

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Carolina Rodrigues Costa

FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *CANDIDA* DE PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Candida*
albicans SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

Orientadora: Prof^a Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Tese de Doutorado

Goiânia, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Carolina Rodrigues Costa

FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *CANDIDA* DE PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Candida*
albicans SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

Orientadora: Profª Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal
de Goiás como requisito parcial para obtenção do grau de
doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de
Microbiologia.

Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq

Goiânia, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA DE TESE
(ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL - UFG)**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFG

Costa, Carolina Rodrigues.
Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol [manuscrito] / Carolina Rodrigues Costa - 2009.

86 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia: f. 49-70.

Inclui lista de abreviaturas, siglas, símbolos e unidades
figuras e tabelas.

1. Fatores de Virulência 2. *Candida albicans* 3. Pacientes
imunocomprometidos 4. Características moleculares *I. Título*

Este trabalho é dedicado aos meus pais Theobaldo e Zaia e a meus irmãos Márcio e Théo, que sempre me acompanharam nesta jornada

"Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar. Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre."

(Bob Marley)

Mãe,

VOCÊ é uma pessoa essencial na minha vida: Obrigado por todos os momentos dedicado a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, honestidade, afeto, amizade. Saiba que nunca deixarei de te amar. Espelho-me muito em você, e és um exemplo a se seguir. Sei que tenho uma pessoa em que me apoiar sempre que estiver necessitando de amor e compreensão. Muito mais do que mãe você é minha amiga, meu escudo contra todas as coisas ruins. Te amo muito...

AGRADECIMENTOS

À Deus pela tua proteção no dia de ontem e no dia de hoje, oferecendo em sentimento as minhas vitórias, pois sei que tudo na vida está em Tuas Mãos.

À minha orientadora Maria do Rosário Rodrigues Silva pelo carinho, incentivo, ensinamento e confiança.

À professora e madrinha Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes pela amizade e companheirismo, pelos conselhos recebidos.

À professora Lúcia pela dedicação, incentivo e apoio dados, direcionando minha caminhada para que a realização deste trabalho pudesse ser concretizada.

Aos professores Pedro Henrique Ferri e Sheila Araújo Teles pela disponibilidade e auxílio na realização da parte estatística deste trabalho.

Ao professor Xisto Sena Passos por ceder os isolados de *Candida* sp provenientes do sangue e cateter.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de micologia, Hildene, Xisto, Percília, Davi, Ana Cristina, Genebaldo, Maysa, Janine, Crystiane, Núbia, Flávio, Fábio, Evandro e Milton pelos bons momentos de convívio, solidariedade e colaboração na pesquisa, possibilitando a realização dos meus objetivos.

Aos funcionários técnico-administrativos da secretaria do IPTSP e do curso de pós-graduação pela atenção, apoio e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ATCC – *American Type Culture Collection*

CEB – Célula epitelial bucal

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CR – *Complement Receptor*

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

P 42 – proteína 42

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pH – Potencial hidrogeniônico

Pz – Zona de precipitação

RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SAB – Soro albumina bovina

SAP – *Secretory Aspartil Proteinase*

SPSS – *Statistical Programme for Social Sciences*

YAD – *Yeast Ammonium Dextrose*

YEPD – *Yeast Extract Potato Dextrose*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Correlação do gene <i>SAP</i> com função em patogenicidade de <i>C. albicans</i>	07
Figura 2. Atividade de proteinase dos isolados 31, 35, 140, 173 obtidos do sangue de pacientes nosocomiais.	28
Figura 3. Atividade de fosfolipase dos isolados 4, 8, 10, 15 de <i>C. albicans</i> obtidos da mucosa bucal de pacientes infectados pelo HIV	30
Figura 4. Formação hifal do isolado 23 de <i>C. albicans</i> resistente ao fluconazol e itraconazol	33
Figura 5. Formação hifal de isolados de <i>C. albicans</i> suscetíveis e resistentes ao itraconazol usando diferentes concentrações do antifúngico durante crescimento e indução	35
Figura 6. Formação hifal de isolados de <i>C. albicans</i> suscetíveis e resistentes ao fluconazol usando diferentes concentrações do antifúngico durante crescimento e indução	37
Figura 7. Perfil de RAPD para isolados de <i>Candida albicans</i> suscetíveis e resistentes ao fluconazol usando o <i>primer</i> RSD6	38
Figura 8. Dendrograma dos 13 isolados de <i>C. albicans</i> resistentes (1, 13, 23, 24, 34) e suscetíveis (2, 5, 8, 12, 15, 36, 55 e 115) ao fluconazol obtido pelo <i>primer</i> RSD6 pela técnica de RAPD	39
Tabela 1. Concentração inibitória mínima de isolados de <i>C. albicans</i> suscetíveis e resistentes ao fluconazol e itraconazol	24
Tabela 2. Atividade de proteinase de 112 isolados de <i>Candida</i> spp obtidas da cavidade bucal (58) de pacientes HIV positivos, de cateter (33) e sangue (21) de pacientes hospitalizados	29
Tabela 3. Atividade de fosfolipase de 112 isolados de <i>Candida</i> spp obtidas da cavidade bucal (58) de pacientes HIV positivos, de cateter (33) e sangue (21) de pacientes hospitalizados	31
Tabela 4. Avaliação da habilidade de aderência à célula epitelial bucal de isolados de <i>Candida</i> obtidas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos, de cateter e sangue de pacientes hospitalizados	32

Tabela 5. Avaliação do dimorfismo (em 250 células) para isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao itraconazol em meio de crescimento YAD e posterior inoculação em meio indutor 199 com diferentes concentrações de itraconazol 34

Tabela 6. Avaliação do dimorfismo (em 250 células) para isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol em meio de crescimento YAD e posterior inoculação em meio indutor 199 com diferentes concentrações de fluconazol 36

Tabela 7. Concentração inibitória mínima e perfil molecular por RAPD com o primer RSD6 de isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol 40

RESUMO

A capacidade de aderência ao tecido do hospedeiro, a produção de exoenzimas, a resistência aos antifúngicos e a formação de hifas são fatores que podem interferir no processo infeccioso causado por *Candida*. Resistência aos derivados azólicos utilizados no tratamento de candidíase, tem sido observada em pacientes imunocomprometidos. Tipagem molecular como o RAPD-PCR tem sido utilizada para discriminação entre isolados de *Candida* spp suscetíveis e resistentes aos antifúngicos. Neste trabalho foram avaliados fatores de virulência e características moleculares de leveduras do gênero *Candida* isoladas de amostras do sangue, de cateter de pacientes nosocomiais e da cavidade bucal de pacientes HIV positivos. Os isolados utilizados foram identificados como: *Candida albicans* (59) *Candida parapsilosis* (22), *Candida tropicalis* (14) *Candida guilliermondii* (07), *Candida famata* (05), *Candida krusei* (03), *Candida lusitanae* (01) e *Candida kefyr* (01). Estas leveduras foram avaliadas quanto à atividade de proteinase, fosfolipase e à sua capacidade de aderência. A ação do fluconazol e itraconazol sobre a formação hifal, foi avaliada em 5 isolados previamente classificados como suscetíveis e resistentes ao fluconazol e ao itraconazol. A caracterização genotípica de 13 isolados de *C. albicans* resistentes e suscetíveis ao fluconazol foi realizada por meio de RAPD-PCR. Os resultados mostraram que a atividade de proteinase foi detectada em 88,1% de isolados de *C. albicans* e em 69,8% de *Candida* não *albicans*, enquanto que a fosfolipase foi detectada em 55,9% de isolados de *C. albicans* e em 37,7% de *Candida* não *albicans*. Isolados do sangue foram mais proteolíticos do que os do cateter e os da cavidade bucal, enquanto para a fosfolipase foi observado maior produção desta enzima em isolados da cavidade bucal. A capacidade de aderência à célula epitelial foi maior em *C. albicans* que *Candida* não *albicans*, no entanto não houve diferença de comportamento entre isolados obtidos dos diferentes locais estudados. A formação de hifas foi maior nos isolados resistentes do que nos isolados suscetíveis quando sob a ação de qualquer um dos dois fármacos. Na análise do RAPD-PCR foi verificada a formação de dois grupos distintos para os isolados suscetíveis e resistentes ao fluconazol, sendo que apenas um isolado resistente foi agrupado com os suscetíveis. Neste trabalho, foi verificado que a atividade de exoenzimas e a habilidade de aderência dependem além da espécie de *Candida* como também do local onde foi isolada no hospedeiro, que isolados resistentes formaram mais hifas do que os suscetíveis sob a ação de antifúngico e que as características moleculares dos isolados resistentes em mais de um padrão fingerprinting não permitiram predizer a sua suscetibilidade ao fluconazol.

ABSTRACT

Adhesion to host tissues, production of hydrolytic enzymes, the resistance to antifungals and ability to production hyphal interfere in the infectious process caused by *Candida*. Resistance to azole antifungal agents, used to treatment of candidiasis, has been observed to immunocompromised patients. Molecular typing based on RAPD-PCR has been used to discriminate between susceptible and resistant isolates to antifungal agents. In this work, were evaluated the virulence factors and molecular characteristics of *Candida* isolates obtained of samples from blood, catheter of nosocomial patients and from oral cavity of HIV positive patients. The isolates were identified as: *Candida albicans* (59) *Candida parapsilosis* (22), *Candida tropicalis* (14) *Candida guilliermondii* (07), *Candida. famata* (05), *Candida krusei* (03), *Candid. lusitaniae* (01) and *Candida kefyr* (01). The proteinase and phospholipase production and the adherence ability were determined for these yeasts. The effect of fluconazole and itraconazole antifungal agents on hyphal formation were studied to 5 isolates previously classified as either susceptible or resistant. The characterization genotypic of resistant and susceptible isolates to fluconazole was carried out for 13 isolates of *C. albicans* by RAPD-PCR method. The results showed that proteinase activity was detected in 88.1% of *C. albicans* isolates and in 69.8% of non *C. albicans*, while phospholipase was produced in 55.9% of *C. albicans* isolates and in 37.7% of non *C. albicans*. Isolates of blood were more proteolytic than catheter and oral cavity, while for phospholipase, there was more production of this enzyme in the oral cavity. The ability of adherence to buccal epithelial cell was higher in *C. albicans* than non *C. albicans*, however there was not behavior difference between the isolates from different sources studied. The hyphal formation was higher in resistant isolates than susceptible isolates when used the both drugs. In RAPD-PCR method the formation of two different groups was verified for susceptible and resistant isolates being that only one resistant isolate was clustered in the susceptible group. Thus, in this work, it was verified that the exoenzymes activity and adherence ability depend not only of the specie of *Candida*, but too of the source from host; the resistant isolates produced more hyphal than susceptible isolates under the antifungal action and the molecular characteristics of the resistant isolates did not suggest unique DNA fingerprints did not predicting their susceptibility to fluconazole.

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Aspectos Gerais	16
1.2 - Fatores que interferem no desenvolvimento de Candidíase.....	16
1.2.1. Fatores relacionados ao microrganismo.....	16
1.2.1.1 Fenômeno de aderência	17
1.2.1.1.1 Fibrinogênio.....	18
1.2.1.1.2 Fibronectina.....	18
1.2.1.1.3 Laminina.....	19
1.2.1.1.4 Componentes do complemento.....	19
1.2.1.2 Produção de exoenzimas.....	20
1.2.1.2.1 Proteinase.....	20
1.2.1.2.2 Fosfolipase	22
1.2.1.3 Transformação da fase de levedura para filamentosa (Dimorfismo).....	23
1.2.1.4 Resistência aos antifúngicos.....	24
1.2.2 Fatores relacionados ao hospedeiro.....	27
1.3 Candidíase em pacientes imunocomprometidos.....	28
1.3.1 Infecção bucal em pacientes com AIDS.....	28
1.3.2 Infecções nosocomiais por Candida.....	30
1.4 Caracterização molecular de fungos do gênero Candida.....	31
2 OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Procedência dos isolados e identificação	34
3.2 Determinação dos fatores de virulência das leveduras.....	35
3.2.1 Proteinase.....	35
3.2.2 Fosfolipase.....	36
3.2.3 Aderência de leveduras.....	36
3.2.3.1 Obtenção de células epiteliais.....	36
3.2.3.2 Determinação da aderência.....	37
3.3 Ação de itraconazol e fluconazol na indução da formação de hifas em C. albicans (Dimorfismo).....	38
3.3.1 Escolha dos isolados suscetíveis e resistentes aos derivados azólicos.....	38
3.3.2 Crescimento da levedura em presença de derivados azólicos.....	38
3.4 Caracterização genotípica usando RAPD.....	40
3.4.1 Isolados	40
3.4.2 Extração de DNA.....	40
3.4.3 Análise do DNA polimórfico de amplificação randômica (RAPD-PCR).....	40
3.5 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Proteinase.....	42
4.2 Fosfolipase.....	43
4.3 Aderência.....	45

4.4 Dimorfismo.....	45
4.5 Caracterização genotípica de isolados de C. albicans resistentes e suscetíveis ao fluconazol através da técnica de RAPD-PCR.....	49
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	58
7 REFERÊNCIAS.....	59
ARTIGO ACEITO PELA REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO.....	78

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais

Durante as últimas décadas, as infecções por *Candida* têm aumentado não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença (Zaugg et al. 2001, Pappas et al. 2004). O aumento das infecções, com lesões graves têm levado a um alto índice de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Edmond et al. 1999, Lacaz et al. 2002). Embora *C. albicans* permaneça o agente etiológico mais comum associado à candidíase, verifica-se que outras espécies não *albicans* como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* estão também envolvidas como importantes patógenos destas infecções fúngicas oportunistas (Qi et al. 2005, Pfaller & Diekema 2007).

As espécies de *Candida* existem como comensais, fazendo parte da microbiota humana e animal, sendo encontradas na cavidade bucal, no trato gastrointestinal e no sistema genitourinário, podendo em determinadas circunstâncias causar infecções, que são comuns principalmente nos indivíduos com alterações no sistema imune (Ha & White 1999, Hossain et al. 2003, Kumar et al. 2008). Desta forma, acredita-se que a candidíase tenha a maioria das vezes origem endógena, sendo que a capacidade que as leveduras do gênero *Candida* têm de colonizar, penetrar e fazer danos ao tecido do hospedeiro depende de um equilíbrio entre fatores de virulência deste microrganismo e de fatores específicos ligados ao hospedeiro.

1.2 - Fatores que interferem no desenvolvimento de Candidíase

1.2.1. Fatores relacionados ao microrganismo

1.2.1.1 Fenômeno de aderência

A capacidade que o microrganismo tem de aderir à superfície das células do hospedeiro, representa o primeiro estágio de patogênese. Os mecanismos usados por espécies de *Candida* para aderir são múltiplos e não têm sido definidos precisamente (Ghannoum & Radwan 1990, San Millán et al. 2000, Vidotto et al. 2003). A hidrofobicidade da superfície da mucosa, a presença de açúcar no meio e formação de tubo germinativo parecem interferir no processo de adesão (Manfredi et al. 2007). Doenças infecciosas, como a candidíase são conhecidas por começar com a fixação do patógeno a um alvo particular no hospedeiro (Calderone & Fronzi 2001). É claro, portanto que a inibição desta ligação constitui um importante passo para controlar a infecção em um período precoce (Vardar-Ünlü 1998 a e b).

As espécies de *Candida* podem também aderir a superfícies de dispositivos médicos e formar biofilmes. A adesão de *Candida* em dispositivos como o cateter facilita o aparecimento de candidemia e a formação de uma massa de microrganismos, incluindo *Candida*, denominada de biofilmes, que torna o microrganismo mais resistente aos antifúngicos (Chandra et al. 2001, Auler et al. 2009). Espécies de *Candida* como *C. parapsilosis* e *C. albicans* têm sido constantemente descobertas como causadoras de candidemia, acreditando-se que esta elevada frequência, principalmente quando se refere a *C. parapsilosis* pode ser explicada pela alta capacidade desta espécie de aderir a superfícies plásticas tais como o cateter (Paula et al. 1999, Dagdeviren et al. 2005).

A parede das leveduras do gênero *Candida*, constituída de glucano, manoproteína e quitina não possui apenas a propriedade de dar a forma estrutural à célula, mas também é o local onde se inicia a interação entre o microrganismo e o meio ambiente. As proteínas representam cerca de 6 a 25% do peso da parede celular, sendo que algumas manoproteínas de massa molecular de 60, 68, 200 e >200 kDa, denominadas adesinas, permitem a sua aderência a receptores extracelulares, como fibrinogênio, fibronectina e laminina presentes nos tecidos humanos (Vardar-Ünlü 1998 a e b, Pires et al. 2001). O fungo ao penetrar na célula do

hospedeiro, é reconhecido pelo sistema imune e a instalação ou progresso da infecção pode ser dificultada restringindo o foco de infecção, já em casos de infecções disseminadas, as leveduras penetram aderindo à superfície de tecidos de órgãos internos e sanguíneo podendo algumas vezes levar o indivíduo à morte (Ghannoum & Abu-Elteen 1990, Senet, 1998).

Os receptores de adesinas de *Candida*, como fibrinogênio, fibronectina, laminina e componentes do complemento presentes no organismo do hospedeiro têm sido exaustivamente estudados.

1.2.1.1.1 Fibrinogênio

Este substrato, que tem um importante papel no processo de coagulação, bem como na reparação do tecido lesado e atua em reações inflamatórias, liga-se as manoproteínas de 60, 68 e >200 kDa da parede celular de *Candida*. A ligação às manoproteínas ocorre no fragmento D e na cadeia β do fibrinogênio (Vandar-Ünlü 1998 b). Depósitos de fibrinogênio nos quais apresentam elementos fúngicos em abscessos são observados em camundongos infectados com leveduras do gênero *Candida*. Senet (1998) demonstrou que o fibrinogênio purificado é capaz de fixar-se à superfície do tubo germinativo, sendo que a quantidade de fibrinogênio que se liga às formas hifais e de tubos germinativos de *Candida* é muito maior do que quando esta espécie está sob a forma arredondada ou ovalada.

1.2.1.1.2 Fibronectina

A fibronectina, proteína de massa molecular variável de 60 kDa a 120 kDa, largamente encontrada em tecido conjuntivo e na membrana basal, pertencente à família das integrinas (moléculas de adesão) é responsável pela ligação à superfície da parede celular de *Candida* que é rica em glicoproteínas (Senet, 1998). Demuri & Hostetter (1996) observaram uma maior ocorrência de fibronectina, assim como de fibrinogênio, na superfície de tubo germinativo em comparação à levedura. Há uma visível correlação de níveis elevados de fibronectina com maior

facilidade das leveduras em invadir o hospedeiro. Sendo assim, a aderência de *Candida* à fibronectinas, presentes em coágulos de sangue, na matriz subendotelial e cobrindo superfícies artificiais como cateter e válvulas cardíacas podem ter um importante papel para o desencadeamento de candidíase (Penn & Klotz 1994).

1.2.1.1.3 Laminina

Esta glicoproteína presente em membranas basais do hospedeiro promove *in vitro* a aderência de vários tipos de células eucarióticas, como espécies de *Candida* (Bouchara et al. 1990, Pärnänen et al. 2008). Estudos realizados com microscopia eletrônica e imunofluorescência permitiram demonstrar a presença de receptores de laminina em tubos germinativos de *Candida* spp. (Bouchara et al. 1990). Os polipeptídeos de 37 e 67 kDa presentes na parede celular de *Candida* são os responsáveis pela ligação à laminina (Lopez-Ribot et al. 1994).

1.2.1.1.4 Componentes do complemento

C. albicans é um potente ativador do sistema complemento aumentando a fagocitose de *Candida* mediada pelos receptores do complemento (Fidel 2002). Estes componentes participam de muitas atividades biológicas, particularmente infecções e reações inflamatórias. Os receptores do complemento pertencentes à família de integrinas, como o CR2 e o p42-CR3 estão fortemente relacionados à capacidade de aderência das células. Estes tipos de receptores são freqüentemente ligados à superfície externa da parede celular de espécies de *Candida* (Wadsworth et al. 1993).

O fenômeno de ligação de *C. albicans* às células do hospedeiro pode ter importantes implicações terapêuticas. Baseando-se neste fato, novos tratamentos para candidíase podem

envolver a inibição de aderência do microrganismo à célula do hospedeiro (Ghannoum & Radwan 1990).

1.2.1.2 Produção de exoenzimas

1.2.1.2.1 Proteinase

Atualmente, as proteases secretadas por fungos do gênero *Candida* têm sido consideradas um importante fator de virulência. A correlação de virulência e atividade de proteinase aspartil secretora (Sap) pode ser demonstrada através do conhecimento que isolados de *Candida* fortemente proteolíticos mostram maior aderência às células do epitélio bucal e às células endoteliais quando comparadas às cepas menos proteolíticas (Klotz et al. 1983, Ghannoum & Abu Elteen 1986, Hoegl et al. 1996, Kumar et al. 2006).

As proteinases de um modo geral estão envolvidas em vários processos (Davies 1990), que incluem formação de pseudomicélio, aderência e fenômeno “switching”, que contribuem ainda mais para a patogenicidade das leveduras (Bektic et al. 2001, Naglik et al. 2003a).

A atividade de proteinase no gênero *Candida* é devida a uma única classe de proteinase, Sap que estão implicadas na patogênese do fungo (Hube 1996, Naglik et al. 2004). As proteinases são capazes de degradar proteínas como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucina, lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas como as da classe IgA (Naglik et al. 2003a, Da Costa et al. 2009).

A atividade de proteinase de *Candida* está associada com uma família de isoenzimas Sap com pesos moleculares entre 35 e 50 kDa, codificadas pelos genes *SAP1-10* que aumentam a capacidade do microrganismo de colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e evadir da resposta imune (Naglik et al. 2003b, Naglik et al. 2004). As Saps 1-3 estão associadas às células na forma de leveduras, têm atividade ótima em pH 3-5. As Saps 4-6 estão associadas à formação de hifas, têm atividade em pH 5-7. Dessa maneira pode-se dizer que as Saps com atividade em

intervalos de pH entre 3 e 7 são importantes para a sobrevivência e infecção de espécies de *Candida* dentro do hospedeiro (Monod et al. 1994, Monod et al. 1998, Ribeiro et al. 2004).

Estudos prévios criaram um modelo hipotético que correlaciona a expressão do gene *SAP* com a patogenicidade de espécies de *Candida* (Naglik et al. 2004). A aderência dessas leveduras nas células epiteliais da mucosa bucal e o fenômeno conhecido como “switching”, assim como, a invasão e danos aos tecidos do hospedeiro os quais contribuem para o desenvolvimento de infecções sistêmicas, ocorrem pela secreção das Saps 1 e 3. A habilidade de formar lesões na pele está relacionada à secreção da Sap 1, já as interações com o sistema imune do hospedeiro, ocorrem quando a Sap 2 é secretada, pois esta proteinase é responsável pela hidrólise das proteínas do sistema imune. No entanto, para que esse microrganismo escape da fagocitose dos macrófagos e consiga sobreviver é necessário a expressão do gene *SAP4*, que também está ligada à infecções sistêmicas junto com a secreção da Sap 6. A expressão dos genes *SAPs* 4, 5 e 6 foi induzida em macrófagos de murino após fagocitose de células de *Candida* (Borg-von et al. 1998). O dimorfismo apresentado por *C. albicans* é conferido pelas Saps 4, 5 e 6. Nos biofilmes formados por culturas de *Candida* verifica-se uma alta secreção das Saps 5, 6 e 9 (Naglik et al. 2003b). Pouco se sabe sobre a relação das Saps 8 e 10 com a patogenicidade em *Candida*. Genes da família *SAP* podem ser expressos em vários estágios do processo de infecção e Saps específicas tem papel especial neste processo (Naglik et al. 2004). Os genes que codificam para proteinase mais comumente expressa na cavidade bucal de indivíduos carreadores de *Candida* são *SAP 2* e *SAPs* 4-6, enquanto que na candidíase bucal são expressos os genes de *SAP 1* e *SAP 3* (Samaranayake et al. 2002). Os genes de proteinases correlacionados com sua atividade estão apresentados na figura 1.

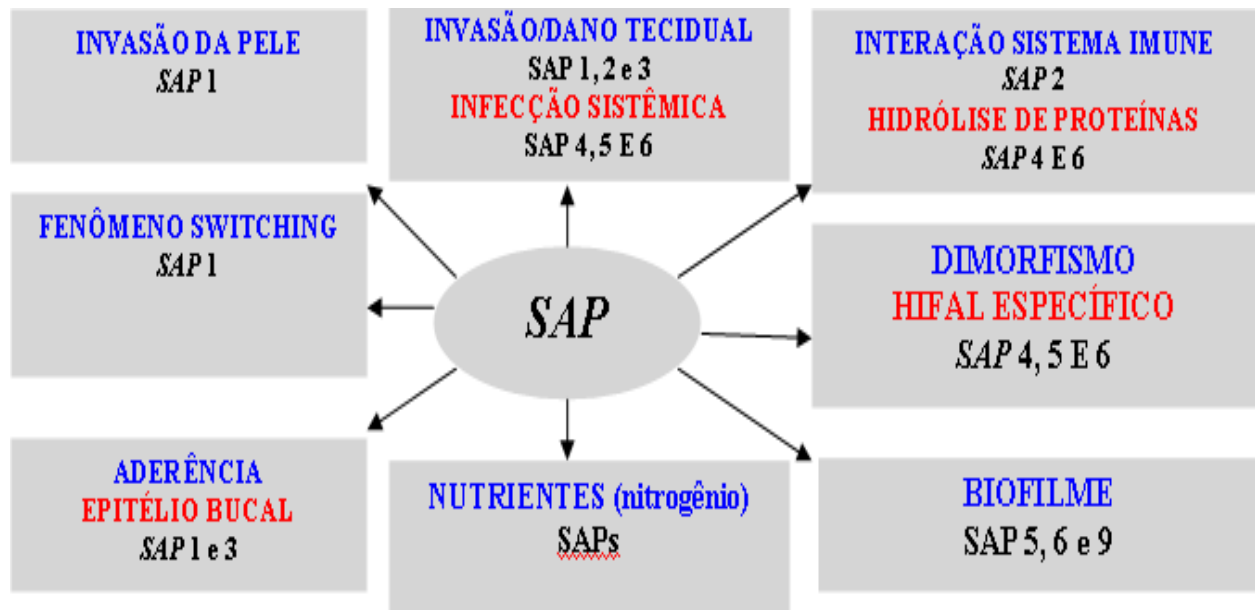


Figura 1. Modelo hipotético de correlação do gene *SAP* com função em patogenicidade de *C. albicans* segundo Naglik et al. (2004).

A virulência de *C. albicans* diminui quando inibidores de proteinase são usados no tratamento de candidíase (Schaller et al, 1999). Inibidores de proteinase tem ação fungicida e fungistática sobre cepas de *C. albicans*. Schaller et al. (1999) após exposição de proteinase de *C. albicans* a inibidores de proteinase, observou uma redução na atividade de proteinase da *Candida*, sugerindo que o uso do inibidor pode atuar como fungicida, diminuindo a presença de candidíase oral em pacientes com AIDS.

1.2.1.2.2 Fosfolipase

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas, capazes de degradar fosfolípides sendo classificadas fosfolipases A, B, C, D, lisofosfolipases e lisofosfolipases transacilases. Estes são os maiores componentes da membrana biológica, podendo ser encontrados em todos os animais, plantas e bactérias. Entre os fosfolípidos naturais o mais comum é a fosfatidilcolina (lecitina) que funciona como substrato para as quatro fosfolipases. A presença destas enzimas na superfície da levedura e na extremidade do pseudomicélio propicia a lesão tecidual por

danificação dos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro (Niewerth & Korting 2001).

As fosfolipases A e B são as de maior relevância e as mais freqüentemente estudadas. A ação da fosfolipase A libera um produto tóxico, a lisolecitina, que tem o potencial de destruir as membranas dos eritrócitos (hemólise). A presença dessa enzima no sítio de formação do broto da levedura e de formação do tubo germinativo possibilita uma maior ação de hidrólise dos fosfolípidos das membranas intracelulares do organismo hospedeiro (Niewerth & Korting 2001). A fosfolipase B, também contribui para a patogenicidade da candidíase pela degradação do tecido do hospedeiro e pela remoção de ácidos graxos. Não há formação de lisolecitina, no metabolismo da fosfolipase B, sendo que os produtos da reação são glicerofosforilcolina e ácidos graxos (Ibrahim et al. 1995).

Os isolados de *Candida* spp podem apresentar diferentes níveis de atividade desta enzima. A produção em altos níveis de fosfolipase está relacionada a um aumento nos níveis de patogenicidade, já que os isolados que possuem altas quantidades de fosfolipase apresentam uma maior capacidade de aderência e invasão (Ibrahim et al. 1995, Shimizu et al. 1996).

1.2.1.3 Transformação da fase de levedura para filamentosa (Dimorfismo)

A capacidade de *C. albicans* se apresentar sob a forma de levedura e de fase filamentosa é denominada dimorfismo (Brown & Gow 1999, Ernst 2000). *C. albicans* pode alterar sua morfologia de levedura para hifa em resposta a condições ambientais, sendo que a forma de blastoconídios predomina em meio rico de nutrientes, enquanto os filamentos são formados em resposta à falta de nutrientes (van Burik & Magee 2001). Esta característica dimórfica está envolvida na patogenicidade deste fungo (Birse et al. 1993, Bodey 1993)). Este fenômeno é importante para uma maior interação do fungo com o hospedeiro, permitindo a penetração e proliferação em uma grande variedade de tecidos (Birse et al. 1993).

As células em forma de leveduras e de hifas podem estar presentes no hospedeiro durante o crescimento comensal e também durante o processo de infecção. A formação de hifas além de promover a invasão da célula para dentro da mucosa também evita que as células de *Candida* sejam englobadas por macrófagos e neutrófilos. A transição de leveduras para hifas pode ser influenciada pela temperatura, pH, fontes de carbono e substâncias químicas e nutrientes presentes do meio (Odds 1988, van Burik & Magee 2001). *In vitro*, o soro fetal bovino é importante indutor da formação hifal em isolados de *C. albicans* (Brown & Gow 1999).

Vários agentes antifúngicos têm efeitos na morfologia de *C. albicans*. É conhecido que anfotericina B inibe o crescimento do fungo na sua forma filamentosa, enquanto os derivados azólicos podem fazer com que as células fúngicas fiquem agrupadas ou produzam brotos com alterações estruturais (Gil et al. 1994). Em experimentos de Ha & White (1999), foi observado uma correlação positiva entre os níveis de resistência, como determinado pela concentração inibitória mínima (CIM) de um isolado, e a sua habilidade de formar hifas na presença de antifúngicos azólicos.

1.2.1.4 Resistência aos antifúngicos

Fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B são os fármacos mais frequentemente empregados para tratamento das infecções causadas por *Candida* (Costa et al. 2004, Gualco et al. 2007).

Fluconazol, voriconazol e itraconazol são derivados azólicos, compostos de três grupamentos amina, que atuam na inibição da síntese do ergosterol (Como & Dismukes 1994, Ghannoum & Hossain 2000, Klepser et al. 2000, Silva 2005). Os azólicos bloqueiam a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (Vanden Bossche et al. 1994, Vanden Bossche 1997, Silva et al. 1998, Maertens 2004). Os antifúngicos triazólicos, são considerados bastantes efetivos para o tratamento de candidíases e são menos tóxicos que a anfotericina B, podendo ser administrados por via oral (Nenoff et al. 1999, Burgess et al. 2000). Fluconazol é recomendado para o

tratamento de candidemia em pacientes neutropênicos devido a sua eficácia e alta biovolatilidade o qual permite uso oral e intravenoso (Pappas et al. 2004).

Cepas de espécies de *Candida* resistentes aos azólicos e dificuldades no tratamento têm emergido em pacientes com infecções fúngicas oportunistas (Diekema et al. 2005, Fleck & Hof 2008). Métodos de referência estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) permitem detectar isolados resistentes a determinados antifúngicos através da determinação de valores de CIM. Embora estes testes apresentem reprodutibilidade, a interpretação de CIM, como resistente ou como suscetível para muitos antifúngicos não é ainda conhecido, tornando muitas vezes difícil a interpretação de CIM (Fleck & Hof 2008).

São conhecidos três mecanismos de resistência aos azólicos. 1- Redução do acúmulo intracelular do fármaco resultante da utilização reduzida deste agente antifúngico ou do aumento da excreção do fármaco devido à ação de produtos de genes de resistência aos antifúngicos, 2- Alteração estrutural da enzima 14- α -demetilase, resultando em uma diminuição na sua ligação aos azólicos, 3- Síntese aumentada de 14- α -demetilase, devido a amplificação do gene (transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico) (Nenoff et al. 1999).

A resistência aos derivados azólicos pode ser influenciada pela imunossupressão dos pacientes, uso prolongado do agente antifúngico, uso de outras substâncias quimioterápicas e resistência intrínseca de espécies de *Candida* não *albicans* (Lattif et al. 2004). O uso freqüente de terapia antifúngica em pacientes com AIDS, em decorrência de constantes recidivas de candidíase bucal ou esofágica, é o fator que provavelmente tenha maior influência na ocorrência de resistência ao fluconazol. Espécies de *Candida* como *C. glabrata* e *C. krusei* tem se mostrado comumente resistentes ao fluconazol devido ao uso prolongado deste agente antifúngico (Taylor et al. 2000, Colombo et al. 2002). Segundo Barchiesi et al. (2002) pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que fazem uso de terapia antiretroviral altamente ativo

(HAART), freqüentemente apresentam leveduras na cavidade bucal resistentes ao fluconazol. A freqüência de resistência em cepas isoladas de infecção de corrente sanguínea, é pouco conhecida. Estudos brasileiros mostram que as taxas de resistência de isolados da corrente sanguínea a antifúngicos azólicos são baixas, alcançando menos de 3%, excetuando-se *C. glabrata*, que tem habilidade para desenvolver resistência (Colombo et al. 2003, Antunes et al. 2004).

Anfotericina B é um poliênico usado no tratamento de infecções fúngicas mais graves como as sistêmicas. Atua ligando-se ao ergosterol, produzindo poros, resultando no aumento da permeabilidade de membrana levando a um desequilíbrio osmótico pela perda de íons intracelulares e conseqüentemente lise e morte das células (Rex et al. 1994). Este antifúngico pode ser usado para o tratamento de doenças endêmicas causadas por diferentes agentes como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* que são causadores de lesões sistêmicas graves. Além disso, este fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento de candidíase invasiva (Cuenca-Estrela et al. 2000, Carrillo-Muñoz et al. 2001). Embora poucos relatos de resistência aos poliênicos tenham sido descritos na literatura, esta pode ocorrer em isolados de *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* assim como de *Trichosporon sp* e *Fusarium sp* (Georgopapadakou & Walsh 1996, Vanden Bossche 1997, Boff et al. 2008). O mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo, sendo que o ergosterol dá lugar à formação de outros lipídios (Sanglard 2002). Apesar de poucos relatos de resistência dos isolados a este fármaco, seu uso tem sido limitado devido aos graves efeitos colaterais como os nefrotóxicos e devido à dificuldade na sua administração que deve ser feita por via endovenosa (Nenoff et al. 1999).

As espécies de *Candida* podem ser resistentes a agentes antifúngicos usados para proposta terapêutica e profilática. Por essa razão, é importante a identificação do agente etiológico e a descrição de dados laboratoriais sobre a sua suscetibilidade, para direcionamento da clínica, selecionando o antifúngico apropriado para terapia.

1.2.2 Fatores relacionados ao hospedeiro

A integridade da pele e das mucosas é considerada de grande relevância na defesa do hospedeiro. Todas as circunstâncias que alteram a superfície da pele ou de mucosas por traumatismo, maceração e oclusão, favorecem a aderência do fungo e sua invasão no tecido, propiciando assim a instalação da infecção (Urizar 2002). O uso de prótese dentária, por exemplo, altera as condições da mucosa bucal, produzindo lesões por microtraumatismo, dificultando a chegada dos anticorpos salivares e determina o aparecimento de um meio ácido e microaerófilo que favorece a proliferação dos fungos (Urizar 2002). Infecções por *Candida* decorrentes de traumatismos são comumente observadas em pacientes que fazem uso de cateter, devido à formação de biofilme, que permite a multiplicação do fungo, facilitando a penetração e invasão tecidual (Seneviratne et al. 2007) Os riscos para adquirir infecções relacionadas ao cateter dependem do tipo de paciente e localização deste dispositivo. Infecções relacionadas ao uso de cateter venoso central podem estar relacionadas a cinco mecanismos: contaminação no local da inserção devido à falta de assepsia; migração de organismos da pele na superfície externa do cateter; contaminação do centro do cateter por fontes endógenas e exógenas que passaram através do lúmen; infusão contaminada e disseminação hematogênica de infecção fúngica e bacteriana. Nos cateteres curtos a contaminação pela pele é mais freqüente enquanto nos mais longos, contaminação na parte interna é mais freqüente (Bouza et al. 2002).

A microbiota bacteriana regula o número de fungos, inibindo sua aderência à superfície celular por bloqueio de receptores celulares, e competindo com os fungos para utilização de nutrientes é considerada um fator importante que interfere na defesa do hospedeiro. Além disto, algumas bactérias são capazes de produzir antifúngicos o que altera a proliferação das leveduras. É conhecido que o uso de antibióticos favorece o crescimento de fungos do gênero *Candida*, devido à redução da microbiota bacteriana (Urizar 2002).

Além destes fatores, mecanismos mediados por imunidade celular e humoral constituem uma eficiente proteção contra infecções por fungos do gênero *Candida* (Richardson & Warnock

1994). O papel da atividade de neutrófilos contra infecções sistêmicas pode ser evidenciado pelo aumento de infecções disseminadas em pacientes submetidos à quimioterapia (Merz 1990). A defesa do hospedeiro com relação a neutrófilos e macrófagos é realizada através da ação microbicida destas células (Greenfield 1992). Com relação às células T verifica-se através de observações clínicas e experimentais que estas apresentam grande relevância na prevenção de candidíase mucocutânea (Fidel 2002). Este tipo de infecção é freqüente em crianças com problemas no timo, principal órgão formador de linfócitos T e em pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA), em que se observa uma acentuada diminuição destas células (Merz 1990, Delgado et al. 2009). A imunidade humoral é efetuada pela formação de anticorpos, que associados ao sistema complemento, atuam como opsonizadores para as células fagocitárias ou impedem a aderência do microrganismo às células IgA secretoras (Odds 1988, Samaranayake & Macfarlane 1990).

1.3 Candidíase em pacientes imunocomprometidos

1.3.1 Infecção bucal em pacientes com AIDS

A infecção causada pelo HIV leva a imunodepressão profunda e produz várias manifestações que incluem sintomas orais (Bosco et al. 2003). Os indivíduos infectados com HIV são predispostos a um grande número de infecções por fungos devido às alterações que ocorrem no sistema imunológico mediado por células, principalmente, linfócitos T. Nesses indivíduos, candidíase de orofaringe é a infecção fúngica oportunística mais comum (Vargas & Joly 2002, Pongsiriwet et al. 2004, Back-Brito et al. 2009). Várias espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* têm sido apontadas como causadoras de lesões nestes indivíduos. Em 1995, foi descrita uma nova espécie, *Candida dubliniensis*, que apresenta características fenotípicas semelhantes à *C. albicans*, com relativa freqüência na mucosa bucal dos pacientes HIV positivos (Sullivan et al. 1995, Sullivan et al. 2004).

A candidíase bucal ou esofágica em pacientes com SIDA caracteriza-se por um quadro clínico grave, com manifestações crônicas e recidivantes que são atribuídas à diminuição da função de células “T helper” (Chandler 1985, Samaranayake & Holmstrup 1989, Whelan et al. 1990). Esta forma clínica ocorre em 80 a 95% dos pacientes com AIDS, quando a contagem de linfócitos T CD4 está abaixo de 200 células/mm³ (Dupont et al. 1994, Samaranayake et al. 2002, Kumar et al. 2008).

A forma clínica mais conhecida de candidíase bucal é a pseudomembranosa, a qual está estreitamente correlacionada com o estado imune do paciente (Bosco et al. 2003). Clinicamente, essas lesões iniciam-se por pequenos pontos esbranquiçados na mucosa, que se tornam confluentes, formando placas pseudomembranosas, fortemente aderidas à mucosa com um fundo eritematoso. Essas lesões aparecem com maior frequência nas mucosas que revestem as bochechas, ponta de língua e palato mole, podendo ocorrer invasão maciça da cavidade com comprometimento generalizado, dificultando a deglutição (Sangeorzan et al. 1994).

Outras formas clínicas como a candidíase eritematosa ou queilite angular associadas à *Candida* são também frequentes e podem existir concomitantemente. A forma eritematosa ou de queilite pode algumas vezes ser a primeira manifestação de uma alteração sistêmica, incluindo infecção pelo HIV. Nos pacientes HIV positivos ocorre progressão clínica das candidíases desde a forma leve inicial como a eritematosa e queilite angular à formas mais graves e tardias cronificadas como pseudomembranosas ou hiperplásicas. Esta progressão está relacionada além da redução no número de linfócitos T CD4, com aumento da carga viral e evolução da imunossupressão (Ceballos et al. 1996, Ceballos 2001, Detel et al. 2001, Back-Brito et al. 2009, Carpio et al. 2009).

A detecção precoce da lesão bucal e suas complicações é um componente importante no tratamento, considerando que candidíase é um dos primeiros sinais de progressão de doença viral.

1.3.2 Infecções nosocomiais por *Candida*

As infecções nosocomiais são consideradas importantes causa de morbidade e mortalidade (Pfaller 2000, Cantón et al. 2001, Bustamante 2005). Relatos de Beck-Sagué & Jarvis (1993) mostraram um aumento da taxa de infecção hospitalar de 2% na década de 80 para 6,6% na década de 90. Microrganismos freqüentemente considerados contaminantes ou colonizantes passaram a ter características oportunistas e são relatados por inúmeros pesquisadores em surtos de infecções hospitalares com alta taxa de letalidade, particularmente nos imunossuprimidos, onde se apresentam produzindo infecções rapidamente progressivas, de difíceis diagnósticos e refratárias à terapêutica (Araújo 1998).

Estas infecções têm aumentado em decorrência de vários fatores. A tecnologia disponível na área médica e laboratorial para diagnóstico e tratamento e o aprimoramento das medidas de suporte de vida a pacientes críticos possibilitaram a maior sobrevivência de portadores de doenças degenerativas e neoplásicas, pós-cirúrgicos e de crianças prematuras, facilitando a aquisição de infecções. Outros fatores incluem ventilação mecânica, uso de cateteres, nutrição parenteral e administração de antibióticos de largo espectro. Unidades de terapia intensiva (UTIs), representam aproximadamente 5% dos leitos hospitalares e mais de 20% das infecções hospitalares ocorrem nas UTIs (Marol & Yucessoy 2007). Pacientes com longos períodos de internação, principalmente em UTIs, apresentam maior risco de infecção devido ao uso de procedimentos invasivos, de quimioterápicos ou de antibióticos (Araújo 1998). No Brasil Colombo et al. 2006 detectaram uma incidência de 2,49 casos de candidíase disseminada em 1000 admissões hospitalares em estudo realizado de março de 2003 a dezembro de 2004 em 11 unidades médicas localizadas em 9 diferentes centros brasileiros. Em Goiânia, Passos et al. (2007) verificaram 33 casos de candidemia (9,5%) em 345 pacientes da UTI estudados durante o período de abril de 2003 a março de 2005, no Hospital Universitário.

O aparecimento de infecções nosocomiais tem ocorrido devido a infecções fúngicas, especialmente por espécies de *Candida*. Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por até

78% das infecções fúngicas nosocomiais, considerados como o terceiro patógeno mais comum e quarto causador de sepsis nosocomial (Weinstein & Hayden 1998, Cantón et al. 2001, Silva et al. 2007).

As infecções causadas por *Candida* variam desde uma simples irritação na pele até a formação de lesões sistêmicas e produção de candidemia. O uso de cateter, de antibióticos, nutrição parenteral, freqüentemente, utilizadas em pacientes internados associado à virulência do microrganismo contribuem para uma maior capacidade de invasão por *Candida* spp. (Frazer et al. 1992, Fridkin & Jarvis 1996). A taxa média de mortalidade em pacientes com candidíase sistêmica nos Estados Unidos é de aproximadamente 38% (Beck-Sagué & Jarvis 1993), em Israel de 21,5% (Rennert et al. 2000), na Espanha oscila entre 22 e 33,3% (Sota et al. 1999, Saballs et al. 2000) enquanto no Brasil é de aproximadamente 50% (Colombo et al. 1999, 2006).

Nas investigações sobre epidemiologia e patogenia das infecções fúngicas tem sido utilizada uma ampla variedade de técnicas imunológicas, bioquímicas e genéticas, as quais têm possibilitado a caracterização de isolados (Soll 2000, Marol & Yucesoy 2007, Zeng et al. 2008).

1.4 Caracterização molecular de fungos do gênero *Candida*

Análise genética de isolados de *Candida* mostra que atributos de virulência podem estar intimamente relacionados ao perfil genotípico, sendo por isso relevante o estudo molecular do fungo.

Vários métodos de tipagem molecular têm sido utilizados devido à sensibilidade e especificidade, pois permitem a identificação intraespecífica dos isolados e a detecção de pequenas diferenças no conteúdo de ácidos nucleicos entre as espécies ou entre estirpes de uma mesma espécie. Estes métodos consistem na análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), na cariotipagem eletroforética, PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), no RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), na análise molecular através de microsatélite e PCR com seqüenciamento de uma determinada região do genoma fúngico.

O RFLP foi um dos primeiros métodos utilizados para genotipagem dos isolados de *Candida*. Esta técnica pode ser acompanhada por hibridação com sondas específicas, constituindo um método capaz de permitir a visualização de um número limitado de fragmentos (Boriollo et al. 2005). O uso de sondas de rDNA não tem sido totalmente efetivo para sistemas fingerprinting genotípicos em fungos (Soll 2000). O uso de eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed field) que permite a separação dos cromossomos fúngicos tem sido limitado devido ao elevado custo e ao longo tempo para realização dos ensaios que, reduz a capacidade laboratorial em analisar grande número de amostras (Reiss et al. 1998, Olive & Bean 1999, Boriollo et al. 2005). A análise do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) foi primeiramente descrito por Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990), sendo este, o método de DNA fingerprinting mais usado para caracterização de fungos, especialmente *C. albicans* (Boriollo et al. 2005). Baseia-se no uso de *primers* (tipicamente contendo de oito a 12 nucleotídeos) com seqüência arbitrária, dirigida a um locus cromossômico desconhecido, cuja visualização é feita após amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Gottfredsson et al. 1998, Olive & Bean 1999, Boriollo et al. 2005, Zeng et al. 2008). Esta técnica apresenta rapidez, simplicidade e alto poder discriminatório entre os isolados (Soll 2000).

A análise de microsatélite representa uma seqüência simples repetida de nucleotídeos no genoma do fungo (Cardoso e Wilkinson 2008). Esta técnica foi desenvolvida primariamente para genoma humano, mas atualmente é usada para genotipar fungos patogênicos como *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*, *C. glabrata* (Dalles et al. 2003, Lair-Fullerenger et al. 2003, Foulet et al. 2005).

As técnicas de PCR aliada ao seqüenciamento direto, principalmente de DNA ribossomal, tornaram possível a comparação de ITS (Espaço Interno Transcrito) localizado entre regiões altamente conservadas de muitos isolados e tem permitido avanços significativos na organização taxonômica dos fungos, tendo como vantagem a determinação da ordem dos nucleotídeos com rapidez e eficácia. (White 1990, Sartori 2005).

Experimento prévio mostrou que com poucos isolados de *Candida* houve uma diversidade genética muito grande entre os isolados quando foi utilizado o *primer* RSD6. Dos treze isolados de *C. albicans* foi possível identificar oito genótipos, no trabalho de Dassanayake et al (2002) as bandas produzidas por este *primer* identificaram quinze genótipos diferentes entre vinte isolados de *C. albicans*.

Há fortes evidências de que a resistência dos isolados aos derivados azólicos, especialmente fluconazol resulta de alterações genômicas (Franz et al. 1998, Ribeiro et al. 2005). A emergência de resistência ao fluconazol está associada com exposição contínua da população de *C. albicans* ao fluconazol, levando a uma elevação gradual da CIM de alguns isolados dentro desta população (Barchiesi et al. 1995, Franz et al. 1998). Há poucas informações quanto a diversidade genômica de isolados resistentes aos antifúngicos quando comparados com aqueles suscetíveis. Evidenciar uma possível correlação entre fatores de virulência e genótipos dos isolados de *Candida* pode contribuir para melhorar o conhecimento do desenvolvimento e progressão de candidíase.

2 Objetivos

Geral:

Avaliar os fatores de virulência e moleculares de leveduras do gênero *Candida* isoladas de amostras de sangue e de cateter de pacientes nosocomiais e da cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV.

Específicos:

- 1- Comparar fatores de virulência, como fosfolipase, proteinase e a habilidade de aderência de isolados entre *C. albicans* e *C. não albicans*.
- 2- Comparar fatores de virulência, como fosfolipase, proteinase e a capacidade de aderência de isolados entre os diferentes sítios de isolamento de *Candida* spp (sangue, cateter, cavidade bucal).
- 3- Verificar o efeito de fluconazol e itraconazol no dimorfismo de *C. albicans*.
- 4- Caracterizar genotipicamente os isolados de *C. albicans* resistentes e suscetíveis ao fluconazol.

3. Materiais e Métodos

3.1 Procedência dos isolados e identificação

Um total de cento e doze isolados de *Candida* sendo 58 da mucosa bucal de pacientes HIV positivos provenientes do Hospital de Doenças Tropicais, 33 obtidos de cateter e 21 do

sangue provenientes da unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da UFG foram utilizados neste trabalho. Todos os pacientes deram consentimento informado por escrito e o estudo foi aprovado pelo Comitê de bioética do Hospital de Doenças Tropicais de Goiás (protocolo 007/2004) e do Hospital das Clínicas da UFG (protocolo 027/07).

Todas as leveduras foram identificadas de acordo com Kurtzman & Fell (1998), usando a técnica de produção de tubo germinativo em soro fetal bovino, produção de clamidoconídio em agar corn meal suplementado com 1% de tween 80 e teste de assimilação de carboidrato. Concomitantemente para avaliar a pureza da colônia e separar as diferentes colônias de leveduras foi realizado o cultivo em meio CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Paris, France). Quando as leveduras não puderam ser identificadas pelos métodos acima citados foi usado o Kit API 20 C (bioMérieux, France), que também consiste na assimilação de vários carboidratos. Crescimento a 45°C em caldo Sabouraud dextrose, e teste de assimilação por usar xylose e α methyl-D-glucoside foram usados para ajudar na discriminação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Dolapacci et al. 2002 e Faggi et al. 2005). Através destes métodos identificou-se: 59 *C. albicans*, 22 *C. parapsilosis*, 14 *C. tropicalis*, 07 *C. guilliermondii*, 05 *C. famata*, 03 *C. krusei*, 01 *C. lusitaniae*, e 01 *C. kefyr*. Todas as leveduras foram mantidas em agar Sabouraud dextrose a uma temperatura de 4°C durante cinco anos. Para todos os testes subsequentes foi usada como controle a cepa padrão *C. albicans* ATCC 10231 (Costa et al. 2006).

3.2 Determinação dos fatores de virulência das leveduras

3.2.1 Proteinase

A detecção de atividade de proteinase foi realizada segundo a técnica de Ruchel et al. (1982). Aliquotas de 5 μ l de suspensão de *Candida* numa concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹ foram colocadas em meio indutor de proteinase por 72 horas a 35°C. O meio indutor consiste de 0,2% de soro albumina bovina (SAB, fraction V, Sigma) e solução de vitaminas (Sigma)

adicionadas de Yeast Carbon base (YCB - Difco, Detroit, MI, USA), ajustado a pH 5, esterilizado por filtração e adicionado de ágar (2%) autoclavado.

A atividade da proteinase foi medida pelo tamanho do halo translúcido da hidrólise de SAB, única fonte de nitrogênio do meio. A atividade enzimática denominado de Pz foi calculada como proporção entre o diâmetro da colônia e diâmetro da zona de degradação do substrato. $Pz \leq 0,64$ foi considerado positivo.

3.2.2 Fosfolipase

A atividade de fosfolipase foi realizada de acordo com método de Price et al. (1982). Foram inoculados 5 μ l de suspensão de *Candida* (4 isolados em cada placa) em uma concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹ em placas de Petri contendo 20 mL de ágar Sabouraud dextrose adicionado de NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM e 10% de gema de ovo estéril. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi realizada após 96 horas. Atividade enzimática denominada de Pz, foi calculada como a proporção entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de degradação do substrato, classificada da mesma forma como para proteinase descrita no item anterior.

3.2.3 Aderência de leveduras

3.2.3.1 Obtenção de células epiteliais

Para a realização da técnica de aderência foram coletadas primeiramente células epiteliais da boca de indivíduos saudáveis (sem sintomas de candidíase) utilizando swab (que foi friccionado em toda cavidade bucal). Esse swab foi colocado em 6 mL de tampão salina fosfato (PBS: 8,77 g de NaCl, 1,02 g de Na₂HPO₄, 0,34 g de NaH₂PO₄/L), lavado 2 vezes com o mesmo tampão, sendo que as células obtidas foram ressuspensas em PBS para obter uma concentração final de 5×10^5 células mL⁻¹, contadas em câmara de Neubauer (Biasoli et al 2002).

3.2.3.2 Determinação da aderência

A verificação da aderência pelos isolados de *Candida* foi feita segundo Kimura & Pearsall (1978) com algumas modificações: 0,5 mL da suspensão de levedura contendo $2,5 \times 10^7$ leveduras mL^{-1} foi misturada com 0,5 mL do pool de célula epitelial bucal. A mistura foi tamponada em PBS pH 7,2 e incubada a 37°C com agitação por uma hora, passada em papel de filtro Whatman número 41, o qual foi lavado com 10 mL de PBS para a eliminação de leveduras não aderentes. Células epiteliais com leveduras aderentes foram transferidas para uma lâmina por pressão do papel de filtro nesta lâmina, fixadas pelo calor e coradas usando a técnica de Gram-Nicolle. A determinação da aderência foi verificada pela contagem do número de leveduras aderidas a 100 células epiteliais (Biasoli et al. 2002). O esquema de determinação da aderência às células epiteliais encontra-se na figura 2.

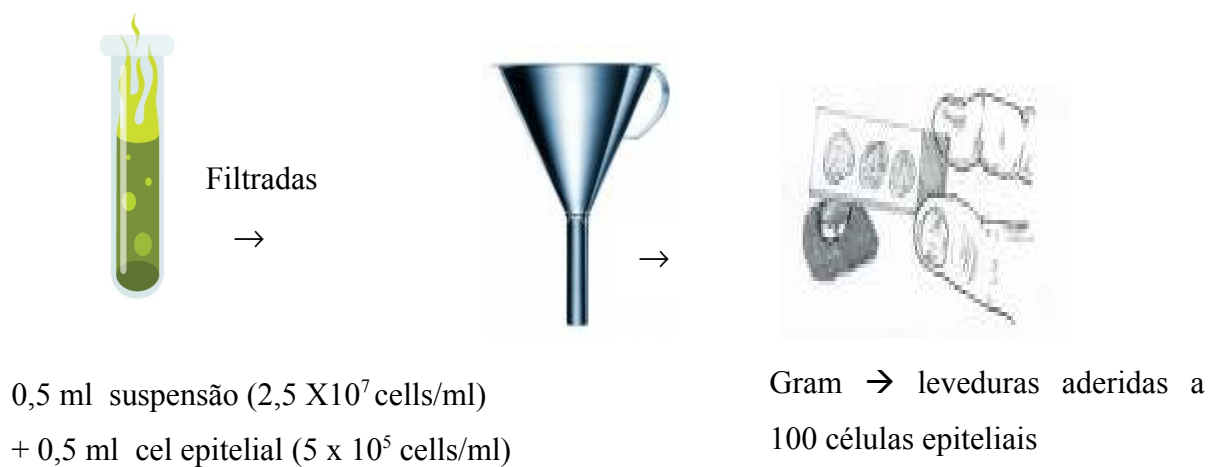


Figura 2. Determinação da aderência de células de *Candida* à células epiteliais da mucosa bucal.

3.3 Ação de itraconazol e fluconazol na indução da formação de hifas em *C. albicans*

(Dimorfismo)

3.3.1 Escolha dos isolados suscetíveis e resistentes aos derivados azólicos

Para determinar os efeitos dos agentes antifúngicos sobre a formação hifal, foram usados 5 isolados previamente classificados como suscetíveis (03) e resistentes (02) aos azólicos, itraconazol e fluconazol.

A resistência dos isolados para fluconazol foi considerada como CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ e para itraconazol $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ conforme os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI (2008) para *C. albicans*. Os valores de CIM dos 5 isolados de *C. albicans*, são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de isolados de *C. albicans* suscetíveis (S) e resistentes (R) ao fluconazol e itraconazol.

Nº. do isolado de <i>C. albicans</i>	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Fluconazol	Itraconazol
02	2 (S)	0,015 (S)
12	0,5 (S)	0,25 (S)
13	128 (R)	64 (R)
15	0,25 (S)	0,25 (S)
23	128 (R)	128 (R)

Fluconazol (R) $\rightarrow \geq 64 \mu\text{g/mL}$

Itraconazol (R) $\rightarrow \geq 1 \mu\text{g/mL}$

3.3.2 Crescimento da levedura em presença de derivados azólicos

A metodologia para verificar a indução de hifas sob a ação de antifúngicos foi realizada segundo Ha & White (1999). Os isolados de *C. albicans* crescidos em yeast extract potato dextrose (YEPD) por 48 horas foram subcultivados em 5 mL do meio de crescimento, YAD (1,77 g de levedura nitrogenada sem aminoácido adicionado de 5,0 g de sulfato de amônia e 5,4

g de dextrose/L) por 48 horas a 30°C em movimento rotatório (180 g) na ausência ou presença de itraconazol ou de fluconazol. Os derivados azólicos foram usados de acordo com a sua concentração inibitória mínima, de tal modo, que a concentração utilizada foi de 1/2, 1/4 e 1X CIM do fármaco.

As culturas de células obtidas no meio de YAD foram centrifugadas por 5 minutos a 10°C, lavadas 2 vezes com 5 mL de PBS e transferidas (concentração de 3×10^6 células/mL) para 5 mL de meio indutor de hifas (meio 199) acrescido de soro fetal bovino a 10%. A mesma concentração de antifúngico usada anteriormente (1/2; 1/4 e 1X CIM) foi adicionada ao meio indutor. As células foram incubadas a 37°C a 240g, durante 3 horas, realizando-se a contagem de 250 células (leveduras + hifas) em câmara de Neubauer (Figura 3).

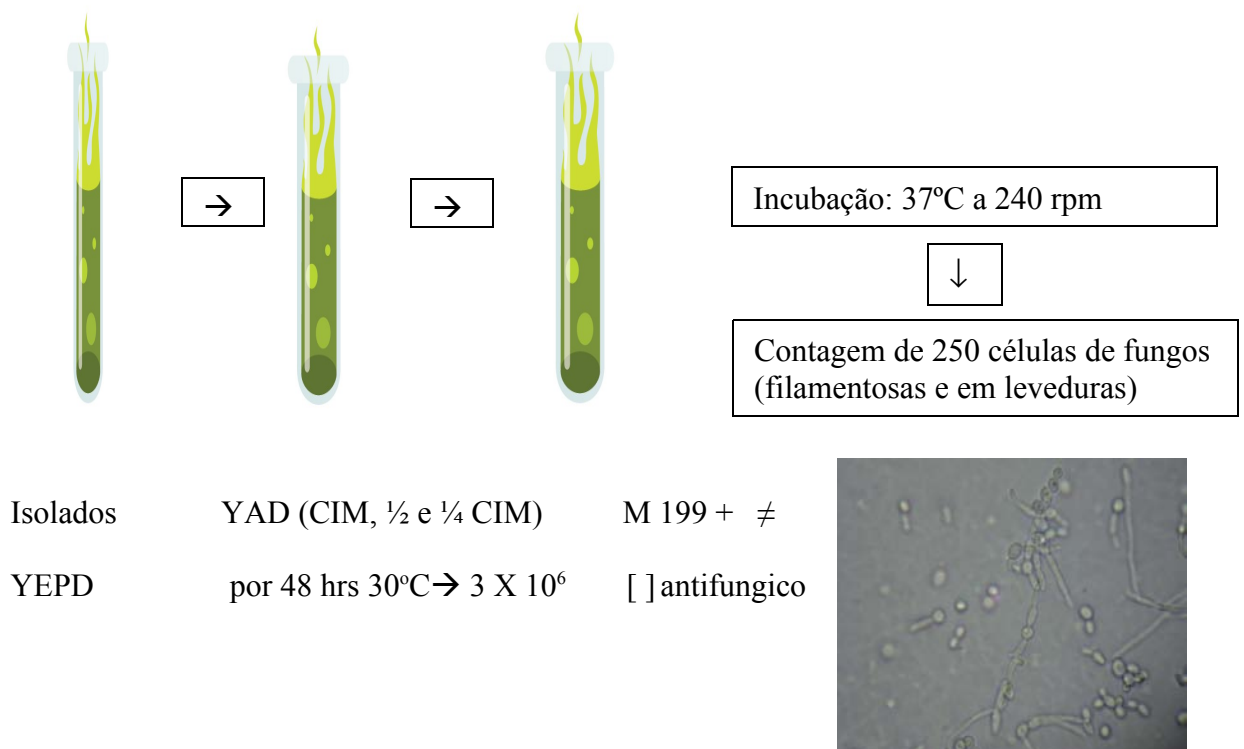


Figura 3. Metodologia usada para induzir a formação de hifas

3.4 Caracterização genotípica usando RAPD

3.4.1 Isolados

Um total de 13 isolados de *C. albicans* foram submetidos à caracterização genotípica usando a técnica de RAPD-PCR. Estas cepas foram escolhidas de acordo com a classificação de *breakpoints* estabelecidos pelo teste de suscetibilidade de microdiluição em caldo do CLSI (2008) que estabelece valores de CIM como resistentes e suscetíveis. Desta forma foram estudados cinco isolados resistentes e oito suscetíveis ao fluconazol.

3.4.2 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada segundo a metodologia de Del Poeta et al. (1999) e modificada por Casali et al. (2003). Colônias de *C. albicans* crescidas em ágar YEPD a 37°C por 24 a 48 horas foram suspensas em 0,5 mL de TENTS (Tris HCL 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, 2% de Triton, 1% de SDS) contendo 0,2 mL de pérolas de vidro de 0,45 mm, 0,5 mL de fenol clorofórmio e agitados em vórtex por 2 minutos. Após a centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm, a fase aquosa foi transferida para novo tubo e o mesmo volume de etanol absoluto foi adicionado e incubado a -20°C por 1 hora para precipitação do DNA. O DNA precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0), adicionado de 50 µg/mL de RNase, e incubado a 37°C por 30 minutos. O DNA obtido foi desproteínezado e extraído do isolado por adicionar volume igual de fenol clorofórmio e centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novo eppendorf, adicionou-se 20 µl de NaCl 5 M e o DNA foi precipitado com etanol 70%, que depois de secado, foi estocado a -20°C em 50 µl de tampão TE até processamento para PCR.

3.4.3 Análise do DNA polimórfico de amplificação randômica (RAPD-PCR).

A reação de amplificação utilizando o *primer* RSD6 (5'-GCGATCCCCA-3') foi realizada como descrita por Dassanayake et al. (2002).

As reações foram feitas em volumes de 25 µl, incluindo 50 ng de DNA template (1 µl), 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,3 (2,5 µl); 50 mM de MgCl₂ (1,0 µl); 0,2 mM de cada dNTP (2,0 µl); 2,5 U de taq DNA polimerase (0,5 µl) (Invitrogen), adicionados de 1,5 µM de RSD6 (1,25 µl). A amplificação foi realizada em PCR MJ Research Thermal Cycler modelo PTC-100™ programada da seguinte forma: os primeiros cinco ciclos incluíam 30 segundos de desnaturação a 94°C, 2 minutos de anelamento a 27°C e 2 minutos de extensão a 72°C, seguido por 45 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 2 minutos de anelamento a 32°C e 2 minutos de extensão a 72°C, e mantida a 72°C por 15 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com *blue green* (LGC Biotecnologia), visualizados em transiluminador e fotografados.

3.5 Análise estatística

Os resultados dos dados foram analisados estatisticamente usando Windows SPSS versão 11.0. Teste t- Student, Kruskal-Wallis, Mann Whitney e proporção foram usados para avaliar os fatores de virulência dos isolados. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Para montar o dendrograma dos isolados suscetíveis e resistentes ao fluconazol foi usado o programa SPAD versão 5.5. Para todos os métodos realizados neste trabalho, foram utilizados experimentos em duplicata.

4 Resultados

4.1 Proteinase

Cinquenta e dois isolados de *C. albicans* (88,1%) e 37 isolados de *Candida* não *albicans* (69,8%) demonstraram atividade de proteinase. A análise estatística não mostrou diferença de comportamento entre as espécies *albicans* e não *albicans*. *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* mostraram alta atividade de proteinase (81,8% e 85,7%, respectivamente). Todos os isolados de *C. famata* (05) e de *C. lusitaniae* (01) obtidos do cateter apresentaram atividade proteolítica. A alta atividade de proteinase mostrada por 4 isolados de *C. albicans* é observada na figura 4.

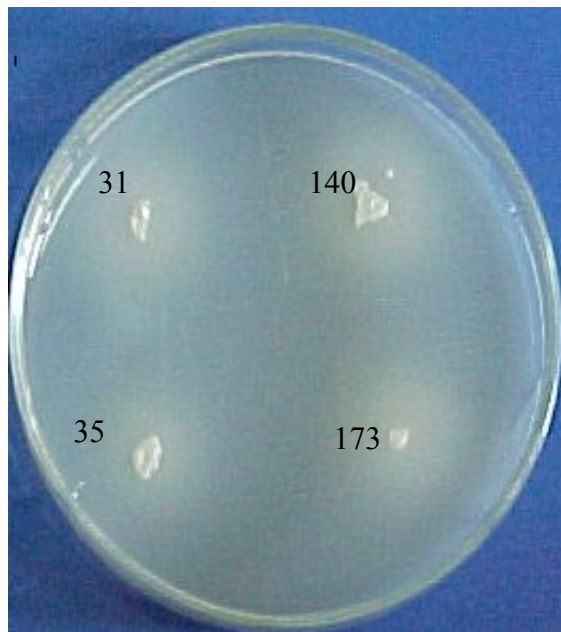


Figura 4. Atividade de proteinase dos isolados 31, 35, 140, 173 obtidos do sangue de pacientes nosocomiais

A atividade de proteinase foi detectada em 70,6% dos isolados da cavidade bucal (41/59) (em 21 do sangue (100%) e em 81,8% do cateter (27/33). Isolados do sangue foram mais proteolíticos do que isolados do cateter e da cavidade bucal ($P= 0,016$). A comparação entre espécies de *Candida* isoladas dos diferentes sítios mostrou que os isolados de *Candida* não

albicans do cateter, foram mais proteolíticos do que isolados de *C. albicans* ($P < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de proteinase de 112 isolados de *Candida* spp obtidas da cavidade bucal (58) de pacientes HIV⁺, de cateter (33) e sangue (21) de pacientes hospitalizados.

Espécies	Cavidade bucal		Sangue		Cateter		Total	
	n/total	(%)	n/total	(%)	n/total	(%)	n/total	(%)
<i>C. albicans</i>	29/31	93,5	15/15	100	8/13	61,6	52/59	88,1
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	12/27	44,4	6/6	100	19/20	95,0	37/53	69,8
<i>C. parapsilosis</i>	5/9	55,6	3/3	100	10/10	100	18/22	81,8
<i>C. tropicalis</i>	4/13	30,8	1/1	100	0	0	5/14	35,7
<i>C. guilliermondii</i>	2/3	66,7	2/2	100	2/2	100	6/7	85,7
<i>C. krusei</i>	1/1	100	0	0	1/2	50	2/3	66,7
<i>C. kefyr</i>	0/1	0	0	0	0	0	0/1	0
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	0	1/1	100	1/1	100
<i>C. famata</i>	0	0	0	0	5/5	100	5/5	100

n: número de isolados produtores de proteinase

4.2 Fosfolipase

A atividade de fosfolipase foi detectada em 55,9% dos isolados de *C. albicans* (33/59), enquanto somente 37,7% identificados como *Candida* não *albicans* (20/53) foram fosfolipase positiva. A análise estatística não mostrou diferença de comportamento entre as espécies *albicans* e não *albicans* ($P > 0,05$). Todas as espécies de *Candida* não *albicans* exibiram baixa produção desta enzima, enquanto 55,9% dos isolados de *C. albicans* apresentaram atividade de fosfolipase. A alta atividade de fosfolipase de *C. albicans* é observada na figura 5.



Figura 5. Atividade de fosfolipase dos isolados 4, 8, 10 e 15 de *C. albicans* obtidos da mucosa bucal de pacientes HIV positivos.

Fosfolipase foi detectada em 37 isolados da cavidade bucal (64%), em 7 do sangue (33,3%) e em 9 do cateter (27,3%). Isolados da cavidade bucal foram significativamente mais produtores desta enzima do que os do sangue e do que os do cateter ($P= 0,003$). A comparação entre espécies de *C. albicans* e não *albicans* isoladas dos diferentes sítios não mostrou diferença estatisticamente significativa com relação a atividade desta enzima (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de fosfolipase de 112 isolados de *Candida* spp obtidas da cavidade bucal (58) de pacientes HIV⁺ e de cateter (33) e sangue (21) de pacientes hospitalizados.

Espécies	Cavidade bucal		Sangue		Cateter		Total	
	n/total	(%)	n/total	(%)	n/total	(%)	n/total	(%)
<i>C. albicans</i>	24/31	77,4	07/15	46,6	02/13	15,4	33/59	55,9
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	13/27	48,2	0/6	0	7/20	35,0	20/53	37,7
<i>C. parapsilosis</i>	7/9	77,8	0/3	0	3/10	30,0	10/22	45,4
<i>C. tropicalis</i>	3/13	23,1	0/1	0	0	0	3/14	21,4
<i>C. guilliermondii</i>	2/3	66,6	0/2	0	1/2	50,0	3/7	42,8
<i>C. krusei</i>	1/1	100	0	0	1/2	50,0	2/3	66,7
<i>C. kefyr</i>	0/1	0	0	0	0	0	0/1	0
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	0	0/1	0	0/1	0
<i>C. famata</i>	0	0	0	0	2/5	40,0	2/5	40,0

n: número de isolados produtores de fosfolipase

4.3 Aderência

A capacidade de aderência à célula epitelial bucal (CEB) foi maior em *C. albicans* (\bar{X} = 227,5 ± 107,1) do que em *Candida* não *albicans* (\bar{X} = 154 ± 76,5) ($P < 0,001$). Isolados de *C. guilliermondii* mostraram alta habilidade de aderência (\bar{X} = 196,1 ± 93,7), mas não foi analisado estatisticamente devido ao pequeno tamanho da amostragem (7 isolados). A habilidade de aderência à CEB de isolados do sangue, do cateter e da cavidade bucal mostrou-se bastante semelhante ($P = 0,113$). Isolados de *C. albicans* da cavidade bucal ($P = 0,002$) e do cateter ($P = 0,032$) foram mais aderentes a CEB que isolados de *Candida* não *albicans* (tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da habilidade de aderência à CEB de isolados de *Candida* obtidas da cavidade bucal de pacientes HIV⁺, de cateter e sangue de pacientes hospitalizados

Etiologia	Número médio de leveduras aderidas a 100 CEB ± dp			
	Cavidade bucal	Sangue	Cateter	Total
<i>C. albicans</i>	258,9 ± 119,3	180,7 ± 51,5	207,6 ± 105,6	227,5 ± 107,1
<i>C. não-albicans</i>	164,9 ± 95,7	130,8 ± 46	146,2 ± 50,6	154 ± 76,5
<i>C. parapsilosis</i>	171,4 ± 83,7	126,0 ± 46,9	149,5 ± 52,5	155,3 ± 65,6
<i>C. tropicalis</i>	125,2 ± 87,6	102 ^a	-	123,5 ± 84,4
<i>C. guilliermondii</i>	258 ± 109,2	152,5 ± 65,8	147 ± 66,5	196,1 ± 93,7
Outras espécies*	254,5 ± 54,5	-	141,9 ± 52,21	164,4 ± 68,6

a = um isolado

* *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. lusitaniae*

4.4 Dimorfismo

Os cinco isolados de *C. albicans* analisados, três suscetíveis e dois resistentes ao itraconazol e ao fluconazol, mostraram diferenças na formação de hifas quando sob a ação do antifúngico. Na ausência do fármaco, para todos os isolados foi observada a formação de hifas em mais de 90% das células.

A formação de hifas foi maior nos isolados resistentes do que nos isolados suscetíveis quando sob a ação de qualquer um dos dois fármacos ($p < 0,001$), sendo que esta ação era mais pronunciada quando sob valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtida através do teste de suscetibilidade realizado previamente. À medida que os valores da concentração do antifúngico foram aumentando ($1/4$ CIM, $1/2$ CIM e $1X$ CIM), foi produzida uma menor quantidade de hifas, que variava de acordo com a suscetibilidade do isolado. Houve uma variação significativa na produção de hifas pelos isolados na presença do fármaco na sua CIM comparada com $1/2$ CIM ou $1/4$ de CIM ($p < 0,001$)

A formação de hifas do isolado 23 de *C. albicans* resistentes ao fluconazol e ao itraconazol na ausência de fármaco e na presença de $1/2$ de CIM de fluconazol é mostrado na figura 6.

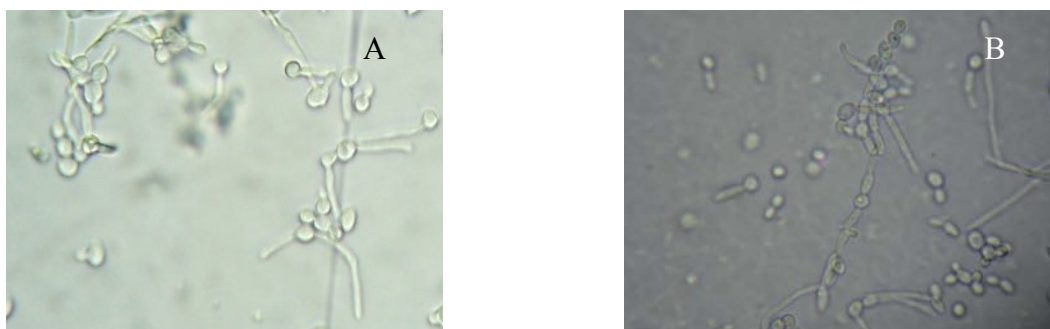


Figura 6. Ação do fluconazol no dimorfismo do isolado 23 de *C. albicans* resistente ao fluconazol e itraconazol. A- na ausência do antifúngico B- na presença de $1/2$ CIM em meio 199 (400X).

Os resultados obtidos com relação ao dimorfismo sob a ação de fluconazol e de itraconazol encontram-se nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 7 e 8.

Tabela 5. Avaliação do dimorfismo (em 250 células) para isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao itraconazol em meio de crescimento YAD e posterior inoculação em meio indutor 199 com diferentes concentrações de itraconazol.

Concentração do antifúngico ($\mu\text{g/mL}$)

isolado/ suscetibilidade	Sem antifúngico	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM
	hifas n (%)	hifas n (%)	Hifas n (%)	Hifas n (%)
02/suscetível	234 (93,6)	35 (14)	68 (27,2)	95 (38)
12/suscetível	225 (90,0)	20 (08)	54 (21,6)	57 (22,8)
13/resistente	237 (94,8)	72 (28,8)	109 (43,6)	135 (54)
15/suscetível	238 (95,2)	08 (3,2)	13 (5,2)	30 (12)
23/resistente	230 (92,0)	85 (34)	87 (34,8)	125 (50)

CIM= Concentração inibitória mínima

YAD= Base nitrogenada com extrato de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio.

P < 0,001 → diferença significativa entre os isolados resistentes e suscetíveis

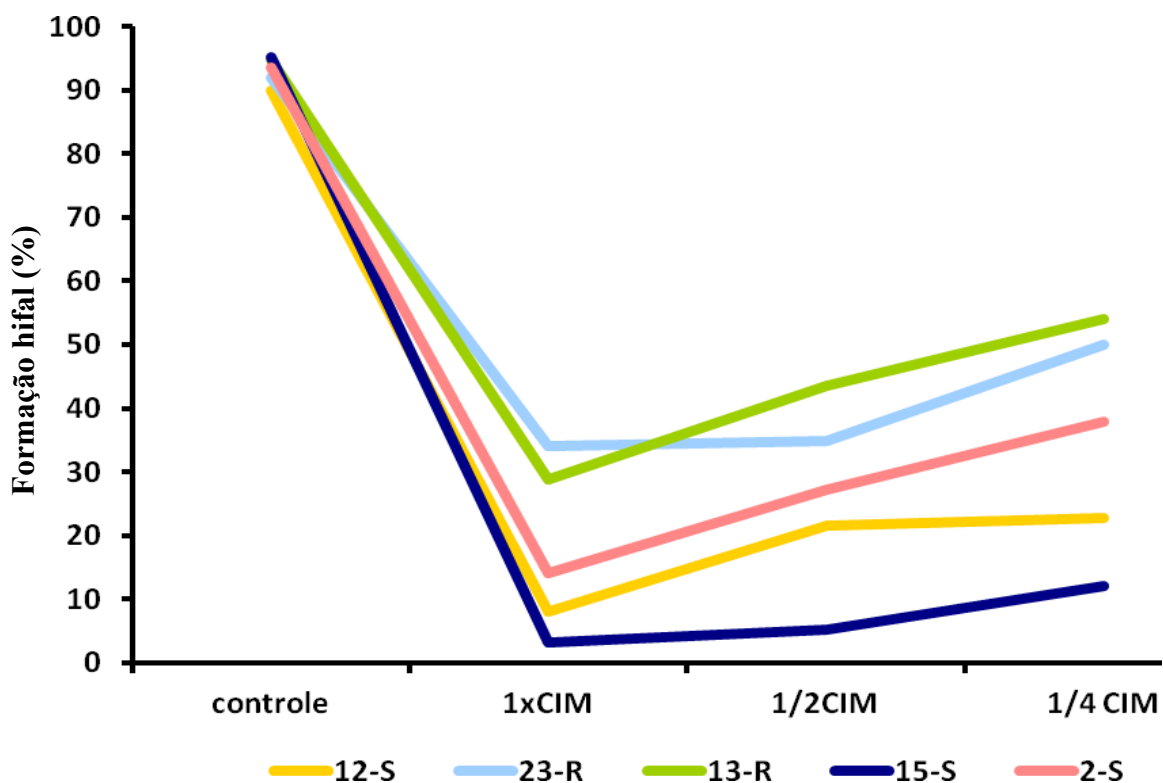


Figura 7. Formação hifal de isolados de *C. albicans* suscetíveis (2, 12 e 15) e resistentes ao itraconazol (13 e 23) usando diferentes concentrações do antifúngico durante crescimento e indução.

Tabela 6. Avaliação do dimorfismo (em 250 células) para isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol em meio de crescimento YAD e posterior inoculação em meio indutor 199 com diferentes concentrações de fluconazol.

isolado/ suscetibilidade	Concentração do antifúngico (µg/mL)			
	sem antifúngico	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM
	hifas n (%)	hifas n (%)	hifas n (%)	hifas n (%)
02/suscetível	225 (90)	30 (12)	88 (35,2)	95 (38)
12/suscetível	230 (92)	20 (08)	53 (21,2)	70 (28)
13/resistente	237 (94,8)	125 (50)	153 (61,2)	160 (64)
15/suscetível	236 (94,4)	15 (06)	40 (16)	58 (23,2)
23/resistente	239 (95,6)	107 (42,8)	136 (54,4)	145 (58)

CIM= Concentração inibitória mínima

YAD= Base nitrogenada com extrato de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio.

P < 0,001 → diferença significativa entre os isolados resistentes e suscetíveis

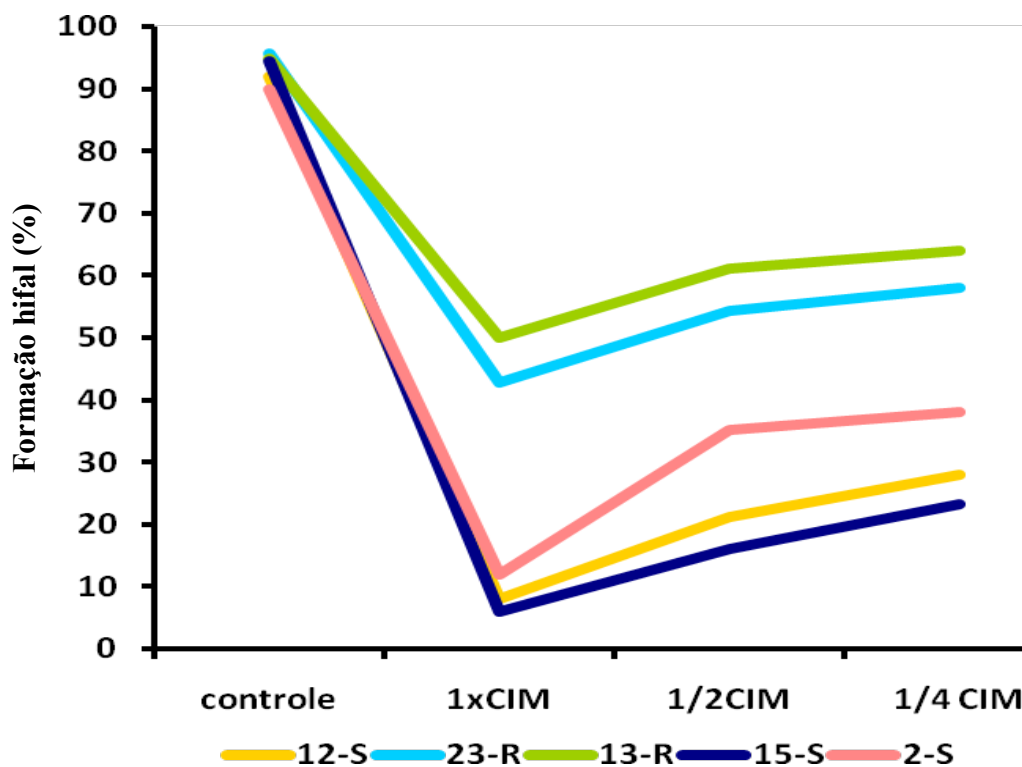
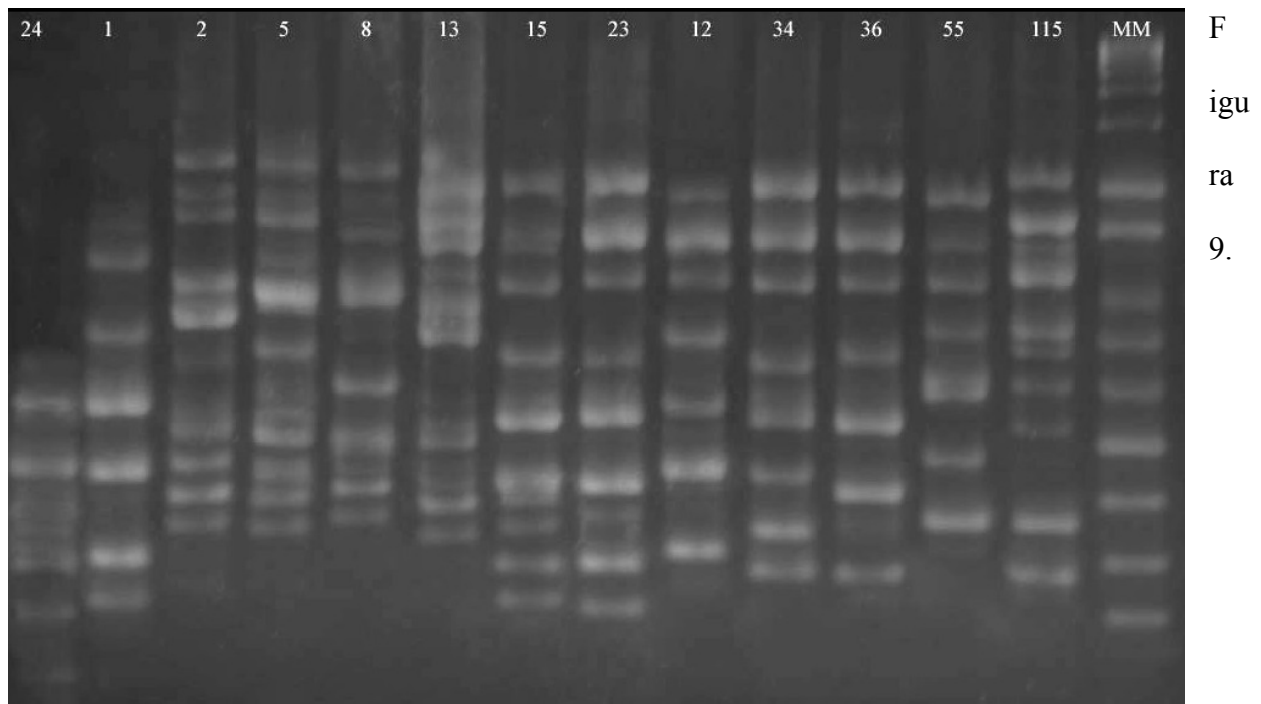


Figura 8. Formação hifal de isolados de *C. albicans* suscetíveis (2, 12 e 15) e resistentes (13 e 23) ao fluconazol usando diferentes concentrações do antifúngico durante crescimento e indução.

4.5 Caracterização genotípica de isolados de *C. albicans* resistentes e suscetíveis ao fluconazol através da técnica de RAPD-PCR.

Os isolados de *C. albicans*, mostraram número de bandas que variou de 7 a 11 usando-se o primer RSD6, pela técnica de RAPD-PCR (Figura 9).

12000
5000
2000
1650
850
650
500
400
300
200
100
pb



Perfil de RAPD para isolados de *C. albicans* suscetíveis (2, 5, 8, 12, 15, 36, 55 e 115) e resistentes (1, 13, 23, 24 e 34) ao fluconazol usando o primer RSD6.

*MM- marcador de 100 pares de base (Invitrogen)

O critério para interpretação dos dados foi relacionado à diferença na posição das bandas. O perfil de bandas observado quando se utilizou o *primer* RSD6 permitiu identificar oito genótipos distintos entre os 13 isolados (resistentes ou suscetíveis ao fluconazol), classificados em grupos A e B de acordo com o dendrograma. No grupo A foram incluídos os isolados 15 e 36 (suscetíveis), 1, 23, 24 e 34 (resistentes) e no grupo B foram incluídos os isolados 2, 5, 12, 55 e 115 (suscetíveis) e 13 (resistente) como mostrado na Figura 10. Dos cinco isolados resistentes ao fluconazol, três (1, 23 e 34) produziram o mesmo perfil genotípico (A1), entretanto entre os isolados suscetíveis apenas dois (2 e 5) produziram o mesmo perfil genotípico (B1). Fato interessante ocorreu com os isolados 15 e 36 (suscetíveis ao fluconazol) que se mostraram com o mesmo perfil genotípico dos resistentes (A1). Os demais isolados produziram genótipo independente. O perfil molecular dos isolados é mostrado na tabela 7

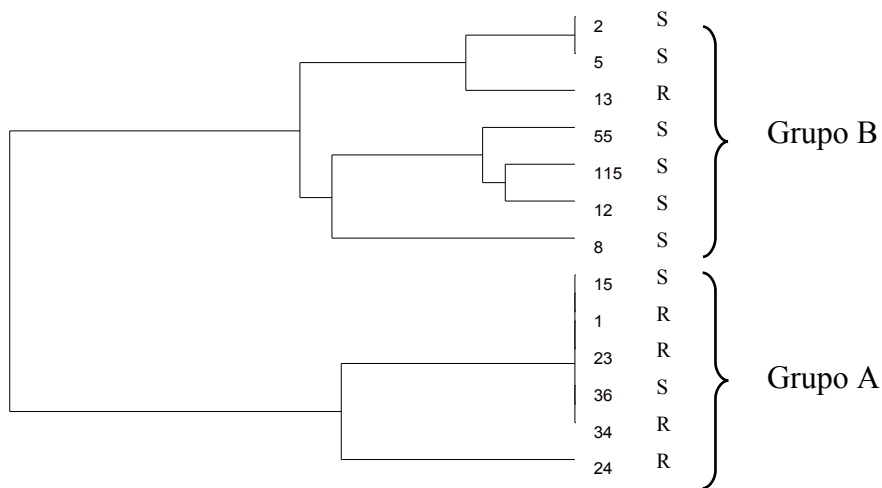


Figura 10. Dendrograma dos 13 isolados de *C. albicans* resistentes (1, 13, 23, 24 e 34) e suscetíveis (2, 5, 8, 12, 15, 36, 55 e 115) ao fluconazol obtido por amplificação com o *primer* RSD6 por RAPD-PCR.

Tabela 7. Perfil molecular por RAPD de isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes a CIM de fluconazol.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil molecular
Resistentes	01	A1
	13	B2
	23	A1
	24	A2
	34	A1

Suscetíveis	02	2,0	B1
	05	0,125	B1
	08	0,5	B6
	12	2,0	B5
	15	0,25	A1
	36	4,0	A1
	55	1,0	B3
	115	1,0	B4

5 Discussão

A capacidade de produção de proteinase e de fosfolipase, aderência a superfície de células do hospedeiro, habilidade de produção de hifas, além de resistência aos antifúngicos são considerados importantes fatores de virulência para espécies de *Candida*, facilitando o estabelecimento da infecção (Calderone & Fronzi 2001, Yang 2003).

Há vários estudos relacionados a fatores de virulência de *C. albicans* e *C. não albicans*, mas somente poucos relatos na literatura investigam a virulência em espécies de *Candida* relacionados à localização deste fungo no hospedeiro. De acordo com alguns autores, proteinase aspartil secretora e fosfolipase são produzidas em altas taxas em *C. albicans*, enquanto espécies de *C. não albicans* apresentam baixas taxas dessas enzimas (Kantarcioglu & Yucel 2002, Kumar et al. 2006, Gokce et al. 2007). Neste trabalho, embora não estatisticamente significante, os isolados de *C. albicans* foram mais produtores de proteinase e de fosfolipase do que *C. não albicans* sendo detectados em 88,1% e 55,9 % de isolados de *C. albicans* e em 69,8% e 37,7% de *C. não albicans* respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à característica da cepa ou estar relacionados ao local onde foi isolado o fungo. Em isolados do sangue, independente da espécie foi verificada alta atividade de proteinase. Na cavidade bucal a produção desta enzima foi maior em *C. albicans* do que *C. não albicans*, enquanto isolados de *Candida não albicans* do cateter foram mais proteolíticos. A alta atividade de proteólise verificada por todos os isolados de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. famata*, confirma a habilidade de produção dessa enzima por espécies de *C. não albicans* isoladas de cateter. Isolados de *C. parapsilosis* de espécimes clínicas de pacientes hospitalizados apresentam-se com elevada atividade de proteinase (Dagdeviren et al. 2005).

É conhecido que a atividade de fosfolipase produzida pelo fungo pode ser diferente em determinadas localizações no hospedeiro. Price et al.(1982) observaram diferenças na atividade de fosfolipase em isolados do sangue (55%), feridas (50%) e urina (30%). Apesar de não haver

diferença significativa de fosfolipase entre as espécies de *Candida* obtidas de diferentes locais, foi verificado neste trabalho que isolados do sangue e do cateter apresentaram menor atividade desta enzima do que isolados da cavidade bucal. A alta produção de fosfolipase na cavidade bucal, encontrada no presente estudo é semelhante à verificada por vários pesquisadores. A atividade de fosfolipase, em pacientes imunocomprometidos foi detectada em todos os isolados obtidos da cavidade bucal por Kumar et al. (2006). Koga Ito et al. (2006) verificaram elevada produção de fosfolipase em isolados da cavidade bucal de pacientes HIV positivo.

Os dados verificados neste trabalho mostraram que a atividade enzimática está relacionada não somente à espécie de *Candida*, mas também ao local do hospedeiro onde foi isolado o fungo, pois o comportamento enzimático foi diferente nos locais estudados (sangue, cateter e mucosa bucal).

Alguns estudos têm mostrado que *C. albicans* tem sido mais aderente a CEB que outras espécies de *Candida* (Biasoli et al. 2002, Lyon & Resende 2006). Neste trabalho foi verificada maior aderência de *C. albicans* ($P < 0,001$), sendo que isolados desta espécie da cavidade bucal e do cateter apresentaram-se mais aderentes do que *Candida* não *albicans*. A alta habilidade de aderência apresentada por *C. albicans* pode indicar maior virulência quando comparada com espécies não *albicans*. Em experimento realizado por Henriques et al. (2007) foi verificado que *C. albicans* foi mais aderente a CEB do que *C. dubliniensis*. Surpreendentemente, foi observado que isolados de *C. guilliermondii* obtidos neste estudo mostraram alta capacidade de aderência ($\bar{x} = 196,1 \pm 93,7$). De acordo com Kennedy (1988), é conhecido que aderência pode ser considerada como processo específico multifatorial envolvendo vários tipos de adesinas na superfície das células de *Candida* bem como variedade de sítios de ligação à célula do hospedeiro.

A morfogênese de *C. albicans* e a transição de leveduras para hifas estão relacionados com a patogenicidade da levedura. A forma filamentosa do fungo possui uma estrutura que permite uma penetração no tecido do hospedeiro mais fácil do que quando este se apresenta em

forma de levedura (Gow et al. 2002, Yang 2003). A parte apical da hifa é o local de maior secreção de enzimas capazes de degradar proteínas, lipídios e outros componentes celulares que facilitam a infiltração no tecido (Hube & Naglik 2001). Experimentos com *C. albicans* realizados em cobaia mostraram que as leveduras que eram capazes de formar hifas apresentaram maior capacidade de invasão ao tecido do que as mutantes de leveduras. Estas últimas devido à mutação perderam a capacidade de diferenciar em hifas diminuindo assim a capacidade de penetração (Felk et al. 2002). Da mesma forma, comprovando a maior virulência da célula fúngica na sua forma hifal, é conhecido que *in vitro* a adesão às células epiteliais bucais é menor nas células em forma de levedura do que nas formas hifais (Kriznik et al. 2005).

A influência de derivados azólicos sobre a virulência de *C. albicans* tem sido investigada (Gow et al. 2002, Benhardt et al. 2003). Willis et al. (2001) relataram diminuição da habilidade de adesão às células epiteliais bucais e decréscimo na produção de fosfolipase de *C. albicans* que foram tratados com fluconazol. Em concentrações subinibitórias de itraconazol, Blanco et al. (2006) verificaram redução da adesão às células epiteliais desta levedura. Assim, a influência de antifúngicos azólicos na transformação de leveduras para hifas levando-se em consideração se o isolado é suscetível ou resistente aquele fármaco, tem sido pouco investigada, por isso foi estudada neste trabalho. Há indicações de que microrganismos suscetíveis perdem a habilidade de formar hifas sob a ação do antifúngico, enquanto os isolados resistentes não são ou são pouco afetados sob estas condições (Ha & White 1999). A formação hifal foi inibida significativamente nos isolados suscetíveis, tanto na presença de itraconazol quanto de fluconazol neste trabalho. A inibição da formação de hifas na dependência da concentração do antifúngico verificada neste estudo para itraconazol e fluconazol (correlação com a concentração antifúngica) foi observada também por Ha & White (1999). Estes resultados mostram que a inibição de crescimento da levedura por antifúngico nos isolados suscetíveis é acompanhada pela inibição da formação da hifa. Ainda pode ser sugerido que nos isolados resistentes, a formação de hifa seja um importante fator de resistência, não inibindo o crescimento do fungo quando sob a ação do antifúngico. Os

azólicos atuam na produção de ergosterol da célula fúngica. Assim, o efeito de azólicos sobre a formação hifal ocorre provavelmente devido a aumentada área de superfície das células hifais comparada à das leveduras, pois estruturas hifais requerem mais membrana plasmática por célula. Trabalhos anteriores mostram que uma amostra com alterações no gene *ERG11*, responsável pela produção do ergosterol (principal constituinte da membrana celular da célula fúngica) apresenta limitações na produção da hifa, presumivelmente devido à carência de ergosterol (Lees et al. 1990).

Há numerosos estudos investigando a diversidade genética de isolados de *Candida* suscetíveis e resistentes ao fluconazol (Danassanayake et al. 2002, Ribeiro et al. 2005). A técnica de RAPD-PCR pode ser usada para discriminação entre estes tipos de isolados (Diaz-Guerra et al. 1997, Danassanayake et al. 2002, Cirak et al. 2003).

Fluconazol é o antifúngico mais usado para tratamento de infecções causadas por *C. albicans*, mas tem sido observado um número aumentado de isolados desta espécie resistentes a este fármaco. Portanto, a detecção de resistência entre os isolados é considerada de grande importância. A característica genotípica da levedura pode variar como uma resposta ao tratamento por este antifúngico e assim pode ser útil para aplicação apropriada do antifúngico (o perfil molecular de um determinado isolado antes do tratamento pode ser diferente do pós tratamento). Caracterização genotípica em grupos tem sido definida por Xu et al. (2000) para isolados resistentes ao fluconazol.

O perfil molecular encontrado neste trabalho, com 8 genótipos diferentes mas com 4 dos 5 isolados resistentes ao fluconazol classificados no mesmo grupo (A), ou seja de mesma origem clonal e apenas 1 isolado em outro grupo (B) compartilhado com isolados suscetíveis mostra que o comportamento das cepas resistentes não foi único, mas muito similar. Xu et al. (2000) encontraram resultados semelhantes aos descritos neste estudo, onde de 78 isolados os resistentes puderam ser caracterizados em 3 grupos, compartilhado com amostras suscetíveis ao fluconazol. Da mesma forma, Danassanayake et al (2002) mostraram que dos 20 isolados estudados, um

isolado resistente apresentou o mesmo perfil do isolado suscetível. Diante dos resultados obtidos, as características moleculares dos resistentes em mais de um padrão fingerprinting sugerem que não se pode prever se uma amostra é suscetível ou resistente ao fluconazol usando apenas a técnica de RAPD-PCR, embora haja evidência de correlação de genótipo e amostra resistente ao fluconazol.

6 Conclusões

1- As diferenças na expressão das atividades de proteinase e de fosfolipase e a capacidade de adesão à CEB, estão intimamente relacionados à espécies de *Candida* e aos sítios de onde as amostras foram procedentes (cateter, sangue e cavidade bucal).

2-Alta atividade de proteinase e fosfolipase de *Candida* não *albicans* mostra a importância para conduzir futuros estudos relacionados ao mecanismo de virulência destas espécies, as quais estão emergindo como patógenos clinicamente importantes.

3- A inibição de crescimento das leveduras por antifúngicos nos isolados suscetíveis foi acompanhada pela inibição da formação da hifa.

4- A maior formação de hifas observada nos isolados resistentes do que nos suscetíveis sob a ação de antifúngicos sugere a presença de hifas como um importante fator de resistência, o qual pode impedir a inibição de crescimento do fungo pelo antifúngico.

5-As características moleculares dos isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol em mais de um padrão fingerprinting não permitiram prever se uma amostra é suscetível ou resistente a este antifúngico usando apenas a técnica de RAPD como discriminatória, embora tenha sido observada evidência de correlação de genótipo e amostra resistente ao fluconazol.

6-Apesar de *Candida albicans* ter sido mais aderente à CEB que espécies não *albicans*, *C. guilliermondii* apresentou alta habilidade de aderência a CEB.

7 Referências

Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'azevedo PA, Severo LC 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 46: 239-241.

Araújo MAE 1998. Infecções [fúngicas nosocomiais](#). *Revista do Idipa* n° 1/outubro.

Auler ME, Morreira D, Rodrigues FFO, Abrão MS, Margarido PFR, Matsumoto FE, Silva EG, Silva BCM, Schneideer RP, Paula CR 2009. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology* 1-6.

Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconsellos TC, Querido SMR, Jorge AOC, Reis ASM, Balducci I, Koga-Ito CY 2009. Frequency of *Candida* spp in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia* 167: 81-87.

Barchiesi F, Hollis RJ, McGough DA, Scalise G, Rinaldi MG, Pfaller MA 1995. DNA subtypes and fluconazole susceptibilities of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. *Clin Inf Dis* 20: 634-640.

Barchiesi F, Maracci M, Radi B, Arzeni D, Baldassarri I, Giacometti A, Scalise G 2002. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 50: 999-1002.

Beck-Sagué CM, Jarvis WR 1993. The National nosocomial fungal surveillance system. secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J. Infec. Dis* 167: 1247-1251.

Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Flörl C, Zepelin MB, Dierich MP, Würzner R 2001. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *Immunol and Med Microbiol* 31: 65-71.

Bernhardt H, Knoke M, Bernhardt J 2003. Changes in *Candida albicans* colonization and morphology under influence of voriconazole. *Mycoses* 46: 370-374.

Biasoli SM, Tosello ME, Magaró HM 2002. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 45: 465-469.

Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS 1993. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 61: 3648-3655.

Blanco MT, Morales JJ, Lúcio L, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Gómez-García AC 2006. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. *Oral Microbiology Immunology* 21: 69-72.

Bodey GP 1993. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment. Raven Press New York

Boff E, Lopes PGM, Spader T, Scheid LA, Loreto E, Dal Forno NF, Aquino V, Severo, LC, Santurio JM, Alves, SH 2008. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à Anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 36-40.

Borg-von ZM, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28: 543-554.

Boriollo MFG, Hofling JF, Mendes A, Rosa EAR 2005. Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) em estudos epidemiológicos. *Estud Biolog* 27: 21-47.

Bosco VL, Birman EG, Cury AE, Paula CR 2003. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesqui Odontol Bras* 17: 217-222.

Bouchara JP, Tronchin G, Annaix V, Robert R, Senet JM 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infection and Immunity* 58: 48-54.

Bouza E, Burillo A, Munoz P 2002. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect* 8: 265-274.

Brown AJ, Gow NA 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7: 333-338.

Burgess DS, Hastings RW, Summers KK, Hardin TC, Rinaldi MG 2000. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36: 13-18.

Bustamante CI 2005. Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches. *Curr Opin Infect Dis* 18: 490-495.

Calderone RA, Fronzi WA 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microb* 9: 327-335.

Cantón E, Viudes A, Pemán J 2001. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberam Micol* 18: 51-55.

Cardoso JE, Wilkinson MJ 2008. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Summa phytopathol* 34: 55-57.

Carpio E, Lopez V, Fardales V, Benitez I 2009. Oral manifestations of HIV infection in adult patients from the province of Sancti Spiritus, Cuba. *J Oral Pathol Med* 38: 126-131.

Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberam Micol* 18: 2-5.

Casali AK, Goulart L, Silva LKR, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 33: 405-415.

Ceballos A 2001. Las candidiasis orales en el paciente HIV (+): Ayer y hoy. *Gac Med Bilbao* 98: E16-E18.

Ceballos A, Aguirre JM, Echebarria MA, Ceballos L 1996. Prevalencia y distribución de las candidiasis orales en pacientes con SIDA establecido. *Medicina Oral* 1: 6-10.

Chandler FW 1985. Pathology of the mycoses in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), in M.R. McGinnis (ed) *Curr top med mycol*, vol.1 Springer-Verlag, New York, p.1-23.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* Vol. 80, N 3 903-908.

Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S 2003. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1027-1032.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. Document M27 – A3, CLSI, Pennsylvania, 19087- 1898, vol. 28.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchin MI, Richtmann R, Derossi A, Wey S 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diag Microbiol Inf Dis* 34: 281-286.

Colombo AL, da Matta D, de Almeida LP, Rosas R 2002. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *J Infect Dis* 6: 118-123.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano EJU, Nucci M 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 41: 235-239.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Mata DA, Warnock D, Morgan J 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol* 44: 2816-2823.

Como JA, Dismukes WE 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J med* 330: 262-72.

Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OFL, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Silva MRR 2006. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop* 48: 257-261.

Costa M, Passos XS, Miranda ATB, de Araújo RSC, Paula CR, Silva MRR 2004. Correlation of *in vitro* itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycopathol* 157: 43-47.

Cuenca-Estrela M, Mellado E, Guerra TMD, Monzón A, Tudela JLR 2000. Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 46: 475-477.

Da Costa KRC, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC 2009. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia* 167: 73-79.

Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M 2005. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical species of hospitalised patients. *Mycoses* 48: 321-326.

Dalle F, Dumont L, Franco N, Mesmacque D, Caillot D, Bonnin P, Moiroux C, Vagner O, Cuisenier B, Lizard S, Bonnin A 2003. Genotyping of *Candida albicans* oral strains from healthy individuals by polymorphic microsatellite locus analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2203–2205.

Dassanayake RS, Ellepola ANB, Samaranayake YH, Samaranayake LP 2002. Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale. *APMIS* 110: 315-321.

Davies DR 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann Rev Biophysics and Biophysical Chem* 19: 189-215.

Delgado ACD, Pedro RJ, Aoki FH, Resende MR, Trabasso P, Colombo AL, de Oliveira MSM, Mikami Y, Moretti ML 2009. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect* 15: 364-371.

Del Poeta M, Toffaletti DL, Rude TH, Dykstra CC, Heitman J, Perfect JR 1999. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathology and as an antifungal target. *Genetics* 152: 176-178.

Demuri GP, Hostetter MK 1996. Evidence for a beta (1) integrin fibronectin receptor in *Candida tropicalis*. *J Infec Dis* 174: 127-132.

Detel SR, Tarwater P, Phair JP, Margolick J, Riddler SA, Muñoz A 2001. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. *AIDS* 15:347-355.

Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL 1997. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 35: 856-861.

Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis R, Pfaller M 2005. Prospective global surveillance for *Candida* spp infection: four year results from the ARTEMIS study. Abstract M-2238. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C, December.

Dolapci I, Tekeli A, Gocmen JS, Aysev D, Guriz H 2002. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp.-positive hemocultures. *Acta path. Microbial. Scand* 110: 391-395.

Dupont B, Denning DW, Marriot D, Sugar A, Viviani MA, Sirisanthana T 1994. Mycoses and AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 32: 19-28.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN 1999. Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Inf Dis* 29: 239-244.

Ernst JF 2000. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2002. Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14: 398-405.

Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinelli C, Difonzo, E 2005. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses* 48: 211-215.

Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-Regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and Immunity* 70: 3689-3700.

Fidel Jr PL 2002. Immunity to *Candida*. *Oral Diseases* 8: 69-75.

Fleck R, Hof H 2008. Breakpoints for posaconazole susceptibility testing: background and discussion about the need of establishing values. *Mycoses* 51: 1-4.

Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier JC, Costa MJ, Bretagne S 2005. Microsatellite Marker Analysis as a Typing System for *Candida glabrata* *J clin microbiol* 43:4574-4579.

Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhauser J 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3065-72.

Frazer VJ, Jones M, Dunkel J, Strofer S, Medoff G; Dunagan WC 1992. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 15: 414-421.

Fridkin SK, Jarvis WR 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9: 499-511.

Georgopapadakou N, Walsh TJ 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 279-291.

[Ghannoum M](#), [Abu Elteen K](#) 1986. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 24: 407-13.

Ghannoum, M., and K. H. Abu-Elteen 1990. Pathogenicity determinants in *Candida*: a review. *J. Mycol. Med.* 33:265-282.

Ghannoum MA, Radwan SS 1990. *Candida* adherence to epithelial cells. CRCPress- Boston.

Ghannoum MA, Hossain MA 2000. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opinion on Invest Drugs* 9:1797-1813.

Gil C, Perez-Diaz R, Nombela C 1994. Inhibitory and morphological effects of several antifungal agents on three types of *C. albicans* morphological mutants. *J Med. Vet. Mycol* 32:151-62.

Gokce G, Cerikcioglu N, Yagei A 2007. Acid proteinase, phospholipase and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 164: 265-269.

Gottfredsson MG, Cox GM, Perfect JR 1998. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology* 30:405-418.

Gow NAR, Brown AJP, Odds FC 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5: 366-371.

Greenfield RA 1992. Host defense system interactions with *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 30: 89-104.

Gualco L, Debbia EA, Bandettini R, Pescetto L, Cavallero A, Ossi MC, Schito AM, Marchese A 2007. Antifungal resistance in *Candida* spp isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 179-184.

Ha KC, White TC 1999. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemother* 43: 763-768.

Henriques M, Azeredo J, Oliveira R 2007. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. *Mycoses* 50: 391-396.

Hoegl L, Ollert M, Korting HC 1996. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidosis. *J Mol Med* 74: 135-142.

Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Doma E 2003. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol and Immunol* 18: 302-308.

Hube B 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Trop Med Mycol* 7: 55-69.

Hube B, Naglik J 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147: 1997-2005.

Ibrahim AS, Mirbord F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 63: 1993-1998.

Kantarcioğlu A, Yücel A 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160-165.

Kennedy MJ 1988. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* 2: 73-169.

Kimura LH, Pearsall NH 1978. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 21: 64-68.

Klepser ME, Hoffman HL, Evans EJ 2000. Novel triazole antiungal agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 539-605.

Klotz SA, Drutz DJ, Harrison JL, Hupert M 1983. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun* 42: 36-40.

Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, Resende MA 2006. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia* 161: 219-223.

Kriznik A, Bouillot M, Coulon J, Gaboriaud F 2005. Morphological specificity of yeast and filamentous *Candida albicans* forms on surface properties. *Biologies* 328: 928-935.

Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T 2006. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 161: 213-218.

Kumar CPG, Menon T, Rajasekaran S, Sekar B, Prabu D 2008. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. *Mycoses* 52: 44-48.

Kurtzman CP, Fell JW 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Fourth edition, Elsevier.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins EM 2002. *Tratado de Micologia Médica* Ed Sarvier 1104p.

Lair-Fuller S, Guillot J, Desterke C, Seguin D, Warin S, Bezille A, Chermette R, Bretagne S 2003. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1798–1800.

Lattif AB, Banerjee U, Prasad R, Biswas A, Wig N, Sharma N, Haque A, Gupta N, Baquer NZ, Mukhopadhyay G 2004. Susceptibility pattern and molecular type of species-specific *Candida* in oropharyngeal lesions of Indian human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 42: 1260-1262.

Lees ND, Broughton MC, Sanglard D, Bard M 1990. Azole susceptibility and hyphal formation in cytochrome P-450-deficient mutant of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 831-836.

Lopez-Ribot, JJ, Casanova M, Monteagudo C, Sepúlveda P, Martinez JP 1994. Evidence for the presence of a high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. *Infection and immunity* 62:742-746.

Lyon JP, Resende MA 2006. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wears after exposure to fluconazole. *Mycoses* 50: 21-24.

Maertens JA 2004. History of development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect Dis* 10 (Suppl. 2): 1-10.

Manfredi M, Merigo E, Salati A, Conti S, Savi A, Polonelli L, Bonanini M, Vescovi P 2007. In vitro candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP) against *Candida albicans* cells adhered to resin acrylic discs. *J Oral Pathol Med* 36: 468-471.

Marol S, Yucessoy M 2007. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses* 51: 40-49.

Merz WG 1990. *Candida albicans* strain delineation. *Clin Microbiol* 3: 321-334.

Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida species*. *Mol Microbiol* 13: 357-368.

Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D 1998. Differential regulation of SAP 8 e SAP 9, which encode two new members of secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiol* 144: 2731-2737.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B 2003a. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428.

Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes –Naglik LL, Greenspan D 2003b. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188: 469-479.

Naglik JR, Albrecht A, Bader O, Hube B 2004. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6: 915-926.

Nenoff P, Oswald U, Hausteil UF 1999. *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses* 42: 629-639.

Niewerth N, Korting C 2001. Phospholipase of *Candida albicans*. *Mycoses* 44: 361-367.

Odds FC 1988. *Candida* and Candidosis a review and bibliography. *Bailliere Tindall, London, United Kingdom*.

Olive DM, Bean P 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, 37: 1661-1669.

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38: 161-189.

Pärnänen P, Kari K, Virtanen I, Sorsa T, Meurman JH 2008. Human laminin-332 degradation by *Candida* proteinases. *J Oral Pathol Med* 37: 329-335.

Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, Souza LKH, Fernandes OFL, Sales WS, Silva MRR 2007. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 163: 145-151.

Paula CR, Marques SA, Matsumoto FE, Melo TA, Gambale W 1999. Nosocomial yeast infection in a public children's hospital of São Paulo, Brasil. *Trends in invasive Fungal infect*: 161 Abstract Book, 14-16 October, Malta.

Penn C, Klotz SA 1994. Binding of plasma fibronectin to *Candida albicans* occurs through the cell binding domain. *Microb Pathog* 17: 387-393.

Pfaller MA 2000. Epidemiologic of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. *Braz J Infect Dis* 4: 161-167.

Pfaller MA, Diekema DJ 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.

Pires MFC, Corrêa B, Gambale W, Paula CR 2001. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 163-169.

Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sriburee P, Pattanaporn K, Krisanaprakornkit S 2004. Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. *J Oral Science* 46: 101-105.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.

Qi QG, Hu T, Zhou XD 2005. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. *J Oral Med* 34: 352-356.

Rennert G, Pitlik S, Finkelstein R, Kitzes-Cohen R 2000. Epidemiology of candidemia - A nationwide survey in Israel. *Infection* 20: 26-29.

Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, [Debeaupuis JP](#), [Hanazawa R](#), [Latgé JP](#), [Lortholary J](#), [Makimura K](#), [Morrison CJ](#), [Murayama SY](#), [Naoe S](#), [Paris S](#), [Sarfati J](#), [Shibuya K](#), [Sullivan D](#), [Uchida K](#), [Yamaguchi H](#) 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 36: 249-257.

Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, Van der Horst CM, Edwards J, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, Levenstein MJ, Webb CD 1994. For the Candidemia Study Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 331(20): 1325-1330.

Ribeiro MA, Mirandal AE, Paula CR 2004. Prevalence and exoenzyme secretion of *Candida albicans* isolates from oral and vagina mucosas of HIV-infected women. *Mycopathologia* 157: 255-261.

Ribeiro MA, Paula CR, Perfect JR, Cox GM 2005. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. *Med Mycol* 43: 647-650.

Richardson MD, Warnock, DW 1994. Fungal Infection Diagnosis and management. 4th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, p. 207.

Ruchel R, Tegeler R, Trost TM 1982. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 233-244.

Saballs P, Torres-Rodríguez JM, Salvadó M, Sales P, Gimeno Bayón JL, Knobel H, Colomé JLL, Serrano C, Drobnic L 2000. La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio retrospectivo de nueve casos. *Rev Iberoam Micol* 17:2-5.

Samaranayake LP, Holmstrup P 1989. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J. Oral Pathol. Med* 18: 554-64.

Samaranayake LP, MacFarlane TW 1990. Oral candidosis, Boston Wright p.265.

Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, Blignaut E, Wanzala P 2002. Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Diseases* 8(Suppl. 2): 151-160.

Sangeorzan JA, Bradley SF, Zarins LT, Ridenour GL, Tibali RN, Kauffman CA 1994. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 97: 339-346.

Sanglard D 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* 5: 379–385.

San Millán R, Elguezabal N, Regúlez P, Moragues MD, Quindos G, Ponton J 2000. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology* 146: 2105-2112.

Sartori, D. Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em grãos de café. 2005. P.97. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

- Schaller M, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen W, Hube B 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34: 169-180.
- Senet JM 1998. *Candida* adherence phenomena, from comensalism to pathogenicity *Internat Microbiol* 1: 117-122.
- Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP 2007. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseses* 14: 582-590.
- Shimizu MT, Almeida Q, Fantinato V, Unterkircher CS 1996. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulfates, proteinase and phospholipase secreted by *Candida species*. *Mycoses* 39: 161-167.
- Silva MRR, de Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR 1998. Drug resistance of yeast isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *Rev Microbiol* 29: 272-275.
- Silva P 2005. Drogas Antifúngicas. In: Farmacologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5^a ed, p. 1081-1090.
- Silva EH, Ruiz LS, Matsumoto FE, Auler ME, Szeszs W, Paula CR 2007. Candiduria in a public hospital of São Paulo: Characteristics of the yeast isolates. *Rev Inst Med Trop* 49: 349-353.
- Soll DR 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 13: 332-370.
- Sota M, Ezpeleta C, Cisterna R 1999. Description of 165 of fungemia: a multicenter study. *Rev Iberoam Micol* 16: 30-35.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes JA, Bennett DE, Coleman DC 1995. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141 (Pt. 7): 1507-1521.

Sullivan DJK, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, *et al* 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS yeast Res* 4: 369-76.

Taylor BN, Fichtenbaum C, Saavedra M, Slavinski J, Swoboda R, Wozniak K, Arribas A, Powderly W, Fidel PL Jr 2000. In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis* 182: 955-959.

Urizar JMA 2002. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol* 19: 17-21.

Van Burik JAH, Magee PT 2001. Aspects of fungal pathogenesis in Humans. *Annu Rev Microbiol* 55: 743-772.

Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC 1994. Molecular mechanism of drugs resistance in fungi. *Trends Microbiol* 2: 393-400.

Vanden Bossche H 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoamer Micol* 14: 44-49.

Vardar-Ünlü G 1998 a. Identification of fibronectin adhesin on *Candida albicans*. *J Med Sciences* 28: 475-480.

Vardar-Ünlü G 1998 b. Mannoprotein adhesin of *Candida albicans* Germ tubes. *J Med Sciences* 28: 469-474.

Vargas KG, Joly S 2002. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol* 40: 341-50.

Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Aoki S, Ito-Kuwa S 2003. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* 20: 52-54.

Wadsworth E, Prasad SC, Calderone RA 1993. Analysis of mannoproteins from blastoconidia and hyphae of *Candida albicans* with a common epitope recognized by anti-complement receptor type 2 antibodies. *Infect Immun* 61: 4675-4681.

Weinstein RA, Hayden MK 1998. Multiply drug-resistant pathogens: epidemiology and control. In: Bennett JV, Brachman PS (eds), *Hospital Infections*, 4th edn. Pennsylvania: Lippincott-Raven, 215-36.

Welsh J, McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-8.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. 315-322.

Whelan WL, Kirsch DR, Kwon-Chung KJ, Wahl SM, Smith PD 1990. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hypervirulent strain. *J.Infect.Dis* 162: 513-8.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-5.

Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ 2001. The influence of anti-fungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91: 317-321.

Yang YL 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol Immunol Infect* 36: 223-228.

Xu J, Ramos AR, Vilgalys R, Mitchell TG 2000. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *J. Clin Microbiol* 38: 1214-1220.

Zaugg C, Zepelim M, Reichard U, Samglard D, Monod M 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69: 405-412.

Zeng X, Xiong C, Wang Z, Jiang L, Hou X, Shen J, Zhou M, Chen Q 2008. Genotypic profiles and virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus. *APMIS* 116: 284-291.

Artigo aceito pela Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo