



ADRIANA PATRICIA MEDEIROS DE SOUZA

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ESPÉCIES
DE *Candida* OBTIDAS DE PORTADORES DE TUMORES DE ÓRGÃOS
SÓLIDOS OU LINFOMAS COM INFECÇÃO FÚNGICA**

**RECIFE
FEVEREIRO/2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ESPÉCIES
DE *Candida* OBTIDAS DE PORTADORES DE TUMORES DE ÓRGÃOS
SÓLIDOS OU LINFOMAS COM INFECÇÃO FÚNGICA**

**ADRIANA PATRICIA
MEDEIROS DE SOUZA**

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

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**RECIFE
FEVEREIRO/2012**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Adriana Patrícia Medeiros de

Formação de biofilme e atividades enzimáticas de espécies de *Candida* obtidas de portadores de tumores de órgãos sólidos ou linfomas com infecção fúngica/ Adriana Patrícia Medeiros de Souza– Recife: O Autor, 2012.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Candida* 2. Linfoma 3. Neoplasias I. Magalhães, Oliane Maria Correia (orientadora) II. Título**

616.969

CDD (22.ed.)

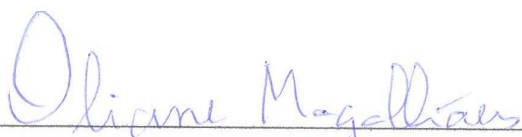
UFPE/CCB- 2012- 309

ADRIANA PATRICIA MEDEIROS DE SOUZA

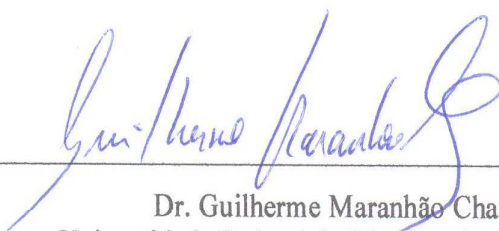
Data da defesa: 29/02/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES



Dra. Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco



Dr. Guilherme Maranhão Chaves
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
Universidade Federal de Pernambuco

Para minha mãe, exemplo de amor,
serenidade e força, meu apoio mesmo
estando em outro plano.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, Pai de bondade infinita, sem a permissão do qual, sequer uma folha se desprende da árvore.

À espiritualidade superior, que nos traz a inspiração necessária quando achamos que já fizemos tudo o que era possível.

A meus pais, José Joaquim de Oliveira, Maria Anunciação de Oliveira e Marineide Medeiros de Sousa, que me incentivaram a buscar uma melhor formação e sempre têm sido fontes de amor incondicional e apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã, Andressa Miqueline, por seu carinho e apoio e por, assim como meus pais, sempre acreditar na minha capacidade de crescimento.

Ao meu noivo, Renato César, o qual dividiu comigo as angústias e alegrias da obtenção de amostras clínicas e realização de experimentos. Por ser o companheiro para todos os momentos e situações.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

À minha orientadora, Dra. Oliane Magalhães, pelas horas de atenção concedidas, pela dedicação e incentivo, e por seu exemplo de profissional e ser humano ético e justo.

À equipe do Hospital do Câncer de Pernambuco e do Hospital Geral Otávio de Freitas.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Milton Bezerra Sobral FUSAN (LACEN - PE), nas pessoas de Valdelucia Oliveira Cavalcanti e Luciana Rezende Bandeira de Mello.

Aos professores Rejane Pereira Neves e Armando Marsden, pelo auxílio prestado na leitura de lâminas de exame direto e identificação dos isolados.

Aos colegas da pós-graduação e dos laboratórios de Imunodiagnóstico de Infecções Fúngicas e de Micologia Médica, em especial aos amigos Ildnay Brandão, Michele Chianca, Mona Lisa Venâncio, Carolina Silva, Nadyr Pedi, Fabíola Gomes, Heloiza Oliveira, Daniela Buonafina, Fabíola Marques, Suanni Lemos, Ana Maria

Parahym, Rubem Moraes, Dianny Caroline, Phelipe Oller, Nelson Lima Júnior, Carla Lira, Elvislene Leite, pela ajuda em diversos momentos e por compartilharem momentos difíceis em meio a disciplinas e experimentos que não produziram o resultado esperado, mas também alegrias e momentos de descontração.

A todos os amigos, que apesar da distância me incentivaram e me deram forças para enfrentar com serenidade as dificuldades que se apresentaram em meu caminho durante toda a minha vida e em especial nos últimos dois anos. Muito obrigada!

RESUMO GERAL

As doenças neoplásicas representam um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e países em desenvolvimento. A quimioterapia e radioterapia deprimem o sistema imune do indivíduo predispondo-o a infecções fúngicas oportunistas. O desenvolvimento da infecção e o grau de lesão que esta provoca envolvem fatores de virulência produzidos pelo patógeno. Os objetivos desse estudo foram investigar a incidência de candidíases em portadores de neoplasias sólidas ou linfomas e a expressão dos fatores de virulência dos agentes etiológicos bem como analisar dados de importância epidemiológica. As amostras clínicas foram coletadas e processadas para exame direto, cultura e identificação dos agentes através das características morfológicas e fisiológicas e metodologia automatizada. A detecção da formação de biofilme foi realizada utilizando o método semi-quantitativo baseado na coloração e a atividade enzimática foi detectada em meios agarizados contendo diferentes substratos. Foram diagnosticados 18 casos de candidíases, sendo candidíase oral a mais prevalente e *Candida albicans* a espécie mais frequentemente isolada. Não foi possível estabelecer associação com a ocupação ou sexo dos pacientes. A faixa etária mais acometida foi 50 a 69 anos e o tratamento quimioterápico representou um importante fator para o desenvolvimento de candidíases. Sessenta e sete por cento dos agentes obtidos formaram biofilme e *C. famata* apresentou maior atividade proteásica e fosfolipásica. Esse trabalho possibilitou a avaliação de candidíase em portadores de neoplasias sólidas ou linfomas, abordando os fatores de virulência.

Palavras-chave: Neoplasias sólidas, linfomas, candidíases, biofilme, atividade proteásica, atividade fosfolipásica.

ABSTRACT

The neoplastic diseases represent an important public health problem in both developed countries and those in development. Chemotherapy and radiation therapy suppress the immune system, predisposing the individual to opportunistic fungal infections. The development of infection and degree of damage it causes involve virulence factors produced by pathogens. The aims of this study were to investigate the incidence of candidiasis in patients with solid tumors and lymphomas and to analyze expression of virulence factors of etiologic agents as well as findings of epidemiological importance. Clinical samples were collected and processed for direct examination, culture and agents identification through the morphological and physiological characteristics and automated methodology. Detection of biofilm formation was performed using semi-quantitative method based on staining and enzyme activity was detected in agar media containing different substrates. We diagnosed 18 cases of candidiasis, oral candidiasis being the most prevalent and *Candida albicans* the most frequently isolated specie. It was not possible to establish association with the patients' occupation or gender. The most affected age group was 50 to 69 years and chemotherapy represented an important factor for the development of candidiasis. Sixty-seven percent of the agents obtained formed biofilms and *C. famata* showed higher phospholipase and protease activity. This work enabled the assessment of fungal infections in patients with solid tumors or lymphomas, addressing virulence factors.

Key-words: Solid malignancies, lymphoma, candidiasis, biofilm, protease activity, phospholipase activity.

Lista de abreviaturas

BSA	Albumina de Soro Bovino
CL	Caseína do Leite
CMC	Candidíase Muco-Cutânea Crônica
COF	Candidíase Orofaríngea
CVV	Candidíase Vulvo-Vaginal
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IFI	Infecções Fúngicas Invasivas
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MSG	Mycoses Study Group
µL	Microlitros
OMS	Organização Mundial de Saúde
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SAP	Proteinase Aspártica Secretada
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
ZA	Zona de Atividade

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – Aspecto de lesões em pacientes com tumores sólidos.....	34
Figura 2 – Percentual dos pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas com hipótese diagnóstica de micose de acordo com o sexo.....	35
Figura 3 –Faixa etária dos pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas diagnosticados com candidíase.....	36
Figura 4. Exame direto de amostras clínicas.....	39
Figura 5. Aspecto característico de cultivo primário de <i>Candida</i> spp.....	39
Figura 6. Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	43
Figura 7. Detecção da atividade proteásica por <i>Candida albicans</i> (URM 6549) utilizando BSA como substrato.....	45
Figura 8. Detecção da atividade fosfolipásica por <i>Candida famata</i> (URM 6556) utilizando lecitina de soja como substrato.....	49

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Dados epidemiológicos dos pacientes portadores de neoplasias sólidas diagnosticados com candidíases.....	37
Tabela 2. Espécies de <i>Candida</i> identificadas como agentes etiológicos de micoses no grupo de pacientes estudado.....	41
Tabela 3. Avaliação da capacidade de formação de Biofilme e detecção da atividade enzimática de fungos isolados de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas.....	47

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. Câncer.....	14
2.2. Infecções fúngicas oportunistas.....	16
2.3. Candidíases.....	18
2.4 Espécies de <i>Candida</i>	21
2.5 Fatores de virulência.....	24
Formação de biofilme.....	25
Produção de enzimas extracelulares: proteases e fosfolipases.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Local de coleta.....	29
3.2 Coleta de amostras.....	29
3.3 Processamento das amostras clínicas.....	30
3.4 Identificação dos isolados.....	30
Características macroscópicas.....	30
Características microscópicas.....	30
Características fisiológicas.....	31
3.5 Detecção da formação de biofilme.....	31
3.6 Detecção da atividade enzimática.....	31
Preparo do inóculo.....	31
Atividade proteásica.....	32
Atividade fosfolipásica.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Dados epidemiológicos e diagnóstico laboratorial micológico.....	34
4.2 Diagnóstico laboratorial e identificação dos isolados.....	38
4.3 Formação de biofilme.....	42
4.4 Detecção da atividade enzimática.....	45
5. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	64

1. INTRODUÇÃO

As doenças neoplásicas têm se revelado um evidente problema de saúde pública mundial, com ocorrência tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. No Brasil, para o ano de 2012, estima-se a ocorrência de mais de meio milhão de novos casos da doença, desses, 98% surgirão em órgãos sólidos. Hábitos como tabagismo, etilismo, má alimentação e infecções virais ou bacterianas, além de fatores genéticos, são condições predisponentes ao desenvolvimento de neoplasias malignas (INCA, 2011).

O avanço na terapia vem possibilitando maior sobrevida a esse grupo de pacientes, no entanto, a quimioterapia e radioterapia apresentam propriedades mielotóxicas e, portanto, deprimem o sistema imune do indivíduo, predispondo-o a uma série de infecções oportunistas, como as de etiologia fúngica (García-Ruiz *et al.*, 2004).

A grande maioria dos estudos acerca de infecções oportunistas em portadores de câncer envolve pacientes com doenças hematológicas malignas (Iwen *et al.*, 2000; Velasco *et al.*, 2003; Cornely *et al.*, 2009), enquanto os dados sobre fatores de risco em pacientes portadores de tumores sólidos são esparsos (DiNubile *et al.*, 2005; Shahid *et al.*, 2008).

Entre os principais agentes envolvidos nas infecções fúngicas oportunistas estão as leveduras do gênero *Candida*. As infecções envolvendo esses agentes, especialmente as profundas ou invasivas (IFI), elevam consideravelmente os índices de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Ascioglu *et al.*, 2002). Além de serem responsáveis por permanência prolongada em hospitais e altos custos associados à assistência à saúde (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2006).

Geralmente, espécies de *Candida* são encontradas como organismos comensais habitando o trato gastrointestinal, mucosas oral e vaginal de indivíduos saudáveis. No entanto, quando esse delicado equilíbrio entre os dois organismos é alterado, aquele considerado até então colonizante passa a provocar infecções de membranas mucosas ou infecções disseminadas desenvolvendo hábito parasita (Kim; Sudbery, 2011).

Dentro do gênero, *C. albicans* é considerada a principal espécie causadora de IFI, porém outras espécies vêm se destacando como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. A utilização profilática do antifúngico fluconazol foi um dos importantes fatores para o surgimento das infecções causadas por leveduras naturalmente resistentes a este triazólico.

Algumas espécies são mais isoladas na presença de cateteres vasculares e nutrição parenteral, enquanto outras se encontram associadas a determinadas patologias como o próprio câncer e estados de neutropenia (Colombo *et al.*, 2006).

A capacidade de um fungo causar doença em outro organismo envolve mecanismos que permitem a adesão e a invasão da célula/tecido do hospedeiro com posterior dano tecidual superficial ou profundo. Dentre outros fatores, destacam-se o crescimento a 37 °C, a formação de biofilme e a produção de enzimas extracelulares, como proteases e fosfolipases.

O biofilme é amplamente associado à virulência de patógenos, uma vez que a maioria deles desenvolve essa estrutura (Ramage *et al.*, 2005).

A produção de enzimas está envolvida em processos como crescimento e multiplicação fúngica, invasão e dano ao tecido hospedeiro (Lacaz *et al.*, 2002; Koga-Ito *et al.*, 2006; Mohandas e Ballal, 2008).

É razoável pensar que em pacientes com sistema imune comprometido a expressão de alguns desses fatores não ocorreria ou aconteceria em menor grau, uma vez que o ambiente apresentaria menor resistência ao estabelecimento e multiplicação do agente infeccioso.

Devemos considerar os dados referentes ao aumento dos índices de morbidade e mortalidade e dos custos com tratamentos e internações hospitalares decorrentes de uma infecção fúngica, bem como as lacunas existentes acerca dessas infecções nesse grupo de pacientes relacionando os fatores de virulência dos agentes etiológicos. Além disso, o diagnóstico precoce e eficaz, bem como a identificação de possíveis alvos terapêuticos, pode proporcionar uma maior sobrevida e melhor qualidade de vida desses pacientes, além da redução dos gastos com saúde pública.

Diante deste cenário, nosso estudo objetiva investigar a incidência de candidíase em portadores de neoplasias sólidas e linfomas, bem como a expressão dos fatores de virulência por parte desses agentes etiológicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

Os termos “Câncer” ou “neoplasias malignas” são utilizados de forma genérica para designar um conjunto de mais de 100 distúrbios, incluindo tumores malignos originados a partir de diferentes tecidos. Uma das definições utilizadas para câncer é “o rápido crescimento de células anormais, ou neoplásicas, que crescem além de seus limites usuais, sendo capazes de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos”. O processo de invasão é denominado metástase, a qual representa a maior causa de óbito decorrente de câncer (OMS, 2011).

O câncer representa uma das principais causas de morte em todo o planeta, sendo considerado um evidente problema de saúde pública. Em 2008, segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), esta doença foi responsável por aproximadamente 7,6 milhões de mortes, correspondendo a 13% do número total de mortes naquele ano. As mortes decorrentes de câncer obedecem a uma tendência progressiva, podendo alcançar índices superiores a 11 milhões em 2030 (OMS; IARC, 2008).

No Brasil, desde o ano de 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando cerca de 17% dos óbitos de causa conhecida notificados no Sistema de Informações sobre Mortalidade. No ano de 2009, foram registrados aproximadamente 160.000 óbitos decorrentes de câncer no país (INCA, 2011a).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar (INCA) publica a cada dois anos um documento contendo as estimativas de novos casos, a partir do qual pode se dimensionar o impacto da doença no país. Considerando tal documento, foi estimada a ocorrência de 518.510 novos casos para o ano de 2012, número que se confirma também no ano de 2013. Deste total, 98% terão como sítio primário da neoplasia, órgãos sólidos. O câncer de pele do tipo não-melanoma será o mais freqüente na população, seguidos por tumores de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e por cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino. Para a população geral, em ordem decrescente de incidência são descritos os seguintes cânceres: câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos), tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil),

cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2011b).

Pode ser observada uma heterogeneidade na distribuição de novos casos da doença por regiões brasileiras, nas quais as regiões Norte e Nordeste apresentam as menores taxas, enquanto as regiões Sul e Sudeste, taxas mais elevadas. Números intermediários são verificados para a região Centro-Oeste do país. Para o estado de Pernambuco, aproximadamente 18.530 novos casos seriam detectados em cada ano da estimativa (INCA, 2011b).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2011), a transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa acontece em vários estágios e geralmente resulta da interação entre fatores genéticos do indivíduo e agentes externos. Estes agentes são classificados em três categorias: carcinógenos físicos, como as radiações ultravioleta e ionizantes; carcinógenos químicos, tais como asbesto, componentes da fumaça do tabaco, aflatoxinas e arsênico; e carcinógenos biológicos, alguns vírus, bactérias e parasitas. Além da interação com esses agentes, outros fatores de risco incluem ingestão de álcool, dieta pobre em nutrientes e sedentarismo.

Diversas são as abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer, envolvendo o uso de quimioterápicos e/ou radioterapia associado ou não à remoção cirúrgica. Apesar do sucesso dessas terapias para a cura de determinados tipos de câncer, por não apresentarem toxicidade seletiva, podem provocar uma imunossupressão severa e prolongada. Tal condição permite o surgimento de infecções oportunistas, as quais podem ser causadas pelos mais diversos agentes, sejam eles de origem viral, bacteriana ou fúngica (Rafailidis *et al.*, 2007).

2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS OPORTUNISTAS

A imunossupressão pode ser definida como a predisposição para adquirir infecções que normalmente não são detectadas em pessoas com um sistema imunológico competente. O risco de um paciente imunossuprimido adquirir uma infecção fúngica é multifatorial e inclui neutropenia por mais de dez dias, idade avançada, câncer ativo, uso de corticosteróides e/ou de antibióticos de largo espectro, transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, uso de cateter venoso central e disfunção de órgãos (García-Ruiz *et al.*, 2004). Soma-se aos anteriores, a existência de colonização fúngica prévia, quando o agente oportunista possui a natureza colonizante (Staber *et al.*, 2007). Em geral, o tratamento das infecções fúngicas invasivas (IFI) alcança reduzidos índices de sucesso terapêutico, elevando as taxas de mortalidade (García-Ruiz *et al.*, 2004).

Os principais agentes envolvidos nas infecções fúngicas oportunistas são os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e as leveduras do gênero *Candida*. No período anterior à profilaxia com fluconazol (até meados da década de 90), a candidíase invasiva representava a principal IFI, no entanto, nos últimos anos, a aspergilose invasiva e infecções causadas por outros fungos filamentosos (Zygomycetes e espécies de *Fusarium*) têm se tornado a principal causa de mortalidade associada às IFI (Staber *et al.*, 2007).

Esse quadro pode diferir consideravelmente entre instituições e regiões estudadas, o qual pode ser influenciado também pelas técnicas de diagnóstico utilizadas e pelo número de necropsias realizadas. Em aproximadamente 30% dos pacientes com câncer submetidos à necropsia, são detectadas IFI fatais (Chamilos *et al.*, 2006). Novamente, nesses pacientes tem sido observado um aumento considerável de aspergilose invasiva e um declínio nas infecções fatais causadas por espécies de *Candida*. É importante considerar que o diagnóstico de IFI *ante-mortem* só tem sido estabelecido numa minoria desses pacientes (Maschmeyer e Haas, 2008).

A observação prática e os estudos publicados revelam que o diagnóstico das IFI enfrenta obstáculos, devido à inespecificidade dos sinais clínicos e às controvérsias relacionadas à determinação dos melhores métodos para o diagnóstico. Apesar do desenvolvimento de manuais práticos (*guidelines*), o diagnóstico precoce e confiável nem sempre é possível, dificultando o desfecho do tratamento futuro (Ascioglu *et al.*, 2002; Cornely *et al.*, 2009).

A fim de minimizar as dificuldades para se estabelecer o diagnóstico de uma infecção fúngica, em 2002 um grupo consenso formado pela European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group (EORTC) e pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSG) publicaram definições padrão de IFI para abordagens clínicas ou de pesquisa epidemiológica (Ascioglu *et al.*, 2002).

Além de conduzir as hipóteses e confirmações diagnósticas, tais definições foram desenvolvidas para facilitar a identificação de grupos relativamente homogêneos para pesquisa clínica e epidemiológica, orientar ensaios clínicos de novas drogas e estratégias de tratamento e promover a comunicação internacional entre pesquisadores (De Pauw *et al.*, 2008).

Foram estabelecidos três níveis de probabilidade para IFI em pacientes com câncer ou submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, são eles: “provada”, “provável” ou “possível” infecção fúngica invasiva. Para que a IFI seja considerada provada basta que um agente fúngico seja detectado através de análise histológica ou cultura de uma amostra de tecido do sítio afetado pela doença. No caso de *Cryptococcus neoformans*, a detecção do antígeno capsular no líquido ou a positividade do exame direto contrastado com tinta da China são evidências suficientes para estabelecer o diagnóstico de criptococose provada. Por outro lado a definição de IFI provável ou possível baseia-se em três pontos: um fator do hospedeiro indicando que o paciente estava sob risco, sinais clínicos e sintomas consistentes com a doença e evidências micológicas que incluam análise microscópica e cultura, mas também testes indiretos, como os de detecção de antígenos (De Pauw *et al.*, 2008).

2.3 Candidíases

O gênero *Candida* compreende espécies patogênicas e inócuas ao ser humano. As espécies patogênicas representam a causa mais prevalente de infecções fúngicas oportunistas (Jackson *et al.*, 2009). No cenário hospitalar, as infecções provocadas por *Candida* spp. estão entre as principais infecções nosocomiais, e são associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade, prolongamento do tempo de hospitalização, e aumento de gastos com serviços de saúde. À medida que se prolonga o tempo de permanência em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e se eleva a frequência de realização de procedimentos invasivos, a incidência de colonização ou infecção por espécies de *Candida* aumenta (Rentz; Halpern; Bowden, 1998).

Muitas vezes, o agente da infecção atua inicialmente como um organismo comensal, habitando o trato gastrointestinal, mucosas oral e vaginal de indivíduos saudáveis sem causar danos. No entanto, em determinadas condições, pode provocar infecções de membranas mucosas ou infecções disseminadas (Kim; Sudbery, 2011).

A conversão de *Candida* spp., organismo comensal, em um patógeno, em geral envolve a interrupção dos mecanismos normais de defesa. Os fatores responsáveis por este déficit imunológico muitas vezes possuem origem iatrogênica, decorrentes do tratamento quimioterápico, imunossupressor ou do uso de cateteres endovasculares (Goméz *et al.*, 2010).

As formas mais comuns de infecção envolvendo espécies de *Candida* são aquelas que acometem as unhas, as onicomicoses. *C. albicans* é responsável por 70% dos casos, enquanto *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* representam 30%. As onicomicoses causadas por espécies de *Candida* têm sido crescentemente observadas em indivíduos com imunidade comprometida em decorrência de fatores como idade avançada, diabetes, doença vascular, imunossupressão e uso de antibióticos de largo espectro. Também é relatada em pacientes com a Síndrome de DiGeorge, agamaglobulinemia e displasia tímica (Jayatilake; Tilakaratne; Panagoda, 2009).

Em indivíduos imunocompetentes, a permanente exposição à umidade e compostos químicos, como detergentes, além da presença de traumas (situações comuns para donas de casa, agricultores e outras profissões) são fatores que contribuem para a existência de onicomicoses provocadas por *Candida* spp. acompanhada de paroníquia (Singal; Khanna, 2011).

Referente às infecções de mucosas, o termo utilizado é candidíase pseudomembranosa, a qual se caracteriza pela formação de pontos brancos, que podem ser facilmente removidos,

revelando uma área de inflamação na membrana subjacente. Esse tipo de infecção normalmente afeta as mucosas vaginal, da orofaringe, do esôfago e gastrointestinal (Kim; Sudbery, 2011). A candidíase vulvo-vaginal (CVV) é uma infecção comum e pode afetar 75% das mulheres em pelo menos uma vez na vida, e algumas mulheres apresentam episódios recorrentes (El-Din *et al.*, 2001). A candidíase orofaríngea (COF) é uma condição bastante comum em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), de tal forma que a sua presença é considerada um marcador do desenvolvimento de SIDA em pacientes HIV-positivos, apesar da redução na incidência após o advento da terapia anti-retroviral (Thompson *et al.*, 2010). A COF é uma patologia também associada a cânceres orais, uso de próteses odontológicas e a pacientes terminais com deficiência na produção de saliva (Runke, 2002).

Existem situações em que a candidíase se manifesta de forma crônica, acometendo simultaneamente pele, unhas e mucosas, numa condição conhecida como candidíase mucocutânea crônica (CMC). CMC é um termo utilizado para denominar um grupo complexo de desordens caracterizado por infecções persistentes ou recorrentes, de longa evolução e usual resistência aos tratamentos, mesmo quando aplicados corretamente (Eyerich *et al.*, 2010). Os pacientes acometidos por essa patologia raramente desenvolvem infecções disseminadas envolvendo o agente da CMC, o qual na maioria das vezes é *C. albicans* (Kirkpatrick, 2001).

A maioria dos casos tem início antes dos três anos de idade e a maior parte dos pacientes demonstra alteração da imunidade celular, em decorrência de uma disgenesia tímica (Eyerich *et al.*, 2010).

As infecções de corrente sanguínea causadas por espécies de *Candida* são conhecidas como candidemia. Em pacientes com sistema imune intacto, a proteção contra tais infecções é promovida pela ação da imunidade celular, especialmente dos neutrófilos. O déficit na imunidade celular, provocado por determinados tipos de câncer ou agentes imunossupressores, que pode ou não estar associado à supressão da comunidade bacteriana pela ação de antibióticos, permite um supercrescimento do agente fúngico. Além disso, a injúria da mucosa oral em decorrência de terapias agressivas como radioterapia e quimioterapia, também contribui para a proliferação e invasão tecidual por parte deste agente, até então considerado colonizante (Staber *et al.*, 2007). Outros fatores de risco incluem cirurgias do trato gastrointestinal, que permitem a disseminação de espécies presentes nesse sítio, e uso de cateteres em UTIs, que podem resultar na formação de biofilme (Kim; Sudbery, 2011).

Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal, local onde há rica colonização por leveduras do gênero *Candida*, em até 70% da população, favorece um supercrescimento e/ou translocação do fungo até os capilares mesentéricos, podendo gerar uma infecção disseminada (Colombo; Guimarães, 2003). Destacam-se nesse ponto a presença de cateteres venosos centrais, nutrição parenteral, uso de antibióticos de largo espectro, uso de corticosteróides, agentes quimioterápicos, câncer em estágio avançado, doenças hematológicas malignas, transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, neutropenia, cirurgia abdominal, queimaduras extensas, hemodiálise, ventilação mecânica, permanência em UTIs e colonização prévia por fungos (Arendrup, 2010).

Os sintomas da candidemia são semelhantes aos de septicemia bacteriana e o diagnóstico é, com frequência, dado tardiamente, prejudicando o sucesso da terapia antifúngica, quando se consegue administrá-la antes do óbito do paciente. Em razão disso, os antifúngicos são administrados de forma profilática após transplantes de medula óssea ou cirurgias abdominais (Kim; Sudbery, 2011).

A colonização prévia pela mesma espécie de levedura envolvida na candidemia é considerada um fator de risco independente para o seu desenvolvimento. Métodos de genotipagem mostram a similaridade entre cepas colonizantes e infectantes, comprovando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos (Nucci; Anaisse, 2001).

A candidemia pode levar à infecção de órgãos internos, condição conhecida como candidíase disseminada. Ambas as patologias representam sérias condições clínicas, apresentando índices elevados de mortalidade, que variam de acordo com a causa exata e fatores de risco predisponentes, podendo alcançar até 50% dos casos (Kibbler *et al.*, 2003, Pfaller; Diekema, 2007).

A candidíase sistêmica em pacientes hospitalizados apresentou índices crescentes durante as décadas passadas, figurando como a quarta causa mais prevalente de infecções da corrente sanguínea, com uma mortalidade associada de 40%, índice que excedia aqueles verificados nas bacteremias (Safdar *et al.*, 2001). A maioria das infecções é causada por *C. albicans*. Nos Estados Unidos, 52% de 379 episódios de candidemia foram provocados por este agente (Pfaller *et al.*, 1998). No Brasil, *C. albicans* foi responsável por 119 de 291 casos (Colombo *et al.*, 2006).

Enquanto *C. albicans* ainda é considerada dentro do gênero, o principal agente de IFI, outras espécies vêm se destacando como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C.*

krusei. A utilização profilática do fluconazol aparece como fator importante para o surgimento das infecções causadas por leveduras naturalmente resistentes aos triazólicos, como *C. glabrata* e *C. krusei*. A fungemia provocada por *C. parapsilosis* tem sido associada ao uso de cateteres vasculares e nutrição parenteral, enquanto que o câncer e a neutropenia se relaciona com a infecção causada por *C. tropicalis* (Bassetti *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006).

Além das formas clínicas apresentadas, candidíase intertriginosa, balanopostite e granuloma candidótico são outras doenças causadas por espécies do gênero *Candida* (Eyerich *et al.*, 2010; Verma; Wollina, 2011).

2.4 Espécies de *Candida*

O gênero *Candida* é classificado dentro do filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (Hibbett *et al.*, 2007). O nome do gênero foi inicialmente utilizado para designar leveduras nas quais não havia sido observado o ciclo sexual (Kim; Sudbery, 2011).

Existem mais de 150 espécies de *Candida*, destas, cerca de dezessete estão associadas à micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (Dignani; Solomkin; Anaissie, 2003). Dessas 17 espécies, apenas cinco são responsáveis por mais de 90% das infecções invasivas por *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Outras menos frequentes são: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa* entre outras (Gómez *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos recentes apontam que *C. albicans* permanece como o agente mais comum de candidemia nos Estados Unidos, na Europa e na América Latina, apesar da frequência de isolamento de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* ter aumentado durante as últimas décadas, alcançando índices que variam entre 40 a 50% dos casos (Pfaller; Diekema, 2007; Lass-Florl, 2009; Nucci *et al.*, 2010). A taxa de mortalidade de candidemia provocada por espécies não-*albicans* é no mínimo tão alta quanto aquela envolvendo *C. albicans* (Dimopoulos *et al.*, 2008).

Apesar de ser a espécie consideravelmente mais isolada em todo o mundo, a frequência de infecções por *C. albicans* varia de acordo com a faixa etária dos pacientes, sítios anatômicos afetados, uso prévio de antifúngicos e presença de co-morbidades (Pfaller;

Diekema, 2007). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos. A resistência a anfotericina B é raramente relatada (Sanglard; Odds, 2002).

C. parapsilosis apresenta-se, desde a década de 80, como um importante patógeno hospitalar de fungemias, é uma espécie encontrada mais na pele do que em superfícies de mucosas a qual possui como característica marcante a capacidade de proliferar em soluções contendo glicose, formando biofilmes em cateteres, o que permite estabelecer uma associação entre a utilização de cateter venoso em posição central e maior ocorrência de fungemia por essa espécie. Também é notável a sua associação com nutrição parenteral e predileção por crianças e neonatos pré-termo. A maioria dos isolados se mostra sensível aos triazólicos e a Anfotericina B e as taxas de mortalidade por essa espécie são mais baixas que as apresentadas por outras espécies de *Candida* (Colombo; Guimarães, 2003; Pappas *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2010). Em países da América Latina, *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva em diferentes estudos (Godoy *et al.*, 2003; Goldani; Mario, 2003).

Em 2005, *C. parapsilosis*, por se apresentar como um táxon heterogêneo do ponto de vista genético, foi reclassificada em três espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). Em um estudo realizado no Brasil, através de ferramentas de biologia molecular, foi revelado que de 141 isolados de corrente sanguínea identificados como *C. parapsilosis*, 9% eram na verdade *C. orthopsilosis* e 3% pertenciam a espécie *C. metapsilosis* (Gonçalves *et al.*, 2009).

O uso prévio de fluconazol tem sido associado significativamente a infecções por *C. glabrata*, uma vez que essa espécie apresenta menor sensibilidade a este antifúngico. Além dos problemas terapêuticos associados aos azólicos, foi relatada uma menor susceptibilidade de isolados desta espécie em relação à anfotericina B (Pfaller *et al.*, 2001). Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (Diekema; Pfaller; Jones, 2002). *C. glabrata* constitui a segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatadas nos Estados Unidos e Europa (Abi-Said *et al.*, 1997).

Candida krusei é uma espécie naturalmente resistente ao fluconazol e que, portanto, também adquiriu vantagens no processo patogênico a partir do uso desse medicamento. Tem se revelado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores

de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (Iwen *et al.*, 1995).

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Tem sido reportada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos (Colombo; Guimarães, 2003). No Brasil, mesmo em pacientes não portadores de câncer, é uma espécie que apresenta importante frequência de isolamento (Motta *et al.*, 2010). Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos (Ozhak-Baysan *et al.*, 2011).

Outras espécies de *Candida* apresentam-se menos frequentes, porém são importantes devido principalmente a resistência apresentada aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Fazem parte desse quadro *C. lusitaniae*, a qual tem sido frequentemente associada à resistência natural ou adquirida a anfotericina B (Hawkins; Baddour, 2003); *C. guilliermondii*, a qual vem sendo reconhecida como patógeno emergente relacionado principalmente a pacientes com câncer com resistência *in vitro* e *in vivo* a anfotericina B (Hazen, 1995; Brito *et al.*, 2011); *C. rugosa*, que apresenta redução na sensibilidade ao fluconazol, assim como *C. guilliermondii*; *C. inconspicua* e *C. norvegensis*, as quais apresentam resistência intrínseca ao fluconazol, sendo a primeira mais relacionada com fungemia em pacientes soro-positivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana e com enfermidades hematológicas malignas (Pfaller; Diekema, 2007).

Em alguns casos pouco frequentes, podem ser isolados mais de um tipo de *Candida* em uma única hemocultura. Nesses casos, a origem mais comum do fungo costuma ser os cateteres vasculares e sua retirada junto com o início da terapia antifúngica é uma importante medida para o tratamento desses pacientes (Goméz *et al.*, 2010).

A partir do momento em que os mecanismos de defesa do hospedeiro são alterados, o processo de infecção se inicia. No entanto, somente o fator imunológico não é suficiente para o desenvolvimento da patologia, participando deste processo os fatores de virulência dos patógenos.

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência consistem nos mecanismos que permitem a invasão da célula ou tecido do hospedeiro com posterior dano tecidual superficial ou profundo. Muitos fatores de virulência são considerados tão óbvios que por vezes nem são analisados, como por exemplo, a habilidade de crescimento a 37 °C e sob pH fisiológico, elementos essenciais para a virulência de fungos que invadem tecidos profundos. O tamanho compatível com os alvéolos é outro fator importante para fungos adquiridos através da inalação de esporos (Hogan; Klein; Levitz, 1996).

A maioria dos patógenos, inclusive as espécies de *Candida*, desenvolveu uma série de moléculas e estratégias específicas para auxiliar na colonização, invasão e patogênese. Os fatores de virulência expressos por espécies de *Candida* variam conforme o tipo, local e estágio da infecção, e a natureza da resposta imune do hospedeiro, sendo os principais: capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam na invasão tissular, mudança de fenótipo, formação de biofilme e a produção de enzimas extracelulares como proteases e fosfolipases (Colombo; Guimarães, 2003; Mohandas; Ballal, 2011).

Apesar da determinação genética, a expressão dos fatores de virulência pelos microrganismos ocorre quando estes são submetidos a certas condições ambientais, como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Tais condições são específicas para cada microrganismo e para cada isolado de determinado agente, podendo variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (Álvares; Svidzinski; Consolaro, 2007).

Nem sempre todas as etapas de virulência são cumpridas por um microrganismo, no entanto, o contato entre o patógeno e a camada que recobre a superfície epitelial da mucosa do hospedeiro é um requisito básico para o desenvolvimento da infecção. A aderência permanente entre o patógeno e o tecido do hospedeiro requer o estabelecimento de ligações específicas entre macromoléculas denominadas adesinas (estruturas da superfície do microrganismo) e receptores específicos nas células eucarióticas (laminina, fibronectina e fibrina) (Ribeiro *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011).

Em resposta a situações ambientais, tais como presença de elementos do soro sanguíneo, elevação do pH e temperatura, ou condições de privação de nutrientes, algumas espécies de *Candida* transitam da forma de levedura brotante para forma filamentosa (hifas

verdadeiras e pseudo-hifas). Essa transição levedura-hifa inclui sérias alterações no padrão de expressão gênica, e se mostra essencialmente importante para a patogenicidade de determinadas espécies, uma vez que mutantes de *C. albicans*, por exemplo, que não conseguem realizar a transição de uma forma para outra, apresentam virulência atenuada (Whiteway; Oberholzer, 2004). O desenvolvimento de micélio pelas espécies de *Candida* também favorece as infecções fúngicas uma vez que o formato micelial propicia maior aderência, dificultando a ação fagocitária pelo sistema imune (Ribeiro *et al.*, 2004).

Além do fenômeno dimórfico, as leveduras do gênero *Candida*, também transitam entre a morfologia usual, com células redondas a ovais (fenótipo *white*), e um tipo celular alongado com estrutura superficial alterada, o qual foi denominado opaco (*opaque*) em razão da aparência das colônias produzidas por essas células em placas contendo ágar (Ramírez-Zavala *et al.*, 2008). A transição *white-opaque* contribui para uma melhor adaptação das espécies a diferentes nichos do hospedeiro, enquanto células *white* são muito mais virulentas que as células *opaque* após a infecção intravenosa, o fenótipo *opaque* é superior em infectar a pele (Kvaal *et al.*, 1999). Como as células *opaque* são instáveis a 37 °C, acredita-se que a transição entre as duas formas pode ser especialmente relevante em ambientes do hospedeiro com temperaturas mais baixas, como a pele (Lachke *et al.*, 2003). Esse mecanismo de *switching* fenotípico apresenta alta frequência e reversibilidade e pode favorecer também mudanças na sensibilidade a drogas antifúngicas (Ribeiro *et al.*, 2004).

Formação de biofilme

Os biofilmes são conceituados como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias, aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, envoltas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética (Silva, 2009). A formação dessa estrutura por espécies de *Candida* tem sido demonstrada em uma diversidade de superfícies abióticas, inclusive dispositivos médicos (Ramage *et al.*, 2006) e representa importante etapa para o desenvolvimento da infecção clínica, uma vez que uma significativa proporção de infecções microbianas em humanos envolve a formação dessa estrutura (Ramage *et al.*, 2005). Os organismos presentes no biofilme comportam-se de maneira distinta daqueles chamados de planctônicos, mostrando-se refratários à terapia (Douglas, 2003). Outras vantagens do biofilme incluem proteção contra componentes do

ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e troca de material genético (Mohandas; Ballal, 2011).

Como algumas espécies de *Candida* são frequentemente encontradas na microbiota humana normal, torna-se mais fácil a sua interação com a maioria dos biomateriais implantados e superfícies do hospedeiro. O suporte à colonização e a formação de biofilme por *Candida* spp. foram demonstrados em diversos dispositivos como *stents*, *shunts*, próteses, implantes, tubos endotraqueais, marcapassos e vários tipos de cateteres. O tratamento das infecções associadas a esses dispositivos quando associadas a biofilme pode ser difícil e oneroso, uma vez que a infecção geralmente ocorre após o término da terapia antimicrobiana, e, para a resolução faz-se necessária a remoção do dispositivo (Kojic; Darouiche, 2004).

Entre os fungos, *C. albicans* permanece como a espécie mais comumente associada à formação de biofilme. Nessa espécie, o desenvolvimento dessa estrutura envolve três fases: aderência das leveduras a superfície do dispositivo (fase inicial), formação de uma matriz com morfogênese de transição (fase intermediária) e aumento de material da matriz adquirindo uma arquitetura tridimensional (fase de maturação). O biofilme maduro de *Candida* possui uma mistura de formas e consiste numa rede densa de leveduras, hifas e pseudohifas envolvidas numa matriz de polissacarídeos, outros carboidratos e componentes desconhecidos (Douglas, 2003).

Alguns fatores influenciam a formação e a estrutura dos biofilmes formados por *Candida*, tais como a natureza da superfície de contato, fatores ambientais (disponibilidade de glicose e hidrofobicidade da superfície, por exemplo), dimorfismo levedura-hifa e a espécie envolvida (Kojic; Darouiche, 2004).

A maioria das espécies de *Candida* produz biofilme *in vitro* em graus diferenciados. Hawser e Douglas (1994) demonstraram que *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* e *C. glabrata* produzem significativamente menos biofilme que *C. albicans*. Essa informação também foi verificada por Kuhn *et al.* (2002) que, além deste aspecto, também revelaram que o biofilme formado por *C. albicans* apresenta uma morfologia mais controversa que aquele formado por *C. parapsilosis*, composto apenas por blastosporos agrupados.

Os estudos acerca da variabilidade na produção de biofilme entre cepas da mesma espécie têm apresentado resultados divergentes, assinalando a importância da utilização de uma metodologia bem estabelecida, bem como a importância do fato de que *Candida* exibe ampla diversidade fenotípica, o que pode ser relacionado à patogenicidade e/ou virulência (Kojic; Darouiche, 2004).

Produção de enzimas extracelulares: proteases e fosfolipases

As enzimas proteolíticas pertencem ao grupo das hidrolases, as quais possuem em comum o envolvimento de água na formação do produto. As proteases incluem todas as enzimas que catalisam a reação hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas, digerindo-as em peptídeos ou aminoácidos livres, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (Romero *et al.*, 2001).

Staib (1965) foi quem primeiro noticiou o efeito proteolítico extracelular em leveduras, através da observação do crescimento de *C. albicans* em meio contendo albumina, como fonte simples de nitrogênio. A produção de enzimas proteolíticas aumenta a habilidade do organismo em penetrar o tecido e de evadir-se do sistema imune do hospedeiro, uma vez que estão envolvidas nos processos de dano à membrana celular, clivagem de anticorpos IgA e IgG, lise de queratina, hemoglobina, colágeno e mucina (Cutler, 1991; Ribeiro *et al.*, 2004; Mohandas; Ballal, 2011).

Essas enzimas pertencem ao grupo das proteinases aspárticas secretadas (SAPs), as quais são detentoras de baixa especificidade por substratos protéicos, sua atividade pode ser detectada, por exemplo, em meio contendo albumina de soro bovino a pH 5,0 (Ribeiro *et al.*, 2004). Outros substratos utilizados em estudos *in vitro* são a caseína do leite e a gelatina (Kumar *et al.*, 2009). A ação dessas enzimas foi verificada *in vitro* através da observação de que cepas mutantes não proteolíticas de isolados do gênero *Candida* são menos patogênicas para camundongos em relação às cepas selvagens (MacDonald; Odds, 1980).

As fosfolipases representam outro grupo de enzimas envolvidas com o mecanismo de infecciosidade de *Candida*, essas enzimas foram inicialmente descritas por Werner (1966), o qual verificou a atividade em cultivos de *C. albicans* em meio de cultura enriquecido com gema de ovo (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina). De forma semelhante às SAPs, as fosfolipases também são dependentes de pH ácido (3,6 a 4,7) e são codificadas por uma família gênica, compreendendo as fosfolipases A, B e C, lisofosfolipase e lisofosfolipase transcetilase (Ribeiro *et al.*, 2004).

O termo fosfolipase refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres de glicofosfolipídios (Ghannoum, 2000). O método proposto por Price, Walkinson e Gentry (1982) permite a detecção semiquantitativa da atividade fosfolipásica em grande número de amostras de fungos em meio de cultura contendo lecitina e cálcio.

O caráter patogênico das fosfolipases reside no fato de que afetam diretamente os fosfolipídios das membranas celulares dos hospedeiros, permitindo a penetração da hifa e provocando lesões teciduais de graus diversos, dependendo do organismo invasor e do tecido invadido (Kantarcioglu; Yucel, 2002).

Em decorrência da incidência crescente de infecções invasivas por *Candida* spp., existe um grande interesse em estudar os fatores de virulência dessas espécies, incluindo a produção de biofilme e enzimas extracelulares, a fim de estabelecer estratégias de controle e prevenção de candidíase e também de determinar possíveis alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Kantarcioglu; Yucel, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

As amostras clínicas utilizadas nesse estudo foram coletadas a partir de pacientes assistidos nos ambulatórios e enfermarias do Hospital do Câncer de Pernambuco e do Hospital Geral Otávio de Freitas, ambos localizados na cidade do Recife/PE. A coleta das amostras e o acesso aos prontuários dos pacientes para obtenção dos dados clínicos e epidemiológicos foi realizada após submissão e aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, número do CAAE: 0009.0.447.000-11 (ANEXO 1).

3.2 Coleta de amostras

Os pacientes foram examinados pelo corpo clínico e/ou pela executante do estudo durante o período de maio de 2010 até outubro de 2011 para verificação de indicação clínica de hipótese diagnóstica de micoses. Conforme a suspeita de infecção fúngica, foram realizados procedimentos adequados para coleta de amostras de acordo com as particularidades de cada caso e conforme literatura especializada (Lacaz *et al.*, 2002).

Para lesões de cavidade oral, foram utilizados *swabs* de algodão esterilizados, os quais foram friccionados sobre as lesões e posteriormente acondicionados em tubo de ensaio contendo água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol na concentração de 50 mg/L. Para lesões sugestivas de infecções de pele ou onicomicoses, escamas epidérmicas e ungueais foram obtidas por escarificação com o auxílio de bisturi esterilizado.

Quando os pacientes apresentaram sinais clínicos de infecção do sistema respiratório, amostras de escarro, em triplicata, foram colhidas em jejum após higienização da cavidade oral e em hipótese de fungemia, o sangue coletado foi inoculado em meio infusão de cérebro e coração (BHI). Fragmentos de tecido foram obtidos por profissionais habilitados do referido hospital.

Após a coleta, os espécimes clínicos foram encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, para realização do diagnóstico micológico através de exame direto e cultivo.

3.3 Processamento das amostras clínicas

Espécimes clínicos como secreção obtida por *swab* e escarro foram manipulados para exame direto a fresco (sem adição de clarificante ou corante), escamas epidérmicas e ungueais e fragmentos de tecido foram clarificados com solução aquosa de hidróxido de potássio a 20%. Paralelamente, as amostras foram inoculadas ou semeadas em duplicata, na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol, contido em placas de Petri e mantidas à temperatura de 30 °C e 37 °C por até 30 dias.

Após o crescimento de colônias, foi preparada suspensão das células em água destilada adicionada de cloranfenicol numa concentração de 50 mg/L e, a partir dessa suspensão, 0,2 mL foi semeado por estrias na superfície do meio ágar Sabouraud contendo 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri. As unidades formadoras de colônias fúngicas foram repicadas para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud.

Após a obtenção de cultura pura, foi procedida a identificação dos isolados.

3.4 Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada de acordo com a metodologia convencional, através da observação de aspectos macro, microscópicos e fisiológicos e, quando necessária, automatizada (Lacaz *et al.*, 2002).

3.4.1. Características macroscópicas

Foram realizadas diferentes análises fenotípicas como diâmetro, bordos, consistência e coloração das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (Porto *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000).

3.4.2. Características microscópicas

A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada a partir de culturas com 48 horas de crescimento em meios de água-bile para a observação de forma das células, tipo de brotação, formação de pseudo-micélio e micélio verdadeiro, produção de clamidosporos ou esporos de origem sexuada (Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000).

3.4.3. Características fisiológicas

Para leveduras, as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas por meio de testes de assimilação e fermentação pela utilização de compostos de carbono, assimilação pela utilização de compostos de nitrogênio (Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000), produção de urease (Lacaz *et al.*, 2002) e produção de ácido acético (Barnett *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002). Além disso, os isolados foram submetidos à identificação por método automatizado, utilizando o sistema Vitek[®] 2 (BioMérieux) no Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Milton Bezerra Sobral FUSAN (LACEN - PE).

3.5 Detecção da formação de biofilme

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método visual descrito por Shin *et al.* (2002). Os isolados foram semeados no meio ágar Sabouraud contido em placas de Petri e mantidos a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada suspensão em solução salina na concentração final de 3×10^7 unidades formadoras de colônias/mL, aferida a partir de contagem em Câmara de Neubauer. A partir dessa suspensão, 1 mL foi inoculado em 9 mL de Sabouraud líquido contido em tubos de poliestireno (Tubos de Falcon), sendo o teste mantido a 37°C por 24h sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os tubos lavados com água destilada esterilizada e posteriormente, adicionado o corante fucsina (QEEL-Química Especializada Erich Ltda) para realização da avaliação de acordo com a intensidade da coloração.

A interpretação foi realizada de acordo com o proposto por Shin *et al.* (2002): coloração fraca (1+); coloração mediana (2+ a 3+) e fortemente corada (4+), representando capacidade fraca, moderada e forte de formação de biofilme, respectivamente.

3.6 Detecção da atividade enzimática

Preparo do inóculo

Os isolados foram crescidos em meio ágar Sabouraud contido em placas de Petri para crescimento a 30 °C por 48 horas. Após o crescimento, foram preparadas suspensões de células em ágar-água na concentração de 2%, acrescidos de Tween 80 (0,2%), para obtenção de 10^7 células por mL. Dessa suspensão, foram retirados 2 µL e inoculadas em três pontos

equidistantes nas placas de Petri contendo meio com substrato específico ou em tubos contendo o substrato gelatina.

Atividade proteásica

A atividade proteásica foi detectada segundo a metodologia de Aoki *et al.* (1990), utilizando como substrato a albumina de soro bovino (BSA), e Lacaz *et al.* (2002), com o uso de caseína do leite (CL) e gelatina como substratos. Os meios contendo BSA e CL foram contidos em placas de Petri e o meio contendo gelatina foi contido em tubos de ensaio. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37 °C durante sete dias em triplicata.

Após o tempo de crescimento da cultura em cada substrato, foi observada a formação de halo em torno da colônia. No caso do substrato CL, para diferenciar a proteólise verdadeira da produção de metabólitos ácidos e alcalinos contidos no leite, adicionou-se solução acidificada de cloreto de mercúrio.

A zona de atividade (ZA) foi calculada de acordo com a metodologia proposta por Kantarcioglu e Yucel (2002), o qual adaptou a interpretação do método de Price, Walkinson e Gentry (1982). A Zona de atividade (ZA) foi obtida através da medição do diâmetro da colônia e da zona de precipitação e aplicação na fórmula descrita abaixo:

$$Z_A = \frac{\varnothing \text{ da col\~{o}nia}}{\varnothing \text{ da col\~{o}nia} + \text{Zona de Precipita\~{c}\~{a}o}}$$

Onde:

ZA = Zona de Atividade

Ø da colônia = Diâmetro da Colônia

Zona de precipitação = Halo Formado

Interpretação:

- ZA entre 0,90 – 1,0cm = + (muito fraca)
- ZA entre 0,89 – 0,80cm = ++ (fraca)
- ZA entre 0,79 – 0,70cm = +++ (forte)
- ZA < 0,69cm = ++++ (muito forte)

Para o substrato gelatina foi observada a liquefação ou não da gelatina. Após sete dias de crescimento, as culturas teste, em triplicata, e um controle negativo (tubo sem inóculo da cultura) são refrigerados a 8 °C por 30 minutos; a atividade enzimática foi considerada positiva quando o meio permaneceu liquefeito (teste positivo); quando o meio readquiriu a consistência sólida, foi considerado ausência de atividade enzimática (teste negativo).

Atividade fosfolipásica

Para detecção da atividade fosfolipásica, foi adotado o método proposto por Price e Cawson (1977), utilizando ágar Sabouraud e sais com adição de lecitina de soja como substrato, contido em placas de Petri. Após o inóculo em três pontos equidistantes, as placas foram incubadas a temperatura de 37 °C durante 7 dias, sendo observada a formação ou não de halo em torno da colônia. Quando presente, o halo foi medido e interpretado de acordo com a fórmula descrita acima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados epidemiológicos e diagnóstico laboratorial micológico

Durante o período de setembro de 2010 a setembro de 2011, foram examinados 225 pacientes com tumores sólidos ou linfomas, dentre os quais, 53 apresentaram hipótese diagnóstica para micose superficial ou invasiva. Os pacientes apresentaram sinais clínicos de infecções de cavidade oral (n=21), de pele (n=16), de corrente sanguínea (n=6), de trato respiratório (n=3) e de onicomicoses (n=2) (Figura 1). Um paciente com suposta infecção pulmonar foi excluído do estudo, pois não foi possível coletar a terceira amostra de esputo.

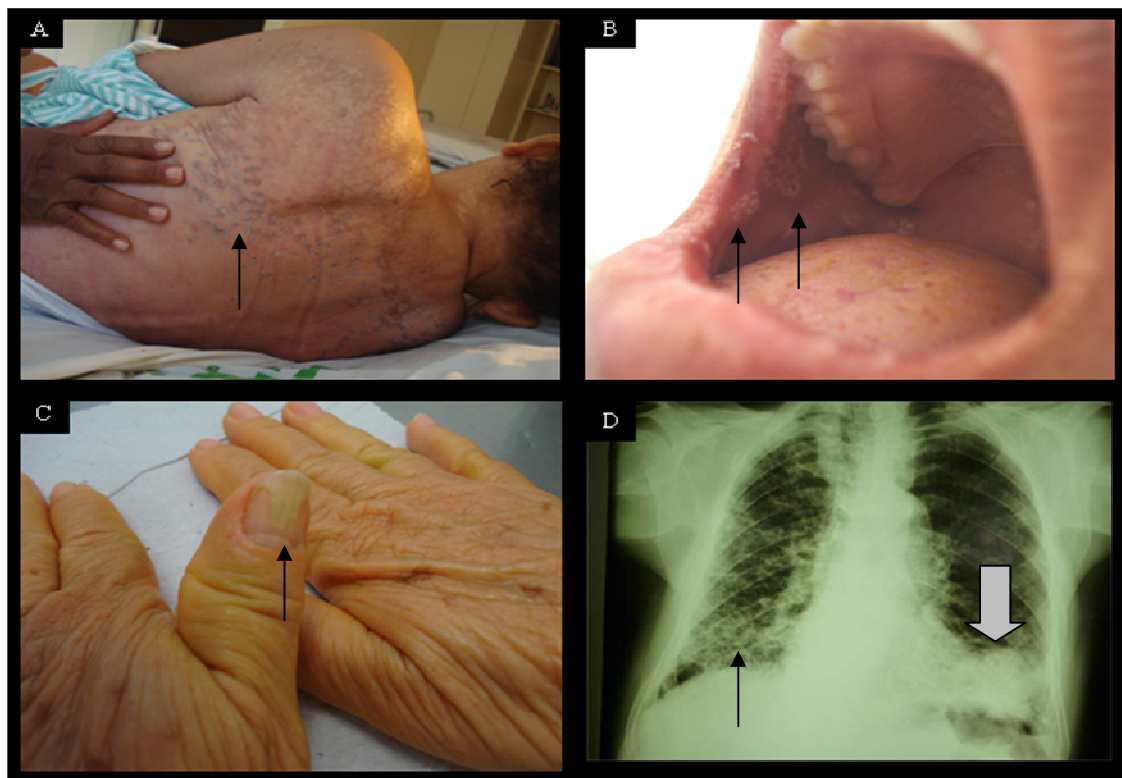


Figura 1. Aspecto de lesões em pacientes com tumores sólidos. A: lesão disseminada em pele, apresentando áreas descamativas (↑); B: Aspecto clínico de lesão de cavidade oral, apresentando diversas placas esbranquiçadas aderidas à mucosa (↑); C: Lesão subungueal, com acometimento distal (↑); D: Aspecto de imagem radiológica de tórax, demonstrando infiltrado leucocitário nos pulmões (↑) e formação de massa fúngica na base do pulmão esquerdo (seta larga).

Dos 52 pacientes com hipótese diagnóstica de micose 60% (31) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 40% (21) era do sexo feminino (Figura 2). Em 8% (18) dos casos, foi possível confirmar o diagnóstico de candidíases. Destes, 72% (13) eram do sexo masculino e 28% (5) do sexo feminino (Figura 2).

A maior prevalência do sexo masculino também foi observada por Diekema, Pfaller e Jones (2002) e Arora *et al.* (2011), ambos abordando a incidência de candidemia. Diferente do observado em nosso estudo, não foi possível estabelecer diferença significativa entre os sexos no que diz respeito à incidência de candidíases em pacientes com câncer no trabalho executado por Pasqualotto *et al.* (2006), no qual 51,6% dos pacientes pertenciam ao sexo masculino.

A principal faixa etária dos pacientes com suspeita de micose foi a entre 50 e 69 anos, com idade média de 53 anos, o paciente mais jovem apresentava quatro anos e o mais idoso, 86 anos de idade (Figura 3). Esse dado está de acordo com o descrito na literatura, segundo a qual, as micoses podem afetar indivíduos em qualquer idade; os jovens e idosos são acometidos a depender do grau de comprometimento imunológico e quantidade de inóculo do patógeno (Nam *et al.*, 2010).

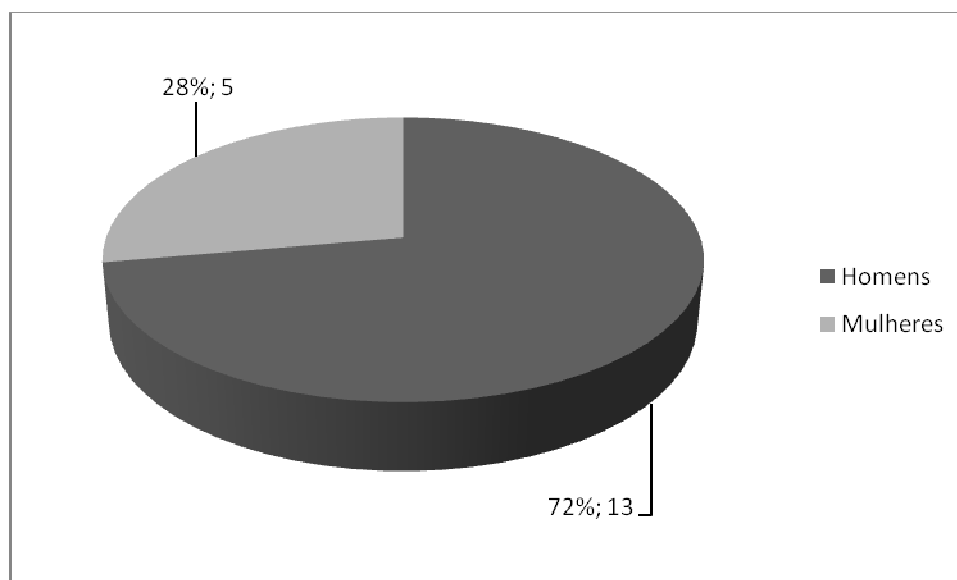


Figura 2. Percentual dos pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas com hipótese diagnóstica de micose de acordo com o sexo.

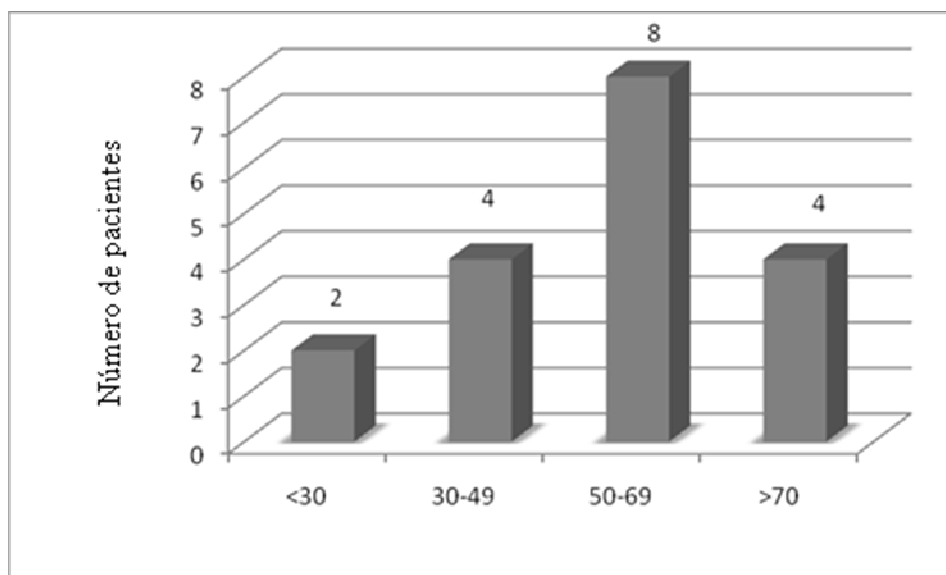


Figura 3. Faixa etária dos pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas diagnosticados com candidíase.

Em um estudo realizado por Bodey *et al.* em 1992, no qual foram coletados dados internacionais de necropsias em pacientes com câncer, foram identificadas infecções fúngicas em 25% dos pacientes com leucemias, 12% dos pacientes com linfoma e 5% dos pacientes com tumores sólidos. Em nosso estudo consideramos desde infecções fúngicas superficiais até as invasivas, quando as primeiras podem não ter sido abordadas no estudo de Bodey *et al.* (1992).

A incidência e o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas (IFI) em pacientes oncológicos não têm sido abordados por estudos multicêntricos recentes, o que torna difícil a obtenção de estimativas fidedignas da frequência desse tipo de infecção nessa população. Além disso, a maioria dos estudos acerca do tema diz respeito às malignidades hematológicas, provavelmente em razão da menor frequência de IFI observada nesse grupo de pacientes.

Em geral, quando comparados com pacientes portadores de malignidades hematológicas, os portadores de neoplasias sólidas estão sob menor risco de desenvolver e respondem melhor ao tratamento das IFI (DiNubile *et al.*, 2005).

A maioria dos pacientes do grupo estudado apresentou tumores na cavidade oral (22%). Tumores gástricos (16%), tumores ósseos (11%) ou linfomas não-Hodgkin (11%) vieram em seguida. Os outros tipos de tumores estão descritos na Tabela 1. Um estudo abordando candidemia apontou maior prevalência de tumores do sistema digestivo (77,1%), do sistema genitourinário (36,0%) e ginecológico (18,8%) (Pasqualotto *et al.*, 2006).

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos pacientes portadores de neoplasias sólidas diagnosticados com candidíases.

Registro paciente	Sexo	Ocupação	Idade (anos)	Tumor	Tratamento do câncer
1	M	Sem ocupação	4	Tumor renal	QT
2	F	Comerciante	53	Tumor gástrico	QT
3	M	Aposentado	76	Linfoma não-hodgkin	QT
4	M	Pedreiro	65	Tumor em cavidade oral	Não tratado
5	F	Não informado	36	Tumor ósseo	QT/cirúrgico
6	M	Cobrador	41	Tumor ósseo	Não tratado
7	M	Soldador	52	Tumor de língua	QT
8	M	Comerciante	53	Linfoma não-Hodgkin	QT
9	F	Agricultora	53	Tumor raquimedular	QT
10	M	Policial militar	66	Tumor em cavidade oral	QT e RT
11	F	Do lar	52	Tumor de mama	QT/cirúrgico
12	M	Pedreiro/segurança	44	Tumor gástrico	QT
13	M	Aposentado	79	Tumor gástrico	Cirúrgico
14	M	Aposentado	86	Tumor em cavidade oral	RT
15	F	Enfermeira	56	Tumor de mama	QT
16	M	Cortador de cana	43	Tumor de região inguinal	QT
17	M	Agricultor	26	Tumor de testículo	QT
18	M	Aposentado	81	Tumor de pulmão	Não tratado

Legenda: F=feminino; M=masculino; QT=Quimioterapia; RT=Radioterapia

Os pacientes que apresentaram diagnóstico de micose relataram ocupações diversas, não sendo possível estabelecer nenhuma correlação entre o diagnóstico e a ocupação exercida. Por outro lado, foi realizado tratamento quimioterápico contra o câncer em 13 dos 18 pacientes, representando um importante fator para o desenvolvimento de infecção fúngica. A correlação entre os dados epidemiológicos e diagnósticos dos pacientes está disposta na Tabela 1.

Os pacientes que recebem quimioterapia frequentemente apresentam imunossupressão, o que eleva o risco para infecções fúngicas, incluindo os vários tipos de candidíases. Nas situações que envolvem candidíase oral, o dano tecidual local devido à terapia anti-câncer induz à essa condição, na qual o paciente refere dor intensa, dificuldade para se alimentar, falar e realizar higiene oral (Albuquerque; Camargo, 2007). O déficit na realização de higiene oral aumenta o risco para o desenvolvimento dessa patologia secundária em pacientes que são submetidos à quimioterapia ou radioterapia (Lalla *et al.*, 2010).

A prevalência de infecções causadas por *Candida* spp. varia bastante dependendo da região, do centro estudado e do tipo de câncer. A observação da prevalência de candidíases em relação às micoses causadas por outras espécies diverge do que foi relatado para IFI em pacientes com malignidades hematológicas. Nesse grupo de pacientes, foi observada uma mudança a partir da década de 90, quando a aspergilose invasiva passou a ser a principal IFI, e em paralelo observou-se a emergência de zigomicoses, enquanto as candidíases invasivas apresentaram índices decrescentes (Chamilos *et al.*, 2006).

4.2 Diagnóstico laboratorial e identificação dos isolados

O diagnóstico de candidíases foi baseado nos dados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial foi baseado na observação de células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes (figura 4A), com ou sem formação de pseudomicélio ou micélio verdadeiro (figura 4B) em espécimes clínicos de cavidade oral, sangue, esputo, escamas epidérmicas e ungueais, bem como a obtenção do agente etiológico em cultura (figura 5).

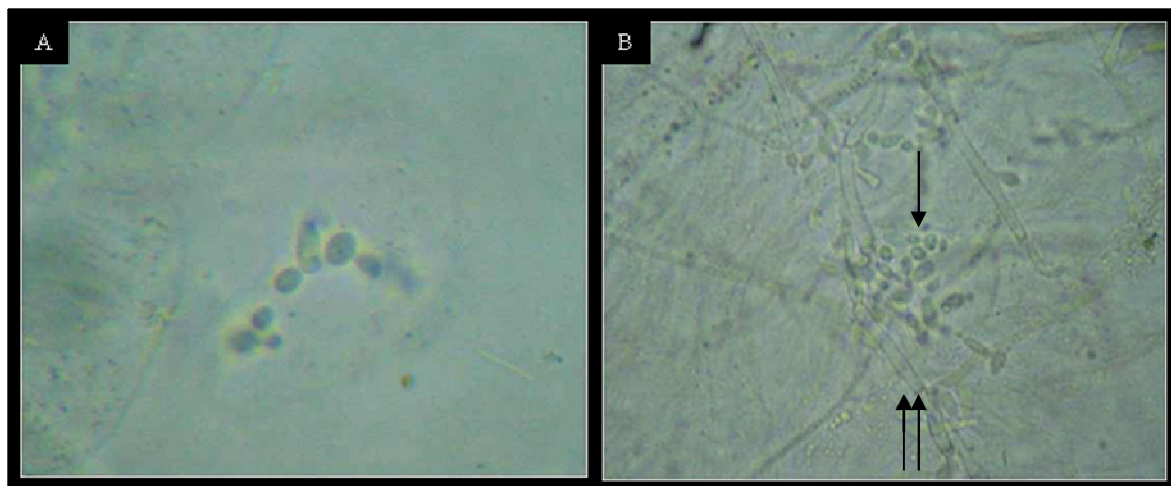


Figura 4. Exame direto de amostras clínicas. A: célula de levedura brotantes; B: Células de leveduras ovais e hialinas (↑) e micélio verdadeiro (↑↑) em amostras de cavidade oral (400X).



Figura 5. Aspecto característico de cultivo primário de *Candida* spp.: cultura de coloração branca a creme, lisa e de bordo regular.

Foram identificados 10 isolados de *C. albicans*, três de *C. tropicalis*, dois de *C. haemulonii*, um de *C. guilliermondii*, um de *C. parapsilosis* e um de *C. famata* (Tabela 2). Nossos resultados revelaram *C. albicans* como o agente mais comum de candidíases (55%). De forma semelhante ao nosso estudo, Arora *et al.* em 2011, observaram *C. albicans* como agente de 78% de infecções fúngicas em diversos pacientes, e também não observaram tendência em direção a maior prevalência de espécies não-*Candida albicans*. Diekema, Pfaller e Jones (2002) também observaram que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente de candidemia, apresentando índice igual a 58%. Por outro lado, estudos realizados em diversas regiões do planeta apresentaram maiores prevalências de infecções provocadas por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (Gómez, *et al.*, 2010; Morace; Borghi, 2010).

No Brasil, em estudo realizado por Pasqualotto *et al.* (2006) espécies de *Candida* não-*Candida albicans* foram responsáveis por 57,8% das candidemias em pacientes com câncer, especialmente *C. parapsilosis* (27,7%) e *C. tropicalis* (13,3%). Em portadores de tumores sólidos, essas espécies foram isoladas em 51,6% dos casos de candidemia.

Em estudo multicêntrico realizado na Espanha, *C. parapsilosis* (20,73%), *C. glabrata* (13,61%), *C. tropicalis* (10,77%) e *C. krusei* (5%) foram responsáveis juntas por aproximadamente 51% das infecções de corrente sanguínea causada por leveduras desse gênero em vários grupos de pacientes (Cisterna; Ezpeleta; Telleria, 2010).

Candida famata geralmente é associada a infecções sanguíneas relacionadas ao uso de cateteres e raramente é relatada como agente de outro tipo de infecção (Krcmery; Kunova, 2000; Prinsloo; Weldhagen; Blaine, 2003; Desnos-Ollivier *et al.*, 2008). Baseando-se nos dados de vigilância mundial do Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC), essa espécie foi isolada em 0,08 a 0,5% dos episódios de candidíase invasiva (Diekema; Pfaller; Jones, 2002). Elkamouni *et al.* (2011) relataram um raro caso de candidemia causado por *C. famata* em um paciente submetido a quimioterapia para o tratamento de linfoma de Hodgkin, reafirmando o caráter oportunista desse patógeno.

Candida haemulonii é uma espécie que raramente causa infecção no homem, porém está relacionada à resistência aos antifúngicos mais frequentemente utilizados. Seu isolamento pode ser atribuído ao uso desses medicamentos, bem como ser indício de colonização (Kim *et al.*, 2009). Para julgarmos a importância clínica dos isolados do nosso estudo seria necessária a realização de análises adicionais.

O surgimento de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* como patógenos em pacientes oncológicos supostamente seria decorrente do uso indiscriminado de antifúngicos

no início da década de 1990, para fins de profilaxia após transplante de células-tronco hematopoiéticas e para fins terapêuticos nos casos de neutropenia febril (Marr, 2000). Apesar de diversos autores concordarem com essa teoria (Arslankoylu *et al.*, 2010; Person; Kontoyiannis; Alexander, 2010; Bassetti *et al.*, 2011), alguns estudos reportaram o baixo uso de triazólicos no Brasil, sugerindo que o uso prévio de antifúngicos não teria sido o fator principal para a emergência dessas espécies no país (Nucci *et al.*, 1998; Antunes *et al.*, 2004).

Tabela 2. Espécies de *Candida* identificadas como agentes etiológicos de micoses no grupo de pacientes com câncer.

Registro paciente	Espécie/ URM	Sítio de isolamento
5	<i>Candida albicans</i> URM6541	Pele
8	<i>C. albicans</i> URM6542	Cavidade oral
9	<i>C. albicans</i> URM6543	Cavidade oral
10	<i>C. albicans</i> URM6544	Cavidade oral
11	<i>C. albicans</i> URM6545	Cavidade oral
12	<i>C. albicans</i> URM6546	Cavidade oral
15	<i>C. albicans</i> URM6547	Cavidade oral
16	<i>C. albicans</i> URM6548	Cavidade oral
17	<i>C. albicans</i> URM6549	Cavidade oral
18	<i>C. albicans</i> URM6550	Escarro
1	<i>C. famata</i> URM6556	Sangue
2	<i>C. guilliermondii</i> URM6558	Unha
3	<i>C. haemulonii</i> URM6554	Unha
13	<i>C. haemulonii</i> URM6555	Cavidade oral
7	<i>C. parapsilosis</i> URM6557	Cavidade oral
4	<i>C. tropicalis</i> URM6551	Cavidade oral
6	<i>C. tropicalis</i> URM6552	Região inguinal
14	<i>C. tropicalis</i> URM6553	Cavidade oral

4.3 Formação de biofilme

Em nosso estudo, todos os 18 isolados de *Candida*, foram capazes de formar biofilme (Figura 6). Quatro desses isolados apresentaram forte capacidade de formar essa estrutura, 13 demonstraram capacidade moderada e somente uma levedura revelou fraca capacidade de formação de biofilme (Tabela 3).

O gênero *Candida* pode formar biofilme em superfícies naturais ou em biomateriais utilizados em dispositivos médicos, geralmente o desenvolvimento acontece em três estágios: adesão e colonização da superfície pela levedura; crescimento e proliferação das leveduras permitindo a formação de uma camada basal de células e desenvolvimento de pseudohifas e hifas extensivas paralelamente à produção de matriz extracelular (Seneviratne *et al.*, 2009).

Segundo Junqueira *et al.* (2011), alguns fatores podem influenciar na formação de biofilme *in vitro*, como a natureza do material que compõe a superfície utilizada no ensaio, a espécie envolvida e o sítio de isolamento da cepa estudada.

Os isolados de cada espécie estudada se comportaram de maneira semelhante. Os três isolados de *C. tropicalis* demonstraram forte capacidade de formação de biofilme, enquanto que todos os isolados de *C. albicans* apresentaram capacidade moderada de formação dessa estrutura, a exceção de um, que mostrou capacidade forte.

O sítio de isolamento não influenciou na formação do biofilme quando considerada uma única espécie. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Hasan *et al* (2009), os quais, utilizando ensaios colorimétricos, verificaram que cepas de *C. albicans* isoladas de sangue e mucosa oral produziram a mesma quantidade de biofilme.

Nossos resultados relacionados à formação de biofilme concordam com a afirmação de Ramage *et al.* (2001), segundo os quais, o estabelecimento de *C. albicans* como um patógeno oportunista e um dos principais agentes de infecções nosocomiais, está relacionado com a alta propensão desta espécie em se aderir a uma variedade de superfícies (etapa inicial à formação do biofilme).



Figura 6. Avaliação da capacidade de formação de biofilme, a partir da esquerda: Forte (4+): *Candida tropicalis*; Moderada (2+/3+): *C. albicans*, Fraca (1+): *C. parapsilosis*.

Candida tropicalis também foi a espécie que apresentou maior capacidade de formação de biofilme no estudo de Estivill *et al.* (2011), utilizando TeflonTM como superfície de contato.

Apesar de ser menos prevalente do que *C. albicans*, *C. tropicalis* permanece como importante causa de infecções em humanos, especialmente em razão da alta mortalidade dos pacientes (Bizerra *et al.*, 2008). Comumente associada à candidemia nosocomial e candidúria, foi relatado que essa espécie é capaz de formar biofilmes extensos na superfície de cateteres de PVC e polistireno (Shin *et al.*, 2002; Parahitiyawa *et al.*, 2006; Bizerra *et al.*, 2008).

Alguns autores afirmam que *C. albicans* possui maior capacidade de formação de biofilme do que qualquer outra espécie, independente do material utilizado no estudo (Hawser; Douglas, 1994; Hasan *et al.*, 2009). No entanto, isso não foi observado em nosso experimento. Talvez essa divergência ocorra em razão dos diversos métodos disponíveis à avaliação da formação do biofilme, como as técnicas são bastante distintas existe uma dificuldade em comparar nossos resultados com aqueles obtidos por outros autores. A maioria dos outros autores realizou ensaios em microplacas de polistireno (Ramage *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002), ressaltando a importância de considerarmos que a formação de biofilme por cada espécie de *Candida* varia de acordo com o material que compõe a superfície (Tumbarello *et al.*, 2007).

4.4 Detecção da atividade enzimática

Utilizando o substrato Soro de Albumina bovino, 78% dos isolados apresentaram atividade proteásica, a qual variou entre muito fraca (6), fraca (7) ou forte (1). Apenas quatro isolados não apresentaram atividade proteolítica, sendo dois pertencentes à espécie *C. haemulonii*, um da espécie *C. guilliermondii* e um pertencente à espécie *C. tropicalis*. Destacou-se o URM6549 de *C. albicans*, o qual revelou atividade proteásica forte com zona de atividade igual a 0,78 (Figura 7) (Tabela 3). Todos os isolados de *C. albicans* apresentaram produção de protease, outras espécies produtoras foram *C. famata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

A detecção da atividade proteolítica de espécies de *Candida* utilizando BSA como substrato está de acordo com o descrito por Borst e Fluit (2003), Kumar *et al.* (2006), Kumar *et al.* (2009) e Macêdo *et al.* (2009).



Figura 7. Detecção da atividade proteásica por *Candida albicans* (URM6549) utilizando Albumina de Soro Bovino como substrato.

Nenhum dos isolados apresentou atividade proteolítica frente aos substratos caseína do leite e gelatina, sugerindo que provavelmente estes não são substratos adequados para testes envolvendo leveduras do gênero *Candida*. A utilização do substrato gelatina também não foi eficiente para detecção da atividade proteásica no estudo de Kumar *et al.* (2009), porém, diferentemente do observado em nosso trabalho, estes mesmos autores detectaram atividade proteásica utilizando caseína do leite em isolados de *Candida* obtidos de cavidade oral de pacientes com tuberculose pulmonar.

A produção de protease por espécies de *Candida* não depende apenas do tipo de isolado ou tipo de infecção, mas também do fenótipo, condições ambientais e até mesmo da fase de infecção (De Bernardis *et al.*, 2001).

Foi possível detectar atividade fosfolipásica em 44% dos isolados testados. A zona de atividade apresentou variações desde o grau muito fraco (ZA=0,92) até muito forte (ZA=0,66). Quatro isolados apresentaram zona de atividade muito fraca, um isolado demonstrou fraca zona de atividade, dois isolados apresentaram-se com forte zona de atividade e um isolado obtido de corrente sanguínea destacou-se apresentando zona de atividade muito forte (Figura 8) (Tabela 3), esse isolado foi identificado como *C. famata*.

Dos 18 isolados, sete apresentaram simultaneamente três parâmetros considerados fatores de virulência, no entanto o isolado 1, *C. famata*, destacou-se em termos quantitativos, como aquele cujos resultados de detecção obtiveram o maior *score* numérico.

Os estudos abordando a produção dessa enzima raramente incluem *C. famata* (Issa *et al.*, 2011; Mohandas; Ballal, 2011), dificultando a comparação com nossos resultados, o que indica a necessidade de realização de estudos posteriores envolvendo este e outros isolados desta espécie. Além disso, também é necessária a comparação com outros isolados de corrente sanguínea, a fim de estabelecer parâmetro de discussão.

A expressão de fosfolipase foi observada em apenas quatro, dos 10 isolados de *C. albicans*. A ausência de expressão de fosfolipase por *C. tropicalis* também foi verificada em nosso estudo, concordando com os dados obtidos por Mohandas e Ballal (2008).

A detecção de atividade fosfolipásica através da utilização do substrato lecitina de soja é reforçada por diversos estudos (Borst; Fluit, 2003; Kumar *et al.*, 2006 e Kumar *et al.*, 2009).

Tabela 3. Avaliação da capacidade de formação de Biofilme e detecção da atividade enzimática de fungos isolados de amostras clínicas de pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas.

Registro Paciente	Espécie/URM	Sítio de isolamento	Biofilme	Gelatina	Zona de atividade		
					proteásica	fosfolipásica	
					Caseína do leite	BSA	Lecitina de soja
5	<i>Candida albicans</i> URM6541	Pele	2+	-	-	0,92 (+)	0,75 (+++)
8	<i>C. albicans</i> URM6542	Cavidade oral	2+	-	-	0,92 (+)	0,87 (++)
9	<i>C. albicans</i> URM6543	Cavidade oral	2+	-	-	0,83 (++)	-
10	<i>C. albicans</i> URM6544	Cavidade oral	2+	-	-	0,90 (+)	-
11	<i>C. albicans</i> URM6545	Cavidade oral	3+	-	-	0,85 (++)	0,90 (+)
12	<i>C. albicans</i> URM6546	Cavidade oral	3+	-	-	0,8 (++)	-
15	<i>C. albicans</i> URM6547	Cavidade oral	3+	-	-	0,90 (+)	-
16	<i>C. albicans</i> URM6548	Cavidade oral	2+	-	-	0,80 (++)	0,90 (+)
17	<i>C. albicans</i> URM6549	Cavidade oral	4+	-	-	0,78 (+++)	-

Continuação da Tabela 3.

Número Paciente	Espécie/URM	Sítio de isolamento	Biofilme	Gelatina	Zona de atividade		
					Proteásica	fosfolipásica	
					Caseína do leite	BSA	Lecitina de soja
18	<i>C. albicans</i> URM6550	Esputo	3+	-	-	0,82 (++)	-
1	<i>C. famata</i> URM6556	Sangue	3+	-	-	0,88 (++)	0,66 (++++)
2	<i>C. guilliermondii</i> URM6558	Unha	2+	-	-	-	-
3	<i>C. haemulonii</i> URM6554	Unha	2+	-	-	-	-
13	<i>C. haemulonii</i> URM6555	Cavidade oral	2+	-	-	-	-
7	<i>C. parapsilosis</i> URM6557	Cavidade oral	1+	-	-	0,87 (++)	0,77 (+++)
4	<i>C. tropicalis</i> URM6551	Cavidade oral	4+	-	-	0,92 (+)	-
6	<i>C. tropicalis</i> URM6552	Pele	4+	-	-	0,93 (+)	0,92 (+)
14	<i>C. tropicalis</i> URM6553	Cavidade oral	4+	-	-	-	0,90 (+)

Legenda: 1+ = capacidade fraca de formação de biofilme; 2+, 3+ = capacidade moderada de formação de biofilme; 4+ = capacidade forte de formação de biofilme; - = não detecção, + = atividade muito fraca, ++ = atividade fraca, +++ = atividade forte, ++++ = atividade muito forte.

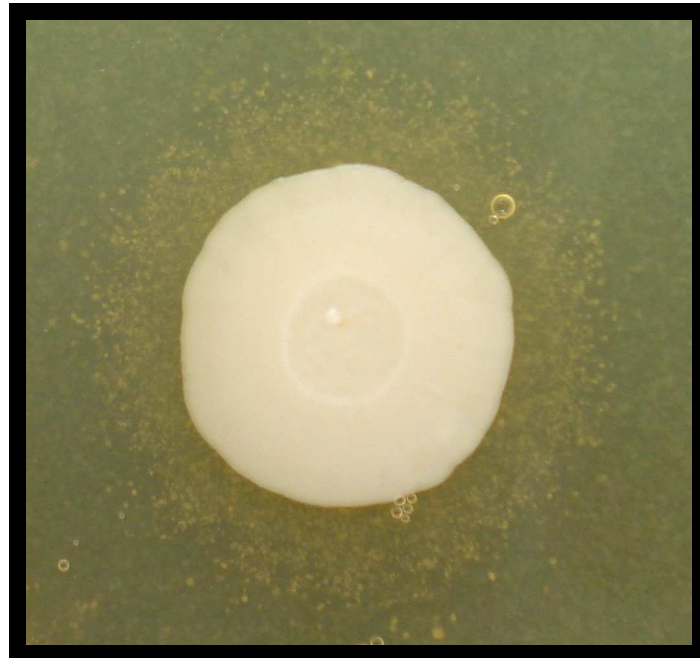


Figura 8. Detecção da atividade fosfolipásica por *Candida famata* (URM 6556) utilizando lecitina de soja como substrato.

Não foi possível estabelecer uma relação entre o sítio de infecção e a produção de enzimas em razão da grande diferença entre o número de isolados da cavidade oral quando comparado a outros sítios. No entanto, ressaltamos que os isolados de *C. tropicalis* e *C. albicans* originários de diferentes sítios apresentaram resultados semelhantes dentro da espécie, indicando que o fator espécie foi mais importante que o fator sítio de infecção.

Borst e Fluit (2003) afirmam que a detecção de protease e fosfolipase é maior em isolados provenientes de infecções do trato respiratório, quando comparados a culturas de outros sítios corpóreos. Costa *et al* (2010) verificaram que isolados de corrente sanguínea e de cateteres apresentaram menor atividade fosfolipásica que os isolados de cavidade oral, enquanto que os isolados sanguíneos foram mais proteolíticos do que os isolados de cavidade oral.

Apenas três isolados não apresentaram nenhuma atividade proteásica ou fosfolipásica, incluindo os dois de *C. haemulonii* e o isolado de *C. guilliermondii*. Esta espécie, em geral, apresenta tanto atividade proteolítica quanto fosfolipásica (Mohandas e Ballal, 2008; Costa *et al.*, 2010; Mohandas e Ballal, 2011). No estudo de Mohandas e Ballal (2008), os quais utilizaram isolados provenientes de diversas amostras clínicas, essa espécie apareceu como maior produtora de fosfolipase. Talvez o isolado testado em nosso estudo não tenha apresentado nenhuma atividade enzimática em razão do sítio de isolamento, no entanto, não podemos afirmar esse dado, uma vez não obtivemos outros isolados de *C. guilliermondii* para compará-los entre si.

A diferença de produção de protease e fosfolipase entre diferentes espécies é um resultado esperado, uma vez que, partindo do princípio segundo o qual as fosfolipases e proteases aspárticas de *C. albicans* são consideradas importantes fatores de virulência, a ausência ou redução da expressão dessas enzimas aponta para a natureza menos virulenta de outras espécies do gênero (Mohandas; Ballal, 2008).

As diferenças observadas dentro da mesma espécie são verificadas também por Costa *et al.* (2010) e podem ser decorrentes de características próprias da cepa testada, bem como do sítio de isolamento.

A patogenicidade de espécies de *Candida* é resultado das características dos isolados, estado imunológico do hospedeiro e condições locais dos sítios de infecção (Kumar *et al.*, 2009).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados podemos concluir que:

- As infecções fúngicas representam patologias pouco frequentes em pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas.
- A maioria das infecções fúngicas em pacientes portadores de neoplasias sólidas possuem natureza superficial.
- Os pacientes portadores de tumores da cavidade oral e de linfomas, do sexo masculino, na faixa etária de 50 e 69 anos, submetidos a tratamento quimioterápico se encontram sob maior risco de desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas.
- Espécies do gênero *Candida* são os principais agentes de infecção fúngica em pacientes portadores de neoplasias sólidas ou linfomas.
- *Candida albicans* permanece como a espécie mais frequentemente isolada como agente de micoses oportunistas em pacientes com tumores de órgãos sólidos ou linfomas.
- O substrato albumina de soro bovino, diferentemente da Caseína do Leite e da Gelatina, apresenta alta sensibilidade para a detecção de atividade proteásica por espécies de *Candida*.
- O sítio de infecção não influenciou a expressão de enzimas extracelulares envolvidas com a virulência.
- A capacidade de formação de biofilme por espécies de *Candida* é variável de acordo com a espécie e a cepa testada.
- *Candida haemulonii* não expressa atividade fosfolipásica ou proteásica *in vitro* utilizando os substratos Lecitina de soja, soro de albumina bovino, caseína do leite e gelatina.
- As diferentes espécies de *Candida* expressam as enzimas extracelulares de forma distinta, havendo também diferenças entre cepas da mesma espécie.
- A formação de biofilme e produção de enzimas extracelulares, como as proteases e fosfolipases, representam importantes fatores de virulência, mesmo quando a infecção acontece em pacientes que apresentam deficiência imunológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Pinzcowski, H., Vartivarian, S. 1997 The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 24: 1122-1128.
- Albuquerque, I.L.S., Camargo, T.C. 2007. Prevention and treatment of radiotherapy-induced oral mucositis: a literature review. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53:195-209.
- Álvares, C.A. Svidzinski, T.I.E., Consolaro, M.E.L. 2007. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43:319-327.
- Antunes, A.G.V., Pasqualotto, A.C., Diaz, M.C., d'Azevedo, P.A., Severo, L.C. 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46:239-241.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, Y., Masuhara, T. 1990. Comparative pathogenicity of wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralblatt für Bakteriologie* 273: 332-343.
- Arendrup, M.C. 2010. Epidemiology of invasive candidiasis. *Current Opinion in Critical Care* 16: 445-452.
- Arora, D., Anand, N., Goya, G., Kumar, R., Gupta, P., Sarita. 2011. Prevalence and risk factors of candida in cases of candidemia in a tertiary care hospital. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3:157-159.
- Arslankoylu, A.E., Kuyucu, N., Yilmaz, B.S., Erdogan, S. 2011. Symptomatic and asymptomatic candidiasis in a pediatric intensive care unit. *Italian Journal of Pediatrics* 21;37:56.
- Ascioglu, S., Rex, J. H., de Pauw, B., Bennett, J. E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D. W., Donnelly, J. P., Edwards, J. E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, O., Méis, J. F., Patterson, T. F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P. M., Stevens, D. A., Walsh, T. J. 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical Infectious Disease*. 34: 7-14.
- Atlas de mortalidade por câncer <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/> > Acesso em 29/08/2011a.
- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

- Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M.P., Rosso, R., Pallavicini, F.B., Viscoli, C. 2006. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care *BMC Infectious Diseases* 6:21.
- Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M.P., Mussap, M., Viscoli, C. 2011. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 6:e24198.
- Bizerra, F.C., Nakamura, C.V., de Poersch, C., Estivalet-Svidzinski, T.I., Borsato-Quesada, R.M., Goldenberg, S., Krieger, M.A., Yamada-Ogatta, S.F. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research* 8(3): 442-50.
- Bodey, G., Bueltmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., Mall, G., Martino, P., Meunier, F., Milliken, S. 1992. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *European Journal of Clinical Microbiol & Infectious Disease* 11:99–109.
- Borst, A., Fluit, A.C. 2003 High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *Journal of Medical Microbiology* 52(11): 971-4.
- Brito, G.N., Inocência, A.C., Querido, S.M., Jorge, A.O., Koga-Ito, C.Y. 2011. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV positive patients and control individuals. *Brazilian Oral Research* 25: 28-33.
- Cancer <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em 29/08/2011.
- Chamilos, G., Luna, M., Lewis, R.E., Bodey, G.P., Chemaly, R., Tarrand, J.J., Safdar, A., Raad, I.I., Kontoyiannis, D.P. 2006. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003) *Haematologica* 91:986-989.
- Cisterna, R., Ezpeleta, G., Telleria, O. 2010. Spanish Candidemia Surveillance Group. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 11:4200-4206.
- Colombo, A.L., Guimarães, T. 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:599-607.
- Colombo, A.L., Nucci, M., Park, B.J., Nouér, S.A. Arthington-Skaggs, B., da Matta, D.A., Warnock, D., Morgan, J., Brazilian Network Candidemia Study. 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2816–2823.
- Cornely, O.A., Böhme, A., Buchheidt, D., Einsele, H., Heinz, W.J., Karthaus, M., Krause, S.W., Krüger, W., Maschmeyer, G., Penack, O., Ritter, J., Ruhnke, M., Sandherr, M., Sieniawski, M., Vehreschild, J.J., Wolf, H.H., Ullmann, A.J. 2009. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies.

- Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica* 94: 113-122.
- Costa, C.R., Passos, X.S., Souza, L.K., Lucena, P. de A., Fernandes, O. de F., Silva, M. do R. 2010. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52(3): 139-43.
- Cutler, J.E. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 45: 187-218.
- De Bernardis, F., Sullivan P.A., Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. 2001. *Medical Mycology* 39(4): 303-13.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd edition, Utrecht, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C.A., Denning, D.W., Patterson, T.F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W.E., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kibbler, C.C., Kullberg, B.J., Marr, K.A., Muñoz, P., Odds, F.C., Perfect, J.R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B.H., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., Viscoli, C., Wingard, J.R., Zaoutis, T., Bennett, J.E. 2008. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 46(12):1813-1821.
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J.C., Dromer, F. 2008. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of Clinical Microbiology* 46:3237-3242.
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Jones, R.N. 2002. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. SENTRY Antimicrobial Survey 1 lance Program, 1997-2000. *International Journal of Antimicrobial Agents* 20: 412-418.
- Dignani, M.C., Solomkin, J.S., Anaissie, E. 2003. *Candida*. In: Anaissie, E., McGinnis M.R., Pfaller, M.A. (eds.) *Medical Mycology*. Filadélfia, Churchill Livingstone, pp. 195-239.
- Dimopoulos, G., Ntziora, F., Rachiotis, G., Armaganidis, A., Falagas, M.E. 2008. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit acquired blood stream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesthesia and Analgesia* 106:523-529.
- DiNubile, M. J., Hille, D., Sable, C. A., Kartsonis, N. A. 2005. Invasive candidiasis in cancer patients: observations from a randomized clinical trial. *Journal of Infection*. 50: 443-449.

- Douglas, L.J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11: 30-36.
- El-Din, S.S., Reynolds, M.T., Ashbee, H.R., Barton, R.C., Evans, E.G.V. 2001. An investigation into the pathogenesis of vulvo-vaginal candidosis *Sexually Transmitted Infection* 77:179-183.
- Elkamouni, Y., Lmimouni, B., Doghmi, K., Elouenass, M. 2011. *Candida famata* candidemia in immunosuppressed patient: report of a case with literature review. *Annales de biologie clinique* 69: 609-611.
- Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>> Acesso em 29/08/2011b.
- Estivill, D., Arias, A., Torres-Lana, A., Carrillo-Muñoz, A.J., Arévalo, M.P. 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods* 86(2): 238-42. Epub 2011 Jun 12.
- Eyerich, K., Eyerich, S., Hiller, J., Behrendt, H., Traidl-Hoffmann, C. 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis, from bench to bedside. *European Journal of Dermatology* 20:260-265.
- García-Ruiz, J.C., Amutio, E., Pontón, J. 2004. Infección fúngica invasora em pacientes inmunodeficientes. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 55-62.
- Godoy, P., Tiraboschi, I.N., Severo, L.C., Bustamante, B., Calvo, B., Da Matta, D.A., Colombo, A.L. 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 401-405.
- Goldani, L.Z., Mario, P.S. 2003 *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *The Journal of Infection* 46: 150-160.
- Gómez, J., García-Vázquez, E., Hernández, A., Espinosa, C., Ruiz, J. 2010. Nosocomial candidemia: new challenges of an emergent problem *Revista Española de Quimioterapia* 23:158-68.
- Gonçalves, S.S., Amorim, C.S., Nucci, M., Padovan, A.C.B., Briones, M.R.S., Melo, A.S.A., Colombo, A.L. 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil *Clin Microbiol Infect* 16: 885-887
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., Fries, B.C. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection* 11:753-761.
- Hawkins, J.L., Baddour, L.M. 2003. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clinical Infectious Disease* 36: e14-18.

- Hawser, S. P., Douglas, L.J. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and Immunity* 62: 915–921.
- Hazen, K.C. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Review* 8:462-478.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycology Research* 111:509-547.
- Hogan, L.H., Klein, B.S., Levitz, S.M. 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4):469-88.
- Issa, S.Y., Badran, E.F., Aqel, K.F., Shehabi, A.A. 2011. Epidemiological characteristics of *Candida* species colonizing oral and rectal sites of Jordanian infants. 2011. *BMC Pediatrics* 11: 79.
- Iwen, P.C., Kelly, D.M., Reed, E.C., Hinrichs, S.H. 1995. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clinical Infectious Diseases* 20: 342-347.
- Iwen, P.C., Sigler, L., Tarantolo, S., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Lackner, R.P., McCarthy, D.I., Hinrichs, S.H. 2000. Pulmonary Infection Caused by *Gymnascella hyalinospora* in a Patient with Acute Myelogenous Leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* 38:375-381.
- Jackson, A.P., Gamble, J.A., Yeomans, T., Moran, G.P., Saunders, D., Harris, D., Aslett, M., Barrell, J.F., Butler, G., Citiulo, F., Coleman, D.C., de Groot, P.W., Goodwin, T.J., Quail, M.A., McQuillan, J., Munro, C.A., Pain, A., Poulter, R.T., Rajandream, M.A., Renauld, H., Spiering, M.J., Tivey, A., Gow, N.A., Barrell, B., Sullivan, D.J., Berriman, M. 2009. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Research* 19:2231–2244.
- Jayatilake, J.A., Tilakaratne, W.M., Panagoda, G.J. 2009. *Candida* onychomycosis: A mini-review. *Mycopathologia* 168: 165-73.
- Junqueira, J.C., Fuchs, B.B., Muhammed, M., Coleman, J.J., Suleiman, J.M., Vilela, S.F., Costa, A.C., Rasteiro, V.M., Jorge, A.O., Mylonakis, E. 2011. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar *in vitro* biofilm forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiology* 4;11:247.

- Kantarcioğlu, A.S., Yücel, A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 45(5-6): 160-5.
- Krcmery, V., Kunova, A. 2000. *Candida famata* fungemia in a cancer patient: case report. *Journal of Chemotherapy* 12:189–190.
- Kibbler, C.C., Seaton, S., Barnes, R.A., Gransden, W.R., Holliman, R.E., Johnson, E.M., Perry, J.D., Sullivan, D.J., Wilson, J.A. 2003. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *Journal of Hospital Infection* 54(1):18-24.
- Kim, J., Sudbery, P. 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *Journal of Microbiology* 49:171-177.
- Kim, M.N., Shin, J.H., Sung, H., Lee, K., Kim, E.C., Ryoo, N., Lee, J.S., Jung, S.I., Park, K.H., Kee, S.J., Kim, S.H., Shin, M.G., Suh, S.P., Ryang, D.W. 2009. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clinical Infectious Disease*. 48:e57-61.
- Kirkpatrick, C.H. 2001. Chronic mucocutaneous candidiasis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 20: 197-206.
- Koga-Ito, C. Y., Lyon, J.P., Vidotto, V., Resende, M.A. 2006. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 161: 219–223.
- Kojic, E. M., Darouiche, R.O. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 255–267.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity* 70: 878–888.
- Kumar, V.G., Latha, R., Vedhagiri, K., Sathiamoorthi, T., Jayarani, G., Sasikala, R., Selvin, J., Natarajaseenivasan, K. 2009. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale* 19:3-10.
- Kumar, C.P., Kumar, S.S., Menon, T. 2006. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 161(4):213-8.
- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D.R. 1999. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infection and Immunity* 67: 6652–6662.

- Lalla, R.V., Latortue, M.C., Hong, C.H., Ariyawardana, A., D'Amato-Palumbo, S., Fischer, D.J., Martof, A., Nicolatou-Galitis, O., Patton, L.L., Elting, L.S., Spijkervet, F.K., Brennan, M.T. Fungal Infections Section, Oral Care Study Group, Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). 2010. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer* 18:985-92.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Vaccari, E. M. H., Melo, N. T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição, São Paulo, Sarvier.
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Soll, D.R. 2003. Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infection and Immunity* 71: 4970–4976
- Lass-Flörl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52: 197–205.
- MacDonald, F., Odds, F.C. 1980. Inducible proteinase of *C. albicans* in diagnostic serologic and in the pathogenesis of systemic candidosis. *Journal of Medical Microbiology* 13: 423-435.
- Macêdo, D.P.C., Farias, A.M.A., Lima Neto, R.G., Silva, V.K.A., Leal, A.F.G., Neves, R.P. 2009. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(2):188-191.
- Marr, K.A. 2000. The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. *Current Opinion in Infectious Disease* 13:615-620.
- Maschmeyer, G., Haas, A. 2008. The Epidemiology and treatment of infection in cancer patients. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* 31: 193-197.
- Mohandas, V., Ballal, M. 2011. Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*. 3(1): 4–8.
- Mohandas, V., Ballal, M. 2008. Proteinase and Phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 25: 208-210.
- Morace, G., Borghi, E. 2010. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anestesiologica* 76:950-956.
- Motta, A.L., de Almeida, G.M.D., Almeida Júnior, J.N., Burattini, M.N., Rossi, F. 2010. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Brazilian Journal Infect Disease* 14: 441-448.
- Nam, H.S., Jeon, K., Um, S.W., Suh, G.Y., Chung, M.P., Kim, H., Kwon, O.J., Koh, W.J. 2010. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary

- aspergillosis: a review of 43 cases. *Internacional Journal of Infectious Disease* 14:e479-482.
- Nucci, M., Anaissie, E. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clinical Infectious Diseases* 33: 1959-1967.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Microbiology Reviews* 51(5): 561-70.
- Nucci, M., Silveira, M.I., Spector, N., Silveira, F., Velasco, E., Martins, C.A., Derossi, A., Colombo, A.L., Pulcheri, W. 1998. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. *Mycopathologia* 141:65-68.
- Organização Mundial de Saúde/Agência Internacional de Pesquisa em Câncer. 2009. *World Cancer Report 2008*. Lyon
- Ozhak-Baysan, B., Ogunc, D., Colak, D., Ongut, G., Donmez, L., Vural, T., Gunseren, F. 2011. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. *Medical Mycology*.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Lee, J., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Powderly, W., Kauffman, C.A., Hyslop, N., Mangino, J.E., Chapman, S., Horowitz, H.W., Edwards, J.E., Dismukes, W.E. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Disease* 37: 634-43.
- Parahitiyawa, N.B., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., Ye, J., Tsang, P.W.K., Cheung, B.P.K., Yau, J.Y.Y., Yeung, S.K.W. 2006. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 114: 298–306.
- Pasqualotto, A. C., Rosa, D. D., Medeiros, L. R., Severo, L. C. 2006. Candidaemia and cancer: patients are not all the same. *BMC Infectious Disease*. 6 (50).
- Person, A.K., Kontoyiannis, D.P., Alexander, B.D. 2010. Fungal infections in transplant and oncology patients. *Infectious Disease Clinics of North America* 24(2):439-59.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 133–163.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Jones, R.N., Sader ,H.S., Fluit, A.C., Hollis, R.J., Messer, S.A., SENTRY Participant Group. 2001. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3254- 3259, 2001.

- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Hollis, R.J., Messer, S.A. The SENTRY Participant Group. 1998. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *Journal of Clinical Microbiology* 36(7):1886-9.
- Porto, E., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T., Lacaz, C.S. 1998. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 1ª edição. São Paulo, Sarvier.
- Price, M. F., Cawson, R. A. 1977. Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 15: 179-185.
- Price, M. F., Walkison, I. D., Gentry, L. O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.
- Prinsloo, B., Weldhagen, G.F. Blaine, R.W. 2003. *Candida famata* central nervous system infection. *South African Medicine Journal* 93:601–602.
- Rafailidis, P.I., Kakisi, O.K. Vardakas, K., Falagas, M.E. 2007. Infectious Complications of Monoclonal Antibodies Used in Cancer Therapy: A Systematic Review of the Evidence from Randomized Controlled Trials. *Cancer* 109: 2182-2189.
- Ramage, G., Martínez, J.P., López-Ribot, J.L. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research* 6(7): 979-86.
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., López-Ribot, J.L. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 4: 633-638.
- Ramage, G., Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot. 2001. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 2475–2479.
- Ramírez-Zavala, B., Reuss, O., Park, Y.N., Ohlsen, K., Morschhäuser, J. 2008. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 4: e1000089.
- Runke, M. 2002. Skin and mucous infections. In: Calderone, R. (ed.) *Candida and Candidiasis*. Washington D.C., ASM Press.
- Rentz, A.M., Halpern, M.T., Bowden, R. 1998. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clinical Infectious Disease* 27: 781-788.
- Ribeiro, E.L., Guimarães, R.I., Inácio, M.C.C., Ferreira, W.M., Cardoso, C.G., Dias, S.M.S., Naves, P.L.F. 2004. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. *NewsLab* 64.

- Romero, F.J., Garca, L.A., Salas, J.A., Daz, M., Quiros, L.M. 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry* 36: 507-515.
- Safdar, A., Chaturvedi, V., Cross, E.W., Park, S., Bernard, E.M., Armstrong, D., Perlin, D.S. 2001. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 2129-2133.
- Sanglard, D., Odds, F.C. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases* 2: 73-85.
- Seneviratne, C.J., Silva, W.J., Jin, L.J., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology* 54:1052-1060.
- Shahid, M., Malik, A., Bhargava R. 2008. Bronchogenic carcinoma and secondary aspergillosis -common yet unexplored evaluation of the role of bronchoalveolar lavage-polymerase chain reaction and some nonvalidated serologic methods to establish early diagnosis. *Cancer*. 113 (3): 547-558.
- Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P., Ryang, D.W. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1244-1248.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology* 20:1-9.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J. 2011. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology* 19: 241-247.
- Singal, A., Khanna, D. 2011. Onychomycosis: Diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology* 77: 659-672.
- Staber, P., Langner, S., Dornbusch, H. J., Neumeister, P. 2007. Antifungal management in cancer patients. *Wien Med Wochenschr* 157: 503–510.
- Staib, F. 1965. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* 4: 187-193. Werner H. 1996. Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi. *Zentralblatt für Bakteriologie* 200:113-124.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C., Odds, F.C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 284–292.

- Thompson, G.R. 3rd., Patel, P.K., Kirkpatrick, W.R., Westbrook, S.D., Berg, D., Erlandsen, J., Redding, S.W., Patterson, T.F. 2010. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 109:488-495.
- Tumbarello, M., Posteraro, B., Trecarichi, E.M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., Donati, K.G., Sorda, M., Spanu, T., Fadda, G., Cauda, R., Sanguinetti, M. 2007. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (6): 1843-1850.
- Velasco, E., Byington, R., Martins, C. A., Schirmer, M., Dias, L. M., Gonçalves, V. M. 2003. Prospective evaluation of the epidemiology, microbiology, and outcome of bloodstream infections em hematologic patients in a single cancer center. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 22: 137-143.
- Verma, S.B., Wollina, U. 2011. Looking through the cracks of diabetic candidal balanoposthitis! *Internacional Journal of General Medicine* 4:511-513.
- Whiteway, M., Oberholzer, U. 2004. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* 7: 350–357.
- Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R. P., Edmond, M. B. 2003. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clinical Infectious Disease*. 36: 1103-1110.

ANEXO 1**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 10/2011 (CAAE: 0009.0.447.000-11) intitulado: **“AGENTES FÚNGICOS ISOLADOS DE PACIENTES PORTADORES DE TUMORES SÓLIDOS: DIAGNÓSTICO, EPIDEMIOLOGIA E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA”**, apresentado pela pesquisadora responsável **Adriana Patrícia Medeiros de Souza**, foi aprovado nesta data, pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - SPCC / Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca da SPCC / HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 12 de abril de 2011.

Dr. Glauber Leitão
Coordenador

Comitê de Ética em Pesquisa
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer
Hospital de Câncer de Pernambuco

ANEXO 2

Meios de Cultura, Soluções e Corantes

Isolamento e purificação

Ágar-Sabouraud + 50mg/L de cloranfenicol (Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose	40,0g
Peptona	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000mL
Cloranfenicol	50mg

Meios para identificação de leveduras

Ágar uréia de Christensen

(Christensen, 1946 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Peptona	1,0g
Glicose	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato de potássio monobásico	2,0g
Fenol vermelho	12,0mg
Ágar	20,0g
Água destilada	1000mL

Meio para produção de ácidos (CaCO₃)

(diferencia o gênero *Candida* de *Brettanomyces*)

(Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose	5,0g
Extrato de levedura	0,5g
Carbonato de cálcio	0,5g
Ágar	2,0g

Água destilada100mL

Água peptonada – extrato de levedura

(para formação de película e observação da micromorfologia)

(Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose20,0g

Extrato de levedura5,0g

Peptona10,0g

Água destilada1000mL

Meio de Gorodkova

(para induzir a formação de ascos e ascosporos)

(Lacaz *et al.*, 2002)

Peptona1,0g

Glicose0,1g

Cloreto de sódio0,5g

Ágar2,0g

Água destilada100mL

Meio para prova de assimilação de carbono

(Lodder e Kreger-Van-Rij, 1952 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Meio Básico C

Sulfato de amônio5,0g

Fosfato de potássio monobásico1,0g

Sulfato de magnésio 7H₂O0,5g

Ágar20,0g

Água destilada1000mL

Meio para prova de assimilação de nitrogênio
(Lodder e Kreger-Van-Rij, 1952 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Meio Básico N

Dextrose	20,0g
Fosfato de potássio monobásico	1,0g
Sulfato de magnésio 7H ₂ O	0,5g
Ágar	20,0g
Água destilada	1000mL

Meio para fermentação de carboidratos, sem indicador
(Lacaz *et al.*, 2002)

Água Peptonada

Peptona	2,5g
Extrato de levedura	2,5g
Água destilada	1000mL

* Para 100mL do meio basal (água peptonada-extrato de levedura), adicionar 3g de cada um dos açúcares utilizados nesta prova.

Meio para produção rápida de clamidosporos (Feo, 1978 *in* Lacaz *et al.*, 2002)
(meio utilizado para identificação rápida de *Candida albicans* a partir de material clínico)

Meio a base de bile de boi

(Lacaz *et al.*, 2002)

Bile de boi (Bacto Oxgall)	20,0g
Água destilada	1000mL

Todos os meios de cultura utilizados foram preparados de acordo com Lacaz *et al.* (2002), sendo utilizados após 72 horas a temperatura ambiente para controle de esterilização.

Corantes e soluções

Azul de Amann (Carranza, 1949)

Cristais de ácido fênico.....	20g
Glicerina.....	20mL
Ácido láctico.....	20mL
Azul de algodão.....	0,05g
Água destilada q.s.p.....	20mL

Solução de hidróxido de potássio a 20%

Hidróxido de potássio.....	2g
Água destilada.....	100mL

Caracterização Enzimática

Detecção de Atividade Proteásica

Meio de Caseína (Lacaz *et al.*, 2002)

(1) Leite Desnatado (Molico®).....	10g
Água destilada q. s. p.....	100mL
(2) Ágar.....	2g
Água destilada q.s.q.....	100mL

Solução Acidificada de Cloreto de Mercúrio (Frazier apud Lacaz *et al.*, 2002)

Cloreto de Mercúrio.....	12g
Ácido Clorídrico Concentração.....	16mL
Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio de Gelatina (Lacaz *et al.*, 2002)

Extrato de carne.....	3g
Peptona.....	5g
Gelatina.....	120g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Meio de albumina de soro bovino (Aoki *et al.*, 1990)

Sulfato de magnésio.....	0,04g
Fosfato de potássio.....	0,5g
Cloreto de Sódio.....	NaCl 1g
Extrato de levedura.....	0,2g
Glicose.....	4g
Albumina de soro bovino (Sigma®).....	0,5g
Água destilada.....	60mL

Após ajustar o pH da solução para 3,5 e esterilização por filtração, adicionar o filtrado a 140 mL de ágar-água esterilizado.

Detecção de Atividade Fosfolipásica

Ágar Sabouraud acrescido de sais + Lecitina de soja (Price, Walkinson e Gentry, 1982)

Dextrose.....	40g
Peptona de Carne.....	10g
Lecitina de soja.....	2g
Cloreto de Sódio.....	0.29g
Cloreto de Cálcio.....	0,55g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL