

MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE
CANDIDA ISOLADAS DE PORTADORES DE AIDS E DE
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS EM
HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ-ALAGOAS, BRASIL**

RECIFE – PE

2006

MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*
ISOLADAS DE PORTADORES DE AIDS E DE PORTADORES DE
CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ-
ALAGOAS, BRASIL**

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

ORIENTADORA:

Prof^a. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz
Departamento de Micologia – CCB/UFPE

CO-ORIENTADOR:

Prof^o. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho
Setor de Genética, Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciência Biológicas e da Saúde – ICBS/UFAL

RECIFE – PE

2006

Araújo, Maria Anilda dos Santos

Caracterização molecular de espécies de *Candida* isoladas de portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas / Maria Anilda dos Santos Araújo. – Recife: O Autor, 2006.

115folhas: il., fig., tab.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2006.

Inclui Bibliografia e anexos

1. Biologia de fungos – Micologia médica. 2. Leveduras - *Candida* spp. – Isolamento e identificação. 3. Caracterização molecular – Marcadores moleculares, ITS (Internal Space Transcribe), Calb 1 e Calb 2, (GTG)₅. 4. Pacientes portadores de AIDS e de Câncer – Investigação de *Candida* spp. – Secreção de orofaringe, sangue e urina. I. Título.

**582.282.
579.562**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-467**

Ata da Reunião de Prova pública de defesa de Tese da aluna MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO, da área de concentração em MICOLOGIA APLICADA, do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – nível DOUTORADO, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às quatorze horas do dia vinte e nove de junho de dois mil e seis, na sala de aulas teóricas do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, realizou-se a prova pública da defesa de Tese apresentada pela Doutoranda **MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO**, sob a orientação da Profa. LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ, intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS E CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS ESCOLAS DE MACEIÓ-AL-BRASIL"**. Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora aprovada pela Diretora de Pós-Graduação da PROPESQ, Dra. Maria de Fátima Militão de Albuquerque em doze de junho de dois mil e seis, foi composta pelos seguintes membros titulares: Profa. LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ, do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Pernambuco, Doutora em Microbiologia e Imunologia, pela Universidade de São Paulo – USP, Profa. REJANE PEREIRA NEVES, do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Pernambuco, Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco, Profa. NORMA SUELY SOBRAL DA SILVEIRA, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Doutora em Botânica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Profa. BERENEUZA TAVARES RAMOS VALENTE BRASILEIRO, Bolsista PRODOC/CAPES do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Biologia de Fungos, pela Universidade Federal de Pernambuco, Profa. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA, do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Pernambuco, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Como Membros Suplentes o Prof. JOSÉ FERREIRA DOS SANTOS, do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Ciências, pela Universidade Federal do Paraná, e a Profa. CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA, do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Pernambuco, Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. A Profa. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA iniciou a sessão apresentando os membros da Banca Examinadora, agradecendo a colaboração e a presença de todos, explicando que os trabalhos seriam dirigidos pela Doutora LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ na qualidade de orientadora da aluna. Em seguida convidou a Doutoranda para apresentar a sua Tese. A seguir, os membros da Banca Examinadora discutiram alguns pontos e fizeram sugestões sobre o trabalho. Procedida a avaliação, a Banca Examinadora atribuiu à Doutoranda **MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO** a menção: aprovada. Nada mais havendo a tratar, eu, Giovanna de Lima Guterres, lavrei, datei e assinei a presente ATA, que também assinam os demais presentes. Recife, 29 de junho de 2006.

Giovanna de Lima Guterres
Norma Suely Sobral da Silveira
Bereneuza T.R.V. Brasileiro
Rejane Pereira Neves
Cristina Maria de Souza Motta

Em tempo: a homologação fica condicionada à entrega da tese corrigida de acordo com as recomendações dos examinadores no prazo de sessenta dias. O parecer emitido após análise da tese

“Tudo que você pensa e acredita é realizável. Tudo o que uma pessoa pode desejar, pode conseguir. Os seus pensamentos, portanto, fazem a sua vida”.

Lauro Trevisan

OFEERÇO

*A Deus por ter me dado força e
coragem para não desanimar
diante dos obstáculos.*

*Aos meus pais, Conceição e
Anísio, por me incentivarem, por me
ajudarem nos momentos mais
difíceis, por serem exemplos na minha
vida, pela força, coragem e apoio
constant.*

O meu muito obrigada!

Amo vocês

DEDICO

Ao meu filho Maharishy, por não ter me esquecido quando precisei me ausentar, pois a cada retorno demonstrava através de um sorriso, beijo e abraço que estávamos cada dia mais juntinhos. Também ao meu esposo Samarone por ter assumido as responsabilidades durante minha ausência, por ter sido pai e mãe para nosso filho, por estarmos juntos em mais uma caminhada, fortalecendo ainda mais nossa união.

AMO demais VOCÊS

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, através de Centro Ciências Biológicas-CCB pela oportunidade de cursar esta Pós-Graduação e aumentar meus conhecimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo durante a realização do Doutorado em Biologia de Fungos;

À Prof^a. Dra. Leonor Costa Maia por seu grande desempenho na Coordenação da Pós-graduação em Biologia de Fungos e por seu apoio durante todo o curso;

À Prof^a. Dra. Luzinete Aciole de Queiroz pela orientação, ensinamentos e por ter acreditado em mim, pela amizade e carinho demonstrados nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Dr. Euripedes Alves da Silva Filho pela co-orientação, pela ajuda e incentivo de mudança do projeto, dando o suporte necessário para concluir o trabalho e por ser um amigo imprescindível durante este percurso;

Ao Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes e Hospital Escola Dr. Hélvio Auto pelo acesso e colaboração de pessoal qualificado para realização das coletas de amostras clínicas nos pacientes, como também a todos os funcionários que auxiliaram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho;

Aos pacientes portadores de AIDS e portadores de Câncer que se dispuseram em colaborar com esta pesquisa, permitindo que fossem coletadas as amostras clínicas;

À Prof^a. Dra. Norma Suely Sobral da Silveira pela amizade, incentivo constante, exemplo de profissionalismo e pela transmissão de conhecimentos;

A professora Élica Amara Cecília Guedes por ter sido a pessoa certa encontrada na hora certa, pela amizade desde quando eu era aluna de

Graduação do Curso de Biologia da UFAL e pela ajuda constante durante toda a realização deste curso;

À Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e Departamento de Botânica por ter cedido espaço físico e alguns materiais para desenvolvimento deste trabalho de tese;

Às estagiárias Kátia Simone dos Santos, Geone Pimentel, Leide Daiana P. Paiva, Paola Zucoli e Aryanna Kelly P. Souza pela ajuda durante a realização das coletas;

À minha amiga Elvira Maria Bezerra de Alencar por sua sincera amizade, garra, força, companheirismo e por seus conselhos valiosos;

À Bereneuza Valente Brasileiro pela grande ajuda durante a realização deste trabalho, pela força e incentivo constantes;

Às Professoras Rejane Pereira Neves e Oliane Magalhães por seu incentivo e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Marcos Morais pela permissão ao acesso no Laboratório de Genética para realização de algumas atividades relacionadas a tese;

Aos estagiários do Laboratório de genética: Alecsandra, Meiriana e Rafael pela amizade, apoio e ajuda durante a realização das atividades de biologia molecular;

Aos meus irmãos Anilson, Adjane e Adenilson pelo carinho e sincera amizade;

A todos os professores do Departamento de Micologia pelos ensinamentos;

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho o meu muito obrigado.

RESUMO

Foi realizada a caracterização molecular de espécies de *Candida* isoladas de espécimens clínicos de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos em Hospitais-Escola de Maceió-Alagoas; também foi verificada a diversidade genética em níveis específicos e intraespecífico das leveduras isoladas. Foram coletadas amostras de sangue, secreção da orofaringe e urina de pacientes portadores de AIDS atendidos no setor de Infectologia do Hospital Dia – HUPAA/UFAL e no Hospital Escola Dr. Hélvio Auto, como também de pacientes portadores de câncer atendidos no Setor de Oncologia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/UFAL, sendo analisado 405 amostras clínicas. Após isolamento, as leveduras foram purificadas e identificadas. Entre 135 pacientes analisados foi observada uma ocorrência de 35% de isolados de leveduras, sendo a secreção de orofaringe o espécimen clínico do qual houve prevalência (78%), seguido de urina (22%). Entre as espécies de maior ocorrência está *Candida albicans* (63%), seguida de *C. glabrata* (22%), *C. guilliermondii* (18%), *C. parapsilosis* (14%) e *C. tropicalis* (8%). Posteriormente, foi realizada a caracterização molecular das espécies de leveduras, pela análise dos produtos de PCR amplificados com iniciador para a região ITS do rDNA, de ISSR (GTG)₅ e com iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2 para *C. albicans*. Os marcadores moleculares utilizados mostraram-se eficientes, reprodutíveis e auxiliaram na identificação convencional constituindo-se em ferramentas apropriadas para caracterização genética entre espécies de *Candida*.

Palavras chave: *Candida* spp, AIDS, Câncer, Caracterização molecular.

ABSTRACT

It was accomplished the molecular characterization of species of *Candida* isolated from clinical specimens of patients bearers of AIDS and Cancer assisted in School Hospitals of Maceió-Alagoas, It was also verified the genetic diversity in specific and intraspecific levels of the isolated yeasts. It was collected samples of blood, oropharygeal secretion and urine from patients bearers of AIDS assisted in the infectology section of the Hospital Dia - HUPAA/UFAL and in the Hospital Escola Dr. Hólvio Auto, as well as from patients bearers of cancer assisted in the section of oncology of the Hospital Universitário Dr. Alberto Antunes/UFAL, being analyzed 405 clinical samples. After isolation, the yeasts were purified and identified. Among 135 patients analyzed, it was observed an occurrence of 35% of isolated of yeasts, being the oropharygeal secretion the clinical specimen which presented prevalence (78%), followed by urine (22%). The *Candida albicans* is among the species of larger occurrence (63%), followed by *C. glabrata* (22%), *C. guilliermondii* (18%), *C. parapsilosis* (14%) and *C. tropicalis* (8%). Later, it was accomplished the molecular characterization of the species, by the analysis of the products of PCR amplified with initiator for the ITS area of the rDNA, of ISSR (GTG)₅ and with specific-species initiator CALB1 and CALB2 for *C. albicans*. The used molecular markers were efficient, reproductive and they helped in the conventional identification being constituted in appropriate tools for genetic characterization among species of *Candida*.

Key Words: *Candida* spp, AIDS, Cancer, Molecular Characterization

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

	PÁGINAS
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Pacientes Imunocomprometidos.....	13
1.2 AIDS.....	14
1.3 Câncer.....	15
1.4 Leveduras.....	16
1.5 Identificação de Leveduras.....	20
1.6 Caracterização molecular.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Pacientes.....	26
2.2. Coleta de Espécimens Clínicos.....	26
2.3. Processamento das Amostras Clínicas.....	26
2.3.1. Exame Direto.....	26
2.3.2. Obtenção de Cultura.....	27
2.3.3. Purificação e Identificação.....	27
2.4. Análise Molecular das Amostras de Leveduras.....	27
2.4.1. Obtenção de Massa Celular.....	27
2.4.2. Extração do DNA Nuclear.....	28
2.4.3. Quantificação do DNA.....	28
2.4.4. Amplificação do DNA	28
2.4.5. Região ITS do DNA Ribossomal.....	29
2.4.6. ISSR - Inter Simple Sequence Repeats.....	29
2.4.7. Amplificação com Iniciadores CALB 1 e CALB 2.....	31
2.4.8. Análise Estatística.....	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4. ARTIGO.....	41
4.1 <i>CANDIDA</i> SPP ISOLADAS DE SECREÇÃO DA OROFARINGE DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS ATENDIDOS EM HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL.....	41

4.2 ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL.....	61
4.3 IDENTIFICAÇÃO POR PCR DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> ISOLADAS DE PORTADORES DE AIDS E DE PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL.....	75
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	105
6. ANEXOS.....	106
6.1. Ficha do Paciente.....	106
6.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	108
6.3. Registro no Comitê de Ética.....	110
6.4. Instruções para Redação de Artigos.....	111

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Pacientes Imunocomprometidos

Pacientes imunocomprometidos são susceptíveis a diversas infecções; entretanto, os fungos causadores de micoses, raramente provocam infecções sistêmicas em indivíduos imunocompetentes. A detecção de estruturas fúngicas em qualquer parte do organismo revela grande potencial patológico, uma vez que a colonização pode preceder à micose invasiva (LACAZ; MACHADO, 2000).

As infecções fúngicas tornam-se cada vez mais freqüentes e surgem como um problema particularmente significativo em pacientes imunocomprometidos. Diversos fungos, presentes no meio ambiente ou integrante da microbiota própria do homem, podem em determinadas oportunidades passar de sapróbios a patogênicos, provocando quadros clínicos variáveis, desde processos febris benignos, a fungemias, algumas vezes fatais, se não forem diagnosticadas e tratadas precocemente (LACAZ *et al.*, 2002).

Entre as principais infecções fúngicas oportunistas que ocorrem em pacientes imunocomprometidos estão incluídas candidíase, criptococose, histoplasmose, aspergilose, paracoccidioimicose, entre outras (LACAZ; MACHADO, 2000; PORRO; YOSHIOKA, 2000). O principal motivo pelo qual os fungos invadem os tecidos humanos está na incapacidade imunológica do hospedeiro em vencer a invasão do fungo (BRANCHINI, 2002; AZULAY *et al.*, 1989).

Na determinação de fatores predisponentes que indiquem a instalação de doenças fúngicas em pacientes imunocomprometidos, são considerados fatores importantes à terapia das doenças adjacentes resultando na disfunção do sistema imunológico desses indivíduos (RAJENDRAN *et al.*, 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004). A administração de antibióticos de amplo espectro, a utilização de cateteres intravenosos, o uso de nutrição parenteral, a neutropenia, a permanência em unidades de terapia intensiva e as intervenções cirúrgicas são outros fatores predisponentes que freqüentemente se associam a um processo infeccioso (OLIVEIRA, 1997; HOOVER *et al.*, 1997).

1.2 AIDS

O Vírus da Imunodeficiência Adquirida - HIV é um retrovírus com genoma de RNA, da família Retroviridae (retrovírus) e subfamília Lentivirinae. Pertence ao grupo dos vírus citopáticos e não-oncogênicos que se caracterizam por possuir uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia de DNA, que poderá, então integrar-se ao genoma do hospedeiro (TORTORA *et al.*, 2005).

Este vírus é caracterizado por produzir alterações nos mecanismos de defesa da imunidade (DOLANDE *et al.*, 2002), que no estágio avançado da infecção leva a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS); porém o paciente HIV-positivo só é considerado acometido por AIDS quando apresenta contagem CD4+ abaixo de 350cél/mm³ (EYESSON *et al.*, 2002), quando a carga viral apresenta-se acima de 10.000 cópias de RNA viral/mL (MATTOS *et al.* 2004) e se estiverem classificados no grupo IV, segundo a classificação do Center Disease Control – CDC, ou se somarem 10 pontos no critério de pontuação da Organização Panamericana de Saúde – OPAS e da Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2004).

A AIDS no Brasil foi identificada em 1980, a qual se manteve restrita em São Paulo e Rio de Janeiro. Em 1985, observaram-se casos por todo país, sendo que até junho de 2005 foram notificados 371.827 casos de AIDS, destes 251.851 homens e 118.842 mulheres. Na região Nordeste foi registrado 38.837 casos para o total de casos de AIDS no Brasil desde o início da epidemia; no estado de Alagoas em 2005 foram notificados 64 novos casos, totalizando 1.968 casos no Estado (BRASIL, 2005).

A síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS apresenta-se como uma das principais causas de morte prematura, constituindo desta forma um importante problema de saúde pública. A mortalidade de pacientes com AIDS está em grande parte relacionada a infecções oportunistas graves (SANTO *et al.*, 2000).

Em relação às doenças associadas a AIDS que demonstram condições marcadoras da progressão clínica, podemos destacar: 1. Sarcoma de Kaposi; 2. Tuberculose; 3. Candidíase; 4. Herpes zoster ou simples; 5.

Criptococose extra-pulmonar; 6. Pneumonia por *Pneumocystis carinii*; 7. Toxoplasmose cerebral; 8. Infecções por *Cryptosporidium* (GUIMARÃES, 2000).

Associação entre candidíase bucal e AIDS tem sido considerada como um dos sinais iniciais da infecção pelo vírus HIV. Na infecção por este vírus ocorrem alterações em glândulas salivares, no número de proteínas antimicrobianas e de determinados eletrólitos na saliva. Infecções severas por *Candida* foram correlacionadas com deficiências do sistema imune, particularmente das células T, observadas na infecção pelo HIV (WRAY *et al.*, 1990; PHILIP *et al.*, 1991).

A terapia de doenças causadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida é principalmente direcionada para a inibição específica da replicação desses microorganismos retardando a progressão da imunodeficiência e/ou restaurando a imunidade, melhorando a qualidade e aumentando o tempo de vida dos infectados. A introdução da terapia anti-retoviral potente, é composta por três ou mais drogas combinadas, em substituição à monoterapia, constitui um grande avanço na luta contra a infecção pelo HIV (MATTOS *et al.*, 2004).

1.3 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo causar metástase para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (BRASIL, 2005).

Indubitavelmente o câncer é um problema de saúde pública no Brasil, constituindo a segunda causa de morte por doença no país. Nas últimas décadas, o registro de câncer no Brasil, tem mostrado crescentes os casos desta patologia, ressaltando a importância da doença e seu impacto social e econômico (BITTENCOURT *et al.*, 2004).

Em relação a ocorrência de infecções fúngicas em portadores de câncer, podemos destacar os pacientes que apresentam leucemia, linfomas e tumores sólidos, sendo a candidíase e aspergilose as micoses mais comumente diagnosticadas (BODEY *et al.*, 1992). Outro fator importante em

pacientes leucêmicos, é a deficiência na integridade de barreira anatômica da pele e de membranas mucosas, na imunidade celular específica dos linfócitos T e inespecífica dos fagócitos que predispõem de maneira significativa estes pacientes (LACAZ; MACHADO, 2000).

A granulocitopenia severa e prolongada é o fator mais importante para o desenvolvimento de infecção fúngica disseminada em pacientes com neoplasias malignas. Adicionalmente, a emergência dessas infecções tem sido associada à utilização de novos regimes de antibióticos empíricos, durante episódio de prolongada granulocitopenia, secundariamente ao tratamento quimioterápico mais intensivo (NUCCI *et al.*, 1995; NUCCI *et al.*, 1998). Os fungos mais comumente relacionados com infecção em pacientes com câncer pertencem aos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cryptococcus* e, ocasionalmente, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Fusarium* e *Pneumocystis* (OLIVEIRA, 1997).

Alterações como líquen plano, leucoplasias e hiperqueratoses podem favorecer o estabelecimento de *Candida*. Isto se dá principalmente pela retenção prolongada de células epiteliais, alterações moleculares e aumento da quantidade de queratina (KROGH, 1987; OKSALA, 1990; FOTOS *et al.*, 1992). As infecções por *Candida* estão associadas a displasias epiteliais moderadas, glossite romboidal mediana e papilomas. Espécies do gênero *Candida* parecem ter a capacidade de induzir displasias em hiperplasias benignas, de agravar a severidade de displasias epiteliais, e mesmo promover alterações malignas em casos de displasias epiteliais (BARRET *et al.*, 1998). Existem relatos do desenvolvimento de carcinomas “*in situ*” e carcinomas invasivos em sítios de infecção crônica por *Candida* (PEDERSEN *et al.*, 1989).

1.4 Leveduras

Cerca de 56 gêneros e de 500 espécies de *Candida* já foram isoladas e um crescente número vem sendo relatado. Na cavidade bucal já foram isolados 25 gêneros e 167 espécies, no entanto são considerados patogênicos ao homem 10 gêneros e 40 espécies (STENDERUP, 1990; LYNCH, 1994). As leveduras mais comuns na cavidade bucal e em outras superfícies mucosas são espécies do gênero *Candida*, que compreende cerca

de 200 espécies distribuídas na natureza, todas assexuadas e dimórficas, das quais algumas espécies podem viver como sapróbios comensais ou parasitas no homem (KREGER-van RIJ, 1984; FOTOS *et al.*, 1991; BARNETT *et al.*, 2002).

A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista. Durante muito tempo, acreditava-se que apenas a *Candida albicans* era capaz de causar doença no homem. Atualmente, sabe-se que, diferentes espécies de *Candida* são capazes em condições especiais do hospedeiro, de causar diversos tipos de quadro clínicos (SIDRIM; ROCHA, 2004; VIDOTTO, 2004).

Diversas são as espécies de *Candida* que podem viver como sapróbias comensais ou parasitas patogênicos nos seres humanos. Entre elas podemos destacar *C. albicans*, *C. catenulada*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. stelatoidea*, *C. viswanathii*, *C. tropicalis* e *C. zeylanoides* (LACAZ *et al.* 2002; HOOG *et al.* 2000; VIDOTO, 2004).

Espécies do gênero *Candida* têm sido isoladas de vários sítios do corpo humano, como boca, pele, vagina e ânus (VIDOTTO, 2004). Podendo ser encontradas em todos os tecidos, à exceção dos cabelos, e especialmente no trato gastrointestinal, e são eliminadas através das fezes, urina e secreções brônquicas (BERGENDAL *et al.*, 1979; LYNCH, 1994). Na cavidade bucal são encontradas principalmente no dorso da língua, onde as papilas filiformes e reentrâncias, como o forame cego e fissura mediana, servem de sítios que fornecem proteção e meio ambiente favorável para o desenvolvimento de infecção. Além do dorso da língua, *Candida* pode ser encontrada em outros sítios da cavidade bucal, como palato duro e mucosa jugal (ARENDORF; WALKER, 1980).

C. albicans é a espécie mais comum constituindo 60 a 90% dos isolados da cavidade bucal, sendo isolada de crianças e adultos saudáveis e dos portadores de candidíase, incluindo usuários de próteses dentárias, indivíduos HIV positivos, pacientes submetidos a radioterapia e portadores de doenças que afetam as glândulas salivares, como a síndrome de Sjögren (KOGA-ITO, 1997; KINDELAN *et al.*, 1998).

A virulência da *C. albicans* está associada principalmente com sua capacidade de aderência às células epiteliais. Isto se dá principalmente

pela interação das adesinas dos microrganismos e receptores das células epiteliais. A aderência é necessária para a colonização inicial e contribui para a persistência da levedura no hospedeiro. Sem adesão, a taxa de crescimento do fungo é insuficiente para mantê-lo na boca ou trato gastrointestinal. Esta aderência pode ser mediada e facilitada por xerostomia, carboidratos, receptores epiteliais, fibronectinas, tipos específicos de queratina ou mesmo bactérias (FOTOS *et al.*, 1991; JORGE *et al.*, 1993).

C. albicans possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e a outras superfícies, o que pode estar relacionado com sua maior patogenicidade, quando comparada as outras espécies de *Candida* (PIRES *et al.* 2001). Outro fator associado a maior capacidade de causar infecção pode ser sua alta diversidade genética (SANGEORZAN *et al.*, 1994). Esta espécie pode formar tubo germinativo o que lhe propicia o aumento da capacidade invasiva as células do hospedeiro (KIMURA; PEARSAL, 1980). Esta espécie é produtora de numerosas enzimas, entre elas fosfolipase, lipase, fosfomonoesterase, hexosaminidases e pelo menos três proteinases aspárticas (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Estas enzimas favorecem sua implantação no tecido e amostras com atividade fosfolipásica aumentada aderem-se mais fortemente às células epiteliais bucais, aumentando sua patogenicidade (BARRET-BEE *et al.*, 1985).

A espécie *C. tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista principalmente quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, diante da supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antibióticos ou quando ocorrem danos na mucosa gastrointestinal. Esta espécie tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidíase em pacientes com neoplasias, sendo sua freqüência maior em pacientes com leucemias e menor em pacientes com tumores sólidos. As espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis* surgem como importantes patógenos hospitalares constituem-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das candidíases relatadas. Maior ocorrência de *C. glabrata* tem sido observada em pacientes idosos, enquanto *C. parapsilosis* é mais freqüente em crianças e recém nascidos prematuros. As infecções invasivas por *C. guilliermondii* são raras; esta espécie é considerada agente emergente e as

infecções, na maioria dos casos, são descritas em pacientes com câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A imunidade contra *Candida* é dada pela imunidade secretora nas mucosas caracterizada pelas imunoglobulinas secretadas na saliva, associada a imunidade celular quando o microrganismo invade o tecido, através da possível ação das células de Langerhans, células T supressoras, macrófagos e neutrófilos (CHALLACOMBE, 1994).

A transformação de espécies de *Candida* do estado comensal para o estado parasitário deve-se a fatores microbianos, ambientais e individuais. Algumas condições e fatores têm sido relacionados à passagem da forma comensal para quadros de candidíase, no entanto mesmo altas contagens de *Candida* não indicam necessariamente sinais clínicos de candidíase (STENDERUP, 1990).

Quanto aos fatores relacionados ao hospedeiro que predispõem o desenvolvimento de candidíases, podemos destacar quadros de imunossupressão, desordens endócrinas, períodos de convalescência e hospitalização, deficiências nutricionais de ferro e vitaminas, terapia com drogas imunossupressoras, doenças malignas, caquexia, alterações hormonais como gravidez e menopausa, uso de anticoncepcionais, disfunções leucocitárias e doenças mieloproliferativas (SARAMANAYAKE *et al.*, 1986; HEIMDAHL; NORD, 1990; OKSALA, 1990; WAHLIN, 1991; UMAZUME *et al.*, 1995; WILSON, 1998). Desordens endócrinas como diabetes mellitus, hipoadrenalismo, hiperparatireoidismo, hipotireoidismo e hipoadrenocorticism parecem estar associadas com o aumento da candidíase (DOROCKA-BOBKOWSKA *et al.*, 1996; SPOLIDORIO *et al.*, 2001).

Quadros de imunossupressão quer sejam relacionados a desordens sistêmicas como AIDS e doenças mieloproliferativas, ou em respostas à quimioterapia, têm sido relacionadas a maior susceptibilidade à candidíase e infecções por espécies usualmente não encontradas em pacientes saudáveis (FRANKER *et al.*, 1990; BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996; TEANPAISAN; NITTAYANANTA, 1998). A prevalência de lesões por leveduras em pacientes HIV-positivos varia de 50 a 90% e o número de portadores de *Candida* chega a 94% (GREENSPAN, 1994; TEANPAISAN; NITTAYANANTA, 1998). O diagnóstico da candidíase bucal depende das

características clínicas e da evolução, associados à evidenciação das leveduras ou pseudohifas em esfregaços, citologia e cortes histológicos corados com ácido periódico-Schiff (PAS), Grocott, Gram, imunofluorescência, cultura de *Candida* a partir de amostras de saliva, impressão da mucosa, titulação de anticorpos anti-*Candida* salivares, hibridização “*in situ*” e sondas de DNA (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; OLSEN; STENDERUP, 1990; REICHL, 1990; AGUIRRE *et al.*, 1996).

O tratamento da candidíase depende de fatores como: tipo de candidíase, condições gerais do paciente, fatores predisponentes envolvidos e severidade das manifestações clínicas, sendo escolhido de acordo com o agente, forma de administração e a duração da terapia (EPSTEIN, 1990; ZEGARELLI, 1993; GREENSPAN, 1994).

1.5 Identificação de Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares usualmente arredondados que se reproduzem por brotamento, originando blastosporos. Algumas leveduras transformam-se em um estágio micelial sob certas condições ambientais, enquanto outras permanecem sempre unicelulares. As leveduras perfeitas são incluídas na classe *Hemiascomycetes*, ordem *Endomycetales*, e as leveduras imperfeitas na classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*, sendo algumas destas patogênicas ao homem (LODDER, 1970; LACAZ *et al.* 2002).

A propriedade de assimilar vários açúcares tem sido usada para diferenciar espécies. Essa característica está estreitamente relacionada com a fermentação de açúcares, tendo em vista que todos os açúcares fermentáveis são também assimilados, porém, o inverso não ocorre (KREGER-van RIJ, 1984).

As leveduras podem utilizar vários carboidratos nas provas de fermentação. Os compostos mais comumente usados são: glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, trealose, melicitose, arabinose, frutose, xilose, melibiose, amido, inulina, dextrina e glicogênio (HOOG *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

A formação de clamidosporo, usualmente é uma das características utilizadas na identificação de espécie, sendo o primeiro relato

desta estrutura realizado por Benham (1931) utilizando ágar “corn meal”. A distribuição das espécies de *Candida* é muito ampla, tanto no meio ambiente, quanto fazendo parte da microbiota normal do homem (VIDOTTO, 2004). O gênero *Candida* apresenta células variando quanto a forma, em globosa, ovóide, cilíndrica a alongada; reproduzem-se por brotamento multilateral, o pseudomicélio pode ser bem desenvolvido, rudimentar ou ausente; o micélio verdadeiro e os clamidosporos podem estar presentes em algumas espécies (LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; BARNETT *et al.*, 1990).

NAZZAL *et al.* (2005) destacam a importância da PCR como uma ferramenta para identificação de espécies de *Candida* direto da amostra clínica, por se tratar de um método rápido usando seqüências de oligonucleotídeos espécie-específicos.

1.6 Caracterização molecular

Os métodos tradicionalmente utilizados na identificação de leveduras baseiam-se em critérios morfológicos, reprodutivos, fisiológicos e bioquímicos adequados à identificação em nível de espécie, entretanto estão sendo utilizadas técnicas moleculares para auxiliar à identificação tradicional e para estudar a filogenia de muitos fungos. Entre essas técnicas, a de amplificação das regiões ITS (Espaço Interno Transcrito) do rDNA, permite a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos, possibilitando discriminar espécies ou variedades de uma mesma espécie. O polimorfismo destas regiões mostrou ser uma excelente ferramenta de discriminação intraespecífica para leveduras (FUNGARO, 1995; GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1995; BRASILEIRO, 2003; SILVA-FILHO, 2003; SILVEIRA, 2004).

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) é uma técnica que resulta na amplificação seletiva *in vitro* de uma determinada seqüência da molécula de DNA, a partir da utilização da enzima DNA polimerase termo resistente e componentes como desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e oligonucleotídeos iniciadores. Estes iniciadores hibridizam com a região complementar do DNA alvo para produzir bilhões de cópias dessa seqüência em poucas horas. A desnaturação da dupla hélice do DNA, o emparelhamento dos iniciadores com a seqüência alvo pela redução da temperatura da mistura,

e a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase, se processam automaticamente em um equipamento chamado termociclador (NEWTON; GRAHAN, 1997).

A técnica de PCR pode ser aplicada a qualquer situação que necessite da amplificação de regiões de DNA, e tem sido largamente empregada no melhoramento vegetal e animal, tipagens de microrganismos de interesse médico e industrial, diagnóstico de vários tipos de cânceres, e em estudos de genética forense (SAIKI *et al.*, 1998).

Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método importante para a identificação de fungos. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em patologia médica, em plantas e em alimentos. A PCR pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, patótipos, espécies ou taxa superiores. Esta técnica fornece uma rápida, simples e confiável alternativa aos métodos de identificação convencional de fungos isolados da amostra clínica, o que permitirá o diagnóstico das infecções micóticas (GOTTFREDSSON *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 1994; REISS *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 1996; WALSH; CLANOCK, 1998).

Na espécie *C. albicans*, como na maioria dos eucariontes, três diferentes genes do rDNA (5.8S, 18S e 26S) aparecem agrupados em blocos repetidos em dezenas de cópias do genoma. Estes genes são separados por regiões não codificantes denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e removidas após o processamento do transcrito primário para dar origem ao RNA ribossômico maduro. O fato de este agrupamento gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (Figura 1) (WHITE *et al.*, 1990).

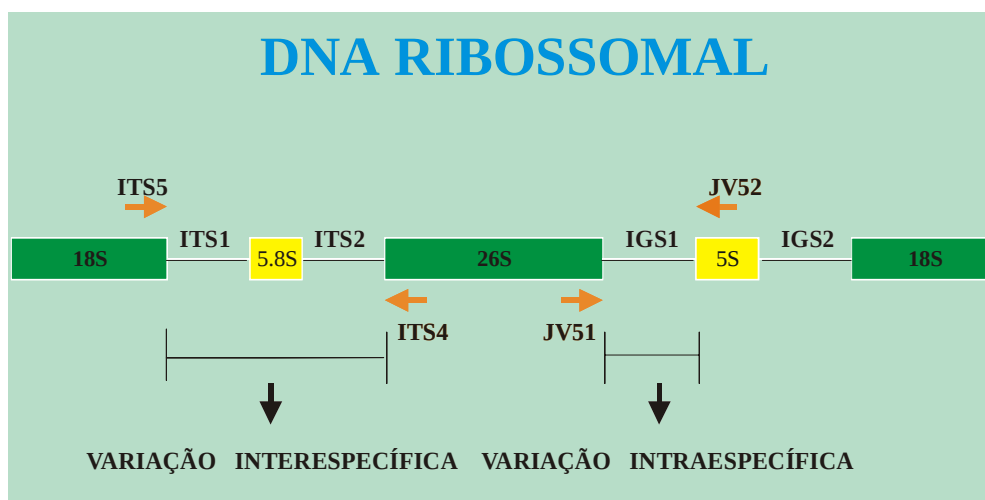


FIGURA 1. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) flanqueada pelos iniciadores universais ITS4 e ITS5 (FUNGARO, 2000).

A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. Porções do gene 26S são bastante variáveis e, portanto, apropriadas para comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos de diferentes espécies. Já as regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados e relativamente curtos entre 400 à 1000pb, e ainda por aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade. Como consequência, é grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de seqüência de nucleotídeos (ESTEVE – ZARZOSO *et al.*, 1999).

As seqüências de DNA que são polimórficas, ou seja, freqüentemente variáveis entre espécies de fungos, tais como as seqüências ITS, são selecionadas para detecção de uma espécie e exclusão de todas as demais. Por exemplo, diferenças na região ITS têm sido usadas para desenvolver testes baseados em PCR, para a identificação de fungos causadores de micoses na espécie humana, toxinas em amostras de

alimentos, bem como patógenos de plantas, sem o prévio isolamento do fungo. Devido as seqüências de rDNA estarem presentes em grande número de cópias no genoma, pode-se obter uma alta sensibilidade no diagnóstico via PCR (CHEN *et al.*, 2001).

Baseando-se no princípio da PCR, WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH e MC CLELLAND (1990) descreveram uma classe de marcadores moleculares, que amplificam regiões anônimas dispersas pelo genoma. Esta variação da técnica da PCR foi chamada de análise do Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic - RAPD). Nesta técnica, não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada. Ao contrário disso, utilizam-se iniciadores de seqüências arbitrárias de bases e analisam-se os produtos amplificados. A amplificação ocorrerá quando a seqüência do iniciador reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também reconhecer o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR. Os iniciadores são utilizados, um a um, para detectar diferenças entre os genótipos. A concentração de DNA genômico é a variável mais importante a ser padronizada, pois o excesso de DNA pode reduzir ou inibir significativamente a atividade de polimerização da enzima *taq* DNA polimerase devido a altas concentrações de impurezas, resultando na ausência de amplificações. Por outro lado, o DNA em concentração muito baixa pode dar origem a padrões de amplificação não reprodutíveis, podendo ocorrer acréscimo ou diminuição de fragmentos amplificados, mesmo entre repetições. Em fungos, cada iniciador de RAPD gera em média 10 segmentos amplificados com peso molecular variando de 300 a 2500 pb. Ao serem totalizados os fragmentos obtidos com os diferentes iniciadores, tem-se desta forma um grande número de locos a serem analisados. A presença de um fragmento amplificado em alguns dos genótipos comparando com a ausência desse mesmo fragmento em outros genótipos caracteriza o que se denomina de polimorfismo de RAPD (FUNGARO, 2000).

Microsatélites são seqüências curtas de até seis nucleotídeos repetidas em bloco encontradas no genoma de vários organismos. Estudos têm demonstrado que estas seqüências são relativamente instáveis, sofrendo deleções e adições de unidade de repetição em *Saccharomyces cerevisiae*,

Escherichia coli e em mamíferos (FIELD; WILLS, 1998). Este marcador molecular pode ser utilizado na própria sequência microssatélite como iniciador de amplificação do DNA, sendo este método denominado de amplificação de seqüências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats - ISSR). O polimorfismo destas regiões entre repetições mostrou ser uma excelente ferramenta de discriminação intraespecífica, tanto para isolados de *Cryptococcus neoformans* (MEYER; MITCHELL, 1995), como para isolados de *S. cerevisiae* industriais usando o trinucleotídeo (GTG)₅ (SILVA-FILHO *et al.* 2005).

A utilização de microssatélites em espécies de *Candida* para estudos epidemiológicos, tem demonstrado que estes marcadores funcionam como excelentes ferramentas para determinação intraespecífica e interespecífica, principalmente permitindo identificar diferentes padrões dentro da mesma espécie (FIELD *et al.* 1996; DALLE *et al.* 2000; BOTTEREL *et al.* 2001; SHEMER *et al.* 2001).

As leveduras constituem um grupo numeroso, diversificado de grande importância econômica. A identificação destes microrganismos é baseada em características fenotípicas, incluindo morfologia de células e provas bioquímicas. Entretanto, a reprodutividade dessas técnicas são afetadas por fatores ambientais que influenciam nas características fisiológicas destes organismos impossibilitando a discriminação intraespecífica. Diversas técnicas moleculares baseadas na análise dos fragmentos das moléculas dos ácidos nucleicos estão sendo cada vez mais utilizadas, como método alternativo para auxiliar e resolver problemas de identificação destes microrganismos. Estas técnicas moleculares têm proporcionado para a micologia um grande potencial de riqueza de caracteres, pois elas analisam o genoma independentemente do estado fisiológico da célula e são sensíveis para distinguir espécies estritamente relacionadas, além de possibilitar uma análise da variabilidade individual e/ou populacional destes fungos, contribuindo desta forma no estudo sistemático e epidemiológico de distribuição de variantes em diferentes regiões geográficas (FUNGARO, 2000; BRASILEIRO *et al.*, 2004).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PACIENTES

Foram analisados espécimens clínicos de 135 pacientes atendidos em ambulatório. Entre 100 pacientes portadores de AIDS, 50 foram atendidos no Setor de Infectologia do Hospital Dia – Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes - HUPAA/UFAL e 50 no ambulatório de Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto/UNCISAL; 35 pacientes portadores de Câncer foram atendidos no Setor de Oncologia do Hospital Universitário Dr. Alberto Antunes - HUPAA /UFAL, entre estes pacientes haviam portadores de câncer de mama, melanoma e útero, ambos em Maceió, Alagoas.

2.2 COLETA DE ESPÉCIMENS CLÍNICOS

De cada paciente foi coletada uma amostra de secreção da orofaringe, sangue e urina, totalizando 405 amostras clínicas. Para a coleta de secreção de orofaringe foram utilizados swabs esterilizados, os quais foram umedecidos em água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol na concentração de 50mg/L e em seguida acondicionados no mesmo tubo contendo água mais antibiótico. Com o auxílio de seringa descartável foram coletados 5mL de sangue e transferidos para tubos tipo Vacuntanier contendo EDTA como anticoagulante. Após as instruções devidas a urina foi coletada pelo próprio paciente. Os recipientes contendo as amostras clínicas foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-ICBS/UFAL para realização de exame direto e cultura.

2.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

2.3.1 Exame Direto

Para detecção de estruturas fúngicas através do exame direto as amostras dos diferentes espécimens clínicos foram processadas a fresco e clarificadas com solução aquosa a 30% de hidróxido de potássio.

2.3.2 Obtenção de Cultura

Para isolamento de leveduras foi utilizado o meio infusão de cérebro-coração (BHI) adicionado de 0,5% de extrato de levedura (YE) contido em tubos e ágar BHI adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placas. Para enriquecimento, 1mL de sangue foi semeado em BHI-YE e mantido a 37°C durante 72 horas. Decorrido o período de incubação, 0,5mL da cultura foi semeado no sentido radial na superfície de ágar BHI com antibiótico. Do precipitado da urina foi retirado 0,5mL e semeado por espalhamento radial na superfície de ágar BHI com antibiótico. A secreção de orofaringe foi semeada com o auxílio de swab por meio de espalhamento radial na superfície do ágar BHI com antibiótico. Todos os espécimens clínicos foram semeados em duplicata para manutenção à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e a 37°C, por um período de 48 horas até 30 dias.

2.3.3 Purificação e Identificação

Para purificação das leveduras foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada com cloranfenicol (50mg/L). Com alça em anel uma alíquota da suspensão foi semeada por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placa. As colônias OBTIDAS foram repicadas para ágar Sabouraud com extrato de levedura contido em tubos, que foram mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Para identificação das leveduras foram adotados os critérios contidos em Barnett *et al.*¹, Hoog *et al.*⁸, Kreger-van Rij¹⁰ e Loder¹⁵.

REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP – Nº 007471/2003-41

2.4 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS

2.4.1 Obtenção de Massa Celular

Foram obtidos 50 isolados de espécies de *Candida* de pacientes portadores de AIDS e de portadores Câncer; também foram analisadas 9 amostras de leveduras cedidas pela Coleção de Culturas – URM/UFPE: *C. albicans* URM – 4126, URM– 4968, URM – 4385; *C. guilliermondii* URM – 4975, URM – 4819; *C. parapsilosis* URM – 4261, URM – 4984; *C. tropicalis*

URM – 4977, URM – 4262. As amostras de levedura foram inoculadas em meio líquido YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) e incubadas a 30°C por 16 horas a 150rpm, em mesa agitadora termostatizada.

2.4.2 Extração do DNA Nuclear

Após o período de incubação foi retirado 1,0mL da amostra e transferido para microtubos esterilizados de 1,5mL e centrifugado por três minutos a 5.900g. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 600µL de solução de lise, mantidos a 65°C em banho-maria por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Posteriormente foram adicionados fenol/clorofórmio (1:1) e após breve agitação as suspensões foram centrifugadas a 15.400g por 10 minutos. Foram transferidos 500µL da fase superior para novos microtubos 1,5mL esterilizados e adicionados 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotação, e 400µL da fase superior foram transferidos para novos microtubos de 1,5mL esterilizados. A estes tubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA. Após a precipitação, por centrifugação a 15.400g por 10 minutos o DNA foi retirado, o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado em etanol a 70% por duas vezes, secado em estufa a 37°C por 30 minutos e em seguida ressuspenso em tampão TE pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) e mantido a -20°C.

2.4.3 Quantificação de DNA

Após descongelamento, as amostra de DNA forma diluídas com água miliq a 1:200µL; em seguida a quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm. Para o cálculo da concentração de DNA foi utilizada a relação 1 DO = 50µg/mL (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.4.4 Amplificação do DNA Nuclear

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Iniciadores usados para amplificar segmentos de DNA de espécies de *Candida*.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	MARCADOR	
		MOLECULAR	REFERÊNCIA
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeldt <i>et al.</i> 1970
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	rDNA	White <i>et al.</i> 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	rDNA	White <i>et al.</i> 1990
CALB 1	TTTATCAACTTGTCACACCA	rDNA	Luo & Mitchell 2002
CALB 2	ATCCCGCCTTACCACTACCG	rDNA	Luo & Mitchell 2002

2.4.5 Região ITS do DNA Ribossomal

A reação de amplificação da região ITS do DNA ribossomal por PCR foi realizada em 25µL de volume final utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, em termociclador HIBAIID de acordo com o protocolo da Tabela 2. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial de seis minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese e fotografados nas mesmas condições do item anterior.

2.4.6 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

A reação de amplificação de seqüências simples entre repetições (ISSR) por PCR com o iniciador (GTG)₅ foi realizada em 25µL de volume final utilizando-se um termociclador HIBAIID, de acordo com protocolo da Tabela 3. A amplificação com o iniciador (GTG)₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de cinco minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3% submetidos a 7,5 volts/cm entre os eletrodos por 150 minutos em tampão TBE

0,5X, corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema de fotodocumentação (DOC Print Vilber Loumart).

TABELA 2. Protocolo de reação para amplificação da região ITS do rDNA com os iniciadores ITS4 e ITS5.

COPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	VOLUME NA REAÇÃO (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água destilada esterilizada		13,35	
Tampão PCR	10X	2,5	1X
BSA (soro albumina bovina)	0,25μg/μL	2,5	0,025μg/μL
Mistura de dNTPs	2,0mM	2,5	0,2mM
Iniciador ITS4	12,5pmoles/μL	1,0	0,5pmoles/μL
Iniciador ITS5	12,5pmoles/μL	1,0	0,5pmoles/μL
MgCl ₂	50mM	1,50	3,0mmoles/μL
Taq Polimerase	5U/μL	0,40	0,05U/μL
DNA	50,0ng/μL	1,0	2,0ng/μL

TABELA 3. Protocolo de reação para amplificação de ISSR por PCR com o iniciador (GTG)₅.

COPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	VOLUME NA REAÇÃO (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água destilada esterilizada		9,75	
Tampão PCR	10X	2,50	1X
BSA (soro albumina bovina)	0,25μg/μL	2,50	0,025μg/μL
Mistura de dNTP	2,0mM	2,50	0,2mM
Iniciador	1,0pmol/μL	5,00	0,2pmoles/μL
MgCl ₂	50mM	1,50	3,0mM
Taq Polimerase	5U/μL	0,25	0,05U/μL
DNA	50,0ng/μL	1,00	2,0ng/μL

2.4.7 Amplificação com iniciadores CALB1 e CALB2

A reação de amplificação por PCR com os iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2 foi realizada em 20µL de volume final utilizando-se um termociclador HIBRID de acordo com o protocolo da Tabela 4. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial de cinco minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos para desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese visualizados em condições iguais às descritas para o iniciador ITS.

TABELA 4. Protocolo de reação para amplificação com iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	VOLUME NA REAÇÃO (µL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água destilada esterilizada		8,15	
Tampão PCR	10X	2,50	1X
BSA (Albumina de soro Bovino)	0,25µg/µL	2,50	0,025µg/µL
Mistura de dNTPs*	2.0mM	2,50	0,2mM
Iniciador CALB1	12,5pmol	1,25	0,5pmoles/µL
Iniciador CALB2	12,5pmol	1,25	0,5pmoles/µL
MgCl ₂	50mM	1,50	3,0mmoles/µL
<i>Taq</i> polimerase	5U/µL	0,10	0,05U/µL
DNA	50,0ng/µL	1,00	2,0ng/µL

2.4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos das amplificações com marcadores (GTG)₅ foram analisadas pelo programa Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs – NTSYS – PC 2.1 (BUSSAD *et al.*, 1990; CRUZ; REGAZZI, 1994; ROHLF, 2002). Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias,

nas quais o número 1 (um) significa a presença da banda e o número 0 (zero) a ausência da banda. A partir das bandas no gel, o programa constrói uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade Simple Matching (SM) calculado de acordo com a fórmula:

$$SM = \frac{(a + d)}{(a+b+c+d)}$$

Onde: SM = coeficiente de similaridade Simple Matching

a = número coincidências positivas

b e c = número de não-coincidências

d = número coincidências negativas

A partir da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre, J. M.; Verdugo, F.; Zamacoma, J. M.; *et al.* Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. *Gerodontology*, 13: 63-67, 1996.
2. Arendorf, T.; Walker, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch. Oral Biol.*, 25: 1-10, 1980.
3. Azulay, M.M.; Oliveira, M.A.L.S.; Assis, T.L.; *et al.* Micoses oportunistas na síndrome de imunodeficiência adquirida. *An. Bras. Dermatol.*, 64: 253-255, 1989.
4. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: characteristic and identification*. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002p.
5. Barret, A. W.; Kingsmill, V., J.; Speight, P. M. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis.*, 4: 26-31, 1998.
6. Barret-Bee, K.; Hayes, Y.; Wieson, R. O. *et al.* A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1217-1221, 1985.
7. Benham, R.W. Certain monilias parasitic on man. Their identification by morphology and by agglutination. *J. infect. Dis.*, 49: 183-215, 1931.

8. Bergendal, T.; Holberg, K.; Nord, C. E. Yeast colonization in the oral cavity and feces in patients with denture stomatitis. *Acta Odontol. Scand.*, 37: 37-45, 1979.
9. Bittencourt, R.; Scaletzky, A.; Boehl, J. A. R. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. *Rev. Bras. Cancerol.* 50: 95-101. 2004.
10. Bodey, G. P.; Bueltmann, B.; Duguid, W.; *et al.* Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:99-109. 1992.
11. Botterel, F.; Desterke, C.; Costa, C.; *et al.* Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4076-4081, 2001.
12. Branchini, M.L. *Principais infecções fúngicas no paciente com infecção pelo HIV*. Paciente em foco, 2002.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças./ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 56p.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de política de Saúde. Coordenação Nacional DST e AIDS. *Boletim epidemiológico AIDS [on line]*. Brasília: dezembro 2005. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/udtv/boletim.html>> Acesso em 28 de agosto de 2006.
15. Brasileiro, B. T. R. V. *Variabilidade genética em isolados de Fusarium solani detectada com a utilização de marcadores moleculares*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 91p. 2003.
16. Brasileiro, B. T. R. V.; Coimbra, M. R. M.; Moraes Junior, M.; Oliveira, N. T. Genetic variability within fusarium solani specie as revealed by dna fingerprinting based on pcr markers. *Bras. J. Microbiol.*, 35: 205-210, 2004.
17. Bunetel, L.; Bonnaure-Mallet, M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy: update on development mechanisms. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, 82: 161-165, 1996.
18. Budtz-Jørgensen, E. Histopathotology, immunology, and sorology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidiasis. *Acta. Odontol. Scand.*, 48: 37-43, 1990.

19. Bussad, W. O.; Miazaki, E. S.; Andrade, D. F. *Introdução à análise de agrupamentos*. Associação Brasileira de Estatística. 105p. 1990.
20. Challacombe, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 78: 202-210, 1994.
21. Chen, Y. C.; Eisner, J. D.; Kattan, M.M.; *et al.* Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. clin. microbiol.* 38: 2302-2310, 2001.
22. Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36:599-607, 2003.
23. Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Imprensa Universitária, 1994. 390 p.
24. Dalle, F.; Franco, N.; Lopez, J.; *et al.* Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin. Microbiol.* 38:4554-4559, 2000.
25. Dolande, M.; Reviákina, V.; Panizo, M. *et al.* Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas en pacientes con SIDA (1997-2001). *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 22: 51-56, 2002.
26. Dorocka-Bobkowska, B.; Budtz-Jørgensen, E.; Wloch, S. Noninsulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.*, 25: 411-415, 1996.
27. Eyesson, J.D.; Tenant-Flowers, M. T.; Cooper, D. J. *et al.* Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly anti-retroviral therapy (HAART) in South London. *J. Oral Pathol. Med.*, 31:169-174, 2002.
28. Epstein, J. B., Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 69: 32-41, 1990.
29. Esteve- Zarzoso, B.; Bellhoch, C.; Uruburu, F.; *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S r RNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Inter. J. System. Bacteriol.* 49:392-337, 1999.
30. Field, D; Wills, C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1647-1652, 1998.

31. _____; Eggert, L.; Metzgar, D.; *et al.* Use of microsatellite polymorphism short and clustered coding-region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 15:73-79, 1996.
32. Fotos, P. G.; Hellstein, J. W.; Vincent, S. D. Oral candidosis revisited. *Gen. Dent.*, 39: 422-430, 1991.
33. _____; _____; _____. Oral candidosis: clinical, historical and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 74: 41-49, 1992.
34. Franker, C. K.; Lucartorto, F. M.; Jonson, B. S.; *et al.* Characterization of the microflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 69: 683-687, 1990.
35. Fungaro, M. H. P.; *Uso do RAPD na taxonomia*. Anais do IX Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul. Caxias do Sul. 74p. 1995.
36. _____. *PCR na micologia: Diagnóstico e análise de variabilidade*. Biotecnologia Ciências e desenvolvimento. ano III, nº 14. 2000.
37. Gottfredsson, M.; Cox, G. M.; Perfect, J. R. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathol.* 30: 405-418, 1998.
38. Grattapaglia, D.; Ferreira, M. E. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª edição. Brasileira: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.
39. Greenspan, D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 78: 211-215, 1994.
40. Guimarães, M. D. C. Temporal trends in AIDS-associated opportunistic infections in Brazil, 1980-1999. *Cad. Saúde Pública*, 16: 21-36, 2000.
41. Heimdahl, A.; Nord, C. E. Oral yeasts infections in immunocompromised and seriously diseased patients. *Acta Odontol. Scand.*, 48: 77-84, 1990.
42. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gené, J.; *et al.* *J. Atlas of clinical fungi*. CBS: Spain. 2000. 1126p.
43. Jorge, A. O. C.; Totti, M. A. G.; Almeida, O. P.; *et al.* Effects of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouth of rates. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, 22: 138-140, 1993.
44. Kindelan, S. A.; Yeoman, C. M.; Douglas, C. W. I.; *et al.* A comparison of intraoral *Candida* carriage in Sjögren's syndrome patients with healthy

xerostomic controls. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 85: 162-167, 1998.

45. Kimura, L. H.; Pearsal, N. N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immunol.*, 28: 464-468, 1980.

46. Kreger-van Rij, N. J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. Pp: 585-844.

47. Koga-Ito, C. Y. *Correlação entre presença de estreptococos do grupo mutans e grupo Candida com níveis de IgA na saliva humana*. Piracicaba, 1997. 154p. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buço-Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

48. Kwon-Chung, K. J.; Bennett, J. E. *Medical Mycology*. Part IV. Subcutaneous and Deep Mycoses. Chapter 13. Candidiasis. Lea & Febiger: Philadelphia, p. 280-336. 1992.

49. Krogh, P. Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 63: 48-54, 1987.

50. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E.; Heins-Vaccari, E. M. et al. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104p.

51. _____; Machado, C. M. *Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea*. São Paulo: BYK. 2000. 272p.

52. Lickfeldt, E.; Meyer, W.; Borner, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PVR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.*, 33:413-426, 1993.

53. Lodder, J. *The Yest: a taxonomic study*. Oxford: North Holland Publishing, 1970.

54. Luo, G.; Mithell, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40:2860-2865, 2002.

55. Lynch, D. P. Oral candidiasis. History, classification and clinical presentation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 78: 189-193, 1994.

56. Mattos, S. L.; Santos, V. R.; Ferreira, E. F. Prevalência de lesões de mucosa bucal em pacientes HIV-positivos da unidade de referência especializada em doenças infecciosas e parasitárias especiais-URE-DIPE (Belém-Pará). *Ver. Bras. Patol. Oral*. 3:7-16, 2004.

57. Meyer, W.; Mitchell T. G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA

sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16: 1648-1656, 1995.

58. Mitchell, T. G.; Sandin, R. L.; Bowman, B.H.; et al. Molecular micology. DNA probes and applications of PCR technology. *J. Med. Vet. Micol.* 32:351-366, 1994.

59. Nazzal, D.; Yasin, S.; Abu-Elteen, K. A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. *New Microbiol.* 28: 245-250, 2005.

60. Newton, C.R.; Grahan, A. *Polymerase Chain reaction*. 2. ed. 1997.192p.

61. Nucci, M.; Silveira, M. I.; Spector, N. et al. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. *Mycopathol.*, 141:65-68 , 1998.

62. _____; Schechter, M.; Spector, N.; et al. Antibiotic regimen as an independent risk factor for disseminated fungal infections in neutropenic patients in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 107-110, 1995.

63. Oksala, E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.*, 48: 71-74, 1990.

64. Oliveira, N. M. C. *Vigilância de colonização por fungos filamentosos em cavidade nasal de pacientes oncológicos pediátricos durante episódios de neutropenia*. Piracicaba, 1997. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

65. Olsen, I.; Stenderup, A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.*, 48:11-18, 1990.

66. Pedersen, A.; Rindun, J. L.; Reibel, J.; et al. Carcinoma *in situ* and carcinoma in patients with chronic oral candidiasis. *Tandlaegebladet*, 93:509-513, 1989.

67. Pires, F. R. características clínicas de pacientes edêntulos e presença de candidíase na saliva antes e seis meses a confecção de novas próteses totais. Piracicaba, 1999. p.139. Dissertação (Mestrado em Biologia e Patologia Buço-Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

68. Philip, C. F. Saliva and salivary gland alterations in HIV infections. *J. Am. Dent. Assoc.*, 122: 122-146, 1991.

69. Porro, A.M.; Yoshioka, M.C.N. Manifestações dermatológicas da infecção pelo HIV. *An. Bras. Dermatol.*, 75: 655-697, 2000.
70. Ranjedran, C.; Basu, T. K.; Baby, A.; *et al.* Incidence and significance of opportunistic fungi in leukemia patients in India. *Mycopathologia*. 119: 83-87. 1992.
71. Reichl, R. B. Oral candidiasis: an old disease of growing concern. *Gen. Dent.*, 38: 114-120, 1990.
72. Reiss, E., K.; Tanaka, G.; Bruker, V.; *et al.* Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol.*, 36: 249–257, 1998.
73. Rohlf, F. J. *NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.0*. Nova York: Exeter Software, 2002.
74. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2ª Edição. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York. 1989.
75. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; *et al.* Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491, 1998.
76. Sangeorzan, J. A.; Bradley, S. F.; He, X.; *et al.* Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergency of fluconazole resistance. *Am. J. Med.*, 97: 339-346, 1994.
77. Santo, A. H.; Pinheiro, C. E.; Jordani, M. S. Causas básicas e associadas de morte por Aids, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. S. Pub.*, 34: 581-588, 2000.
78. Saramanayake, L. P.; Hughes, A.; Weetman, D. A.; *et al.* Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J. Oral Pathol.*, 15: 251-254, 1986.
79. Shemer, R.; Weissman, Z.; Hashman, N.; *et al.* A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. *Microbiol.* 147: 2021-2028, 2001.
80. Silva-Filho, E. A. Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 108p.

81. Silva-Filho, E. A.; Santos, S. K. B.; Resende, A. M.; et al. D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* ., 88: 13-23, 2005.
82. Silveira, A. C. B. *Taxonomia, características de patogenicidade e variabilidade genética de espécies de Malassezia*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 2004. 112p.
83. Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia médica: À luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2004. 388p.
84. Spolidorio, D. M. P.; Spolidorio, L. C.; Barbeiro, R. H.; et al. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida sp* e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. *Pesqui Odontol Bras*, 15: 354-358, 2001.
85. Stenderup, A. Oral mycology. *Acta Odontol. Scand.*, 48: 3-10, 1990.
86. Sullivan, D. J.; Henman, M. C.; Moran, G. P.; et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J. Med. Microbiol.*, 44: 399-408, 1996.
87. Teanpaisan, R.; Nittayananta, W. Prevalence of *Candida* species in AIDS patients and HIV-free subjects in Thailand. *J. Oral Pathol. Med.*, 27: 4-7, 1998.
88. Tortora, J. T.; Funke, B. R.; Case, C. L. *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 920p.
89. Umazume, M.; Ueta, E.; Osaki, T. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 432-439, 1995.
90. Vidotto, V. *Manual de micologia médica*. Tecmedd: São Paulo. 204p. 2004.
91. Wahlin, Y. B. Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 71: 689-695, 1991.
92. Walsh T. J.; S. J. Chanock. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 18:101–153, 1998.
93. Welsh, J.; McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Ac. Res.*, 18: 7213-7218, 1990.
94. White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M. A.;

Gelfand, D. H.; Sninsk, J. J.; White, T. J. (ED), PCR Protocols, a guide to methods and applications. *New York. Academic Press*. 1990. p. 315-322.

95. Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.*, 18: 6531-6535, 1990.

96. Wilson, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br. Dent. J.*, 185: 380-384, 1998.

97. Wray, D.; Felix, D. H.; Cumming, C. G. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *Br. Dent. J.*, 168: 326-329, 1990.

98. Zegarelli, D. J. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, 26: 1069-1089, 1993.

4. ARTIGOS

4.1 *CANDIDA* SPP ISOLADAS DE SECREÇÃO DE OROFARINGE DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS ATENDIDOS EM HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL

ARTIGO SUBMETIDO A:

**BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
SÃO PAULO/BRASIL**

**CANDIDA SPP ISOLADAS DE SECREÇÃO DE OROFARINGE DE
PACIENTES PORTADORES DE AIDS ATENDIDOS EM
HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

***Maria Anilda dos Santos Araújo^{1, 2}**; Elvira Maria Bezerra de
Alencar¹; Kátia Simone dos Santos²; Aryanna Kelly Pinheiro Souza²;
Euripedes Alves da Silva Filho³; Lusinete Aciole de Queiroz¹

1. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia

2. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Setor de Botânica

3. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Setor de Biologia

*Autor para correspondência: Rua: Conselheiro Francisco Vieira, 23, Prado, Maceió-
AL, CEP 57010-230. Fone: (82) 3376-9236. Email: anildaraujo@ibest.com.br

**CANDIDA SPP ISOLADAS DA SECREÇÃO DE OROFARINGE
DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS ATENDIDOS EM
HOSPITAIS-ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

RESUMO

Foi realizada a detecção de espécies de *Candida* na secreção de orofaringe de pacientes portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió-Alagoas, Brasil. De pacientes atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/HUPAAUFAL e Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto, foram coletadas amostras de secreção da orofaringe, as quais foram processadas para exame direto e cultura. Após isolamento, as leveduras foram purificadas e identificadas. Entre 100 pacientes analisados, foram isolados leveduras de 29%, dos quais 16 (55%) foram de pacientes atendidos no Setor de Infectologia do Hospital Dia-HUPAA/UFAL e 13 (45%) de pacientes atendidos no Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto/UNCISAL. Em relação à ocorrência de espécies de *Candida*, verificou-se maior expressão de *C. albicans*, representando 31% dos casos, seguida de *C. guilliermondii* (27,5%), *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (17,3%), e *C. tropicalis* (6,9%).

Palavras chave: *Candida* spp, secreção de orofaringe e AIDS.

**CANDIDA SPP ISOLATED FROM THE OROPHARYGEAL
SECRETION OF PATIENT BEARERS OF AIDS ASSISTED IN
SCHOOL HOSPITALS OF MACEIÓ, ALAGOAS, BRAZIL.**

ABSTRACT

It was accomplished the detection of species of *Candida* in the oropharygeal secretion of patient bearers of AIDS assisted in school hospitals of Maceió-Alagoas, Brazil. From patients assisted in the Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes/HUPAAUFAL and Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto, samples of secretion from the oropharygeal were collected which were processed for direct exam and culture. After isolation, the yeasts were purified and identified. Among 100 analyzed patients, yeasts were isolated of 29%, of which 16 (55%) were obtained from patients assisted in the infectology section of the Hospital DIA-HUPAA/UFAL and 13 (45%) from patients assisted in the Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto/UNCISAL. Related to the occurrence of isolated *Candida*'s species, it was verified larger expression of *Candida albicans*, representing 31% of the cases, followed by *C. guilliermondii* (27,5%), *C. glabrata* and *C. parapsilosis* (17,3%), and *C. tropicalis* (6,9%).

key words: *Candida* spp, Oropharygeal Secretion, AIDS.

INTRODUÇÃO

Entre as infecções oportunistas, as causadas por fungos, estão entre as principais doenças observadas em pacientes com AIDS, as mais comuns são candidíase, criptococose, histoplasmoses, aspergilose, paracoccidioomicose, entre outras^{14, 23, 25, 29}.

Candidíases são as infecções micóticas mais frequentes e podem acometer qualquer tecido, órgão ou sistema. Esta infecção pode ser considerada como um indicador da AIDS, e como um importante componente para o diagnóstico precoce e análise da progressão da infecção pelo HIV^{1, 3, 4, 8, 17, 18}.

De acordo com Fridkin e Jarvis⁷, Jarvis⁹, Wingard³¹ o registro de infecções causadas por *Candida albicans* tem diminuído relativamente devido a incidência de infecções causadas por outras espécies incluindo *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. Krusei*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. novergensis*, *C. rugosa*, *C. utilis* e *C. zelandensis* também tem sido mencionadas^{5, 28}.

A recorrência de candidíase oral está relacionada ao tratamento periódico que se faz necessário nos pacientes imunocomprometidos, porém o uso prolongado de antibióticos e drogas antifúngicas tanto no tratamento quanto na profilaxia tem resultado na resistência de *C. albicans*, assim como no surgimento de outras espécies de *Candida*^{6, 21}.

Este estudo teve como objetivo detectar a ocorrência de espécies de *Candida* da secreção de orofaringe de pacientes portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES

Foram analisados espécimens clínicos de 100 pacientes atendidos em ambulatório, sendo 50 atendidos no Setor de Infectologia do Hospital Dia – Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes - HUPAA/UFAL e 50 no ambulatório de Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto/UNCISAL, Maceió, Alagoas, Brasil.

COLETA DE ESPÉCIMENS CLÍNICOS

De cada paciente foi coletada uma amostra de secreção da orofaringe, com o auxílio de swabs esterilizados umedecidos em 2mL de água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol contida em tubo. Os recipientes com as amostras clínicas foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-ICBS/UFAL para realização de exame direto e cultura.

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Exame Direto

Para detecção de estruturas fúngicas através do exame direto as amostras dos diferentes espécimens clínicos foram processadas a fresco e clarificadas com solução aquosa a 30% de hidróxido de potássio.

Obtenção de Cultura

As amostras de secreção da orofaringe foram semeadas com o auxílio de swab por espalhamento radial na superfície do meio ágar infusão de cérebro-coração (BHI) contido em placa, adicionado de 50mg/L de

cloranfenicol. Foram semeadas em duplicata e mantidas a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e a 37°C , por um período de 48 horas até 7 dias.

Purificação e Identificação

Para purificação das leveduras foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada com cloranfenicol (50mg/L). Com alça em anel uma alíquota da suspensão foi semeada por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placa. As colônias isoladas foram repicadas para ágar Sabouraud com extrato de levedura contido em tubos e foram mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Para identificação das leveduras foram adotados os critérios de Barnett *et al.*², Hoog *et al.*¹¹, Kreger-van Rij¹² e Lodder¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 100 pacientes portadores de AIDS analisados, em 29% foi observada a ocorrência de leveduras. Os pacientes apresentavam carga viral e nível de CD4 controlados, por estarem sendo submetidos a tratamentos com antiretrovirais e drogas antifúngicas Segundo Mattos *et al.*¹⁸ que verificaram a prevalência de lesões de mucosa bucal em 22% dos pacientes HIV-positivos e associaram essas lesões a candidíase pseudomembranosa, sendo a mais freqüente acometendo 6,3% dos pacientes. Os autores ressaltam que no curso da infecção pelo HIV, a imunossupressão resultante da infecção crônica pelo vírus, culmina com o surgimento de infecções oportunistas e algumas neoplasias.

Em relação aos pacientes atendidos nos dois hospitais, verificou-se a presença de espécies de *Candida* na secreção de orofaringe de 16 (55%) dos pacientes atendidos no Setor de Infectologia do Hospital Dia-HUPAA/UFAL

e de 13 (45%) dos pacientes atendidos no Hospital-Escola Dr. Hélió Auto/UNCISAL. Foi positivo o exame direto da secreção de orofaringe de todos os pacientes com manifestações clínicas características de candidíase. Neves *et al.*²⁰ observaram a ocorrência de 95,8% das amostras de secreção de orofaringe de pacientes com AIDS. Lima *et al.*¹⁵ destacam a secreção de orofaringe como o espécimen clínico que se detecta o isolamento de leveduras, principalmente espécies de *Candida*.

Em relação a prevalência de espécies de *Candida* nos portadores de AIDS nos dois hospitais, verificou-se que nos pacientes atendidos do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes as espécies de maior ocorrência foram *C. albicans* e *C. parapsilosis* com 5 isolados de cada espécie, seguida de 3 amostras *C. guilliermondii*, 2 de *C. glabrata* e 1 de *C. tropicalis*. Nos pacientes do Hospital-Escola Dr. Hélió Auto, *C. albicans* também foi a espécie de maior ocorrência com 4 isolados, seguida de 5 amostras de *C. guilliermondii*, 3 de *C. glabrata* e 1 *C. tropicalis*. *C. parapsilosis* não foi isolada de pacientes deste hospital (Tabela 1). Segundo Gomides *et al.*⁸, Hernández-Hernández *et al.*¹⁰, Lacaz *et al.*¹³, Saballs *et al.*²⁴, Sidrim e Rocha²⁶, Vidotto³⁰ estas espécies são as mais encontradas na secreção de orofaringe de pacientes imunocomprometidos.

Candida albicans foi a espécie de maior ocorrência na secreção de orofaringe, representando 31% dos casos positivos, seguida de 27,5% de *C. guilliermondii*, 17,3% de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis* com 6,9% (Figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Lacaz *et al.*¹³, Sidrim e Rocha²⁶, Silva *et al.*²⁷, Vidotto³⁰, com relação a maior ocorrência de *C. albicans* da secreção de orofaringe. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*

também foram assinaladas pelos autores causando infecções fúngicas em pacientes com AIDS.

O surgimento de outras leveduras em espécimens clínicos diferentes, bem como de espécies *Candida* tem sido demonstrados por alguns autores. Neves *et al.*²⁰ na secreção de orofaringe isolaram *C. albicans* (86,1%), seguida de *C. tropicalis* (5,5%), *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (2,7%), *C. krusei* e *Trichosporon pupillans* (1,4%). Matsumoto *et al.*¹⁹ isolaram em sangue e cateter, as espécies *C. parapsilosis* (35%), seguido de *C. albicans* (20%), *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (8,75%) e Oliveira *et al.*²² isolaram da urina, as espécies *C. tropicalis* (53%), seguida de *C. albicans* (36%)²².

Considerando a literatura especializada de identificação de leveduras, foram observadas variações nas características macro e microscópicas de alguns isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* (Figura 2, 3, 4, 5, 6)^{2, 11, 12, 16}.

TABELA 1. Espécies de *Candida* isoladas de secreção da orofaringe de pacientes portadores de AIDS atendidos em dois Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, Brasil.

ESPÉCIES	SECREÇÃO DE OROFARINGE/ PACIENTES COM AIDS		
	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO	HOSPITAL-ESCOLA Dr.	TOTAL
	Prof. ALBERTO ANTUNES	HÉLVIO AUTO	
<i>C. albicans</i>	5	4	09
<i>C. guilhermondii</i>	3	5	08
<i>C. glabrata</i>	2	3	05
<i>C. parapsilosis</i>	5	0	05
<i>C. tropicalis</i>	1	1	02
TOTAL	16	13	29

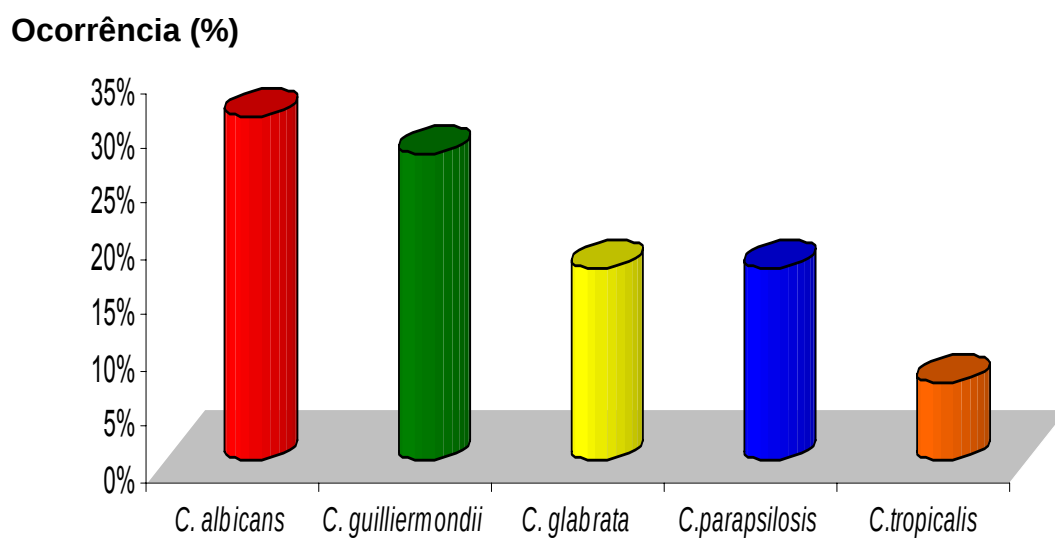


FIGURA 1. Ocorrência de espécies de *Candida* isoladas da secreção de orofaringe de pacientes portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas.

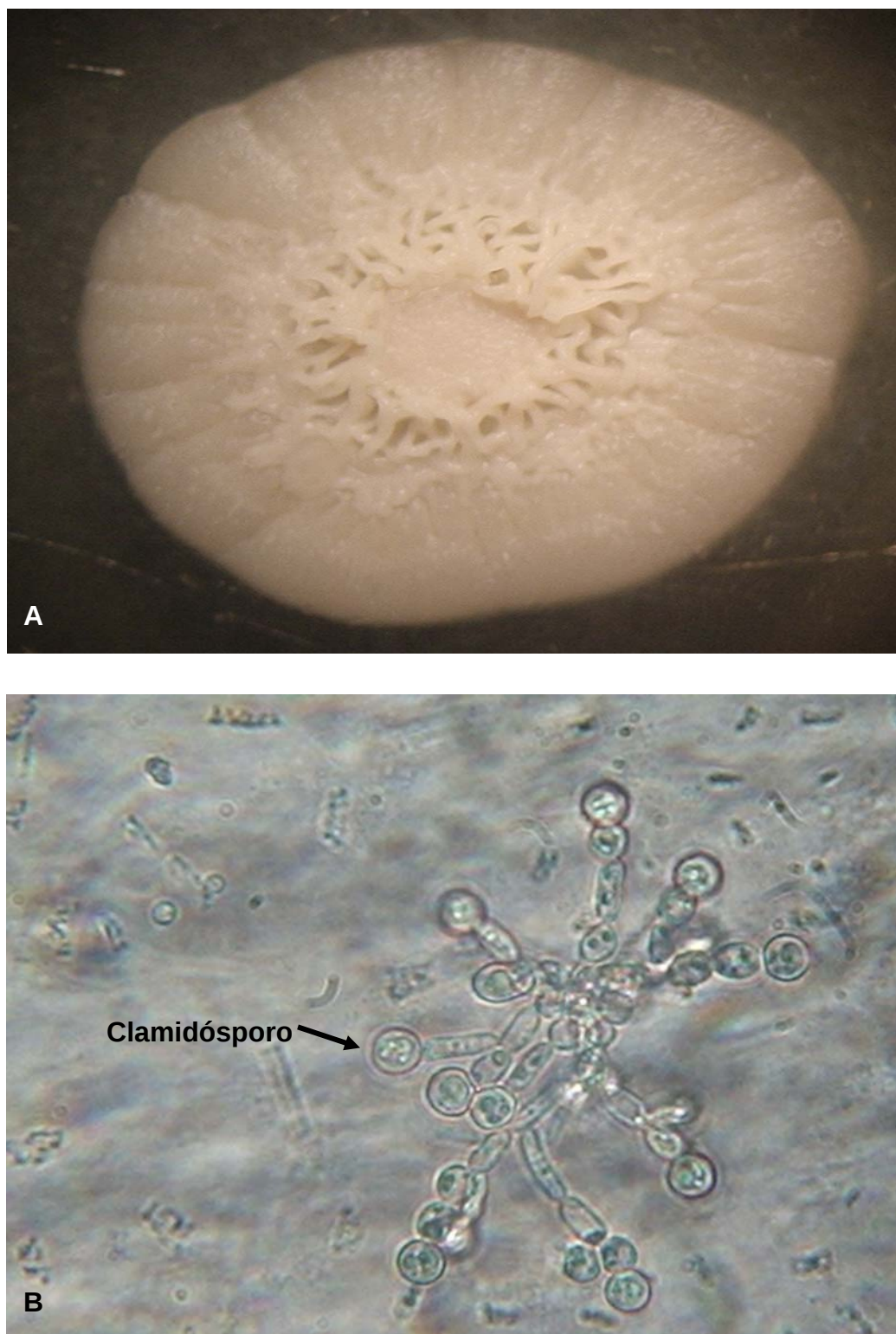


FIGURA 2. *Candida albicans*: **A**, aspectos macroscópicos; **B**, aspectos microscópicos (400X).

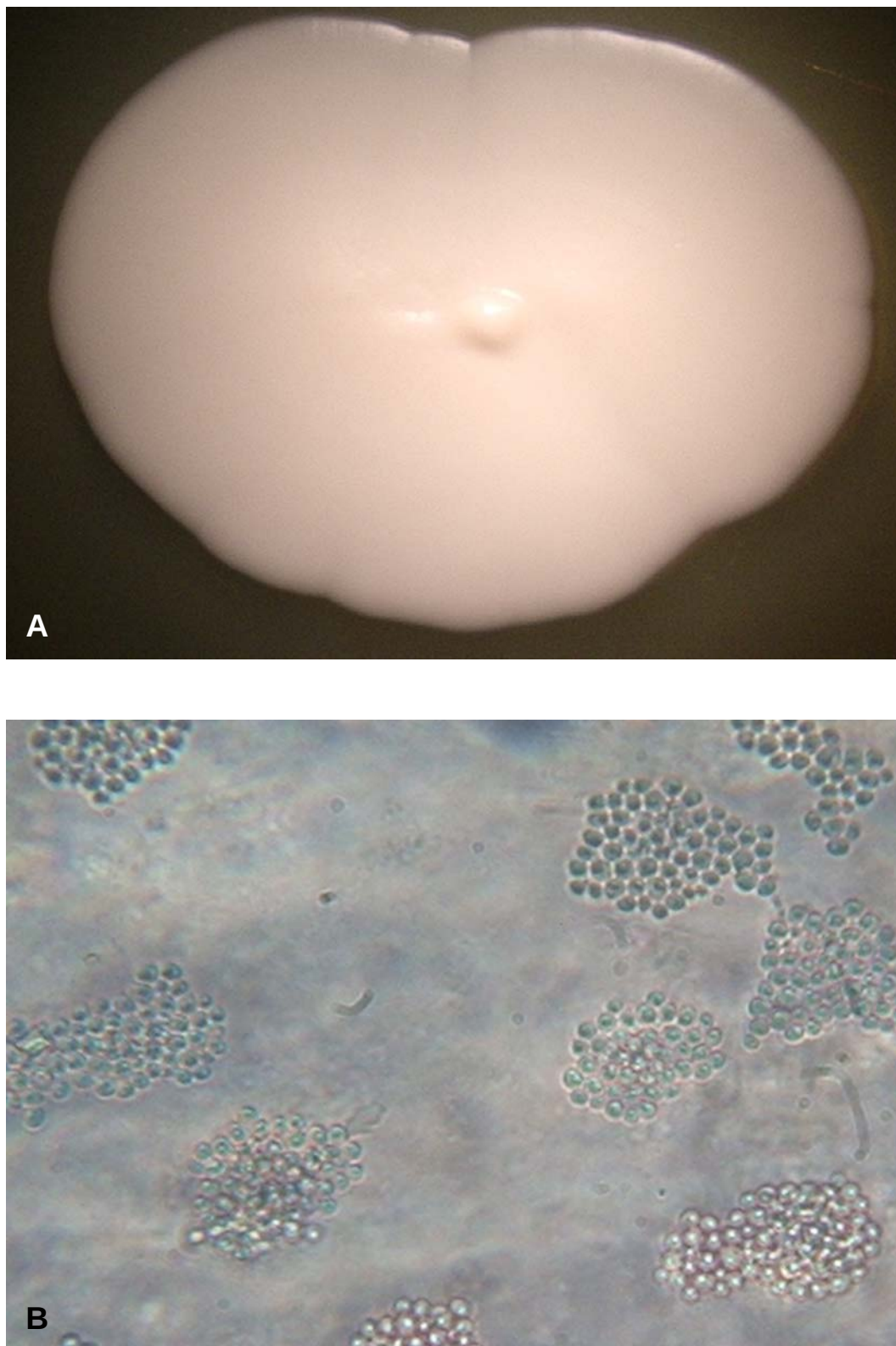


FIGURA 3. *Candida glabrata*: **A**, aspectos macroscópicos; **B**, aspectos microscópicos (400X).

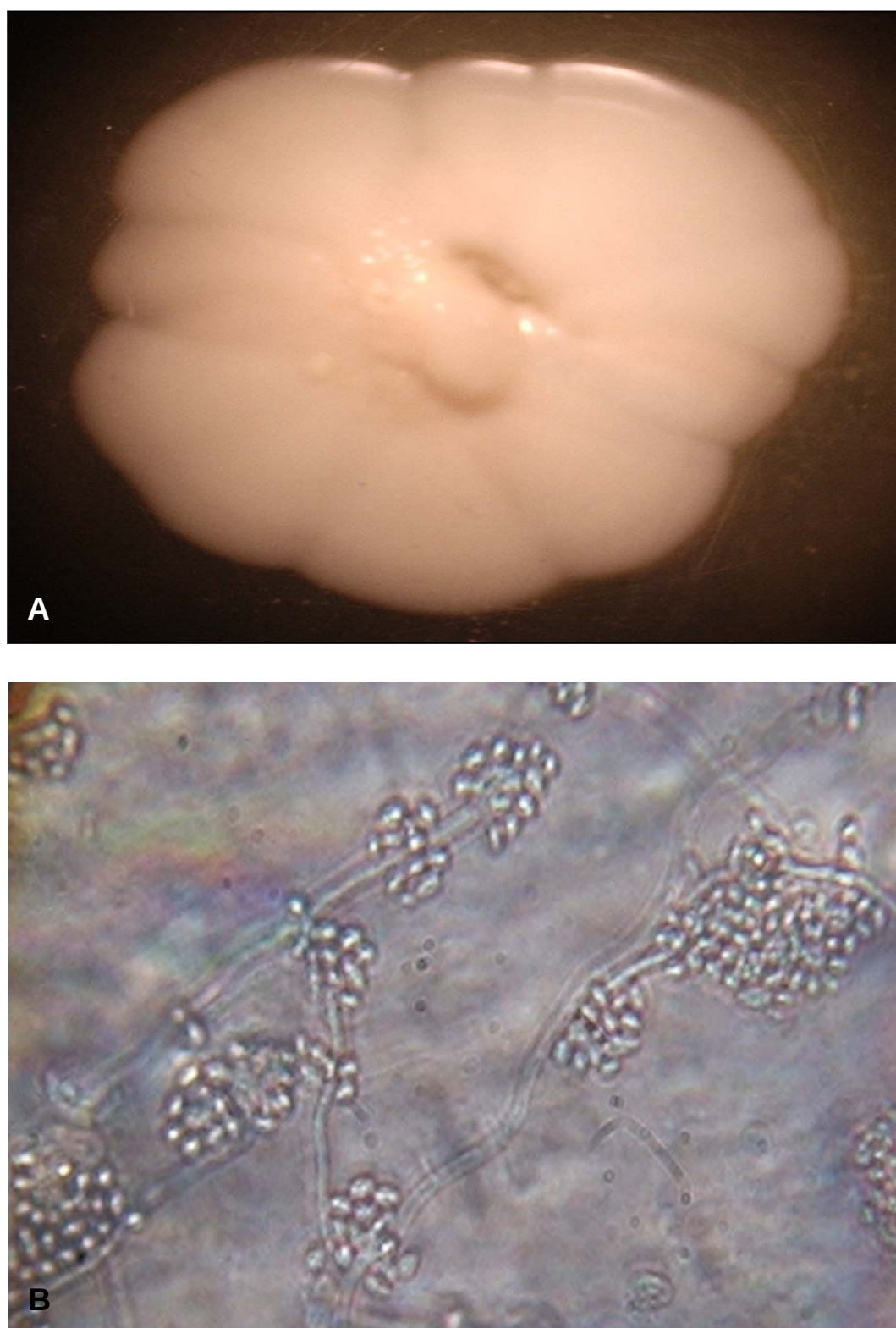


FIGURA 4. *Candida guilliermondii*: **A**, aspectos macroscópicos; **B**, aspectos microscópicos (400X).

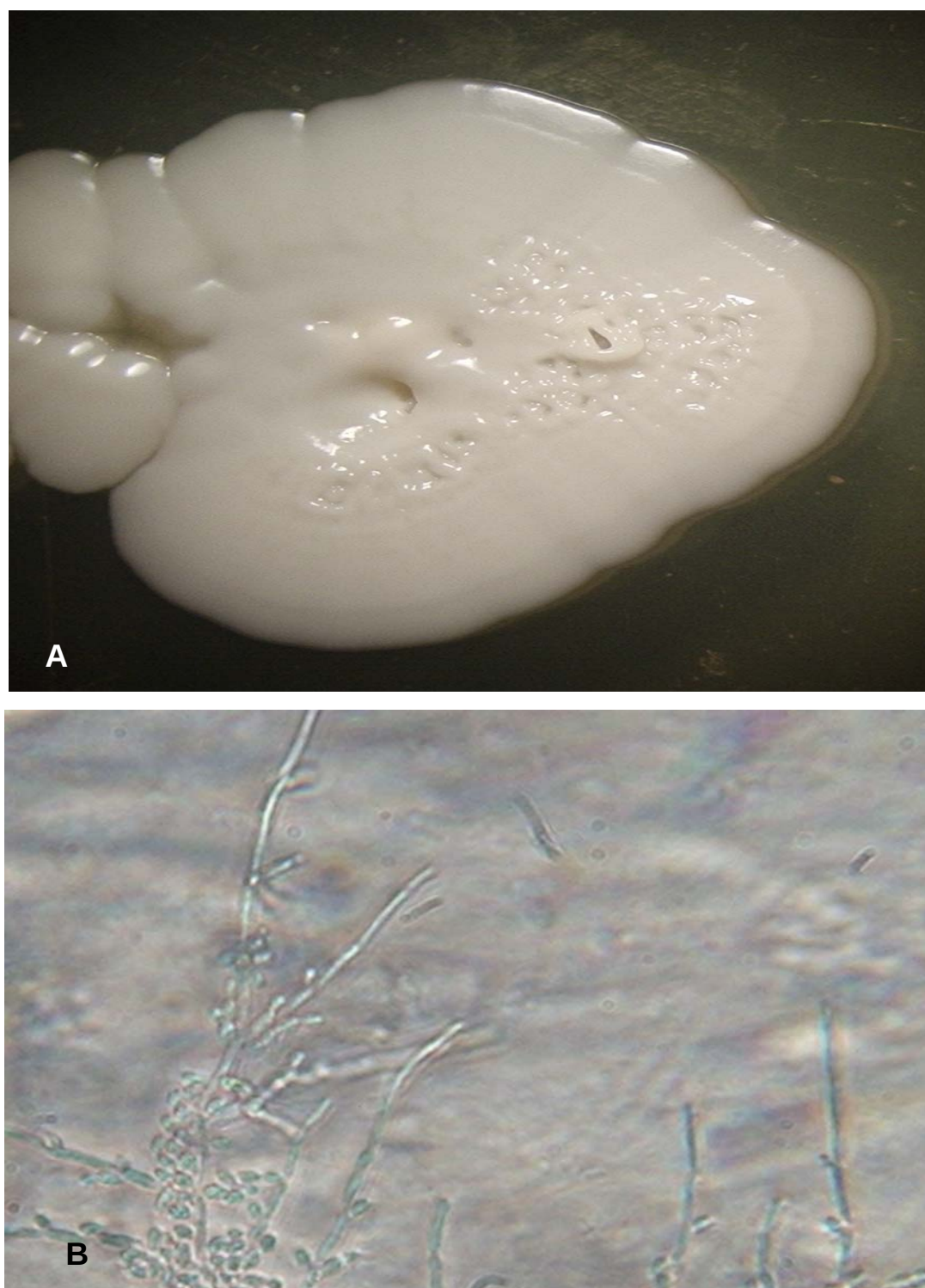


FIGURA 5. *Candida parapsilosis*: **A**, aspectos macroscópicos; **B**, aspectos microscópicos (400X).

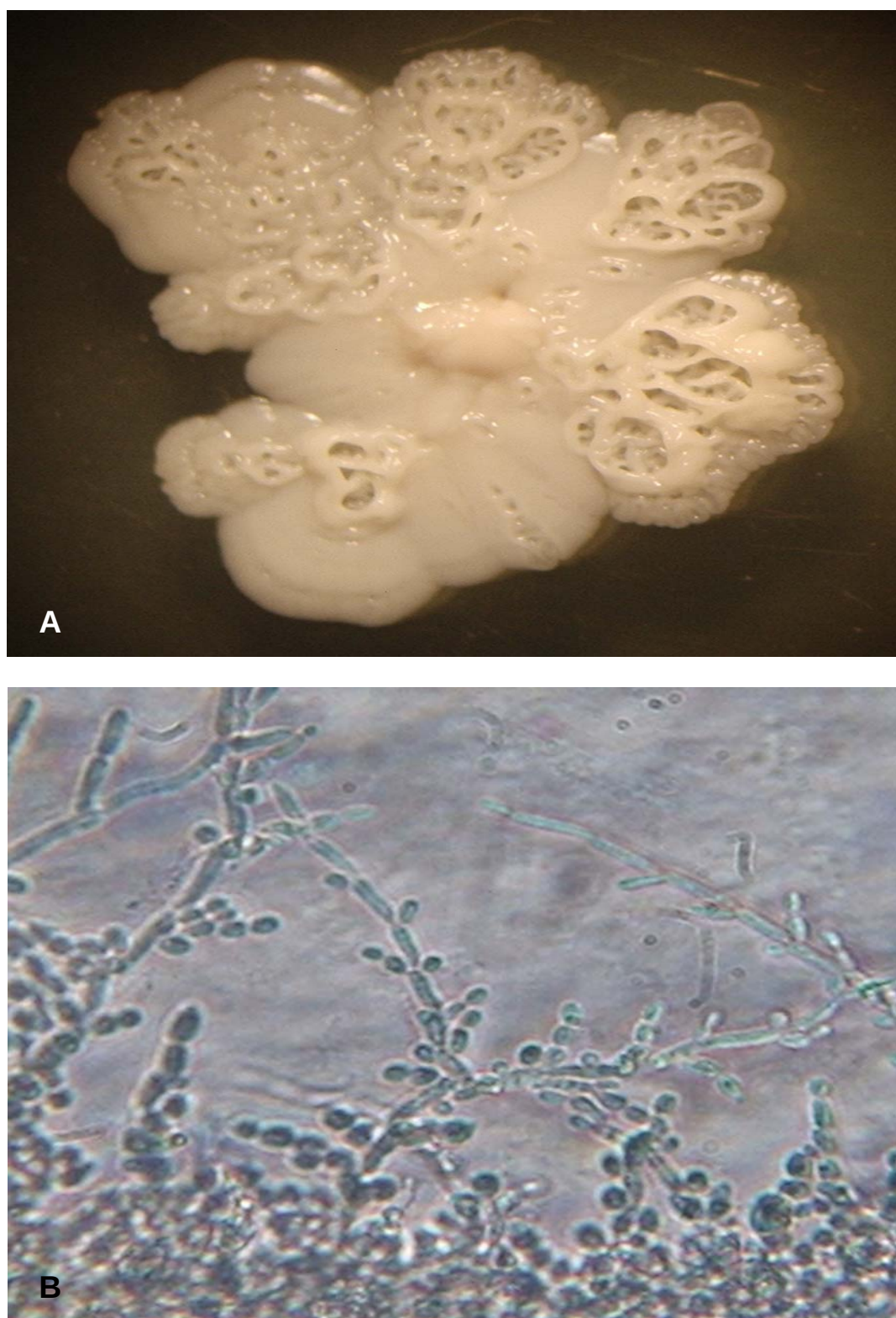


FIGURA 6. *Candida tropicalis*: **A**, aspectos macroscópicos; **B**, aspectos microscópicos (400X).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azulay, M.M.; Oliveira, M.A.L.S.; Assis, T.L.; Pereira-Júnior, A.C.J. Micoses oportunistas na síndrome de imunodeficiência adquirida. *An. Bras. Dermatol.*, 64:253-255, 1989.
2. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: characteristic and identification*. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002p.
3. Bosco, V.L. & Birman, E.G. Oral manifestations in children with AIDS and controls. *Pesqui. Odontol. Bras*, 16: 07-11. 2002.
4. Branchini, M.L. *Principais infecções fúngicas no paciente com infecção pelo HIV*. Paciente em foco, 2002.
5. Coleman, D.C.; Rinaldi, M.G.; Haynes, K.A.; Rex, J.H.; Summerbell, R.C.; Anaisse, E.J.; Li, A.; Sullivan, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med. Mycol.* 36:156-165, 1998.
6. Colombo, A.L.; Barchiesi, F.; McGough, D.A. Rinaldi, M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 535-540, 1995.
7. Fridkin, S. L.; Jarvis, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9:499-511, 1996.
8. Gomides, M.D.A.; Berbert, A.L.C.V.; Mantese, S.A.O.; Rocha, A.; Ferreira, M.S.; Borges, A.S. Dermatoses em pacientes com AIDS: estudo de 55 casos. Uberlândia, MG, Brasil. *Rev. Ass. Med Bras*, 48: 36-41, 2002.
9. Jarvis, R. W. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.*, 20: 1526-1530, 1995.

10. Hernandez-Hernandez, F.; Córdova-Martinez, E.; Manzano-Gayosso, P.; López-Alvarez, R.; Bazan-Mora, E.; López-Martinez, R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. 45: 455-460, 2003.
11. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gené, J. Figueras, M. J. *Atlas of clinical fungi*. CBS: Spain. 2000. 1126p.
12. Kreger-van Rij, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd. Amsterdam: Elsevier. 1984.
13. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a edição. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104p.
14. _____; Machado, C.M. *Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea*. Editora BYK, São Paulo. 272p., 2000.
15. Lima, O.C.C.; Silveira, F.R.X.; Birman, E.G. Manifestações bucais de origem infecciosa em pacientes HIV positivos ou com AIDS/I – doenças fúngicas. *Rev. Ass. Brás. Odontol*, 2: 28-32, 1994.
16. Lodder, J. *The Yest: a taxonomic study*. Oxford: North Holand Publishing, 1970.
17. Marques, S.A.; Porro, A.M.; Mendonça, I.R.S.; Hans-Filho, G. Micoses oportunistas e de comportamento oportunista no Brasil. *An. Bras. Dermatol*. 71: 25-29, 1996.
18. Mattos, S.L.; Santos, V.R.; Ferreira, E.F. Prevalência de lesões de mucosa bucal em paciente HIV-positivos na unidade de referência especializada em doenças infecciosas e parasitárias especiais-URE-DIPE (Belém-Pará). *Rev. Bras. Patol. Oral*, 3: 7-16. 2004.

19. Matsumoto, F. E.; Gandra, R. F.; Ruiz, L. S.; Auler, M. E.; Marques, S. A. V.; Pires, M. F. C.; Gambale, W.; Paula, C. R. Yeast isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathol.*, 154: 63-69, 2001.
20. Neves, R. P.; Cavalcanti, M. A. Q.; Chaves, G. M.; Magalhães, O. M. C. Yeast isolated from clinical samples of AIDS patients. *Braz. J. Microbiol.* 33: 363-364. 2002.
21. Nucci, M.; Colombo, A. L. Emergente of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Braz. J. Infect. Dis.*, 6: 124-128, 2002.
22. Oliveira, R. D. R.; Maffei, C. M. L; Martinez, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Ver. Assoc. Med. Bras.*, 47: 231-235, 2001.
23. Porro, A.M.; Yoshioka, M.C.N. Manifestações dermatológicas da infecção pelo HIV. *An. Bras. Dermatol.*, 75: 655-697, 2000.
24. Saballs, P.; Torres-Rodriguez, J. M.; Salvadó, M.; Sales, P.; Gimeno-Bayón, J. L.; Knobel, H.; Colomé, J. L.; Serrano, C.; Drobnic, L. La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio retrospectivo de nueve casos. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: 2-5, 2000.
25. Saramanayake, L. P.; Holmstrup, P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J. Oral Pathol. Med.*, 18: 554-564, 1989.
26. Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia médica: À luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2004. 388p.
27. Silva, M.R.R.; Paula, C. R. de, Silva, S. C.; Costa, T. R.; Costa, M. R. Resistência à drogas de leveduras isoladas de candidíase orofaríngea em pacientes com Aids. *Rev. Microbiol.*, 29: 271-275, 1998.

-
28. Sota, M.; Ezpeleta, C.; Cisterna, R. Descripción de 165 episodios de fungemia de un estudio multicentrico. *Rev. Iberoam. Micol.*, 16: 30-35, 1999.
 29. Stenderup, A. Oral mycology. *Acta Odontol. Scand.*, 48: 3-10, 1990.
 30. Vidotto, V. *Manual de micologia médica*. Tecmedd: São Paulo. 204p. 2004.
 31. Wingard, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.*, 20: 115-125, 1995.

**3.2 ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

ARTIGO SUBMETIDO A:

**BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
SÃO PAULO/BRASIL**

**ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

***Maria Anilda dos Santos Araújo^{1, 2}**; Elvira Maria Bezerra de Alencar¹; Kátia Simone dos Santos²; Aryanna Kelly Pinheiro Souza²; Euripedes Alves da Silva Filho³; Lusinete Aciole de Queiroz¹

1. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia

2. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Setor de Botânica

3. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Setor de Biologia

*Autor para correspondência: Rua: Conselheiro Francisco Vieira, 23, Prado, Maceió-AL, CEP 57010-230. Fone: (82) 3376-9236. Email: anildaraujo@ibest.com.br

**ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo detectar a ocorrência de leveduras nos espécimens clínicos sangue, secreção da orofaringe e urina de pacientes portadores de câncer atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes - HUPAA de Maceió-Alagoas. Haviam entre os pacientes, portadores de câncer de mama, melanoma e útero. Depois de coletadas, amostras dos espécimens clínicos foram processadas para exame direto e cultura. Após purificação as leveduras foram identificadas. Dos 35 pacientes analisados, 12 (34,3%) apresentaram infecções por leveduras, sendo observada uma ocorrência de 84,6% na secreção da orofaringe e de 15,4% na urina; no sangue não foram detectadas leveduras. As espécies isoladas foram *C. albicans* (53,8%), *C. glabrata* (38,5%) e *C. tropicalis* (7,7%). Os pacientes analisados pertenciam ao sexo feminino, sendo predominante o câncer de mama.

Palavras chave: *Candida* spp, Câncer, Espécimens clínicos.

**SPECIES OF ISOLATED *CANDIDA* OF PATIENTS BEARERS OF
CANCER ASSISTED IN THE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
MACEIÓ, ALAGOAS, BRAZIL**

ABSTRACT

The objective of the present work was to detect the occurrence of yeasts in the clinical specimen blood, secretion oropharyngeal and urine of patient bearers of cancer assisted in the Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes - HUPAA of Maceió-Alagoas. There were among the patients, bearers of breast cancer, melanoma and uterine cancer. After they were collected, samples of the clinic specimens were processed for direct exam and culture. After purification, the yeasts were identified. From the 35 analyzed patients, 12 (34,3%) presented fungic by yeasts, being observed an occurrence of 84,6% in the oropharyngeal secretion and 15,4% in the urine; it wasn't identified yeasts in the blood. The isolated species were *C. albicans* (53,8%), *C. glabrata* (38,5%) and *C. tropicalis* (7,7%). The analyzed patients were of the feminine sex and the breast cancer was predominant.

key words: *Candida* spp, Cancer, Clinic Specimens.

INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm como característica o crescimento desordenado e maligno de células que invadem tecidos e órgãos, podendo causar metástase em diferentes regiões do corpo ⁵.

Em relação a ocorrência de infecções fúngicas em pacientes com câncer, como os portadores de leucemia, linfomas e tumores sólidos, candidíases e aspergiloses estão entre as micoses mais comumente diagnosticadas ^{4, 11}.

A granulocitopenia severa e prolongada é o fator mais importante para o desenvolvimento de infecção fúngica disseminada em pacientes com neoplasias malignas. Adicionalmente, a emergência dessas infecções tem sido associada à utilização de novos regimes de antibióticos, durante episódio de prolongada granulocitopenia, secundariamente ao tratamento quimioterápico mais intensivo ^{16, 17}. As espécies mais comumente relacionadas com infecção em pacientes com câncer, pertencem aos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cryptococcus* e, ocasionalmente, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Fusarium* e também a *Pneumocystis carinii* ¹⁸.

O presente trabalho teve como objetivo detectar a ocorrência de leveduras em espécimens clínicos de pacientes portadores de Câncer atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES

Foram analisadas amostras clínicas de 35 pacientes portadores de Câncer, sendo 9 com câncer de mama, 2 com câncer de útero e 2 com melanoma. Os pacientes foram atendidos previamente no ambulatório do Setor de Oncologia do Hospital Universitário Dr. Alberto Antunes - HUPAA /UFAL e encaminhados ao laboratório do referido hospital, onde foi procedida a coleta dos espécimens clínicos.

REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP – Nº 007471/2003-41

COLETA DE ESPÉCIMENS CLÍNICOS

De cada paciente foi coletada uma amostra de secreção da orofaringe, sangue e urina, totalizando 105 amostras clínicas. Para coleta de secreção da orofaringe foram utilizados swabs esterilizados, os quais foram umedecidos em água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol na concentração de 50mg/L contida em tubos; em seguida os swabs foram colocados no mesmo tubo. Com o auxílio de seringa descartável foram coletados 5mL de sangue e transferidos para tubos tipo Vacuntanier contendo EDTA como anticoagulante. Após as instruções devidas a urina foi coletada pelo próprio paciente. Os recipientes contendo as amostras clínicas foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde-ICBS/UFAL para realização de exame direto e cultura.

PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMENS CLÍNICOS

Exame Direto

Para detecção de estruturas fúngicas através do exame direto as

amostras dos diferentes espécimens clínicos foram processadas a fresco e clarificadas com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio.

Obtenção de Cultura

Para isolamento de leveduras foram utilizados os meios infusão de cérebro-coração (BHI) adicionado de 0,5% de extrato de levedura (YE) contidos em tubo e ágar BHI adicionados de 50mg/L de cloranfenicol contido em placa. Para enriquecimento 1mL do sangue foi semeado em BHI-YE e mantido a 37°C durante 72 horas. Decorrido o período de incubação, 0,5mL da cultura foi semeada no sentido radial na superfície de ágar BHI. Do precipitado da urina foi retirado 0,5mL e semeado por espalhamento radial na superfície de ágar BHI contendo 50mg/L de cloranfenicol. A secreção de orofaringe foi semeada com o auxílio de swab por meio de espalhamento radial na superfície do meio. Todos os espécimens clínicos foram semeados em duplicata para manutenção a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e 37°C, por um período de 48 horas até 30 dias.

Purificação e Identificação

Para purificação das leveduras foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada com 50mg/L cloranfenicol. Com alça em anel uma alíquota da suspensão foi semeada por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placa. As colônias isoladas foram repicadas para meio ágar Sabouraud mais extrato de levedura contido em tubos e foram mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Para identificação das leveduras foram adotados os critérios de Barnett *et al.*¹, Hoog *et al.*⁸, Kreger-van Rij⁹ e Lodder¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos 35 pacientes portadores de câncer, observou-se uma ocorrência de 12 (34,3%) de casos positivos para o isolamento de leveduras. Segundo Lacaz e Machado¹¹ as infecções fúngicas causam uma diversidade enorme de síndromes clínicas, tornando-se a hipótese de etiologia micótica suspeita em qualquer quadro infeccioso relacionado a pacientes imunocomprometidos e que se tratam de infecções que quando são diagnosticadas tardiamente estão associadas a alta letalidade. O índice de infecções fúngicas tem aumentado em pacientes imunocomprometidos, principalmente quando são isolados fungos não considerados patógenos primários a partir de espécimens que contêm uma microbiota diversa e abundante, representando um problema na interpretação do papel patogênico, devido a necessidade de se estabelecer e reunir parâmetros para definir sua participação na enfermidade.

A Tabela 1 mostra a ocorrência dos tipos de câncer em relação aos espécimens clínicos e espécies de *Candida* isoladas de pacientes portadores de câncer atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes. Entre os pacientes analisados o câncer de mama foi o de maior ocorrência, sendo observado em 9 (75%) pacientes, seguido de câncer de útero com 2 (16,7%) casos e melanoma apenas 1 (8,3%) caso. Bittencourt *et al.*³ observaram que o câncer de mama é o mais freqüente atingindo o percentual de 24% de todos os tumores em tratamento oncológico, com maior incidência na vida adulta e no sexo feminino, seguido pelo câncer de colo uterino. De acordo com os dados do Ministério da saúde a taxa de mortalidade por câncer de mama tem aumentado, passando de 5,7/100.000 para 9,7/100.000

mulheres nos últimos 20 anos, continuando a ser a primeira causa de morte nas mulheres brasileiras ⁵. Vale salientar, que as pacientes portadoras de câncer de útero tinham sido esterectomizadas.

A secreção da orofaringe foi o espécimen clínico de maior ocorrência, sendo observado 11 (84,6%) casos de leveduras, seguida da urina com 2 (15,4%) casos; do sangue não foi isolada levedura (Tabela 1). Segundo Neves *et al.*¹⁴ a secreção da orofaringe é o espécimen clínico onde mais ocorrem isolamento de leveduras, principalmente espécies de *Candida*. Entretanto, Barret *et al.*² e Spolidorio *et al.*²¹ também citam a presença deste gênero em biópsias de lesões da mucosa bucal. A microbiota oral é representada por vários tipos de microrganismos, porém em pacientes imunocomprometidos, tanto a microbiota normal como a oportunista pode causar infecções severas, inclusive, atingindo a corrente sanguínea causando infecções generalizadas ⁷.

As espécies isoladas foram *C. albicans* com 7 (53,8%) casos, sendo 6 isolados obtidos da secreção da orofaringe e 1 da urina, dos quais 5 foram isolados de câncer de mama, 1 de melanoma e 1 de câncer de útero; seguida de *C. glabrata* com 5 (38,5%), sendo 4 isolados obtidos da secreção da orofaringe de pacientes portadores de câncer de mama e 1 da urina de portador de câncer de útero; *C. tropicalis* 1 (7,7%) obtido da secreção da orofaringe de paciente portador de câncer de mama (Tabela 1). Estes dados estão de acordo com os observados por Lacaz *et al.*¹⁰, Sidrim e Rocha¹⁹, Silva *et al.*²⁰, onde *C. albicans* é a espécie mais isolada da secreção da orofaringe e nos pacientes portadores de câncer de mama segundo Lacaz e Machado¹¹. Colombo *et al.*⁶ e Nucci e Colombo¹⁶ destacaram o surgimento de outras

espécies causando infecções está relacionado ao tratamento periódico que se faz necessário e também ao uso prolongado de medicamentos utilizados na profilaxia da candidíase oral, resultando na resistência da levedura.

Nos espécimens clínicos urina e secreção da orofaringe de um mesmo paciente portador de câncer de mama, foi obtido isolamento apenas de *C. albicans*. Por se tratarem de leveduras que são encontradas no trato gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável, podem se tornar patogênicas caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como neoplasias¹².

TABELA 1. Ocorrência dos tipos de câncer em relação aos espécimens clínicos e espécies de *Candida* isoladas de pacientes portadores de câncer atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes.

PACIENTE	TIPO DE CÂNCER	ESPÉCIMEN CLÍNICO			ESPÉCIE
		SANGUE	URINA	SECREÇÃO DE OROFARINGE	
1	Mama			+	<i>C. albicans</i>
2	Mama		+	+	<i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i>
3	Mama			+	<i>C. glabrata</i>
4	Útero			+	<i>C. albicans</i>
5	Mama			+	<i>C. glabrata</i>
6	Mama			+	<i>C. albicans</i>
7	Útero		+		<i>C. glabrata</i>
8	Mama			+	<i>C. glabrata</i>
9	Mama			+	<i>C. tropicalis</i>
10	Mama			+	<i>C. albicans</i>
11	Mama			+	<i>C. glabrata</i>
12	Melanoma			+	<i>C. albicans</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: characteristic and identification*. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002p.
2. Barret, A. W.; Kingsmill, V., J.; Speight, P. M. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis.*, 4: 26-31, 1998.
3. Bittencourt, R.; Scaletzky, A.; Boehl, J. A. R. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. *Rev. Bras. Cancerol.* 50: 95-101. 2004.
4. Bodey, G. P.; Bueltmann, B.; Duguid, W.; *et al.* Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:99-109. 1992.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Câncer. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças./ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 56p.
6. Colombo, A.L.; Barchiesi, F.; MCGOUGH, D.A. Rinaldi, M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 535-540, 1995.
7. Gordon-Nunez, M. A.; Pinto, L. P. Candidíase e sua relação com a mucosite oral em pacientes oncológicos pediátricos. *Rev. Bras. Patol.* 2: 4-9, 2003.
8. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gené, J. Figueras, M. J. *Atlas of clinical fungi*. CBS: Spain. 2000. 1126p.
9. Kreger-van Rij, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd. Amsterdam: Isevier. 1984.

10. Lacaz, C. S.; porto, E.; Martins, J. E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104p.
11. _____; Machado, C. M. *Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea*. Editora BYK: São Paulo. 2000. 272p.
12. Lima, O.C.C.; Silveira, F.R.X.; Birman, E.G. Manifestações bucais de origem infecciosa em pacientes HIV positivos ou com AIDS/I – doenças fúngicas. *Rev. Ass. Bras. Odontol.* 2:28-32, 1994.
13. Lodder, J. *The Yest: a taxonomic study*. Oxford: North Holand Publishing, 1970.
14. Neves, R. P.; Cavalcanti, M. A. Q.; Chaves, G. M.; Magalhães, O. M. C. Yeast isolated from clinical samples of AIDS patients. *Braz. J. Microbiol.* 33: 363-364, 2002.
15. Nucci, M.; Colombo, A. L. Emergente of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Braz. J. Infect. Dis.*, 6: 124-128, 2002.
16. Nucci, M; Schechter, M.; Spector, N.; et al. Antibiotic regimen as an independent risk factor for disseminated fungal infections in neutropenic patients in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89: 107-110, 1995.
17. Nucci, M.; Silveira, M. I.; Spector, N. et al. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. *Mycopathol.*, 141:65-68 , 1998.
18. Oliveira, N. M. C. *Vigilância de colonização por fungos filamentosos em cavidade nasal de pacientes oncológicos pediátricos durante episódios de neutropenia*. Piracicaba, 1997. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

19. Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia médica: À luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2004. 388p.
20. Silva, M.R.R.; Paula, C. R. de, Silva, S. C.; Costa, T. R.; Costa, M. R. Resistência à drogas de leveduras isoladas de candidíase orofaríngea em pacientes com Aids. *Rev. Microbiol.*, 29: 271-275, 1998.
21. Spolidorio, L. C.; Martins, V. R. G.; Nogueira, R. D.; Spolidorio, D. M. P. Frequência de *Candida* sp. Em biópsias de lesões da mucosa bucal. *Pesqui. Odontol. Bras.* 17:89-93, 2003.

**4.3 IDENTIFICAÇÃO POR PCR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*
ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS E DE
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS-
ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

ARTIGO SUBMETIDO A:

**BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
SÃO PAULO/BRASIL**

**IDENTIFICAÇÃO POR PCR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*
ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS E DE
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS-
ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL**

***Maria Anilda dos Santos Araújo¹**; Euripedes Alves da Silva
Filho²; Bereneuza T. R. V. Brasileiro³; Kátia Simone dos Santos⁴;
Lusinete Aciole de Queiroz¹; Elvira Maria Bezerra de Alencar¹

1. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia; 2. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Setor de Biologia; 3. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética; 4. Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Setor de Botânica.

*Autor para correspondência: Rua: Conselheiro Francisco Vieira, 23, Prado, Maceió-AL, CEP 57010-230. Fone: (82) 3376-9236. E-mail: anildaraujo@ibest.com.br

IDENTIFICAÇÃO POR PCR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*
ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS E DE
PORTADORES DE CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS-
ESCOLA DE MACEIÓ, ALAGOAS, BRASIL

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética em nível específico e intraespecífico os isolados de *Candida* obtidos de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer, utilizando como marcadores moleculares o DNA ribossomal, ISSR (GTG)₅ e os iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2. Entre os 50 isolados obtidos 19 foram identificadas pelo método convencional como *Candida albicans*, 11 *C. glabrata*, 9 *C. guilliermondii*, 7 *C. parapsilosis* e 4 *C. tropicalis*. Em relação ao fragmento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA verificou-se que os isolados das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* amplificaram um fragmento de 550pb, enquanto *C. parapsilosis* amplificou um fragmento de 520pb. Os resultados obtidos com a utilização do iniciador para ISSR (GTG)₅ demonstraram grande variabilidade intraespecífica, permitindo detectar linhagens dentro da mesma espécie. Com a utilização dos iniciadores espécie-específicos CALB1 e 2, verificou-se que os isolados identificados como *C. albicans*, amplificaram um fragmento de 273pb confirmando a espécie. Todos os marcadores moleculares mostraram-se eficientes, reprodutíveis e auxiliam na identificação convencional, constituindo-se em ferramentas apropriadas para caracterização genética entre espécies de *Candida*.

Palavras chave: *Candida* spp, PCR, AIDS, Câncer.

IDENTIFICATION BY PCR OF SPECIES OF ISOLATED *CANDIDA* OF PATIENTS BEARERS OF AIDS AND CANCER ASSISTED IN SCHOOL HOSPITALS OF MACEIÓ, ALAGOAS

ABSTRACT

The objective of the present work was to verify the genetic diversity to the specific and intraspecific levels of the isolated of *Candida* obtained from patients bearers of AIDS and Cancer assisted in the School Hospitals of Maceió-Alagoas, using as molecular markers the DNA ribossomal, ISSR (GTG)₅ and the specific-species initiator CALB1 and CALB2. From the 50 isolates identified by the conventional method, 19 were *Candida albicans*, 11 *C. glabrata*, 9 *C. guilliermondii*, 7 *C. parapsilosis* and 4 *C. tropicalis*. In relation to the fragment of the area ITS (ITS1-5.8S-ITS2) of the rDNA, it was verified that the isolated of the species *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* amplified a fragment of 550pb, while *C. parapsilosis* amplified a fragment of 520pb. The results obtained with the use of the initiator for ISSR (GTG)₅ demonstrated great intraspecific variability, allowing the detection of lineages in the same species. By the use of the specific-species initiator CALB1 and 2, it was verified that the isolated identified as *C. albicans* amplified a fragment of 273pb confirming the species. All of the molecular markers were efficient, reproductive and they helped in the conventional identification, being appropriate tools for genetic characterization among species of *Candida*.

key words: *Candida* spp, PCR, AIDS, Câncer.

INTRODUÇÃO

A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista em humanos²⁸. Os aspectos clínicos da candidíase variam desde manifestações da colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos¹⁸. As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são mais comumente implicadas em quadros clínicos e *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* são leveduras menos freqüentemente isoladas^{19, 30}.

Os métodos tradicionalmente utilizados na identificação de leveduras baseiam-se em critérios morfológicos e fisiológicos para nível de espécie^{14, 16, 21}, entretanto estão sendo utilizadas técnicas moleculares as quais visam a análise de DNA e auxiliam na taxonomia dos microrganismos possibilitando um estudo da variabilidade individual e/ou populacional^{10, 11}.

A técnica de reação em cadeia de DNA polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) com os iniciadores espécie-específicos é atualmente a mais utilizada para amplificação de fragmentos de interesse e destaca-se na identificação de fungos patogênicos ao homem a partir do espécimen clínico ou de culturas, uma vez que o diagnóstico através de testes convencionais podem ser concluídos em apenas em quinze dias, dificultando o tratamento e melhor resposta terapêutica^{9, 12, 15}.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética em níveis específico e intraespecífico dos isolados de *Candida* obtidos de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos em Hospitais Escola de Maceió, Alagoas, utilizando como marcadores moleculares o rDNA, o ISSR (GTG)₅ e iniciadores espécie-específicos CALB 1 e 2.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Os isolados de leveduras foram obtidos de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos no Setor de Infectologia do Hospital Dia e Setor de Oncologia do Hospital Universitário Profº. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL e do Hospital-Escola Dr. Hêlvio Auto; as leveduras de referência foram obtidas Coleção de Culturas da Micoteca URM-UFPE (Tabela 1).

Obtenção de Massa Celular e Extração do DNA Nuclear

Os isolados foram inoculados em meio líquido extrato de levedura peptona e dextrose-YPD e incubados a 30°C por 16 horas a 150rpm, em mesa agitadora termostatzada. Após período de incubação foi retirado 1,0mL da amostra e transferidos para microtubos esterilizados de 1,5mL e centrifugado por três minutos a 5.900g. O sobrenadante foi descartado e adicionados 600µL de solução de lise, mantidos a 65°C em banho-maria por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados fenol/clorofórmio (1:1) e após breve agitação as suspensões foram centrifugadas a 15.400g por 10 minutos. Foram transferidos 500µL da fase superior para novos microtubos esterilizados de 1,5mL e adicionados 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotações, e 400µL da fase superior foram transferidos para microtubos de 1,5mL novos e esterilizados. A estes tubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA foi coletado por

centrifugação a 15.400g por 10 minutos, lavado com etanol a 70% por duas vezes, secado em estufa a 37°C por 30 minutos e em seguida ressuspendido com tampão TE pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) e mantido a -20°C. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA foi utilizada a relação $1\text{ DO} = 50\mu\text{g/mL}$ ²⁵.

Amplificação do DNA Nuclear

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2, em termociclador HIBRID. A reação das ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) por PCR com o iniciador (GTG)₅ foi realizada no volume final 25μL nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), BSA (soro albumina bovina) 0,025μg/μL, dNTP 0,2mM, iniciador (GTG)₅ 0,2pmoles/μL, MgCl₂ 3,0mM, *Taq* polimerase 0,05U/μL e 2,0ng/μL de DNA. Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por seis minutos. Os produtos de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3% submetidos a 7,5 volts/cm entre os eletrodos por 150 minutos em tampão TBE 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Life Technologies) corados em brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação (DOC Print Vilber Loumart, França).

TABELA 1. Espécies de *Candida* obtidas de pacientes portadores de AIDS e Câncer atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas e da Micoteca URM/UFPE.

ESPÉCIE	ISOLADO	SUBSTRATO	GRUPO DE PACIENTE	PROCEDÊNCIA
<i>C. albicans</i>	CALB - 5	ORO	AIDS	HUPAA
	CALB - 6	URINA	AIDS	HUPAA
	CALB - 7	URINA	AIDS	HUPAA
	CALB - 10	ORO	AIDS	HUPAA
	CALB - 11	ORO	AIDS	HUPAA
	CALB - 12	ORO	AIDS	HUPAA
	CALB - 13	ORO	AIDS	HUPAA
	CALB - 22	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 26	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 27	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 28	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 29	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 33	URINA	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 36	URINA	CÂNCER	HUPAA
	CALB - 38	URINA	CÂNCER	UNCISAL
	CALB - 55	ORO	AIDS	UNCISAL
	CALB - 57	ORO	AIDS	UNCISAL
	CALB - 58	ORO	AIDS	UNCISAL
	CALB - 60	ORO	AIDS	UNCISAL
	URM - 4126	-	-	MICOTECA -UFPE
	URM - 4126	-	-	MICOTECA -UFPE
	URM - 4126	-	-	MICOTECA -UFPE
<i>C. glabrata</i>	CGLA - 20	URINA	AIDS	HUPAA
	CGLA - 21	URINA	AIDS	HUPAA
	CGLA - 23	URINA	CÂNCER	HUPAA
	CGLA - 32	ORO	AIDS	HUPAA
	CGLA - 34	URINA	AIDS	HUPAA
	CGLA - 35	URINA	AIDS	HUPAA
	CGLA - 37	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CGLA - 41	ORO	CÂNCER	HUPAA
	CGLA - 54	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGLA - 56	ORO	AIDS	UNCISAL
<i>C. guilliermondii</i>	CGLA - 59	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGUI - 02	ORO	AIDS	HUPAA
	CGUI - 03	ORO	AIDS	HUPAA
	CGUI - 04	ORO	AIDS	HUPAA
	CGUI - 17	ORO	AIDS	HUPAA
	CGUI - 30	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGUI - 31	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGUI - 39	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGUI - 40	ORO	AIDS	UNCISAL
	CGUI - 42	ORO	AIDS	UNCISAL
<i>C. parapsilosis</i>	URM - 4975	-	-	MICOTECA -UFPE
	URM - 4819	-	-	MICOTECA -UFPE
	CPAR - 08	ORO	AIDS	HUPAA
	CPAR - 09	ORO	AIDS	HUPAA
	CPAR - 14	ORO	AIDS	HUPAA
	CPAR - 15	ORO	AIDS	HUPAA
	CPAR - 16	ORO	AIDS	HUPAA
	CPAR - 18	URINA	AIDS	HUPAA
	CPAR - 19	URINA	AIDS	UNCISAL
<i>C. tropicalis</i>	URM - 4261	-	-	MICOTECA -UFPE
	URM - 4984	-	-	MICOTECA -UFPE
	CTRO - 01	ORO	AIDS	HUPAA
	CTRO - 24	ORO	AIDS	UNCISAL
	CTRO - 25	URINA	AIDS	UNCISAL
	CTRO - 53	ORO	CÂNCER	HUPAA
	URM - 4977	-	-	MICOTECA -UFPE
	URM - 4262	-	-	MICOTECA -UFPE

CALB - *C. albicans*; **CGLA** - *C. glabrata*; **CGUI** - *C. guilliermondii*; **CPAR** - *C. parapsilosis*; **CTRO** - *C. tropicalis*; **HU** - Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes-HUPAA; **UNCISAL** - Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas; **ORO** - Secreção de orofaringe.

TABELA 2. Iniciadores usados para amplificar segmentos de DNA de espécies de *Candida*.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	MARCADOR	
		MOLECULAR	REFERÊNCIA
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeldt <i>et al.</i> ²⁰
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	rDNA	White <i>et al.</i> ³¹
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	rDNA	White <i>et al.</i> ³¹
CALB 1	TTTATCAACTTGTCACACCA	rDNA	Luo & Mitchell ²²
CALB 2	ATCCCGCCTTACCACTACCG	rDNA	Luo & Mitchell ²²

A reação de amplificação da região ITS do DNA ribossomal por PCR foi realizada em 25µL de volume final utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, em termociclador HIBRID, nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), BSA (soro albumina bovina) 0,025µg/µL, dNTP 0,2mM, iniciador ITS₄ 0,5pmoles/µL, iniciador ITS₅ 0,5pmoles/µL, MgCl₂ 3,0mM, *Taq* polimerase 0,05U/µL e 2,0ng/µL de DNA. Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese e fotografados, nas mesmas condições do item anterior.

Amplificação com Iniciadores CALB1 e CALB2

A reação de amplificação por PCR com os iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2²³ foi realizada em 20µL de volume final em

termociclador HIBRID, nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM), BSA (soro albumina bovina) 0,025µg/µL, dNTP 0,2mM, iniciador CALB1 0,5pmoles/µL, iniciador CALB 2 0,5pmoles/µL, MgCl₂ 3,0mM, *Taq* polimerase 0,05U/µL e 2,0ng/µL de DNA. Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, seguidos de 40 ciclos para desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese e fotografados em condições iguais às descritas para o iniciador (GTG)₅.

Análises Estatísticas

Os dados obtidos com as amplificações com o marcador (GTG)₅ foram analisadas pelo programa Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs – NTSYS – PC 2.1^{3, 8, 24}. Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, nas quais o número 1 (um) significa a presença do fragmento e o número 0 (zero) a ausência. A partir desta análise, o programa constrói uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade Simple Matching (SM). A partir da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5 gerou um fragmento de 550pb para todos isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Enquanto a espécie *C. parapsilosis* amplificou um fragmento de aproximadamente 520pb,

como mostra a Figura 1. Estes dados são semelhantes aos observados por Guillamón *et al.*¹³ e Chen *et al.*⁴ que identificaram espécies de leveduras baseadas na análise de RFLP da região ITS do DNA ribossomal, sendo observado que os produtos obtidos através da PCR desta região demonstraram grande variação específica.

A espécie *C. glabrata* amplificou um fragmento de 550pb da região ITS do rDNA, sendo que o tamanho do fragmento amplificado foi diferente do observado por Cirak *et al.*⁶ quando utilizaram métodos moleculares na identificação de espécies de *Candida* obtendo um fragmento de 800pb para esta espécie.

As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram o mesmo tamanho de fragmento para a região ITS do DNA ribossomal. Guillamón *et al.*¹³ e Chen *et al.*⁴ comprovaram que estas espécies apresentam o mesmo tamanho do fragmento ITS, mas são espécies diferentes, através da utilização de enzimas de restrição, que funcionam como uma ferramenta para diferenciar espécies com mesmo tamanho de fragmento ITS, uma vez que apresentam sítios diferentes para as mesmas enzimas de restrição (Cfol, HaeIII, HinfI, BsaHI, HinfII) resultando em padrões específicos.

O tamanho do fragmento de *C. guilliermondii* para região ITS do rDNA foi de aproximadamente 550pb, sendo que para esta espécie Williams *et al.*³² obteve um fragmento amplificado de 600pb quando identificaram espécies de *Candida* através de PCR e análises de polimorfismo de fragmentos de restrição da região ITS do DNA ribossomal. HSU *et al.*¹⁵ identificaram fungos de interesse médico através de iniciadores para seqüências específicas de *C. albicans* (CALB1 e CALB2), *C. glabrata* (CGL1 e CGL2), *C. guilliermondii*

(CGU1 e CGU2), *C. parapsilosis* (CPA1 e CPA2), *C. tropicalis* (CTR1 e CTRO2), *C. krusei* (CKRU1 e CKRU2) e *Cryptococcus neoformans* (CN5 e CN4) e obtiveram apenas produtos de PCR amplificados de suas respectivas espécies.

Das leveduras de referência provenientes da Coleção de Culturas Micoteca-URM foram obtidos produtos de PCR da região ITS do DNA ribossomal, sendo amplificado um fragmento de aproximadamente 550bp para as espécies: *C. albicans* (URM-4986 e URM-4385), *C. tropicalis* (URM-4262 e URM-4817), *C. guilliermondii* (URM-4819), *C. parapsilosis* (URM-4261 e URM-4984) e de 450bp para o isolado URM-4975 de *C. guilliermondii* (Figura 2). Os resultados obtidos são semelhantes aos observados por Guillamón *et al.*¹³ e Chen *et al.*⁴ para espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, mas diferem para *C. guilliermondii*, que segundo os autores apresenta um fragmento de 600pb. Vale salientar que não foi obtida amostra de referência de *C. glabrata*.

As espécies identificadas pelo método convencional como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram identificadas através da biologia molecular utilizando-se os iniciadores espécie-específico CALB1 e CALB2, sendo incluídas as amostras de referência (Tabela 1). Com a utilização destes marcadores, verificou-se que todos os isolados identificados como *C. albicans*, amplificaram um fragmento de 273pb com os iniciadores específicos para *C. albicans* confirmando a espécie. Entre os isolados desta espécie verificou-se grande variação morfológica em relação aos aspectos macroscópicos, no entanto com relação aos aspectos microscópicos observou-se características marcantes, como a formação de

pseudomicélio e de clamidósporos formados em microcultivos utilizando-se os meios agar-fubá, agar-arroz e bile de boi, que características da espécie segundo Barnett *et al.*¹ e Kreger-van Rij¹⁷. Os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Luo e Mitchell²² que identificaram fungos patogênicos de culturas utilizando reações de PCR em multiplex e obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade para iniciadores espécie-específico da região ITS do rDNA.

Os resultados obtidos com as espécies de *C. glabrata* e *C. guilliermondii* são diferentes dos encontrados na literatura com a utilização dos iniciadores CALB e ITS. HSU *et al.*¹⁵ e Chavasco *et al.*⁵ utilizaram iniciadores espécie-específicos para confirmação dessas espécies e demonstraram que a técnica de PCR é útil, prática e mais precisa.

Em relação a *C. parapsilosis* todos os isolados identificados pelo método convencional coincidiram com a identificação molecular utilizando-se os iniciadores ITS sendo observado um fragmento de 520pb e com os iniciadores CALB1 e CALB2, verificando-se que os isolados identificados como *C. glabrata* não amplificaram, sendo considerados espécies diferentes de *C. albicans*. Hsu *et al.*¹⁵, Luo e Mitchell²² e Nazzari *et al.*²³ utilizaram iniciadores específicos para identificação de diferentes espécies de leveduras e obtiveram produtos de PCR apenas para as espécies que apresentam seqüências homólogas aos iniciadores mencionados.

Nos isolados de *C. albicans* foram encontrados perfis que variaram entre 3 a 20 fragmentos, em *C. glabrata* entre 1 a 19 fragmentos, em *C. guilliermondii* entre 2 a 21 fragmentos, em *C. parapsilosis* entre 9 a 22 fragmentos e em *C. tropicalis* entre 1 a 18 fragmentos (Figura 3).

Os perfis gerados pela amplificação com o iniciador (GTG)₅ para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Figura 4, 5, 6, 7, 8). Os isolados de *C. albicans* geraram perfis que foram reunidos em três grupos, um com 73% de similaridade (A e C) e outro com 65% de similaridade (B). Os isolados URM-4126 e CALB-12, URM-4385 e CALB-55, CALB-57 e CALB-60, CALB-28 e CALB-29 apresentaram 100% de similaridade. Dos 6 isolados do grupo A, 5 foram obtidos de pacientes portadores de AIDS e 1 de portador de câncer, sendo observado 4 padrões diferentes. No grupo B observou-se que dos 4 isolados, 3 foram obtidos de pacientes com câncer apresentando 3 padrões distintos e 1 isolado de paciente com AIDS. O grupo C apresentou 8 isolados, sendo 5 isolados obtidos de pacientes portadores de AIDS todos com padrões distintos e 3 isolados de portadores de câncer com 2 padrões diferentes. Entre os 18 isolados de *C. albicans* obtidas de pacientes portadores de AIDS e de portadores de câncer, foram discriminados 17 padrões. Os resultados obtidos mostram que houve grande variabilidade intraespecífica entre os isolados de *C. albicans*, demonstrando que a utilização deste marcador pode ser uma importante ferramenta para distinguir linhagens dentro da mesma espécie. Estes dados são semelhantes ao observados por Thanos *et al.*²⁹ que identificaram espécies de *Candida* com ISSR, sendo que os produtos amplificados de 26 espécies de *Candida* apresentaram maior variabilidade interespecífica do que intraespecífica.

O dendrograma gerado para *C. glabrata* apresentou 5 grupos, sendo que os isolados do grupo A apresentaram 80% de similaridade, mas os isolados CGLA – 20 e CGLA – 21 apresentaram 100% de similaridade. O grupo

B apresentou 4 isolados com 90% de similaridade. O grupo C está formado pelos isolados CGLA – 34 e CGLA – 35 e apresentaram 100% de similaridade entre eles e com cerca de 62% de fragmentos comuns com os grupos A e B. Os isolados CGLA – 37 contidos no grupo D e CGLA – 23 no grupo E, foram os mais distintos, com 59 e 53%, respectivamente, em relação aos demais grupos através da análise da distância genética. Em relação ao grupo de pacientes observou-se que dos 11 isolados 8 foram obtidos de pacientes portadores de AIDS e 3 de pacientes de portadores de câncer, sendo observados 9 padrões distintos. No grupo A foram discriminados 2 padrões, no grupo B 3 padrões dos quais os isolados CGLA – 41 de paciente com câncer e CGLA – 54 de paciente com AIDS apresentaram o mesmo padrão, no grupo C 2 isolados com 1 padrão, o grupo D e E com os isolados CGLA – 37 e CGLA – 23, respectivamente com padrões diferentes. Os resultados obtidos com este marcador molecular demonstram que a presença ou ausência de um fragmento detecta polimorfismo entre os isolados caracterizando linhagens. Silva-Filho *et al.*²⁶ determinaram o padrão de *Saccharomyces cerevisiae* após análise molecular baseada em PCR através do iniciador (GTG)₅, fragmentos polimórficos identificados entre as linhagens de *S. cerevisiae*, permitindo a discriminação de 17 linhagens nativas desta espécie, as quais foram confirmadas pelo método convencional de identificação. Brasileiro² também fez uso deste marcador molecular em isolados de *Fusarium solani* e verificou que esta ferramenta foi mais eficiente para caracterizar a variabilidade genética intraespecífica.

Os isolados de *C. guilliermondii* geraram 4 perfis, sendo que o grupo A apresentou 75% de similaridade de tamanho de fragmento, o grupo B

com 83%, o grupo C com 72% e o grupo D com 95%. Os isolados CGUI – 03, CGUI - 30 e CGUI – 31, pertencentes ao grupo B apresentaram 100% de similaridade. Os nove isolados foram obtidos de pacientes portadores de AIDS, sendo observados 5 isolados no grupo B com 3 padrões diferentes dos quais os isolados CGUI – 03, CGUI – 30 e CGUI – 31 apresentaram o mesmo padrão. O grupo C e D com 2 isolados cada um apresentando um padrão distinto.

Dos 9 isolados de *C. parapsilosis* 8 foram discriminados com 84%, sendo os perfis gerados agrupados em três grupos, o grupo A com 73% de similaridade, o grupo B com 55% e o grupo C com 49% de similaridade, sendo que os isolados deste grupo, CPAR – 18 e CPAR – 19 apresentaram 100% de similaridade. Os grupos A e B de *C. parapsilosis* se relacionam a aproximadamente 55% de similaridade. Entre os isolados desta espécie 7 foram obtidos de pacientes portadores de AIDS, sendo observado 5 isolados no grupo B com 3 padrões distintos e 2 isolados no grupo C com um padrão.

Os perfis gerados pelos isolados de *C. tropicalis* foram agrupados em 3 grupos, sendo que os isolados do grupo A apresentaram 73% de similaridade. Os isolados CTRO – 53 e CTRO – 51 se relacionam com 82% de similaridade, o grupo B com apenas um isolado apresentou 62% de similaridade com o grupo A. O grupo C se relaciona com o grupo A com 55% de similaridade. Dos 5 isolados desta espécie foram obtidos 4 padrões distintos, sendo o grupo A com 3 isolados e 2 padrões diferentes, o grupo B e C com 1 isolado cada um apresentando padrões distintos.

Em relação ao grau de similaridade, observou-se que as diferentes espécies apresentam percentuais bem diversificados, verificando-se

que a PCR utilizando-se o iniciador (GTG)₅ funciona como uma importante ferramenta para detectar a diversidade genética de leveduras. Segundo Couto *et al.*⁷ que realizaram acompanhamento de leveduras presentes na cadeia produtiva da indústria de maionese e saladas, verificaram que das 127 leveduras isoladas foram identificadas espécies de *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Cryptococcus* pelo “kit” API ID 32. Os autores utilizaram também o marcador molecular (GTG)₅ e obtiveram 28 perfis para as espécies identificadas pelo “kit” API, sendo que o iniciador (GTG)₅ foi capaz de discriminar seis isolados que não foram identificados pelo sistema API.

TABELA 1. Comparação entre a identificação convencional e a identificação molecular utilizando os iniciadores espécie-específicos CALB1 e CALB2.

ISOLADO	INICIADORES CALB1 E 2	IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO CONVENCIONAL	IDENTIFICAÇÃO POR PCR
CALB – 5	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 6	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 7	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 10	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 11	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 12	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 13	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 22	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 26	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 27	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 28	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 29	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 33	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 36	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 38	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 55	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 57	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 58	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CALB – 60	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
URM - 4126	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
URM - 4126	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
URM - 4126	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 20	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGLA – 21	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGLA – 23	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGLA – 32	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 34	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 35	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 37	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 41	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
CGLA – 54	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGLA – 56	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGLA – 59	-	<i>C. glabrata</i>	Não albicans
CGUI – 02	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CGUI – 03	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CGUI – 04	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CGUI – 17	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CGUI – 30	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CGUI – 31	+	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i>
CGUI – 39	+	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i>
CGUI – 40	+	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i>
CGUI – 42	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
URM - 4975	+	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i>
URM - 4819	-	<i>C. guilliermondii</i>	Não albicans
CPAR – 08	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 09	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 14	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 15	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 16	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 18	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CPAR – 19	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
URM - 4261	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
URM - 4984	-	<i>C. parapsilosis</i>	Não albicans
CTRO – 01	-	<i>C. tropicalis</i>	Não albicans
CTRO – 24	-	<i>C. tropicalis</i>	Não albicans
CTRO – 25	-	<i>C. tropicalis</i>	Não albicans
CTRO – 53	-	<i>C. tropicalis</i>	Não albicans
URM - 4977	-	<i>C. tropicalis</i>	Não albicans
URM - 4262	+	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>

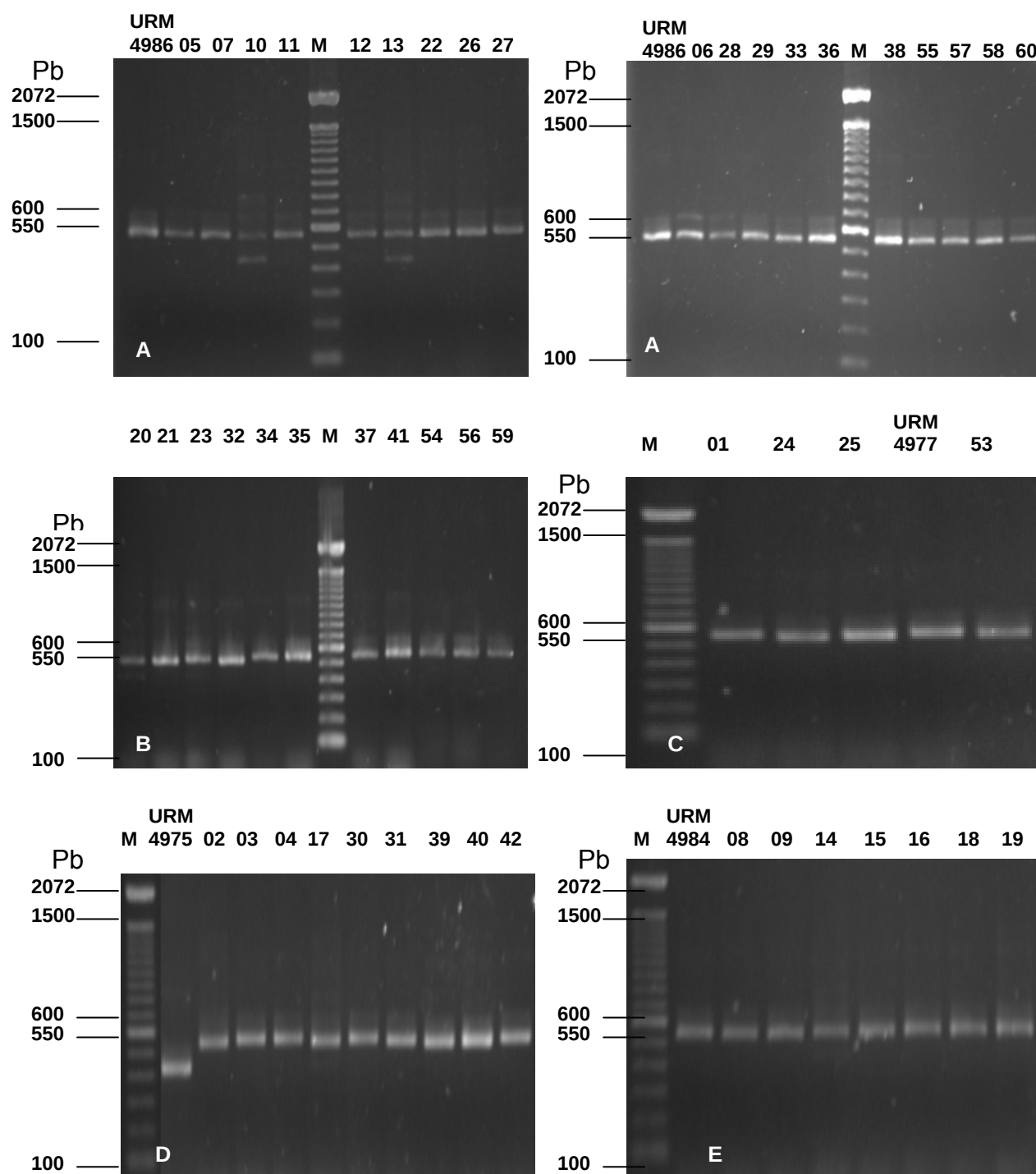


FIGURA 1. Amplificação da região ITS do rDNA de isolados de *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. tropicalis* (C) obtidas de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer; *C. guilliermondii* (D) e *C. parapsilosis* (E) obtidas de portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas; **URM** – amostras da coleção de cultura micoteca; **M** - marcador molecular de 100 pb.

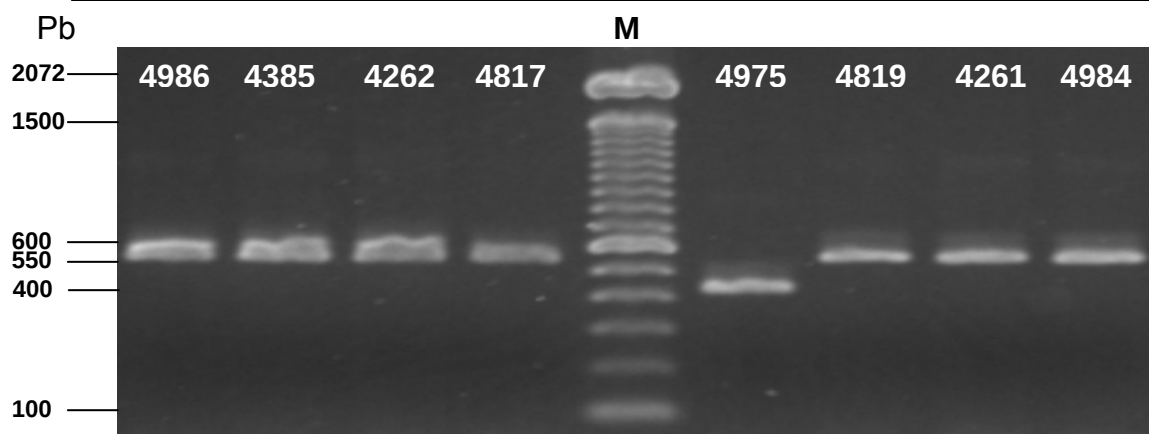


FIGURA 2. Amplificação da região ITS do rDNA de espécies de *Candida* obtidas da Micoteca URM-UFPE. *C. albicans* (4986 e 4385); *C. tropicalis* (4262 e 4817); *C. guilliermondii* (4975 e 4819); *C. parapsilosis* (4261 e 4984); **M** – marcador molecular de 100 pb.

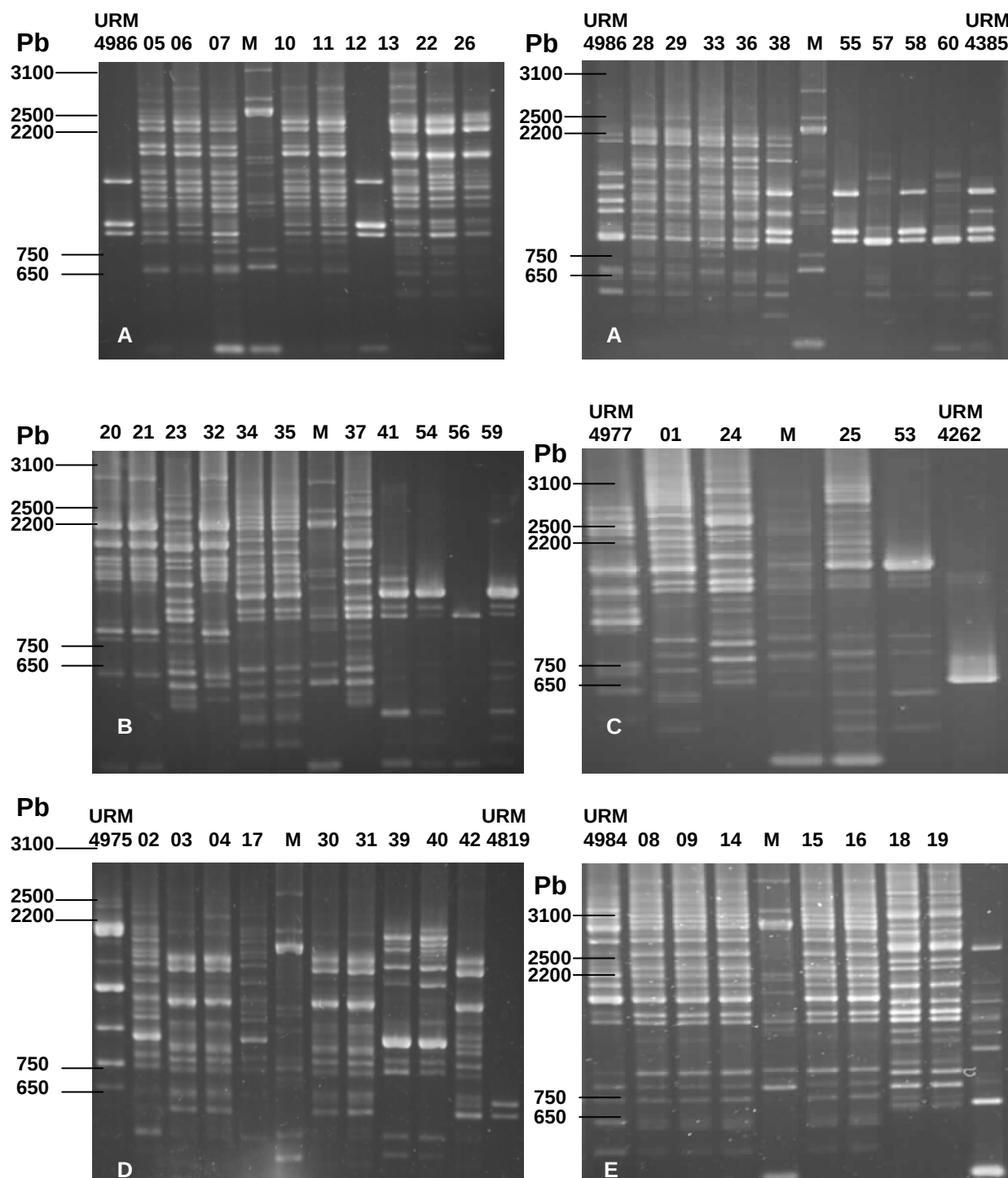


FIGURA 3. Perfis de amplificação ISSR com o iniciador $(GTG)_5$ de isolados de *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. tropicalis* (C) obtidas de pacientes portadores de AIDS e de portadores de Câncer; *C. guilliermondii* (D) e *C. parapsilosis* (E) obtidas de portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas; **URM** – amostras da coleção de cultura micoteca; **M** – *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como marcador de peso molecular.

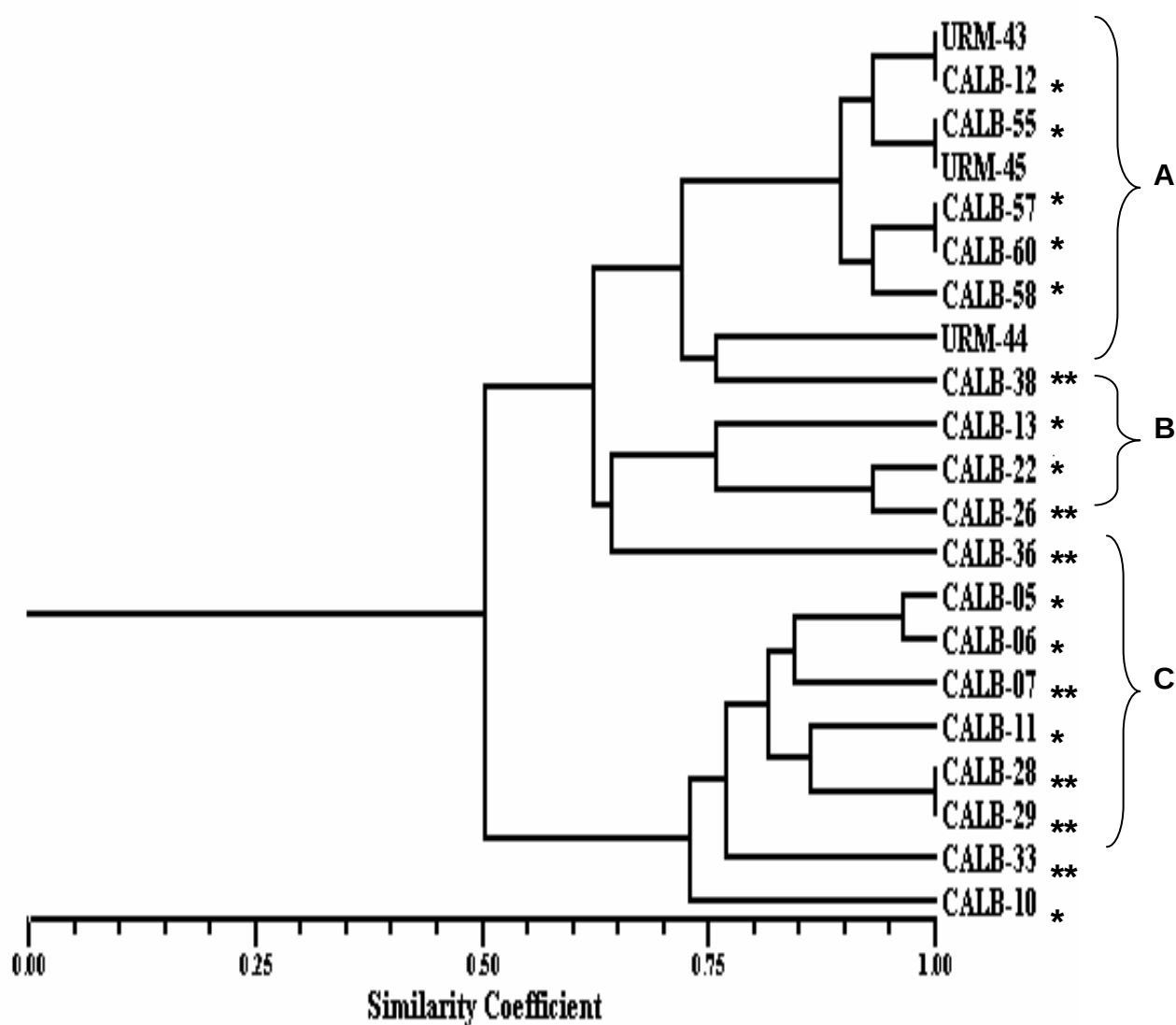


FIGURA 4. Dendrograma dos perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de isolados de *C. albicans* obtidas de pacientes portadores de AIDS(*) e de portadores de Câncer (**) atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

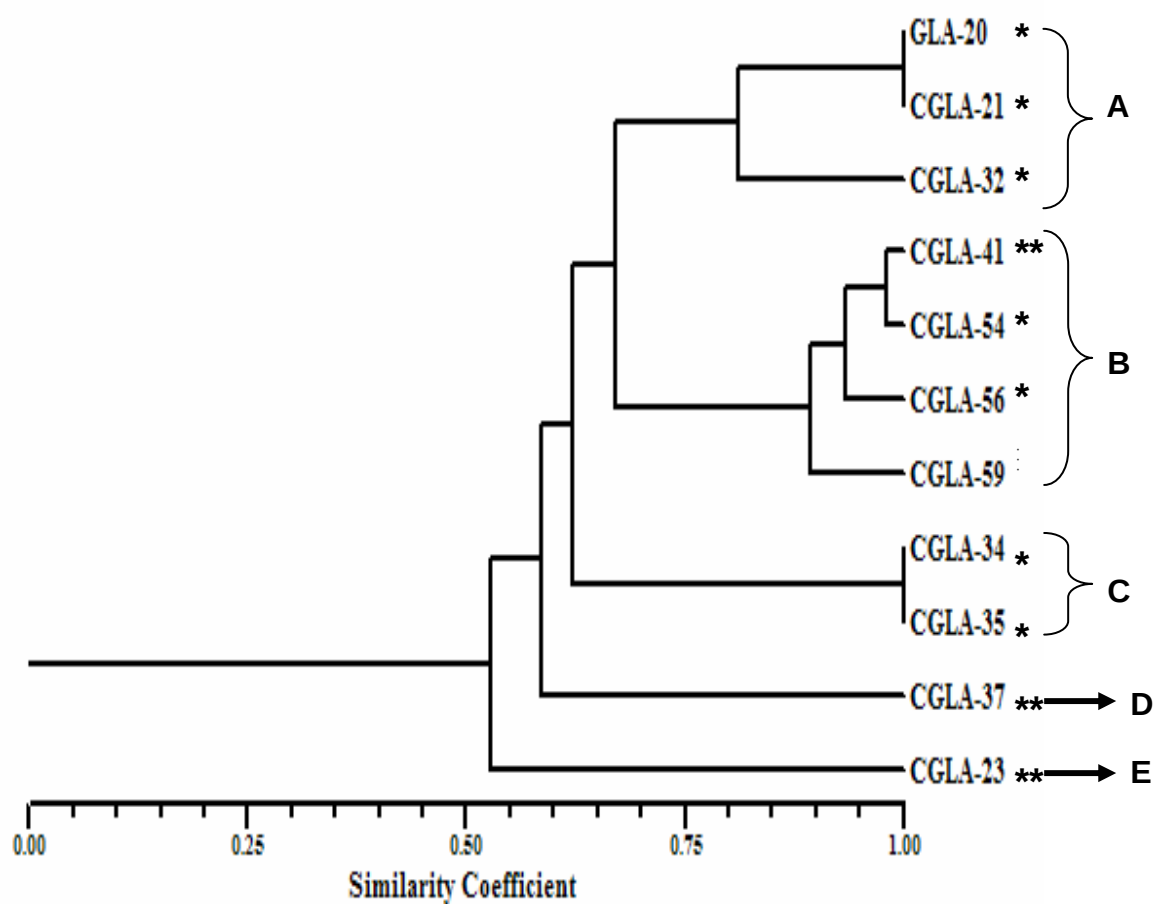


FIGURA 5. Dendrograma dos perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de isolados de *C. glabrata* obtidas de pacientes portadores de AIDS (*) e de portadores de Câncer (**) atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

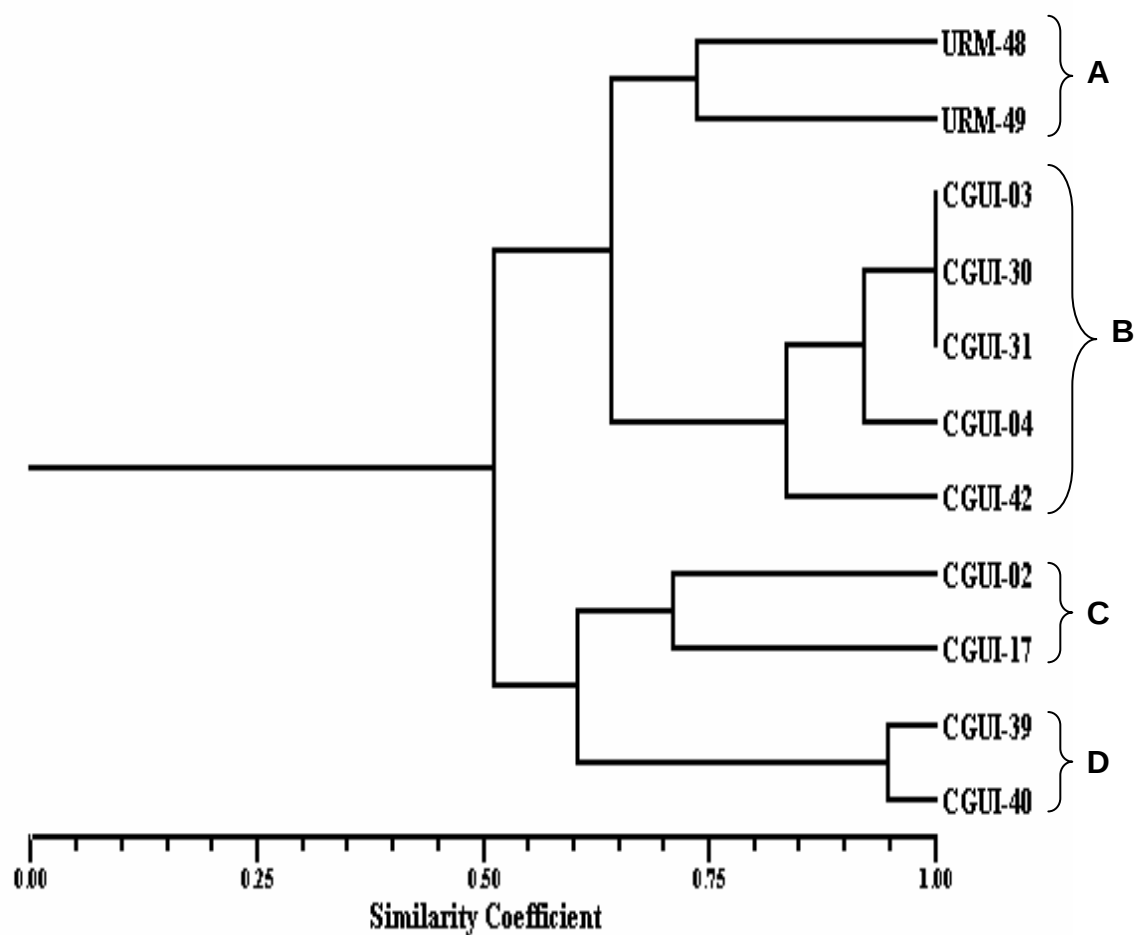


FIGURA 6. Dendrograma dos perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de isolados de *C. guilliermondii* obtidas de pacientes portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

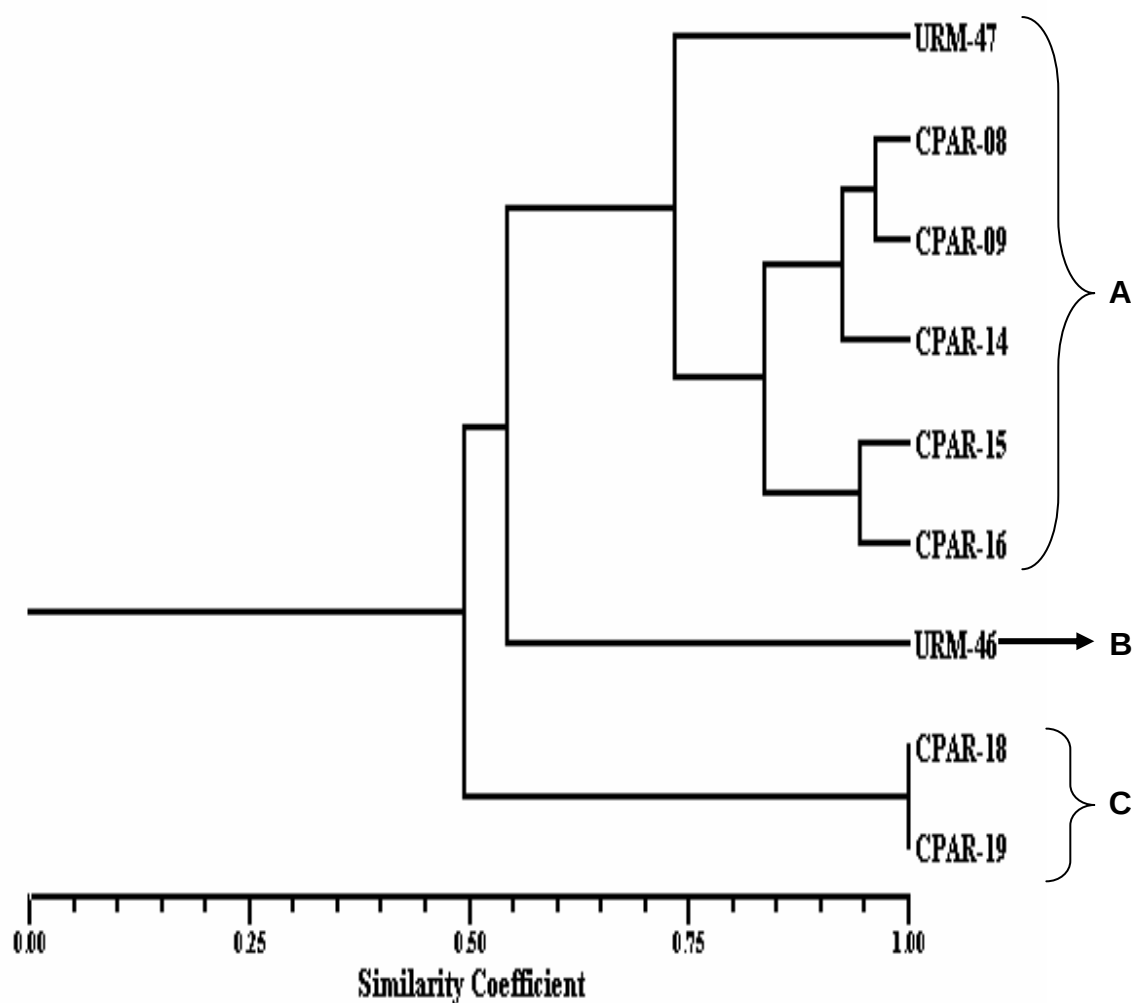


FIGURA 7. Dendrograma dos perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de isolados de *C. parapsilosis* obtidas de pacientes portadores de AIDS atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

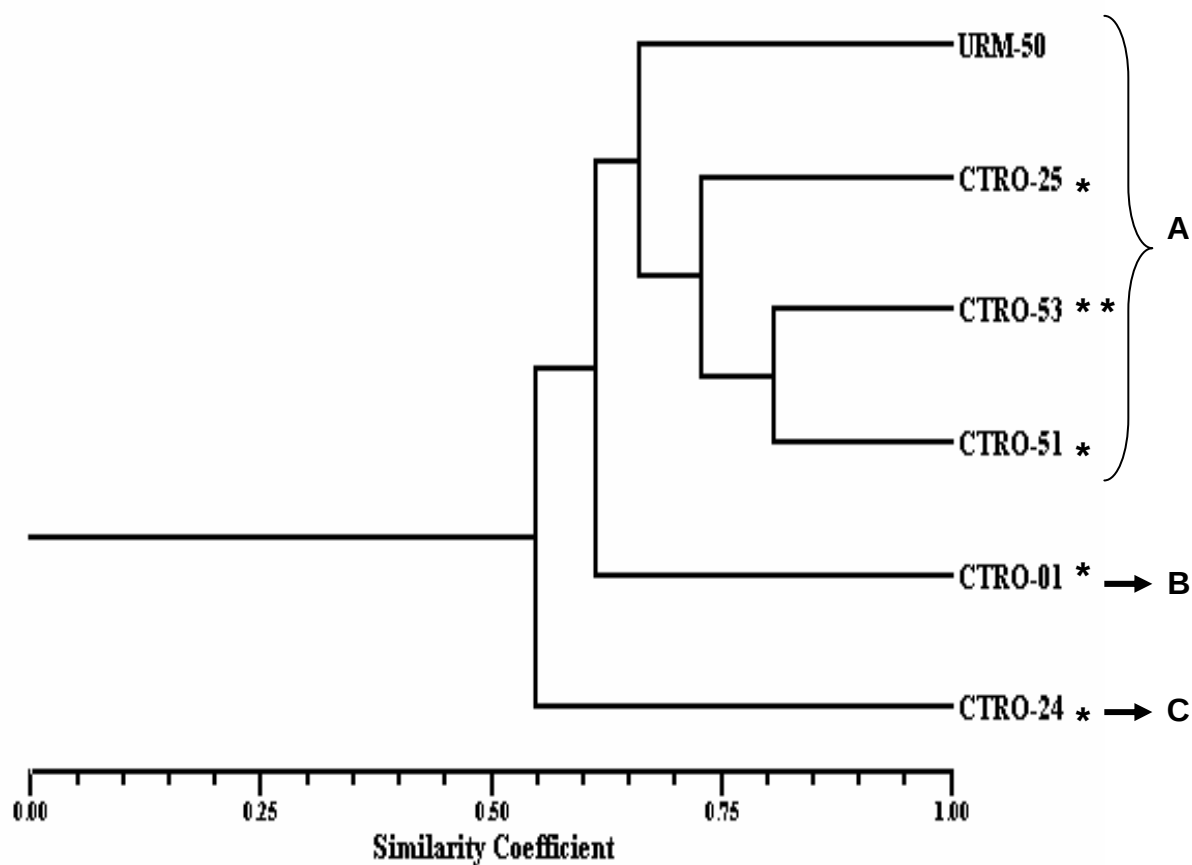


FIGURA 8. Dendrograma dos perfis obtidos da amplificação de ISSR com o iniciador (GTG)₅ de isolados de *C. tropicalis* obtidas de pacientes portadores de AIDS (*) e de portadores de Câncer (**) atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas, através do método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeasts: characteristic and identification*. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002p.
2. Brasileiro, B. T. R. V. *Variabilidade genética em isolados de Fusarium solani detectada com a utilização de marcadores moleculares*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 91p. 2003.
3. Bussad, W. O.; Miazaki, E. S.; Andrade, D. F. *Introdução à análise de agrupamentos*. Associação Brasileira de Estatística. 105p. 1990.
4. Chen, Y. C.; Eisner, J. D.; Kattan, M.M.; Rassouliau- Barret, S. L.; Lefe, K.; Yarfitz, S. L.; Limaye, A.P.; Cookson, B.T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2302-2310, 2001.
5. Chavasco, J. K.; Paula, C. R.; Hirata, M. H.; Aleva, N. A.; Melo, C. E.; Gambale, W.; Ruiz, L. S.; Franco, M. C. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 48:21-26. 2006.
6. Cirak, M. Y.; Kalkanci, A.; Kustimur, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98:1027-1032, 2003.
7. Couto, M. M. B.; Hartog, B. J.; Huis In't Veld, J. H. J.; Hofstra, H.; Van Der Vossen, J. M. B. M. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiol.*, 13: 59-67, 1996.

8. Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Imprensa Universitária, 1994. 390 p.
9. Elie, C. M.; Lott, T. J.; Reiss, E.; Morrison, C. J. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3260-3265, 1998.
10. Fungaro, M. H. P. *Uso do RAPD na taxonomia*. Anais do IX Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul. Caxias do Sul. 74p. 1995.
11. _____. *PCR na micologia: Diagnóstico e análise de variabilidade*. Biotecnologia Ciências e desenvolvimento. ano III, nº 14. 2000.
12. Frutos, R. L.; Fernandez-Espinar, M. T.; Querol, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 175-185, 2004.
13. Guillamon, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J. Querol, A. Rapid identification of wine yeast species base don RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 169: 387-392, 1998.
14. Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gené, J. Figueras, M. J. *Atlas of clinical fungi*. CBS: Spain. 2000. 1126p.
15. Hsu, Min-Chih; Chen, Kuo-Wei; Lo, Hsiu-Jung Lo; Chen, Yee-Chun; Liao, Mei-Hui; Lin, Yu-Hui; Shu-Ying Li. Species identification of medically important fungi by use of real-time Igthtcycler PCR. *J. Med. Microbiol.*, 52: 1071-1076, 2003.
16. Koneman, E.; Allen, S.; Janda, S.; Schereckenberger, P.; Winn, W. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido*, 5º ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

17. Kreger-van Rij, N. J. W. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3^a ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. Pp: 585-844.
18. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a edição. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104p.
19. _____; Machado, C.M. *Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea*. Editora BYK, São Paulo. 272p., 2000.
20. Lickfeldt, E.; Meyer, W.; Borner, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PVR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.*, 33:413-426, 1993.
21. Lodder, J. *The Yest: a taxonomic study*. Oxford: North Holand Publishing, 1970.
22. Luo, G.; Mitchell, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40:2860-2865, 2002.
23. Nazzal, D.; Yasin, S.; Abu-Elteen, K. A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. *New Microbiol.* 28: 245-250, 2005.
24. Rohlf, F. J. *NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.0*. Nova York: Exeter Software, 2002.
25. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniats, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2^a Edição. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York. 1989.
26. Silva-Filho, E. A. *Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação*. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 108p.

27. Silva-Filho, E. A.; Santos, S. K. B.; Resende, A. M.; Morais, J. O. F.; Morais Jr., M. A.; Simões, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* ., 88: 13-23, 2005.
28. Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia médica: À luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2004. 388p.
29. Thanos, M.; Schonian, G.; Meyer, W. Schweynoch, C.; Graser, Y.; Mitchell, T. G.; Presber, W.; Tietz, H. J. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:615-621, 1996.
30. Vidotto, V. *Manual de micologia médica*. Tecmedd: São Paulo. 204p. 2004.
31. White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSK, J. J. & WHITE, T. J. (ED), PCR Protocols, a guide to methods and applications. *New York. Academic Press*. 1990. p. 315-322.
32. Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2476-2479. 1995.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Pacientes portadores de AIDS e Câncer apresentam grande predisposição ao isolamento de leveduras por se tratar de um grupo imunodeprimido e que a presença de qualquer microrganismo pode causar infecções graves se não forem diagnósticas precocemente;
2. O espécimen clínico de maior ocorrência para isolamento de leveduras foi a secreção de orofaringe tanto nos pacientes portadores de AIDS como de Câncer;
3. A *Candida albicans* foi a espécie de maior ocorrência nos dois grupos de pacientes seguida de *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*;
4. Em pacientes portadores de Câncer não foram isoladas *C. guilhermondii* e *C. parapsilosis*;
5. Todos os marcadores moleculares mostraram-se eficientes, reprodutíveis e auxiliam na identificação convencional, constituindo-se em ferramentas apropriadas para caracterização genética entre espécies de *Candida*.

6. ANEXOS

6. 1 FICHA DO PACIENTE

FICHA DO PACIENTE

N.º do Prontuário		N.º Pesquisa	
-------------------	--	--------------	--

DADOS PESSOAIS

Nome	
------	--

Endereço	
----------	--

Sexo	Masculino		Feminino	
------	-----------	--	----------	--

Ocupação	
----------	--

Idade		Estado Civil	
-------	--	--------------	--

DADOS RELACIONADOS COM A DOENÇA

Doença de	AIDS		CÂNCER		Tipo de	
-----------	------	--	--------	--	---------	--

Início da		Tratamento	
-----------	--	------------	--

Lesões preexistentes	Sim		Não		N.º de lesões	
----------------------	-----	--	-----	--	---------------	--

Qual?		Local	
-------	--	-------	--

Sintomas	
----------	--

Protocolo	
-----------	--

Grupo de	
----------	--

Teste de Elisa	
----------------	--

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO**SANGUE****Exame Direto**

--

Cultura

--

Conclusão**Agente Etiológico****DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO****URINA****Exame Direto****Cultura****Conclusão****Agente Etiológico****DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO****OROFARINGE****Exame Direto****Cultura****Conclusão****Agente Etiológico****CONCLUSÃO GERAL**

6.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, paciente matriculado no _____ com registro _____, tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo intitulado “Fungos em pacientes portadores de HIV/AIDS atendidos no Hospital escola Dr. Helvio Auto/ECMAL de Maceió-Alagoas, Brasil”, recebi da estudante de doutorado da Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco Maria Anilda dos Santos Araújo professora substituta da Universidade Federal de Alagoas, responsável pela execução da mesma os seguintes esclarecimentos que me permitiram compreender sem dificuldade e perfeitamente os seguintes aspectos:

1. Que o estudo se propõe a coletar amostras clínicas de secreção da orofaringe, sangue e urina, como também se necessário realizar a raspagem da pele;
2. Que a importância deste estudo é a de diagnosticar doenças causadas por fungos nas diferentes amostras clínicas coletadas;
3. Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: identificar as espécies de fungos isoladas
4. Que esse estudo começará em janeiro de 2005 e terminará em dezembro de 2005;
5. Que o estudo será realizado da seguinte maneira: coleta de amostras clínicas, identificação das espécies, emissão dos resultados dos exames, encaminhamentos dos resultados aos hospitais e analisar geneticamente as diferentes espécies isoladas e identificadas;
6. Que eu participarei das seguintes etapas: coleta de amostras clínicas e recebimento do resultado do exame;
7. Que as alternativas conhecidas para se obter os mesmos resultados são as seguintes: não existe outro método para o isolamento e identificação de fungos causadores de micoses;
8. Que os desconfortos que poderei sentir durante a minha participação são os seguintes: não haverá desconforto para a coleta de amostras clínicas;
9. Que não existe riscos à minha saúde física e mental, pois todo material utilizado na coleta de amostras estão esterilizados e que será realizado por profissionais qualificados;
10. Que continuarei sendo atendido no referido hospital e dispondo de toda a atenção, independente de minha participação na pesquisa;
11. Que os benefícios que deverei esperar com minha participação, são: a detecção da doença causada por fungos e um tratamento específico para determinada micose que deverá ser efetuado pela equipe de médicos do hospital.
12. Que a minha participação na pesquisa será acompanhada pelos médicos dos hospitais, desde a coleta de amostras clínicas, encaminhamento dos resultados dos exames e tratamento;

13. Que, sempre que desejar, me foram dados esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;

14. Que eu poderei, a qualquer momento, recusar-me a continuar participando do estudo e também a retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

15. Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações ficará restrita ao âmbito técnico ou científico;

16. Que eu deverei ser indenizado por qualquer despesa que venha a sofrer pela minha participação nesse estudo e, também, por quaisquer danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para essas despesas, foi-me assegurada à existência de recursos específicos;

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que minha participação implicarão, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE QUALQUER CONSTRANGIMENTOS OU IMPOSIÇÃO me obriguem a isso.

Endereço do participante-voluntário(a):

Domicílio: _____ N° _____

Complemento: _____ Bairro: _____

CEP: _____ Cidade: _____ UF: _____

Telefone: _____ Ponto de referência: _____

Contato de Urgência: _____

Endereço dos responsáveis pela pesquisa:

Instituição: Universidade Federal de Alagoas - Centro de Ciências Biológicas

Endereço: Praça Afrânio Jorge s/n, Prado

CEP: 57010-000

Cidade: Maceió UF: Alagoas

Telefones para contato: (82) 223-5613/376-9236/9341-7177

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa:

Instituição: Universidade Federal de Alagoas - Reitoria, 1º Andar, sala do COC

Endereço: Campus A. C. Simões, BR 104 - Norte, Km 97, Tabuleiro dos Martins

CEP: 57072-970 Cidade: Maceió UF: Alagoas

Telefones para contato: (82) 214-1053

FAX (82) 214-1600

Maceió, _____ de _____ de _____

 Assinatura ou impressão datiloscópica do voluntário ou responsável legal	 Assinatura do responsável pelo estudo
---	--

6. 3 REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

1



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 (versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página 2.

1. Projeto de Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE FUNGOS ISOLADOS DE PACIENTES PORTADORES DE AIDS E CÂNCER ATENDIDOS EM HOSPITAIS ESCOLA DE MACEIÓ-ALAGOAS, BRASIL.			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) CIÊNCIAS BIOLÓGICAS		3. Código: 2.12	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4) D
5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso)		6. Código(s):	7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV ()
8. Unitermos: (3 opções) FUNGOS, AIDS, CÂNCER E ISOENZIMAS			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos No Centro : Total:	10. Grupos Especiais : <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião /Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros (X) Não se aplica ()		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: MARIA ANILDA DOS SANTOS ARAÚJO			
12. Identidade: 2000001059917 SSP/AL	13. CPF.: 759002204-78	19. Endereço (Rua, n.º): RUA: CONS. FRANCISCO VIEIRA, 23, PRADO	
14. Nacionalidade: BRASILEIRA	15. Profissão: BIÓLOGA	20. CEP: 57011-020	21. Cidade: MACEIÓ
16. Maior Titulação: MESTRE EM BIOLOGIA DE FUNGOS	17. Cargo: PROFESSOR SUBSTITUTO	23. Fone: 0XX82-376-9236	24. Fax:
18. Instituição a que pertence: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS			25. Email: anildaraujo@ibest.com.br
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: <u>06/08/03</u>			
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO - HU		29. Endereço (Rua, n.º): CAMPUS A. C. SIMÕES, BR 104 NORTE KM 97, TABULEIRO DOS MARTINS	
27. Unidade/Órgão: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA-LAB. MICOLOGIA		30. CEP: 57072-970	31. Cidade: MACEIÓ
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		33. Fone: 0XX82-214-1110	34. Fax: 0XX82-221-2501
35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional (X) Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: <u>Rosana Vilela</u> Cargo: <u>Profª Rosana Quintela Brandão Vilela</u> Data: <u>21/07/03</u>			
PATROCINADOR			
36. Nome:		39. Endereço:	
37. Responsável:		40. CEP:	41. Cidade:
38. Cargo/Função:		43. Fone:	44. Fax:
		42. UF:	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP			
45. Data de Entrada: <u>06/08/2003</u>	46. Registro no CEP: <u>0074 H/2003-41</u>	47. Conclusão: Aprovado (X) Data: <u>18/12/2003</u>	48. Não Aprovado () Data: / /
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: <u>1 A CADA TRÊS MESES.</u> Data: <u>18/03/2004</u> Data: <u>18/06/2004</u>			
Encaminho a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação () 52. Data: / /		53. Coordenador/Nome: <u>Carla de Fátima Pereira</u> Anexar o parecer consubstanciado	
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP			
54. Nº Expediente:	56. Data Recebimento:	57. Registro na CONEP: 	
55. Processo:			
58. Observações:			

6.4. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DOS ARTIGOS



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)
- [Preparação de originais](#)

ISSN 1517-8382 versão
impressa
ISSN 1678-4405 versão online

Objetivo e política editorial

A **Brazilian Journal of Microbiology** destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e, ocasionalmente, revisões, envolvendo todos os aspectos da microbiologia. Os textos submetidos à publicação devem ser redigidos em inglês, e conter Título, Resumo e Palavras-chave também em português. A **Brazilian Journal of Microbiology** tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

Enviando originais para publicação

Ser membro da Sociedade Brasileira de Microbiologia não é um pré-requisito para a aceitação de um manuscrito para publicação. Trabalhos de pesquisadores do Brasil e de outros países, não membros da SBM, são igualmente considerados para publicação.

Quando um manuscrito é submetido à publicação, entende-se que todos os autores e suas instituições estão de acordo com a publicação. Manuscritos submetidos à publicação na **Brazilian Journal of Microbiology** não podem ter sido publicados anteriormente (exceto na forma de resumo), nem ter sido submetidos à publicação em outro periódico.

Brazilian Journal of Microbiology não assume qualquer responsabilidade por erros cometidos pelos autores. Além disso, a **Brazilian Journal of Microbiology** não assume qualquer responsabilidade pelas conclusões dos autores.

Todos os manuscritos devem ser submetidos em triplicata aos [Editores](#), e enviados ao endereço abaixo (por e-mail ou por fax não são aceitos).

Publicação de um manuscrito

Manuscritos são aceitos para publicação somente após criticamente revisados. Os trabalhos são avaliados por revisores indicados pelo Editores. Após a revisão, os manuscritos são devolvidos para o autor indicado, para as correções sugeridas pelos revisores, quando necessárias. Os autores devem retornar o novo texto para os Editores. O autor indicado recebe uma notificação sobre o recebimento, a aceitação ou a recusa de um trabalho submetido à publicação.

Quando um manuscrito é aceito, o autor indicado é avisado sobre a necessidade

de envio de um disquete de computador contendo o texto. O autor indicado receberá provas tipográficas para correção, que deverão ser cuidadosamente revisadas de acordo com as instruções enviadas e devolvidas no prazo de 5 dias.

Preparação de originais

Tipos de trabalhos

Os seguintes tipos de trabalho podem ser publicados na **Brazilian Journal of Microbiology**:

Trabalho de pesquisa relata os resultados de pesquisa original ainda não publicada. O texto deve ter de 12 a 15 páginas impressas, em espaço duplo, além das referências bibliográficas, tabelas e figuras pertinentes. Um Resumo com Título e Palavras-chave em português também devem ser incluídos.

Nota breve é um relato conciso de novas e importantes descobertas. A Nota Breve deve ser redigida de acordo com as instruções para a preparação de Trabalho de Pesquisa, mas sem as divisões em tópicos. Os Resumos em português e em inglês devem conter no máximo 50 palavras. Tabelas e Figuras devem limitar-se a duas tabelas ou duas figuras, ou uma tabela e uma figura. A designação **short communication** aparecerá no topo do trabalho. O autor deve indicar que o manuscrito é uma nota breve, permitindo que o texto seja avaliado de maneira apropriada.

Mini-revisão - Artigos de revisão serão sobre temas de interesse geral na área de microbiologia, escritos por especialistas convidados. Além dos resumos em inglês e em português, o texto poderá ter também um índice.

Preparação do texto

Geral

1. Todos os manuscritos devem ser datilografados em espaço duplo, com amplas margens, com as páginas numeradas em seqüência. Trabalhos de pesquisa devem ter no máximo 15 páginas impressas, incluindo figuras e tabelas. Notas breves devem ter no máximo 6 páginas.
2. Todos os manuscritos devem ser redigidos em inglês. Os Editores recomendam que, antes de ser submetido, o texto seja cuidadosamente revisado por alguém fluente em inglês. Manuscritos em inglês precário não serão aceitos.
3. O texto deve ser organizado em tópicos, conforme descrito no próximo parágrafo. O nome dos tópicos deve ser digitado em letras maiúsculas (ABSTRACT, INTRODUCTION etc.). A citação de tabelas e de figuras deve iniciar com maiúsculas (as shown in Table 1..., as presented in Fig. 2..., etc.).
4. A abreviação de palavras e de símbolos deve seguir as recomendações da IUPAC-IUB Commission. O Sistema Métrico deve ser adotado em todo o texto.
5. Como regra, as referências devem ser citadas por seus números. Excepcionalmente, quando autores são mencionados no texto, a menção deve ser feita de acordo com os seguintes exemplos: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número)

mentioned that... Não utilizar letras maiúsculas.

6. Aos autores dos trabalhos aceitos para publicação será solicitado o envio de um disquete de 3 1/2" contendo o trabalho digitado em um processador de texto adequado para PC. Esse material pode ser enviado também por correio eletrônico.

Organização

Página de título: Uma página separada deve conter o título do trabalho, o nome completo (inclusive o primeiro nome e as iniciais intermediárias) e a afiliação de cada autor. Um asterisco deve indicar o autor para correspondência. Os números de telefone e fax e o endereço eletrônico, quando disponível, devem ser assinalados no pé da página. A página de título não deve ter nenhum texto. O título deve ser o mais conciso possível e indicar claramente o objetivo do trabalho, não devendo conter abreviações. Expressões do tipo "Effects of...", "Influence of...", "Study on..." etc. devem ser evitadas. O título deve ser preparado com muito cuidado pois ele é utilizado nos sistemas de busca.

Abstract: Deve ser apresentado em uma página separada, limitando-se a no máximo 250 palavras. Ele deve resumir o conteúdo básico do trabalho, devendo ser compreensível mesmo sem a consulta do texto completo. Um *abstract* não deve conter referências, tabelas ou abreviações incomuns. *Abstracts* devem ser preparados com muito cuidado pois são publicados em textos de referência e lidos por pessoas que não têm acesso ao trabalho completo. Três a cinco *keywords* também devem ser apresentados.

Resumo: *Resumo* é o *abstract* redigido em português. Sua preparação deve seguir as recomendações para a preparação do *abstract* em inglês. O *resumo* deve ter também um título em português. As regras para o título em português são as mesmas para o título em inglês (ver acima). Três a cinco *palavras-chave* também devem ser apresentadas. O *resumo* e o título em português também devem ser apresentados em página separada.

Introdução: Deve iniciar em página nova e fornecer ao leitor informações suficientes para que os resultados relatados no trabalho possam ser avaliados sem consulta à literatura. Entretanto, a *introduction* não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve também dar subsídios para a compreensão dos objetivos do trabalho que está sendo apresentado.

Materiais e Métodos: Esse tópico deve fornecer informações suficientes para a repetição do trabalho. Descrição repetida de detalhes de técnicas anteriormente publicadas deve ser evitada. Quando um método publicado é modificado pelos autores, essas modificações devem constar do texto. A origem de reagentes, meios de cultura e equipamentos (companhia, cidade, estado, país) deve ser mencionada. Nomes comerciais e marcas registradas também devem ser indicados. A utilização de subtópicos geralmente facilita a leitura e a compreensão desse item.

Resultados: Esse tópico deve, através de texto, tabelas ou figuras, fornecer os resultados experimentais. Caso um tópico relativo à *Discussion* seja incluído, evitar a excessiva interpretação dos resultados, que deverá ser feita na *Discussion*. Caso *Results* e *Discussion* sejam combinados em um único tópico, os resultados devem ser discutidos no texto quando adequado. Tabelas devem ser numeradas independentemente das figuras, devendo-se utilizar números arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto. A

localização mais adequada das tabelas e figuras deve ser assinalada.

Discussão: Deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações disponíveis.

Agradecimentos: Esse tópico é opcional e deve vir após a discussão. Destina-se a agradecimentos por apoio financeiro e pessoal.

Referências: A lista de referências bibliográficas deve ser apresentada em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Todos os autores devem ser mencionados. As referências devem ser numeradas em ordem crescente. Cada referência deve ser citada no texto por seu número. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o sistema utilizado pelo *Biological Abstracts* ou *Chemical Abstracts*. Todas as referências mencionadas na lista devem ser citadas no texto, assim como todas as referências citadas no texto devem constar da lista. Seguir os seguintes exemplos:

a. Artigo em revista

Campos, L.C.; Whittam, T.S.; Gomes, T.A.T.; Andrade, J.R.C.; Trabulsi, L.R. *Escherichia coli* serogroup 0111 includes several clones of diarrhaegenic strains with different virulence properties. *Infect. Immun.* , 62:3282-3288, 1994.

b. Trabalho ou capítulo em livro

Nelson, E.B. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. *In*: Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G.; Knudsen, G. (eds). *Handbook of applied mycology: soils and plants*. Marcel Dekker, New York, 1991, p.327-355.

c. Livro pelos autores

Salyers, A.A.; Whitt, D.D. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. ASM, Washington, 1994, 418p.

d. Patente

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. Manufacture of cottage cheese. *U.S. Pat.* 3,117,870. Jan.14, 1964.

e. Tese

Calzada, C.T. *Campylobacter jejuni e Campylobacter coli – caracterização em sorogrupos e biotipos das cepas isoladas no município de São Paulo no período de 1983-1989*. São Paulo, 1991, 131p. (Ph.D. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Publicação com autor ou editor desconhecido

Anonymous. The economy of by-products. *Álcool Alcoolquim.*, 2: 33-40, 1985.

g. Comunicações em eventos (Simpósios, Conferências etc.)

Simões, G.S.; Silva, J.; Toledo, A.S.; Gontijo Filho, P.P. *Micobactérias não tuberculosas isoladas de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida*. XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1993, p.41.

Referências como *personal communication* ou *unpublished data* devem ser evitadas, embora algumas vezes elas sejam necessárias. Nesses casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências bibliográficas. Referências a respeito de trabalhos *accepted for publication* ou *in press* podem ser utilizadas. No entanto, referências de trabalhos *submitted* ou *in preparation* não devem ser utilizadas.

Tabelas

As tabelas não devem estar no meio do texto. Cada tabela deve ser apresentada em uma página separada e numerada em sequência empregando números arábicos. O título da tabela deve aparecer no topo, e descrever de maneira clara as informações apresentadas. Títulos e subtítulos devem ser concisos, apresentando os dados em colunas e linhas, cuidadosamente arranjadas.

Figuras

As figuras devem ser identificadas com números arábicos. Dados apresentados em tabelas não devem ser repetidos nas figuras. A legenda deve vir no pé da figura.

Fotografias e desenhos

Apenas fotografias extremamente necessárias para a compreensão do trabalho devem ser apresentadas. Sua qualidade deve ser suficiente para garantir boa reprodução. As fotografias devem ser numeradas no verso e identificadas com o nome do autor. No caso de desenhos, os detalhes devem ter qualidade suficiente para permitir redução. Desenhos e figuras devem ser desenhados ou impressos em preto e devem ser preparados como indicado para as fotografias. Ilustrações coloridas não são aceitas.

Cópias

O autor indicado receberá gratuitamente quinze cópias do trabalho. Cópias adicionais, pagas, devem ser requisitadas no retorno da prova gráfica corrigida.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

Departamento de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214
Cidade Universitária
05508-900 São Paulo SP - Brasil
Tel. / Fax: +55 11 3813-9647



bjm@sbmicrobiologia.org.br