
URM 7427	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7428	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7429	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7430	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7431	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7432	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7433	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7434	0,06	5	0,06	Sinérgico
URM 7443	0,03	5	0,06	Sinérgico
URM 7444	0,03	5	0,015	Sinérgico
URM 7445	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7446	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7447	0,03	5	0,06	Sinérgico
URM 7448	0,03	5	0,12	Sinérgico
URM 7449	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7450	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7451	0,03	5	0,03	Sinérgico
URM 7452	0,03	5	0,12	Sinérgico
ATCC 96144	0,06	5	0,06	Sinérgico
<i>C. metapsilosis</i>				
ATCC 96139	0,06	5	0,12	Sinérgico
<i>C. othopsilosis</i>				
ATCC 22019	0,03	5	0,12	Sinérgico
<i>C. parapsilosis</i>				

*Concetração Inibitoria Fracionária

Lewis et al, 2002, constatou que não foi possível de discernir uma interação sinérgica ou antagônica de fluconazol com Anfotericina B, porque o antagonismo, parece ser unilateral (a atividade do fluconazol parece persistir apesar da anulação da atividade fúngica da Anfotericina B. Em nosso estudo quando utilizado o Fluconazol e a

Anfotericina B padrões indiferentes e de padrão de antagonismos foram encontrados, sendo o primeiro demonstrado pela maioria dos isolados testados, ações de sinergia não foi observadas para as drogas teste, semelhantemente estes padrões foram observados quando foi utilizado o Acido acetilsalicílico e a Anfotericina B. (Tabela 6 e 7)

Tabela 6. Teste de tabuleiro de xadrez (Fluconazol e Anfotericina B) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*.

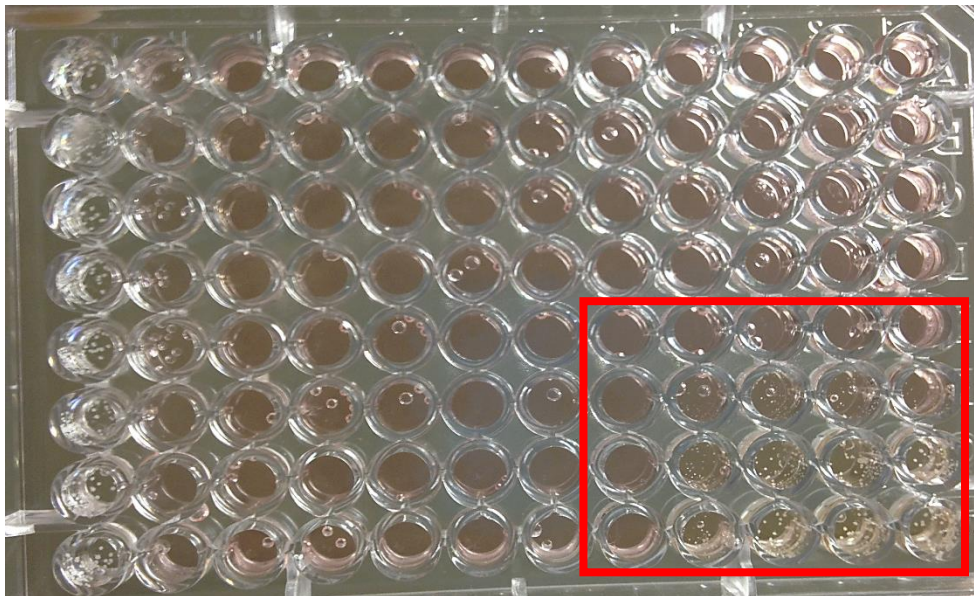
Isolados	Sinergismos Fluconazol / Anfotericina B			
	Fluconazol µg/ml	Anfotericina B µg/ml		FICI µg/ml
URM 6408	1	0,5	1,5	Indiferente
URM 7425	0,25	0,5	2	Indiferente
URM 7426	0,25	0,5	3	Indiferente
URM 7427	0,5	0,5	2,5	Indiferente
URM 7428	0,25	1	5	Antagonismo
URM 7429	0,25	0,5	3	Indiferente
URM 7430	0,25	0,5	2	Indiferente
URM 7431	0,25	0,5	2,5	Indiferente
URM 7432	0,25	1	1,5	Indiferente
URM 7433	0,125	0,5	1,5	Indiferente
URM 7434	0,5	0,25	2,5	Indiferente
URM 7443	0,25	0,25	2	Indiferente
URM 7444	1	1	2,25	Indiferente
URM 7445	1	0,5	2	Indiferente
URM 7446	1	1	1,5	Indiferente
URM 7447	0,5	0,5	2,5	Indiferente
URM 7448	1	2	6	Antagonismo
URM 7449	1	0,5	3	Indiferente
URM 7450	1	0,5	4,25	Antagonismo
URM 7451	0,5	0,5	2,5	Indiferente
URM 7452	0,25	1	2	Indiferente
ATCC 96144 <i>C. metapsilosis</i>	1	0,5	8	Antagonismo
ATCC 96139 <i>C. othopsilosis</i>	0,5	0,5	3	Indiferente

ATCC 22019	1	2	12	Antagonismo
<i>C. parapsilosis</i>				

Tabela 7. Teste de tabuleiro de xadrez (Anfotericina B e Ácido acetilsalicílico) de leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*.

Isolados	Sinergismos Anfotericina B/ Ácido Acetilsalicílico				
	Anfotericina B (Poliênicos)		Ácido Acetilsalicílico	FICI	
URM 6408	2	4	5mM	4	Indiferente
URM 7425	1	1	5mM	2	Indiferente
URM 7426	1	1	5mM	2	Indiferente
URM 7427	0,5	2	5mM	8	Antagonismo
URM 7428	0,5	1	5mM	2	Indiferente
URM 7429	0,25	1	5mM	4	Indiferente
URM 7430	0,25	0,5	5mM	1	Indiferente
URM 7431	0,5	1	5mM	2	Indiferente
URM 7432	1	4	5mM	8	Antagonismo
URM 7433	0,5	1	5mM	2	Indiferente
URM 7434	1	2	5mM	16	Antagonismo
URM 7443	0,5	2	5mM	8	Antagonismo
URM 7444	0,5	1	5mM	4	Indiferente
URM 7445	1	2	5mM	4	Indiferente
URM 7446	1	2	5mM	4	Indiferente
URM 7447	0,25	2	5mM	8	Antagonismo
URM 7448	0,5	16	5mM	16	Antagonismo
URM 7449	1	2	5mM	8	Antagonismo
URM 7450	0,5	2	5mM	8	Antagonismo
URM 7451			5mM		Indiferente
URM 7452	0,5	2	5mM	2	Indiferente
ATCC 96144	0,5	2	5mM	8	Antagonismo
<i>C. metapsilosis</i>					
ATCC 96139	1	2	5mM	8	Antagonismo
<i>C. othopsilosis</i>					
ATCC 22019	1	1	5mM	4	Indiferente
<i>C. parapsilosis</i>					

Figura 16. Perfil de sensibilidade de Fluconazol e Ácido acetilsalicílico frente *Candida othopsilosis* URM 7434



5.8 Ensaio para redução xtt – efeito anti-biofilmes de isolados dos complexo *Candida parapsilosis*

Na atividade anti-biofilmes de Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico (ação sinérgica) podemos observar uma redução significativa na formação de biofilme por espécies do complexo *C. parapsilosis*

Tem sido relatada que a associação de fluconazol com ácido acetilsalicílico resulta em um atividade sinérgica contra *C. albicans* (Scott et al., 1995, Pina-Vaz et al., 2000, Mukherjee Et al., 2003; Zhou et al., 2012). Em nosso estudo, podemos comprovar que o sinergismo das referidas drogas foram não só eficazes contra as estirpes dos complexo *C. parapsilosis* como na formação de biofilmes. Semelhantemente observado nos estudo de Harriott, 2009, que como a prostaglandina EX (PGEx) produzida por fungos afeta a susceptibilidade de agentes antifúngicos, de forma que medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) proporcionam uma ação sinérgica com fluconazol para inibir *in vitro* os biofilmes de *C. albicans*.

Figura 17: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida metapsilosis*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.

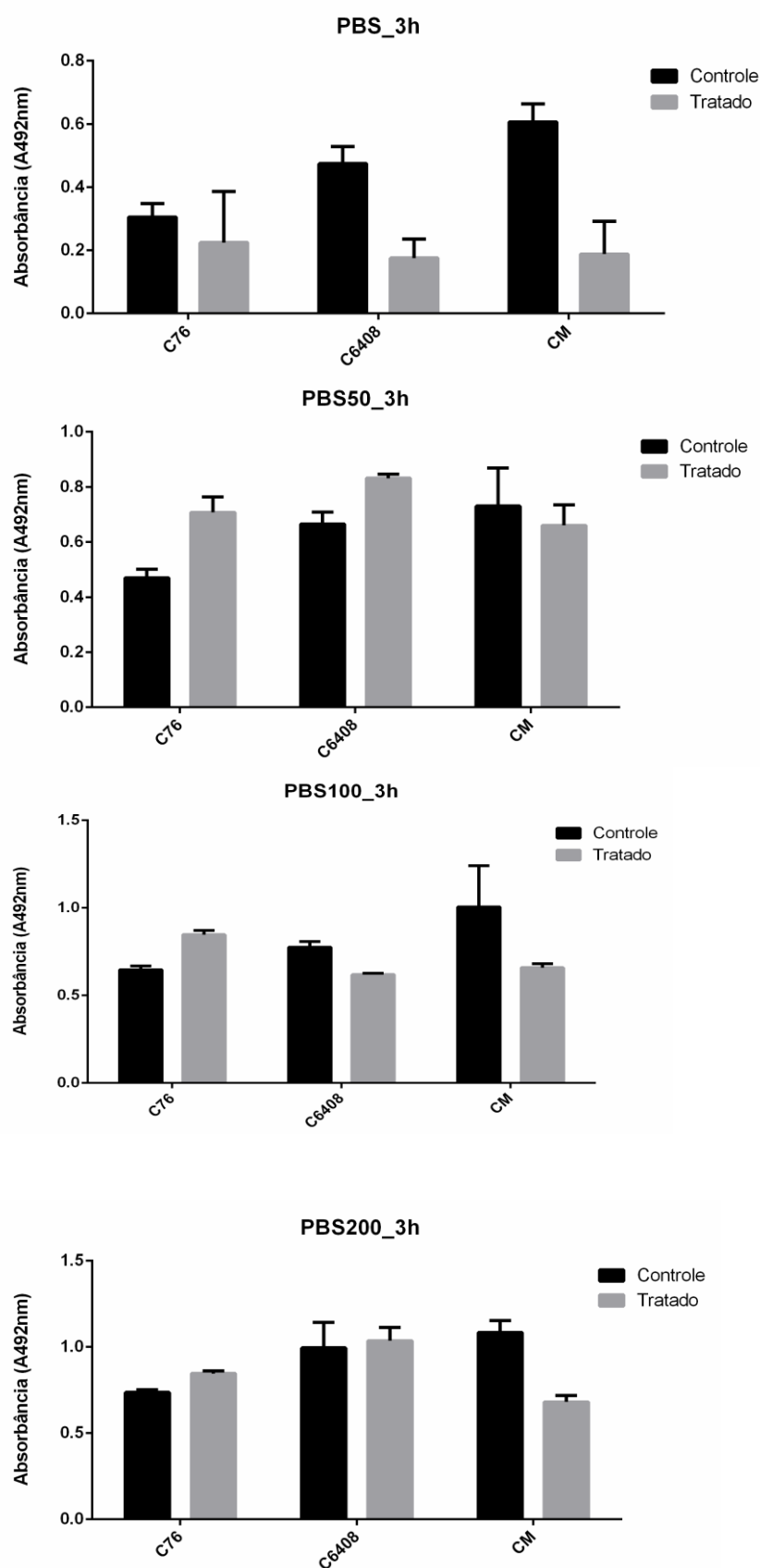


Figura 18: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida orthopsilosis*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.

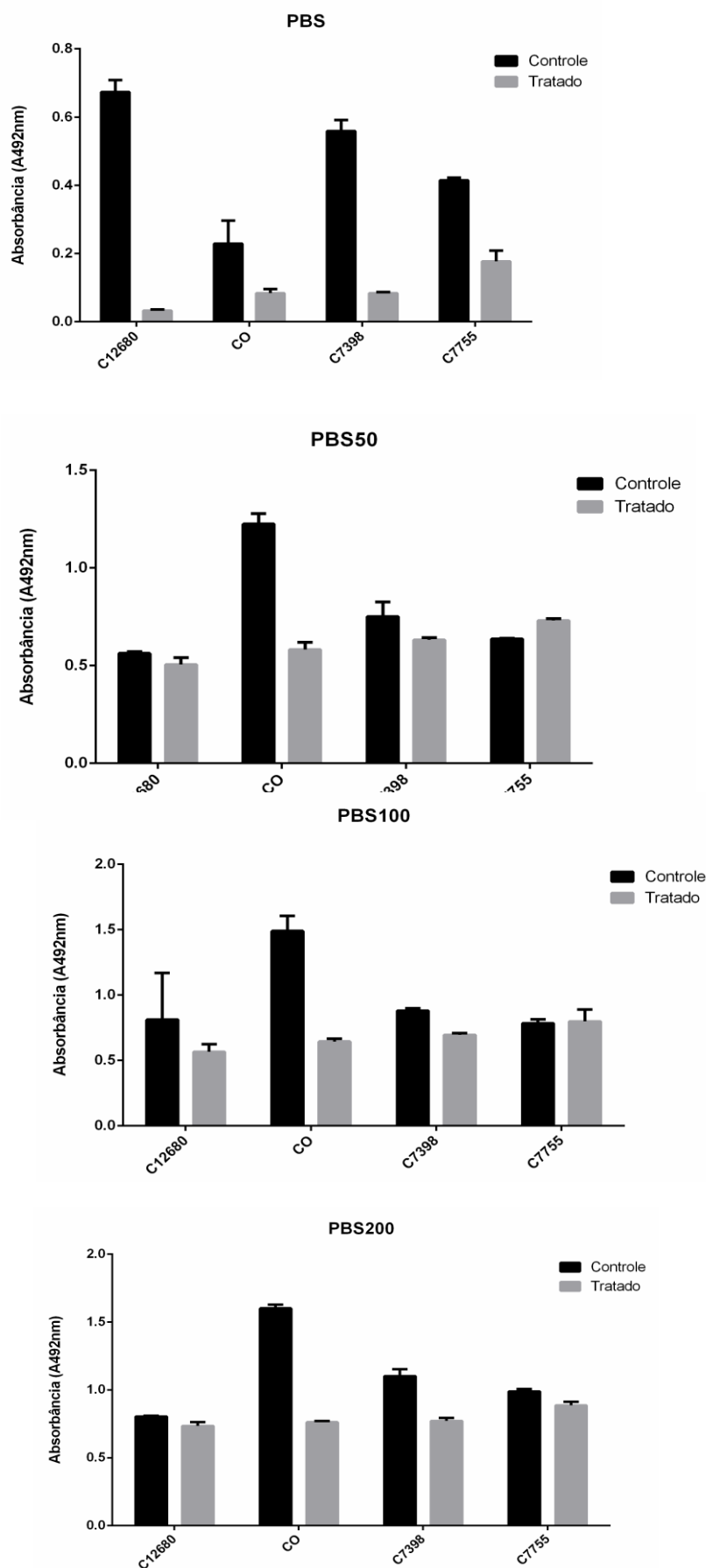
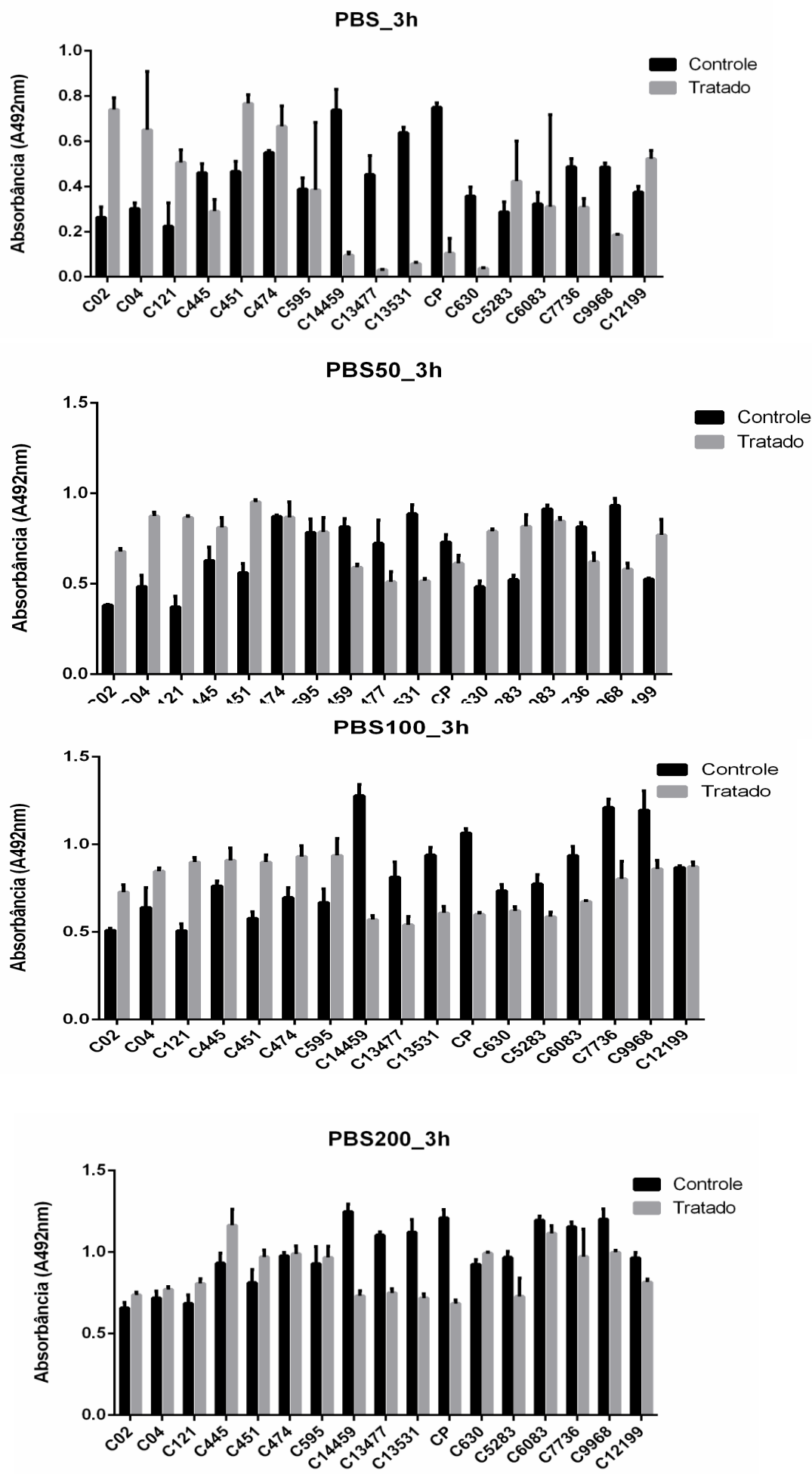


Figura 19: Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *Candida parapsilosis stricto sensu*, após exposição de fluconazol e ácido acetilsalicílico, mensurada em absorbância, obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT.



5.9 Modelo de experimental de endocardite - atividade antifúngica *in vivo*

O modelo murino neutropênico foi usado para se atingir candidíase disseminada, a confirmação da imunossupressão através dos testes hematológicos onde foram observados padrões de neutropenia, além da perda de peso, perda de pelo e fezes diarreicas, reações características do uso de ciclofosfamida.

O critério de seleção da cepa utilizada na infecção, obedeceram alguns padrões pré-estabelecidos através do teste *in vitro*. A cepa selecionada para modelo de infecção foi a *C. orthopsilosis* (URM 7434), pois foi a que apresentou melhor produção de biofilme, menores CIMs, melhor resposta ao tratamento proposto e melhor resposta aos testes pilotos *in vivo*.

Um animal com endocardite foi eutanasiado para realização de análises histopatológicas. Além disso, foi realizado exame direto dos fragmentos de tecidos onde foram observadas células de leveduras ovais e hialinas identificadas através de lâminas clarificadas com solução aquosa de KOK 10%, vista ao microscópio óptico (400x), que confirmaram a infecção e inoculados em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar onde, foram obtidas colônias de leveduras cremosas de coloração branca a bege obtendo o agente etiológico da doença (Figura 20).

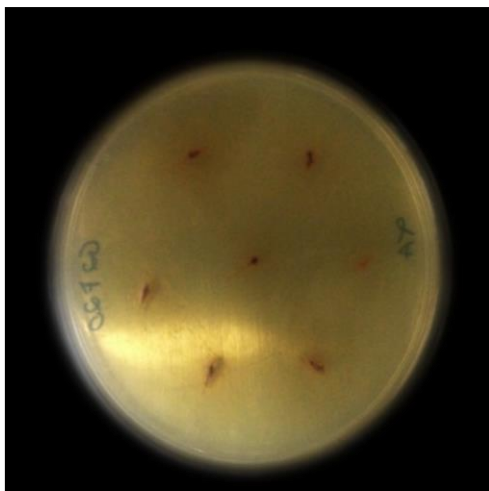
Figura 20. (A) Exame direto dos fragmentos de tecidos cardíaco com várias células de leveduras ovais e hialinas aderidas ao tecido (B) Macroscopia de *Candida* sp. em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos cardíaco. Colônias com bordas lisas; e coloração creme. (C) Cultura pura de *Candida orthopsilosis*.



Após confirmação da infecção, os animais foram tratados com Fluconazol, Ácido acetilsalicílico isolado e combinado e com Anfotericina B por sete dias. Onde no oitavo dia de tratamento foi realizada eutanásia de 50% dos animais para confirmação da cura. Ao exame direto não foram visualizadas células de leveduras e não houve

desenvolvimento fúngico em meio de cultura, (Figura 21). Os demais animais foram observados por 28 dias afim de confirmar o sucesso terapêutico ou recidivas da infecção, decorridos esse período e os animais foram eutanasiados, sendo possível confirmar o sucesso terapêutico.

Figura 21. Cultura sem desenvolvimento fúngico em sete pontos equidistantes, obtidas a partir de fragmentos de tecidos cardíaco, após tratamento combinado de Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A taxonomia morfofisiológica (clássica) é insuficiente para distinguir as espécies do Complexo *Candida parapsilosis*.
 - A técnica proteômica Maldi TOF se mostrou eficaz na distinção do complexo *Candida parapsilosis*, uma vez que estas espécies apresenta fenótipos similares mas genótipos diferentes.
 - As espécies estudadas do complexo *C. parapsilosis* apresentam fraca adesão as células epiteliais.
 - O complexo *C. parapsilosis* apresentam padrões distintos de formação de biofilmes.
 - Os isolados do complexo *C. parapsilosis* possuem capacidade de formação de biofilmes independente da disponibilidade de suplementação.
 - O tempo de formação de biofilme diferem entre as espécies do complexo.
 - Os isolados de *Candida orthopsilosis* apresenta biofilme maduro em 24 horas, enquanto as demais espécies do complexo têm como melhores tempos de formação de biofilme os períodos de 48 a 72 horas.
 - Os isolados do complexo *C. parapsilosis* testados apresentam sensibilidade as drogas antifúngicas Fluconazol e Anfotericina B.
 - Estirpes de *Candida parapsilosis stricto sensu* apresenta resistência a anidulafungina.
 - Ácido Acetilsalicílico inibe a formação de tubo germinativo pelas espécies do complexo *C. parapsilosis*.
- Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico quando combinado apresentam padrão de sinergismo frente as espécies do complexo *C. parapsilosis*.
- Fluconazol e Anfotericina B e Ácido Acetilsalicílico e Anfotericina B quando combinados apresentam padrões indiferentes e antagônicos.
 - Quando combinado Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico, apresentam atividade anti-biofilme frente as espécies do complexo *C. parapsilosis*.
 - O isolado URM 7434 *C. orthopsilosis* é agente de candidemia mesmo em indivíduo imunocompetente.
 - Indivíduo saudáveis (sem doença de base e/ou fatores predisponentes) são susceptíveis a endocardite fúngicas.
 - O tratamento combinado de Fluconazol e Ácido Acetilsalicílico é eficaz contra candidemia e endocardite fúngicas.

REFERÊNCIAS

- Abdelmegeed, E.; Shaaban, M.I. 2013 **Cyclooxygenase inhibitors reduce biofilm formation and yeast-hypha conversion of fluconazole resistant *Candida albicans***. Journal of Microbiology Vol. 51, No. 5, pp. 598–604,.
- Anonymus. 1997; **AINEs como antiagregantes plaquetarios?: Ácido acetilsalicílico**. *Boletín Terapéutico ANDALUZ*; 13 (6):1-5.
- Baillie, G. S., and L. J. Douglas. 1999. **Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms**. J. Med. Microbiol. 48:671–679
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. 2000. **Yeast: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: University press, 1139p.
- Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson, and J. F. Ryley. 1985. **A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of**
- Branchini, M. L., M. A. Pfaller, J. Rhine-Chalberg, T. Frempong, and H. D. Isenberg. 1994. **Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis***. J. Clin. Microbiol. 32:452–456.
- Cancelas, J. A., J. Lopez, E. Cabezudo, E. Navas, J. Garcia Larana, M. Jimenez Mena, P. Diz, J. Perez de Oteyza, L. Villalon, A. Sanchez-Sousa, et al. 1994. **Native valve endocarditis due to *Candida parapsilosis*: a late complication after bone marrow transplantation-related fungemia**. Bone Marrow Transplant. 13:333–33
- Cassone, A., F. De Bernardis, E. Pontieri, G. Carruba, C. Girmenia, P. Martino, M. Fernandez-Rodriguez, G. Quindos, and J. Ponton. 1995. **Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity**. J. Infect. Dis. 171:967–975.
- Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Currier, R. H. Flowers, S. K. Fridkin, and R. A. Hajjeh. 2004.

Epidemiologic and molecular characterization of na outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J. Clin. Microbiol. 42:4468–4472.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; CLSI document M27-S4. CLSI, Wayne, PA, 2012.

CRAIG, W. A., AND D. R. ANDES. 2008. **In vivo pharmacodynamics of ceftobiprole against multiple bacterial pathogens in murine thigh and lung infection models.** Antimicrob. Agents Chemother. 52:3492-3496.

d’Enfert, C. 2006. **Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents.** Curr. Drug Targets 7:465–470.

Dannhardt, G., and W. Kiefer. 2001. **Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects.** Eur. J. Med. Chem. 36:109–126.

De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schafer, and A. Cassone. 1999. **Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*.** J. Infect. Dis. 179:201–208.

FERREIRA, L., SANCHEZ-JUANES, F., GARCÍA-FRAILE, P., RIVAS, R., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., GONZALEZ-BUITRAGO, J.M., VELASQUEZ, E. 2011 **MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae,** PLoS One

Gacser, A., S. Salomon, and W. Schafer. 2005. **Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker.** FEMS Microbiol. Lett. 245:117–121.

Garzoni, C., V. A. Nobre, and J. Garbino. 2007. ***Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26:915–926.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet 2014.. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.225-234,

Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps. 2002. **Prostaglandins as modulators of immunity.** Trends Immunol. 23:144–150.

HERNÁNDEZ-CAÑAVERAL, I., BECERRA, G., JIMÉNEZ-CORDERO, 2009., A., et al. ***Candida albicans* isolated from human fungaemia induces apoptosis in an experimental endocarditis model.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(6): 858-861

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; 77ENE, J.; FIGUERAS, M.J. 2000. **Atlas of Clinical Fungi.** 2ªed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands.

Katragkou, A., A. Chatzimoschou, M. Simitsopoulou, M. Dalakiouridou, E. Diza-Mataftsi, C. Tsantali, and E. Roilides. 2007. **Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.** Antimicrob. Agents Chemother. 52:357–360

Kim, S. K., K. El Bissati, and C. Ben Mamoun. 2006. **Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*.** Microbiology 152:2885–2894.

King, R. D., J. C. Lee, and A. L. Morris. 1980. **Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells.** Infect. Immun. 27:667–674.

Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2002. **Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces.** Infect. Immun. 70:878–888.

Laffey, S. F., and G. Butler. 2005. **Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*.** Microbiology 151:1073–1081.

MARCHETTI, O. ENTENSA, J.M. SANGLARD, D., GLAUSER, M.P., MOREILLON, P. 2000. **Fluconazole plus Cyclosporine: a Fungicidal Combination Effective against Experimental Endocarditis Due to *Candida albicans*.** Antimicrob. Agents Chemother. v. 44, p. 112932-2938.

MIRANDA, Lourdes das Neves; RODRIGUES, Eliete C. A.; COSTA, Silvia F.; VAN DER HEIJDEN, Inneke Marie; DANTAS, Kátia C. LOBO, Renata D.; BASSO, Mariusa; VARKULJA, Gláucia F.; KREBS, Vera Lúcia Jornada; GIBELLI, Maria Augusta Bento Cicaroni; CRIADO, Paulo R.; LEVIN, Anna Sara. 2012. ***Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study.** BMJ Open, São Paulo, p.1-6

MOHAMMADI, S.; MOHAMMADI, J.; Forrest, G.N. 2013. **Epidemiology of *Candida* Endocarditis.** Curr Fungal Infect Rep. 7:306-310.

Noverr, M. C., G. B. Toews, and G. B. Huffnagle. 2002. **Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi.** Infect. Immun. 70:400–402

Noverr, M. C., S. M. Phare, G. B. Toews, M. J. Coffey, and G. B. Huffnagle. 2001. **Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins.** Infect. Immun. 69:2957–2963.

Otaki, M., M. Kawashima, A. Yamaguchi, and N. Kitamura. 1992. **A case report of *Candida* prosthetic endocarditis: an autopsy review.** Kyobu Geka 45:335–338.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I.; 2012. **Flucanazole**

susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal Candida species isolated from lagos Nigeria. Journal of Molecular Epidemiology and Genetics, Lagos, v.3, n.1, p. 84-90.

Panagoda, G. J., A. N. Ellepola, and L. P. Samaranayake. 2001. **Adhesion of Candida parapsilosis to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity.** Mycoses 44:29–35.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. 2007 **Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem.** Clinical Microbiology Reviews, Iowa, v.20, n.1, p.133–163.

Pierrotti, L. C., and L. M. Baddour. 2002. **Fungal endocarditis, 1995–2000.** Chest 122:302–310.

PULCRANO, G.; IULA, D. V.; VOLLARO, A.; TUCCI, A.; CERULLO, M.; ESPOSITO, M.; ROSSANO, F.; CATANIA, M. R. 2013; **Rapid and realible MALDI-TOF mass espectrometry identification of Candida non-albicans isolates from bloodstream infections.** Jounar of Microbiological Methods 94: 262-266.

Ramage, G., J. P. Martinez, and J. L. Lopez-Ribot. 2006. **Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem.** FEMS Yeast Res. 6:979–986.

RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L. 2002. **Investigation of multidrug efflux pumps in relation to flucoazole resistance in Candida albicans biofilms.** J. Antimicrob. Chemother., 4: 973–980.

Ruzicka, F., V. Hola, M. Votava, and R. Tejkalova. 2007. **Importance of biofilm in Candida parapsilosis and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method.** Folia Microbiol. (Praha) 52:209–214.

SILVA, W.J.; SENEVIRATNE, J.; PARAHITIYAWA, N; ROSA, E.A.R.; SAMARANAYAKE, L.P.; CURY, A.A.D.B. 2008.**Improvement of XTT Assay**

Performance for Studies Involving Candida albicans Biofilms. Braz Dent J 19(4): 364-369

Weems, J. J., Jr. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin. Infect. Dis. 14:756–766.
yeasts. J. Gen. Microbiol. 131:1217–1221.

Cappelletty, D.; Eiselstein-Mckitrick, K. 2007. **the echinocandins.** Pharmacother. 27: 369-88.

Tay, S. .; Na, S. L.; CHONG, J. 2009. **Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of Candida parapsilosis isolated from patients with blood stream infections.** J Med Microbiol. 58:185-91

ANEXO A –Aprovação do Comitê de ética no uso de animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 28 de outubro de 2015.

Ofício nº 110/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.ª Rejane Pereira Neves
Departamento de Micologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.034835/2015-70

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “Avaliação da atividade anti-biofilme de inibidor de cicloxigenase e fluconazol em modelo experimental de endocardite por *Candida parapsilosis*”.

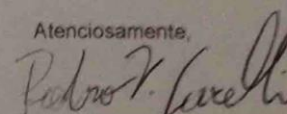
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB/UFPE; Animais: ratos Wistar; Peso: 250g; Idade: 8 a 12 semanas; Nº total de animais: 132.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584