

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL - MG**

**JOSIMARY MORAIS VASCONCELOS OLIVEIRA**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ERG11* DE  
*CANDIDA ALBICANS* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLUCONAZOL**

Alfenas / MG

2017

**JOSIMARY MORAIS VASCONCELOS OLIVEIRA**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ERG11* DE  
*CANDIDA ALBICANS* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Caixeta Franco Ariosi

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan

Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira

Alfenas / MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central - Sede

Oliveira, Josimary Morais Vasconcelos  
O48d Detecção e quantificação da expressão do gene ERG11 de *Candida albicans* sob diferentes concentrações de fluconazol / Josimary Morais Vasconcelos Oliveira. -- Alfenas/MG, 2018.  
67 f. : il. -

Orientadora: Marília Caixeta Franco Ariosa.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.  
Bibliografia.

1. Genes . 2. *Candida albicans*. 3. Expressão Gênica. 4. Fluconazol.  
5. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Ariosa, Marília Caixeta Franco.  
II. Título.

CDD-579.56



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.  
CEP: 37130-001



**JOSIMARY MORAIS VASCONCELOS OLIVEIRA**

“Detecção e quantificação da expressão do gene ERG11 de *Candida albicans* sob diferentes concentrações de fluconazol”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 26 de janeiro de 2018.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Felipe Leomil Coelho

Profª. Dra. Juliana Pereira Lyon  
Instituição: UFSJ

Assinatura: Juliana Lyon

Profª. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Amanda Latércia Dias

Ao meu esposo Renato, que me apoiou incondicionalmente em todas as circunstâncias! Pelo amor, paciência e força em todos os momentos. Você é essencial em minha vida!

Ao meu filho Renato Miguel. Tudo que busco, foi e sempre será pensando em você!

Aos meus pais José e Maria, por não medirem esforços, pelo apoio em tantos momentos difíceis!

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra Marília Caixeta Franco Ariosa, agradeço toda atenção, dedicação e ensinamentos dispensados no decorrer desses anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra Ana Carolina Barbosa Padovan imensamente pela paciência, dedicação e carinho a mim dirigidos. Pelas horas estendidas do seu trabalho em várias tardes. Sou grata pelos seus ensinamentos e presteza sempre que a procurei.

À Prof<sup>a</sup>. Dra Ester Siqueira Caixeta por toda atenção, respeito, carinho e amizade. Por tantos momentos de ensinamentos e descontração.

Aos professores Leonardo Augusto de Almeida e Amanda Latércia Tranches Dias pelas considerações e orientações feitas para conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Dra. Daniela Cristina e Prof. Dr. Fábio Colombo agradeço pela amizade, companheirismo, paciência constante. Os ensinamentos de vocês foram fundamentais!

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Franciene pela amizade e por estar sempre disposta no seu serviço, a ajudar todos os alunos que realizam pesquisas no DMI.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade oferecida.

“Ó Senhor, nosso Deus,  
como é glorioso vosso nome em toda a terra!”  
(Salmos 8:10)

## RESUMO

Espécies de *Candida* habitam o corpo humano, não causam doenças em organismos considerados saudáveis, entretanto podem levar a infecções graves naqueles com alterações nos mecanismos de defesa e/ou quando ocorre comprometimento de barreiras anatômicas. O agente etiológico mais comum das infecções causadas por *Candida* spp. é *C. albicans*, inclusive no Brasil. Há muitos anos, antifúngicos da classe dos azóis vêm sendo prescritos para tratamentos de tais infecções, porém a incidência de casos de resistências tem sido documentada. A superexpressão do gene *ERG11* e bombas de efluxo e mutações no gene *ERG11* são descritos como mecanismos moleculares de resistência a azóis em *Candida* spp. Desta forma, analisar a expressão gênica do *ERG11* de isolados clínicos e de fontes de colonização ambiental foi a proposta deste estudo, envolvendo tratamentos sob concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol (FLU), nunca antes investigada. Assim, foram utilizados três isolados provenientes de fontes de colonização de ambiente hospitalar e cinco isolados clínicos, além da cepa padrão ATCC 10231 cujas concentrações inibitórias mínimas para fluconazol foram obtidas de acordo com o protocolo EUCAST Definitive Document EDef 7.1 (2008). Os tratamentos consistiram de concentrações inibitórias mínimas (CIM) e subinibitórias equivalentes a 1/4 e 1/2 da CIM do antifúngico e na ausência do mesmo. As quantificações das expressões por RT-qPCR foram realizadas para os genes *ERG11*, e o normalizador *Actina*. As análises de expressão relativa foram calculadas utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Observou-se no comportamento de todos os isolados analisados, independente da origem de isolamento, inclusive a cepa padrão ATCC 10231, aumento significativo de expressão do gene *ERG11* em relação aos tratamentos com CIM, 1/2 e 1/4 da CIM de FLU quando comparados aos mesmos isolados na ausência de FLU. Esse aumento variou entre 1,086 a 126,105. No grupo de isolados clínicos, aquele que mais expressou o gene alvo foi o 220 (126,10) e no grupo de colonização ambiental foi o isolado 521 (40,79), ambos no tratamento da CIM de fluconazol. Em geral, a maior dose de fluconazol (CIM) foi a que mais influenciou os isolados a expressarem *ERG11*, seguido dos tratamentos com 1/2 e 1/4 da CIM. Estes resultados, de aumento da expressão de isolados clínicos de *C. albicans* é relevante, especialmente nos casos



de pacientes em tratamento profilático, quando o antifúngico ao invés de proteger o paciente da infecção poderia estar estimulando o patógeno. No caso dos isolados de colonização ambientais terem apresentado o mesmo comportamento, gera um alerta para a importância na higienização no ambiente hospitalar e antissepsia dos profissionais da área da saúde.

Palavras-chave: *ERG11*. *Candida albicans*. Expressão. Fluconazol. Concentração subinibitória. Inibitória

## ABSTRACT

*Candida* species inhabit the human body, don't cause diseases in organisms considered healthy, however can lead to serious infections in those with changes in the defense mechanisms and / or impairment of anatomical barriers. The most common etiological agent of infections caused by *Candida* spp. is *C. albicans*, including in Brazil. Many years ago, antifungal drugs of the azole class have been prescribed for treatments of such infections, however the incidence of cases of resistance has been documented. Overexpression of the *ERG11* gene and efflux pumps and mutations in the *ERG11* gene are described as molecular mechanisms of resistance to azoles in *Candida* spp. In this way, the analysis of the *ERG11* gene expression of clinical isolates and sources of environmental colonization was the proposal of this study, involving treatments under fluconazole inhibitory and subinhibitory concentrations (FLU), never researched before. Thus, three isolates from hospital environment colonization sources and five clinical isolates were used, in addition to the standard strain ATCC 10231 whose minimum inhibitory concentrations for fluconazole were obtained according to the EUCAST Protocol Definitive Document EDef 7.1 (2008). The treatments consisted of minimal inhibitory concentrations (MIC) and subinhibitory equivalent to 1/4 and 1/2 of the CIM of antifungal and in the absence of the same. Quantifications of the RT-qPCR expressions were performed for the *ERG11* genes, and the *Actin* normalizer. Relative expression analyzes were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. It was observed the behavior of all the isolates analyzed, independent of the origin of isolation, including the standard strain ATCC 10231, significant increase of *ERG11* gene expression in relation to treatments with MIC, 1/2 and 1/4 FLU MIC when compared to the same isolates in the absence of FLU. This increase ranged from 1,086 to 126,105. In the group of clinical isolates, the one that most expressed the target gene was 220 (126.10 times) and in the environmental colonization group was the 521 isolate (40,79), both in the treatment of MIC of fluconazole. In general, the highest dose of fluconazole (MIC) was the one that most influenced the isolates expressing *ERG11*, followed by treatments with 1/2 and 1/4 MIC. These results of increased expression of clinical isolates of *C. albicans* are relevant, especially in cases of patients in prophylactic treatment, when antifungal

rather than protecting the patient from infection could be stimulating the pathogen. The fact of the environmental colonization isolates had presented the same behavior, it generates an alert for the importance in hygiene in the hospital environment and antisepsis of health professionals.

Keywords: *ERG11*. *Candida albicans*. Expression. Fluconazole. Subinhibitory concentration. Inhibitory.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia mostrando as diferentes morfologias de crescimento de *C. albicans* ..... 18
- Figura 2** - Mecanismos de resistência a azóis em *C. albicans* ..... 28
- Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando bandas 28S e 18S de RNA ..... 44
- Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR semiquantitativa de todos os isolados nos diferentes tratamentos previamente purificados com DNase I ..... 45
- Figura 5** - Curvas de amplificação dos genes *ACT1* e *ERG11* de *C. albicans*. As linhas que ultrapassaram o “Threshold” correspondem às curvas de amplificação..... 46
- Figura 6** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos isolados cultivados por 24 horas, na ausência de fluconazol (AF) e na presença da CIM, 1/4 e 1/2 da CIM do mesmo antifúngico ..... 47
- Figura 7** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença de 1/4 da CIM de fluconazol e comparados entre si ..... 52
- Figura 8** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença de 1/2 da CIM de fluconazol e comparados entre si ..... 52
- Figura 9** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença da concentração inibitória mínima de fluconazol e comparados entre si ..... 53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Frequência de espécies de leveduras isoladas de pacientes internados em hospitais públicos e privado em São Luís – MA, de julho a dezembro 2010 ..... 21
- Tabela 2** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento... 32
- Tabela 3** - Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol e classificação quanto à sensibilidade dos isolados utilizados, de acordo com as diretrizes do documento EUCAST em leitura realizada após 24 horas ..... 42
- Tabela 4** - Contagem e viabilidade (%) dos isolados de *C. albicans*, após cultivo em diferentes tratamentos: A – ausente, 1/4 e 1/2 de CIM de fluconazol; nos tempos zero e 24 horas de crescimento ..... 43
- Tabela 5** - Valores de expressão diferencial do gene *ERG11* nos tratamentos com CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol, e com ausência do anti-fúngico, normalizados pelo gene constitutivo *ACT1* ..... 49
- Tabela 6** - Dados de expressão de todos os isolados de *C. albicans* nos diversos tratamentos cultivados por 24 horas na ausência e presença de fluconazol ..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
cDNA	- DNA complementar, sintetizado a partir do RNA
CT	- Cycle Threshold
DNA	- ácido desoxirribonucleico.
dNTP's	- desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPEC	- dietilpirocarbonato
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>ERG</i>	- gene ergosterol
EUCAST	- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLU	- fluconazol
NaCl	- Cloreto de sódio
<i>Pellet</i>	- precipitado de células
PBS	- Solução tampão salina fosfato
RNA	- Ácido Ribonucléico
mRNA	- RNA mensageiro
RPM	- Rotações por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TBE	- solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA
Tris HCL	- hidroximetilaminometano
UTI	- Unidade de terapia intensiva
<i>Vortex</i>	- Agitador de tubos
qPCR	- PCR em tempo real ou PCR quantitativo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1 Características Microbiológicas de <i>Candida</i> spp.</b> .....	17
<b>2.2 <i>Candida</i> spp. e Infecções</b> .....	19
<b>2.3 Fatores de Riscos Hospitalar e Profilaxia</b> .....	22
<b>2.4 Antifúngicos Azólicos: Fluconazol</b> .....	24
<b>2.5 Ação dos Azóis</b> .....	25
<b>2.6 Mecanismos de Resistência</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	29
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 Local de Trabalho e Cepas</b> .....	30
<b>4.2 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores</b> .....	30
<b>4.3 Teste de sensibilidade ao antifúngico</b> .....	32
4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Fluconazol por Microdiluição em Caldo.....	32
<b>4.4 Cultivo das Leveduras</b> .....	33
<b>4.5 Viabilidade Celular</b> .....	34
<b>4.6 Obtenção de RNA total</b> .....	35
4.6.1 Extração e Quantificação de RNA.....	35
4.6.2 Integridade do RNA.....	36
4.6.3 Tratamento do RNA com DNase I.....	37
4.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) semiquantitativa.....	37
<b>4.7 Síntese de cDNA – Reação de Transcrição Reversa</b> .....	38
<b>4.8 Investigação da Expressão Gênica por PCR em tempo real e análise dos     dados</b> .....	39
<b>4.9 Análise Estatística</b> .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
<b>5.1 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores</b> .....	41
<b>5.2 Determinação da CIM das cepas selecionadas</b> .....	41
<b>5.3 Determinação da viabilidade celular</b> .....	42

<b>5.4 Avaliação da integridade do RNA extraído</b> .....	43
<b>5.5 Amplificação de DNA</b> .....	44
<b>5.6 Avaliação da expressão gênica de <i>ERG11</i></b> .....	45
5.6.1 Dados PCR quantitativa .....	45
5.6.2 Análise e interpretação dos resultados da PCR quantitativa .....	46
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>RERERÊNCIAS</b> .....	60
<b>APÊNDICES</b> .....	66



## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* habitam o corpo humano, principalmente a pele, o trato gastrointestinal, vagina e cavidade oral. Não causam doenças quando o corpo se apresenta saudável, porém alguns fatores como uso contínuo de antibióticos, imunidade baixa, quimioterapia, incidência de tumores, infecção pelo HIV, diabetes, aumento do número de pessoas idosas e a utilização de métodos invasivos como cateteres, transplantes de órgãos, hiperalimentação parenteral dentre outros, podem acarretar em doenças fúngicas superficiais e candidíase invasiva (HE et al., 2015).

Atualmente, existem muitas espécies conhecidas por causarem candidíases superficiais ou invasivas. No entanto, mais de 90% das candidíases são causadas por apenas 5 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. (HE et al., 2015; SARDI et al., 2013). Parker et al., (2014) relatam que a incidência mundial anual de candidemia é estimada em 300.000 casos com uma taxa de mortalidade de 30 a 55%. *C. albicans* é a mais frequentemente isolada, representando 62% dos casos (GUINEA, 2014).

A indústria farmacêutica tem investido e lançado novos antifúngicos no mercado, porém o uso generalizado dos triazóis e equinocandinas tem levado ao surgimento de isolados resistentes de *Candida* spp. (ANTINORI et al., 2016; ROSSI, 2011;). Desta forma, ressalta-se a importância das pesquisas que visem elucidar os mecanismos moleculares que culminam neste problema.

Diversos estudos têm sido realizados sobre os mecanismos de resistência de isolados clínicos de *Candida* spp. aos azóis. Embora possam ocorrer simultaneamente na mesma célula fúngica, foram didaticamente agrupados em: a) Superexpressão das bombas de efluxo; b) Alteração na biossíntese do ergosterol; c) Mutações no gene *ERG11*; d) Superexpressão do gene *ERG11* (CARVALHO, 2011).

A superexpressão e/ou mutações do gene *ERG11* vêm sendo atribuídas à resistência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* aos azóis (HE et al., 2015).

Existem na literatura muitos estudos envolvendo mecanismos de resistência a derivados azólicos em isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida*, porém pouco é descrito sobre os mecanismos em cepas provenientes de fontes de colonização de ambientes hospitalares. Essa abordagem é relevante, uma vez que tais cepas podem, a partir do ambiente externo, invadir organismos

imunocomprometidos.

Geralmente, os pacientes criticamente doentes, submetidos à transplantes de órgãos ou à grandes cirurgias são alvos de profilaxia com antifúngicos para evitar o desenvolvimento de infecções fúngicas. A exposição de cepas de leveduras sensíveis por períodos prolongados a baixas concentrações dos antifúngicos em geral, está claramente associada a uma alteração nos valores das concentrações inibitórias mínimas e pode levar à seleção de isolados resistentes a tais fármacos, acarretando na necessidade de uma vigilância contínua (BASSETTI et al., 2016; FERREIRA, 2011). Alguns trabalhos experimentais como de Calvet et.al, (1997) e de Claudino (2009) com exposição prévia de culturas de leveduras a concentrações crescentes de fármacos sustentam esta hipótese.

Assim, é de fundamental importância avaliar as condições que possam influenciar a persistência de células fúngicas no hospedeiro e ambiente. Ressaltando que, a partir do ambiente, pode ocorrer um processo infeccioso, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Uma investigação a nível molecular acerca de como é a atividade de cepas sensíveis frente a pressões ambientais, pode colaborar no entendimento dos mecanismos de resistência antifúngica. Desta forma, este trabalho visou avaliar a expressão do gene *ERG11* de isolados clínicos e de colonização de ambientes hospitalares da espécie *C.albicans* em concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol. Esta situação, poderia ser semelhante à resposta clínica de pacientes sob tratamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após a revisão crítica da literatura, a seguir são apresentados os principais temas que foram pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho: *Candida* spp. e infecções causadas por estes microrganismos; fatores de riscos em hospitais e profilaxia; antifúngicos da classe dos azóis, principalmente o fluconal e ação destes medicamentos e resistência fúngica.

### 2.1 Características Microbiológicas de *Candida* spp.

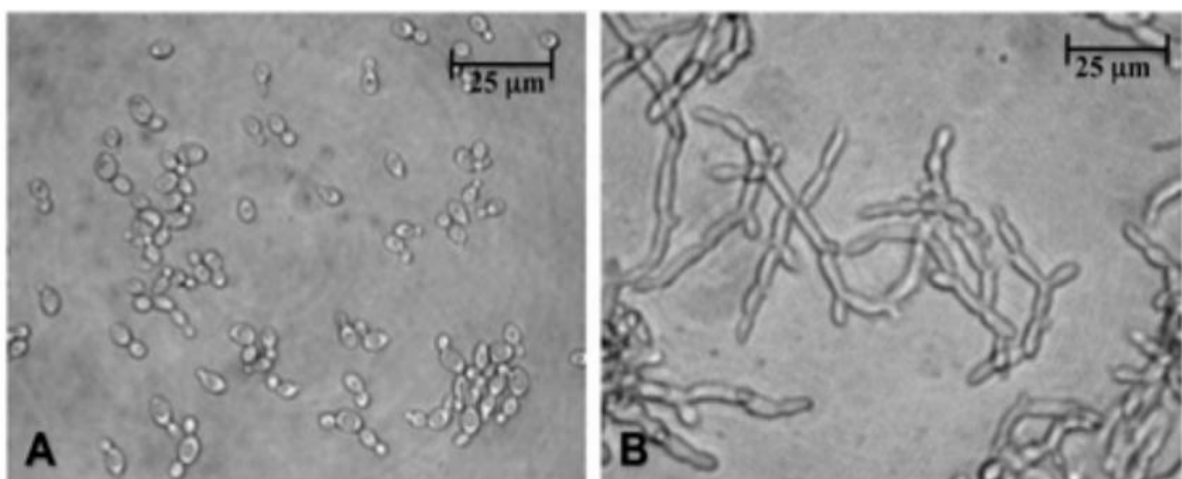
A maioria dos fungos são saprófitas, no entanto, existem diversos gêneros de fungos capazes de causar doenças. Alguns são agentes patogênicos primários, capazes de causar doenças em um hospedeiro saudável, enquanto outros somente em indivíduos imunocomprometidos, são denominados patógenos oportunistas ou secundários (PARKER et al., 2014). E são responsáveis por várias formas de doenças, que vão desde infecções superficiais leves até as sistêmicas, que, na maioria dos casos, são de difícil tratamento. Destes, *Candida* spp. atualmente respondem por cerca de 10 a 15% das infecções hospitalares (PARKER et al., 2014; ROSSI, 2011).

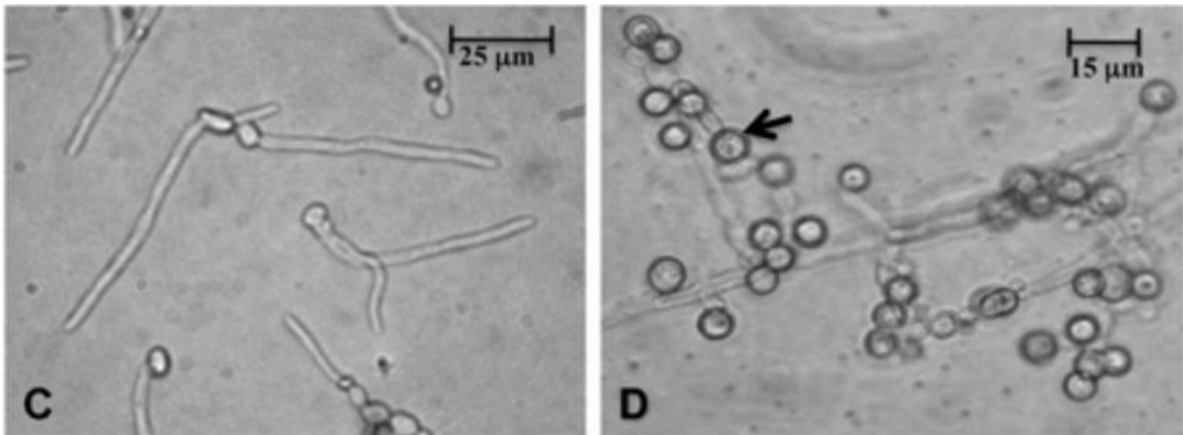
Os microrganismos do gênero *Candida* podem ser encontrados em diferentes ambientes como água, solo, alimentos, na microbiota de humanos e animais, em vários locais, incluindo os ambientes hospitalares. Degradam proteínas e carboidratos para seu desenvolvimento (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Do ponto de vista taxonômico, pertencem ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Debaryomycetaceae (NCBI, 2017). São seres pleomórficos, eucarióticos, heterotróficos, (DANTAS et al., 2016; FERREIRA, 2011). São constituídos de parede celular composta basicamente por quitina e membrana plasmática fosfolipídica que possui diversos esteróis, sendo predominante o ergosterol (NEUFELD, 1999)

A infecção por fungos do gênero *Candida* pode ser favorecida pelo desenvolvimento do micélio e do formato tubular, sendo que este diminui a capacidade de fagocitose de células do sistema imune e proporciona maior aderência à superfície da célula (CLAUDINO, 2007). Esta alteração de morfologia dependente das condições de temperatura e do pH é denominada dimorfismo ou polimorfismo celular. Isso ocorre em *C. albicans*, que pode apresentar-se sob a forma arredondada denominada clamidósporo, ou formando pseudo-hifas ou hifas e micélios verdadeiros (Figura 1) (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Essa habilidade é vista como sendo essencial para a sua capacidade de se adaptar e persistir em diferentes nichos dentro seu hospedeiro (SELLAM; WHITEWAY, 2016).

Especificamente, *C. albicans* é caracterizada principalmente pela morfologia colonial úmida, cremosa e odor específico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose. Microscopicamente as células leveduriformes são de formato ovoide, esférico ou alongado, medem de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Sua proliferação é favorecida em temperaturas variando entre 20°C a 38°C. A faixa ideal de pH varia de 2,5 a 7,5%, sendo que o pH ácido favorece seu crescimento (SANTANA et al., 2013).

**Figura 1** - Fotomicrografia mostrando as diferentes morfologias de crescimento de *C. albicans*





Fonte: Calderone A. R.; Clancy J. C. *Candida* and Candidiasis.

Nota: Células de leveduras (A), pseudo-hifas (B), hifas (C), e clamidósporos (D; um exemplo é indicado por uma flecha)

## 2.2 *Candida* spp. e Infecções

Espécies de *Candida* são encontradas em locais do corpo como pele, vagina, boca e intestinos, compondo a microbiota normal. Em determinadas circunstâncias, quando ocorre ruptura do equilíbrio biológico devido a fatores predisponentes, pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos do hospedeiro por estes micro-organismos. (HARVEY et.al., 2013; SANTANA et al., 2013). Logo, não causam doenças em organismos considerados saudáveis, no entanto, quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas, podem levar a graves infecções. As leveduras são capazes de crescer e difundir-se em tecidos profundos e vasos sanguíneos.

As incidências de infecções fúngicas hospitalares, especialmente a oportunista, têm aumentado consideravelmente desde a década de 1980, acarretando em elevados índices de morbidade e mortalidade, especialmente no grupo de pacientes imunocomprometidos e/ou aqueles hospitalizados com doenças subjacentes graves (SARDI et al., 2013).

As infecções envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco, tais como: a) o uso extensivo de antibióticos, agentes imunossupressores, quimioterapias;

b) o aumento de pessoas apresentando imunodepressão com leucopenia, diabetes, tumores, infecção pelo HIV; c) aumento da idade d) o uso de procedimentos invasivos como mecanismos de transmissão como cateteres, transplantes de órgãos, hiperalimentação parenteral, marca-passos para o coração; e) o contato das mãos de profissionais de saúde que cuidam de pacientes sem a devida higienização (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HE et al., 2015).

Uma infecção causada por *Candida* é denominada candidose ou candidíase. Entre as infecções invasivas, salienta-se a relevância clínica da infecção urinária (candidúria), da corrente sanguínea (candidíase hematogênica, candidemia ou fungemia) e candidíase disseminada de órgãos profundos, a qual, o fígado, o baço e rins são os principais envolvidos (MATSUMOTO et al., 2001; WEI; MILEWSKI; WILLIAMS, 2015). Candidemia não está relacionada apenas com uma alta taxa de mortalidade, mas também se estende à duração da internação hospitalar, conseqüentemente, aumentando os custos acerca do período de manutenção dessa internação (CHENG et al., 2005).

Infecção do esôfago por *Candida* spp. afeta mais de dois milhões de pessoas por ano. Com uma mortalidade em torno de 30 a 55% no mundo, a ocorrência anual de candidemia foi calculado em torno de 300.000 casos. Episódios de candidíase vulvovaginal ocorre em pelo menos 75 milhões de mulheres anualmente. (PARKER et al., 2014).

O Estudo Global de Vigilância Antifúngica ARTEMIS DISK verificou a partir dos dados coletados de 1997 a 2007, em 127 centros médicos de 39 países que dos isolados invasivos de *Candida* spp., cinco espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*), foram responsáveis por 92% dos casos de candidemia. *C. albicans* foi o patógeno mais comum de candidemia em todo o mundo, representando 62% dos casos (GUINEA, 2014).

Pemán et al. (2011), verificou na Espanha, no período entre janeiro de 2009 a fevereiro de 2010, que dos isolados avaliados causando fungemia 44,7% (616/1377) era da espécie *albicans*.

Entre as espécies não *Candida albicans*, *C. tropicalis* representa a terceira ou quarta espécie mais isolada mundialmente. É classificada como segunda na América Latina (20%) e é mais comum do que a *C. glabrata* na região da Ásia-Pacífico (EDDOUZI et al., 2013). *C. parapsilosis* é responsável por cerca de 12% a 17% dos

casos de candidemia nos Estados Unidos e muitos estudos a citam como segunda ou terceira causa mais comum no mundo. *C. parapsilosis* destaca-se pelo risco que representa para recém-nascidos, entre os quais, estima-se que seja responsável por 33% de todos os casos mundiais de fungemia, sendo a taxa média de mortalidade de 10% (GROSSMAN et al., 2015). *C. krusei* é um patógeno oportunista, especialmente entre pacientes com neoplasias hematológicas e aqueles submetidos a transplante de medula óssea. As taxas de mortalidade entre esses pacientes com candidemia por *C. krusei* são alta, variando de 60% a 80% (RICARDO et al., 2014).

No Brasil, candidíase é a segunda causa de mortes em pacientes HIV-positivos (PAULA et al., 2015). Uma pesquisa multicêntrica realizada no mesmo país, um elevado número de candidemia foi relatado, com 2,49 casos em 1.000 admissões (3-10 vezes maior do que a relatada no Hemisfério Norte), com uma taxa de mortalidade bruta por volta de 50%. Estudos epidemiológicos apontaram que as espécies mais frequentes não *Candida albicans* foram *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (NUCCI et al., 2013). Em um estudo realizado em São Luís – MA por Magalhães et al. (2015), no período de julho a dezembro de 2010, foram coletadas 100 amostras clínicas de leveduras de pacientes hospitalizados, as quais foram identificadas a nível de espécie, sendo observado que do total 41,7% pertenciam a espécie *albicans* e 32% a *tropicalis*. (Tabela 1).

Nos últimos anos, mudanças na distribuição de espécies ocorreram de acordo com diferentes áreas geográficas, fatores hospitalares locais, condições predisponentes do paciente e os tipos de agentes antifúngicos recebidos (BASSETTI; PEGHIN; TIMSIT, 2016).

**Tabela 1** - Frequência de espécies de leveduras isoladas de pacientes internados em hospitais públicos (B e C) e privado (A) em São Luís – MA, de julho a dezembro de 2010

Espécies Isoladas	Hospital A	Hospital B	Hospital C	Total Isolados
	Isolados nº. (%)			
<i>Candida albicans</i>	17 (15,8)	16 (14,8)	12 (11,1)	45 (41,7)
<i>Candida glabrata</i>	2 (1,85)	4 (3,7)	2 (1,85)	8 (7,4)
<i>Candida krusei</i>	2 (1,85)	2 (1,85)	1 (0,9)	5 (4,6)
<i>Candida norvegensi</i>	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)

<i>Candida parapsilos</i>	2 (1,85)	0 (0,0)	4 (3,7)	6 (5,6)
<i>Candida tropicalis</i>	12 (11,1)	10 (9,3)	10 (9,3)	32 (29,7)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3 (2,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	5 (4,6)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)
<i>Trichosporon spp.</i>	2 (1,85)	0 (0,0)	2 (1,85)	4 (3,7)
Total	41 (37,9)	34 (31,5)	33 (30,6)	108 (100%)

Fonte: Magalhães et. al. (2015)

### 2.3 Fatores de Riscos Hospitalar e Profilaxia

As leveduras do gênero *Candida* são os mais comuns patógenos oportunistas em seres humanos e estão associados a quase 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais (MAGALHÃES et al., 2015)

A relevância das infecções por *Candida* spp. e ambiente hospitalar passaram a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças (FERREIRA, 2011).

A colonização ambiental ocorre quando o microrganismo permanece com a capacidade de infectar, mesmo em subcondições de desenvolvimento, em superfícies inanimadas, mãos de profissionais de saúde e ambiente (VAZQUEZ et al., 1998). Há indícios de que as epidemias de propagação de *Candida* spp. de colonização à infecção ocorra a partir de fontes ambientais (FERREIRA, 2011).

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena. Métodos de genotipagem mostram a semelhança entre estirpes colonizantes e infectantes, comprovando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos. Processos patológicos, fisiológicos, traumáticos, entre outros, podem facilitar a colonização e translocação de *Candida* spp. até os tecidos profundos provocando posteriores infecções no hospedeiro. As causas mais comumente encontradas são: neutropenia, imunossupressão, quimioterapia. Outras condições auxiliam a entrada do patógeno por via exógena, através do contato das



mãos de profissionais de saúde, uso prolongado de cateteres, implante de próteses contaminadas, administração parenteral de soluções contaminadas, uso prolongado de antibióticos e queimaduras. Considerando que a candidíase invasiva ocorre frequentemente como decorrência destas situações, medidas de prevenção recaem na identificação destes fatores e na tentativa de controlar as doenças de base e minimizar a exposição dos pacientes às condições de risco mencionadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; FERREIRA, 2011).

Reforça Wei; Milewski; Williams (2015) que a infecção sistêmica é mais frequente em pacientes com malignidade hematológica e particularmente quando há colonização gastrointestinal de *Candida* spp., recebimento de quimioterapia ou cirurgia do aparelho digestivo e que os fatores de risco adicionais incluem antibióticos e recebimento de procedimentos de cuidados intensivos.

A epidemiologia de candidemia tem sido extensivamente estudada com foco em populações específicas de pacientes de alto risco, como neonatos, pacientes cirúrgicos, com câncer e criticamente doentes. Nos últimos anos, no entanto, candidemia emergiu como um problema crescente em pacientes internados em enfermarias. Este local pode representar um importante reservatório para infecções por *Candida* spp. Dados de Bassetti; Peguin; Timsit (2016) mostram prevalência deste microrganismo variando entre 24% a 57%, e as taxas de mortalidade mais elevadas quando comparadas com outras alas. O diagnóstico de candidemia em enfermarias é muitas vezes atrasado ou negligenciado, e, conseqüentemente, estes pacientes têm menores chances de melhoras em comparação com pacientes cirúrgicos e em UTIs (ELIAKIM-RAZ et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial da candidemia é baseado na presença de leveduras em amostras de sangue periférico. Um diagnóstico precoce é fundamental para que o tratamento farmacológico seja rapidamente instituído, aumentando, assim, a probabilidade de cura (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Falhas na terapia antifúngica podem ocorrer em decorrência das condições imunológicas do paciente, do antifúngico prescrito e de alterações na sensibilidade do fungo a este medicamento (STRZELCZYK et al., 2013).

Com o aumento progressivo tanto da população de risco quanto do uso de antifúngicos, tem ocorrido aumento nas CIM para estirpes de *Candida* spp., o que pode estar associado à falha do tratamento (FUENTES et al., 2014). Embora os testes

de sensibilidade antifúngica sejam frequentemente utilizados para selecionar os antifúngicos de escolha na terapêutica, a função mais importante, atualmente, é a detecção de resistência. É fundamental estimular o uso racional dos agentes antifúngicos no ambiente hospitalar visando diminuir a ocorrência de resistência, mas especialmente, promover a terapia mais adequada e com isso elevar a sobrevida destes pacientes (SILVA, 2013).

#### **2.4 Antifúngicos Azólicos: Fluconazol**

Compostos antifúngicos são naturais ou sintéticos, cada uma das classes utiliza um meio diferente para matar ou inibir o crescimento de fungos patogênicos. Podem causar alterações nas estruturas básicas e inibir o desenvolvimento das células fúngicas. Atualmente, há algumas famílias de antifúngicos disponíveis no mercado, sendo os da classe dos azóis as mais comuns (FUENTES et al., 2014; PFALLER, 2012;).

Os azóis são fármacos fungistáticos (impossibilitam o crescimento do microrganismo) e agem inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, da via biossintética do ergosterol, interrompendo ou levando a produção insuficiente do ergosterol que é o principal esterol de membrana da célula fúngica, levando à formação de membranas defeituosas (ROSSI, 2011).

A ação antifúngica de compostos azólicos foi relatada pela primeira vez em 1944. O primeiro agente terapêutico oral para as infecções fúngicas sistêmicas foi cetoconazol, embora o seu uso tenha sido limitado pela sua toxicidade. Durante os anos 1990, foram introduzidos nos EUA os primeiros triazóis sistêmicos, primeiro o fluconazol e depois itraconazol. Ambos possuem boa atividade antifúngica e são menos tóxicos do que o cetoconazol (PARKER et al., 2014).

O aparecimento de derivados azólicos com alta biodisponibilidade e baixa toxicidade como o fluconazol, gerou expectativas a novas estratégias terapêuticas, sendo usados para fins profiláticos, em esquemas de manutenção da terapia e em uso combinado a anfotericina B (ROSSI, 2011).

Antifúngico da classe dos azóis são os mais prescritos para prevenção e tratamentos de candidíases. O fluconazol é o representante mais utilizado por ser uma opção valiosa resultando em altos níveis sanguíneos, rápido equilíbrio sérico e boa penetração tecidual, além da praticidade da administração por via oral e bom custo-benefício (ROSSI, 2011; XU et al., 2015).

As diretrizes de tratamento atuais incluem o fluconazol como principal opção terapêutica para o tratamento de infecções por *Candida* spp. (BERKOW; LOCKHART, 2017).

## 2.5 Ação dos Azóis

A nível molecular, várias investigações têm explorado os mecanismos que culminam na aquisição de resistência em isolados clínicos de azóis. Esta classe de medicamento exerce sua ação por meio da inibição da enzima lanosterol $14\alpha$ -demetilase em bolores e leveduras, consequentemente, interferindo na biossíntese do ergosterol na membrana da célula fúngica (EDDOUZI et al., 2013).

O gene *ERG11* está localizado no cromossomo número 5 e possui variação na sequência e número de nucleotídeos segundo a espécie de *Candida*, podendo apresentar tamanho variando de 1569 a 2669 pares de bases respectivamente em *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Este gene codifica a enzima  $14\alpha$ -lanosterol demetilase (Erg11p ou 14-DM), alvo primário dos antifúngicos da classe dos azóis. É uma das enzimas chave na via de síntese de ergosterol de leveduras do gênero *Candida*, sendo fundamental para conversão de lanosterol em ergosterol (Figura 2). Moléculas azólicas bloqueiam este processo e impedem esta síntese na célula, promovendo uma diminuição na concentração do esteroide final (normalmente ergosterol) e uma acumulação concomitante de esteróides  $14$ -metilados, afetando a integridade da membrana e a função de algumas proteínas ligadas à mesma. A depleção de ergosterol juntamente com o acúmulo de esteróides precursores metilados inibem o crescimento de fungos por ruptura da membrana celular, resultando na morte celular. Isto é conhecido em *C. albicans*. (CARVALHO, 2011; EDDOUZI et al., 2013; PARKER et al., 2014; XU et al., 2015).

## 2.6 Mecanismos de Resistência

Nas últimas duas décadas, os índices de fungemias têm se elevado significativamente especialmente devido ao aumento de populações de alto risco. Profilaxia ou tratamento prolongado com vários antifúngicos aumentou a incidência de isolados clínicos resistentes a um ou mais antifúngicos em cepas anteriormente sensíveis (EDDOUZI et al., 2013). Portanto, resistência a antifúngicos torna-se um problema sério para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp.

Um microrganismo é considerado resistente quando é capaz de persistir e desenvolver uma infecção no hospedeiro, mesmo em condições de concentração máxima do fármaco no sítio de infecção. Essa persistência aos antifúngicos pode ser intrínseca (naturalmente presente) ou adquirida (desenvolvida de acordo com influências ambientais). Pode ocorrer, também, quando fatores ambientais levam a colonização ou a substituição das espécies sensíveis por resistentes (PFALLER, 2012; SILVA, 2013). Pode ainda estar associada aos tratamentos profiláticos que, geralmente, são recomendados para utilização em indivíduos imunocomprometidos, que apresentam alto risco para o desenvolvimento de candidíase invasiva (PFALLER, 2012, VAZQUEZ et al., 1998).

As leveduras patogênicas oportunistas do gênero *Candida* possuem mecanismos para estabelecer a infecção. Assim, a expressão de um conjunto de fatores de virulência tais como, morfogênese, formação de biofilme, adesinas de superfície e produção de enzimas hidrolíticas (por exemplo, lipases, proteases e fosfatases) contribuem para a patogênese da candidíase, auxiliando as células fúngicas a escaparem da defesa do hospedeiro (ZICCARDI, M. et al., 2015).

Prevenção prolongada ou o tratamento com antifúngicos estão elevando a incidência de isolados clínicos resistentes a um ou mais antifúngicos em estirpes anteriormente sensíveis. *C. albicans* e *C. tropicalis*, por muito tempo permaneceram como espécies sensíveis aos antimicóticos fluconazol e anfotericina B, mas alguns estudos nos últimos anos apontaram desenvolvimento de resistência ao fluconazol em alguns centros de saúde e falha na terapêutica clínica (EDDOUZI et al., 2013).

A resistência de *C. albicans* a azólicos é um complexo processo que envolve muitos mecanismos, dentre eles: a) maior capacidade de degradar o medicamento; b)

diminuição da permeabilidade da membrana celular, podendo diminuir a quantidade de fármacos que entram na célula; c) formação de biofilme protetor. A resistência pode surgir ainda através dos mecanismos principais: a) mutação no gene *ERG11*. Este gene codifica a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, alvo dos azóis, mutações podem levar em alterações traducionais na sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, na estrutura tridimensional da enzima, reduzindo a afinidade desta enzima na ligação com moléculas de azóis; b) superexpressão de bombas de efluxo. Durante a superexpressão das bombas de efluxo, os genes *CDR1* e *2* (*Candida Drug Resistance*) codificam proteínas transportadoras do tipo *ABC* (*ATP-binding cassette*) e, o gene *MDR1* (*Multidrug Resistance*) codificam proteínas do tipo *MFS* (*Major Facilitator Superfamily*). Nos últimos anos, os estudos realizados com fluconazol mostraram evidências de que em células fúngicas, este medicamento é transportado ao meio externo pelas proteínas transportadoras de membranas; c) superexpressão do gene *ERG11* (Figura 2). A superexpressão do gene *ERG11* leva a uma maior concentração da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase na célula fúngica, acarretando na necessidade de quantidades maiores de antifúngico para inibir a atividade desta enzima (CARVALHO, 2011; PARKER et al., 2014).

A hipótese de superexpressão do gene *ERG11* vem sendo relacionada com a resistência a antifúngicos. No entanto, os estudos não chegaram a uma conclusão definida a cerca dessa superexpressão em *C. albicans* (XU et al., 2015).

Um estudo realizado por Jiang et al. (2013) utilizando experimentos em RT-PCR quantitativo e observando os mecanismos de resistência a azóis em 52 isolados clínicos de *C. tropicalis* na China, revelou que os 31 isolados resistentes a azóis tinham níveis mais elevados de expressão do gene *ERG11* do que os 21 isolados suscetíveis. E o teor médio de ergosterol do grupo resistente era maior que o do grupo susceptível.

Eddouzi et al., em 2013, realizaram um estudo com isolados clínicos obtidos de hospitais da Tunísia. Neste estudo, a espécie *C. tropicalis* exibiu resistência cruzada entre os azóis e a anfotericina B, o que, segundo estes autores, é típico de defeitos na via da biossíntese do ergosterol.

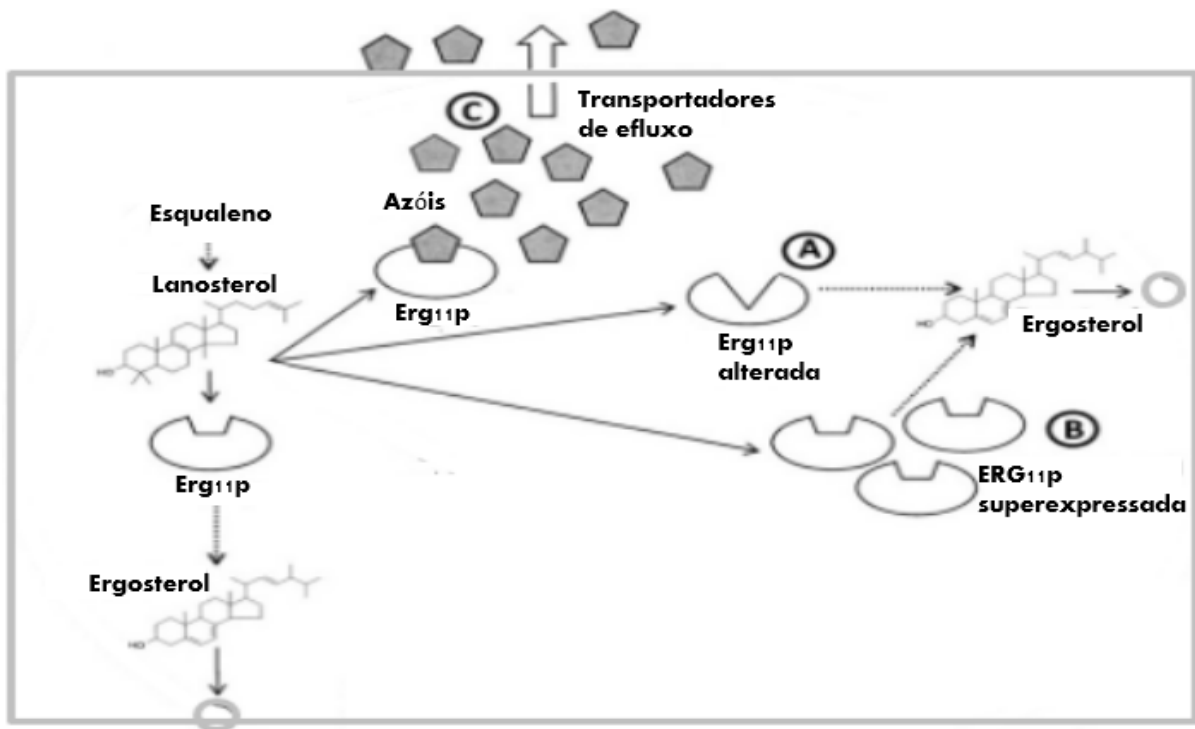
A resistência a azóis em *C. albicans* pode ser o resultado de ambos, uma expressão aumentada do gene *ERG11* e a presença de mutações pontuais. Um aumento da expressão do *ERG11* leva a uma maior produção intracelular da enzima

esterol 14 $\alpha$ -demetilase, sendo necessário aumentar a dose efetiva do fármaco. Mutações pontuais no gene *ERG11* causam substituições de aminoácidos e alterações na configuração espacial da estero 14- $\alpha$ -demetilase, resultando em reduzida afinidade da enzima para os azóis (STRZELCZYK et al., 2013). Estudos têm demonstrado que mesmo uma única mudança de base no *ERG11* pode aumentar a resistência a estes antifúngicos (XU et al., 2015).

Curiosamente, ao contrário de *C. albicans*, a maioria das investigações realizadas em diferentes regiões do mundo apontou que as mutações pontuais no gene *ERG11* de isolados de *C. glabrata* resistentes a azóis, muito raramente foram identificadas ou não estavam presentes em todas as cepas (ROMANOWSKA et al., 2015).

Vários mecanismos podem estar simultaneamente envolvidos em um isolado resistente. Alternativamente, um único mecanismo pode ser o responsável pela resistência (XU et al., 2015).

**Figura 2:** Mecanismos de resistência a azóis em *C. albicans*



Fonte: Adaptado de PARKER et al., (2014)

Nota: Erg11p é um passo essencial na biossíntese de ergosterol, o que é necessário para a estabilidade da membrana e funcionalidade. Azóis inibem Erg11p. A resistência à azóis pode ocorrer através de **a**) Erg11p alterada (mutações pontuais), **b**) superexpressão de *ERG11*, **c**) superexpressão de transportadores de efluxo

### 3 OBJETIVOS

Diante do exposto na revisão de literatura, este estudo teve os seguintes objetivos.

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão gênica do *ERG11* de isolados de *Candida albicans* na ausência e presença de concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a concentração inibitória mínima para fluconazol para todos os isolados clínicos, de colonização de ambientes hospitalares e a cepa padrão ATCC10231;
- b) Analisar a viabilidade de células com os tratamentos do antifúngico;
- c) Avaliar a expressão do gene *ERG11* por PCR em tempo real, de isolados clínicos de *Candida albicans* na ausência e presença de concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol;
- d) Avaliar a expressão do gene *ERG11* por PCR em tempo real, de isolados de fontes de colonização provenientes do ambiente hospitalar de *Candida albicans* na ausência e presença de concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir estão descritos o local de trabalho, os materiais e metodologia empregada no desenvolvimento deste estudo.

### 4.1 Local de Trabalho e Cepas

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos (LBMM) do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) da UNIFAL – MG.

Os isolados de *Candida albicans* utilizados neste trabalho são pertencentes à Micoteca do Laboratório de Micologia do DMI, os quais foram isolados e identificados em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup>. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias.

Foram utilizados oito isolados de *C. albicans*, sendo cinco isolados provenientes de casos de infecção hospitalar com origem em de ponta de cateter em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, sob os números de identificação 31, 121, 220, 221 e 257, e três provenientes de fontes de colonização de ambiente hospitalar, tais como lençol de colchonete e jalecos dos profissionais da saúde, sob os números de identificação 500, 521 e 1020, respectivamente. Como controle, foi adicionada uma cepa de referência do banco American Type Culture Collection (ATCC), *C. albicans* ATCC 10231, proveniente de paciente com broncomicose. Para o estudo, todos foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose a 4°C no LBMM.

### 4.2 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores



Amplificações na PCR convencional do gene *ERG11* e *ACT1* de *C. albicans* (Tabela 2) foram realizadas utilizando tubos com capacidade 0,2 mL para termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) os quais adicionou-se 12,5 µL do Mix Go Taq® Colorless Master Mix (Promega) contendo Taq DNA polymerase, reaction buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores forward e reverse a 10µM, 80 ng de DNA genômico extraído da cepa padrão e água pura qsp 25 µL. Como controle negativo, os tubos não continham DNA. Os tubos foram colocados em termociclador no seguinte programa: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos (desnaturação), 25 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (extensão) e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Seguiu-se para observação em eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com brometo de etídio.

A partir do produto de PCR, foram realizadas reações de seqüenciamento usando oligonucleotideo forward para cada gene a fim de confirmação da seqüência. Os produtos amplificados foram preparados conforme instruções da empresa (Myleus Biotechnology). Os sequenciamentos foram realizados por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

Para a confirmação da identidade, as sequencias de nucleotídeos foram analisadas e montadas manualmente e comparadas às seqüências já depositadas no banco de dados GenBank, utilizando-se a função BLAST (basic local alignment search tool), que alinha as seqüências mais similares àquela de interesse. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Tabela 2** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
ERG11	F 5' -GCTGCTGCCAAAGCTAATTC- 3'	120	60
	R 5' -TCTATGTCTACCACCACCAAATG- 3'		
ACT1	F 5'-ACTACCATGTTCCCAGGTATTG- 3'	122	60
	R 5' -AATACTCTGTCTGGATTGGTGG- 3'		

Fonte: banco de dados GenBank

Legenda: F = *primer forward*; R = *primer reverse*

### 4.3 Teste de sensibilidade ao antifúngico

A seguir é descrito o teste de sensibilidade realizado dos isolados e cepas padrões frente ao fluconazol.

#### 4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Fluconazol por Microdiluição em Caldo

Os testes de sensibilidade ao fluconazol foram realizados pelo método microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do documento *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Definitive Document EDef 7.1 (2008)*.

Os isolados de *C. albicans*, bem como a cepa ATCC 10231 (*C. albicans*) e a cepa controle do teste ATCC 6258 (*C. krusei*) foram previamente cultivados em meio ágar Sabouraud-dextrose por 24 horas a 37°C e, a partir desse cultivo preparou-se suspensões em água destilada com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland, equivalente à  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Logo, foram feitas diluições 1:10, em

meio de cultura RPMI 1640 GIBCO® (Invitrogen), sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho de fenol, tamponado a pH 7,0 com a solução tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] 0,165 mol/L e suplementado com 2% de glicose, logo os isolados apresentaram concentração de  $1 - 5 \times 10^5$  células/mL. Desta diluição, foram adicionados 100  $\mu$ L em microplacas de cultivo celular de 96 poços e 100  $\mu$ L de RPMI 1640 com diluições seriadas correspondentes a 128 a 0,25  $\mu$ g/mL do fluconazol. Dos tratamentos, dois foram controles experimentais sem antifúngico. O primeiro, coluna de número 1, recebeu 200  $\mu$ L do meio de cultura não-inoculado (controle negativo para crescimento celular) e o segundo, coluna de número 12, recebeu 100  $\mu$ L de meio de cultura e 100  $\mu$ L da suspensão de cada microrganismo (controle positivo para crescimento celular). Incubou-se as microplacas a 37°C por 24 horas e em seguida foram feitas leituras da densidade óptica (DO) a 530 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas Anthos Zenyth 200 rt. Cada linhagem testada teve um controle positivo de crescimento, com sua DO fixada como DO máxima (100%), em todos os poços foi descontada a DO do controle negativo para possibilitar o cálculo da CIM. A menor concentração do fluconazol capaz de inibir o crescimento de 50% da linhagem foi determinada como a CIM. Para a cepa *C. krusei* ATCC 6258, controle do teste, a CIM estabelecida para fluconazol é de 16  $\mu$ g/mL a 64  $\mu$ g/mL.

#### 4.4 Cultivo das Leveduras

Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose a 37° C durante 24 horas. Suspensões celulares foram ajustadas na concentração da escala 0,5 de McFarland equivalente a presença de  $1-5 \times 10^6$  células/mL em água destilada e então passadas ao meio RPMI-1640 GIBCO® (Invitrogen), sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho de fenol, tamponado a pH 7,0 com a solução tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] 0,165 mol/L e suplementado com 2% de glicose, correspondendo a  $1 - 5 \times 10^5$  células/mL e incubadas a 37°C durante 24 horas. Para se analisar a influência do antifúngico sobre a expressão do gene *ERG11*, os isolados, quando inoculados ao RPMI, foram tratados separadamente, com

concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações subinibitórias correspondentes a 1/2 e 1/4 da CIM de fluconazol. Também foram analisados os mesmos isolados na ausência de FLU. Estas suspensões celulares foram colocadas para crescimento em estufa incubadora (Shaker), com volume final de 5 mL de cultivo por 24 horas, a 1800 rpm, a 1800 rotações por minuto (rpm).

#### **4.5 Viabilidade Celular**

A análise da viabilidade celular foi realizada para verificar se a exposição das suspensões celulares frente aos tratamentos com fluconazol, poderiam matar grande quantidade de células fúngicas e, neste caso, posteriormente não seria interessante a extração de mRNA de células mortas. Esta avaliação foi realizada selecionando três isolados; dois clínicos, um de colonização de ambiente hospitalar e a cepa padrão ATCC 10231.

Para a realização da análise da viabilidade celular, foi feito contagem celular pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán a 0,08%. Este, permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células não viáveis após exposição ao fluconazol por 24 horas. O número de células foi estimado por contagem em Câmara de Neubauer, utilizando o azul de Tripán, corante que, segundo Liesche et al. (2015) é comumente utilizado para ensaios de viabilidade celular de levedura. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células inviáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim essas células exibem coloração azul após tratamento (FRANÇA, 2008).

Quando cultivadas em meio RPMI 1640, nos tratamentos CIM, 1/2 e 1/4 da CIM de fluconazol e também na ausência deste antifúngico, em tempo zero de crescimento, foi retirada uma alíquota de 20 µL da suspensão celular e adicionado a esta, 20 µL de corante azul de Tripán, tornado uma diluição 1:2. Esta mistura foi homogeneizada, coletou-se uma alíquota de 19 µL e transferiu-se para Câmara de Neubauer. Utilizando microscópio óptico, com a objetiva de 40x, realizou-se a contagem nos quatro quadrantes maiores localizados nas laterais da Câmara.

Repetiu-se o procedimento depois de 24 horas de crescimento, igualmente para os quatro tipos de tratamentos. Segundo protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific), a viabilidade celular deve ser de pelo menos 95% para culturas em fase logarítmica.

Calculou-se o número de células pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células vivas/mortas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

## 4.6 Obtenção de RNA total

### 4.6.1 Extração e Quantificação de RNA

O RNA é uma molécula que degrada facilmente, assim a fim de se obter um RNA íntegro e de boa qualidade, diversas alterações na metodologia para extração do mesmo foram propostas até se atingir uma padronização eficaz. As extrações de RNA foram realizadas a partir da fase exponencial das culturas em meio RPMI-1640 GIBCO® (Invitrogen) utilizando-se o reagente TRIzol (Life Technologies).

Para obtenção do sedimento, o cultivo realizado em RPMI 1640 foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O mesmo, foi lavado duas vezes com 1 mL de PBS gelado e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos, ressuspensando no *vortex*. Sobre o sedimento adicionou-se 1 mL de tampão de extração, contendo: água DPEC, Tris HCl 2M, 0,25M NaCl (0,25M), 0,5 M EDTA e 10% SDS. Sobre este, colocou-se pérolas de vidro (425–600 µm diameter; Sigma, St. Louis, MO, USA) quatro vezes mais em relação ao sedimento. A suspensão foi agitada em *vortex* por 10 minutos, alternando 30 segundos em agitação e 30 segundos em gelo, sem deixar o tubo aquecer, para promover a formação de poros na parede celular e facilitar o

rompimento da célula. Após, a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Neste momento, distribui-se 1 mL de TRIzol em tubos e sobre eles, adicionou-se o líquido resultante da centrifugação. Foi agitado novamente em *vortex*, nas mesmas condições por 10 minutos. Acrescentou-se 400 µl de clorofórmio e repetiu-se o procedimento com o *vortex* por mais 10 minutos, seguindo de incubação por 3 minutos em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas ao máximo, 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Neste instante, a mistura separou-se em uma fase fenólica abaixo avermelhada, uma interfase (DNA) e uma fase superior aquosa (RNA). Foi removida toda fase aquosa para outro tubo e adicionou-se isopropanol, em volume igual ao conteúdo. Esta suspensão foi incubada no freezer a -20°C por 30 minutos e após centrifugada a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Foi desprezado o sobrenadante, e o RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (MERCK), centrifugando o tubo a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Após este procedimento, retirou-se todo o sobrenadante e deixou-se o RNA secar por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, ressuspendeu-se com 30 µl de água DPEC (SIGMA).

A quantificação foi realizada por absorvância a 260 nm utilizando um espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific) com 1 µl de cada amostra, foram quantificadas as concentrações em ng/µl a 260 nm e observadas as razões entre as absorvâncias em 260 nm e 280 nm, 260 nm e 230 nm.

#### 4.6.2 Integridade do RNA

Os RNAs extraídos foram aplicados em gel de agarose 1% em TBE (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 3 µl de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados e fotografados com as imagens adquiridas em transluminador Gene Genius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3).

#### 4.6.3 Tratamento do RNA com DNase I

O RNA dos isolados foram purificados utilizando uma endonuclease, (DNase I, Promega) para remover DNA contaminante.

Para cada amostra, utilizou-se tubos com capacidade 0,2 mL para termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem). Nestes, adicionou-se 1,5 µg de RNA, completando o volume em 8 µl utilizando água DEPC, 1 µl de RQ1 RNase-Free DNase (1 unidade/mL em 50% de glicerol, HEPES 10 mM, pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) e 1 µl de tampão 10X (Tris-HCl 400 mM, pH 8.0, MgSO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub> 10mM). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37 °C para degradação de DNA, e então foi adicionado 1 µl de solução de parada (20mM EGTA, pH 8.0) para prevenir que os íons metálicos (Mg/Ca) catalisassem a hidrólise do RNA durante o aquecimento. Em seguida, a temperatura foi elevada para 65°C por 10 minutos a fim de inativar a DNase. Ao término do processo, foi realizada nova quantificação em (ng/µL) utilizando o espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific).

#### 4.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) semiquantitativa

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a região de interesse do gene *ERG11* de *C. albicans* (Tabela 2). Tubos para termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) com capacidade 0,2 mL foram utilizados para cada amostra. A amplificação foi realizada utilizando-se o kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que possibilitam analisar o progresso das amostras durante a eletroforese. Adicionou-se nos tubos, 6,25 µl do “mix” composto por 0,5 unidade de TaqDNA polimerase em 5 mM Tris-HCl, pH 8.5; 25mM KCl; 0,75 mM MgCl<sub>2</sub> e 100 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso (Tabela 2), 100 ng de RNA e água pura qsp 12,5 µl.

Foram adotadas medidas de controle em todas as reações. Adicionou-se controles negativo, contendo apenas água pura, mix e os oligonucleotídeos iniciadores e positivo, contendo DNA extraído da cepa padrão ATCC 10231.

Os tubos foram colocados no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) no seguinte programa: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos (desnaturação), 25 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (extensão) e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

O produto gerado foi observado em eletroforese em gel de agarose a 2%. As amostras que se apresentaram de forma negativa, sem amplificação de DNA, foram reversamente transcritas para cDNA.

#### **4.7 Síntese de cDNA – Reação de Transcrição Reversa**

Em capela de fluxo laminar, foi preparado mix contendo: 1 µl de oligonucleotídeo Oligo-dT na concentração de 100 µM e 1 µl dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados “dNTPs” (dATP - desoxiAdenosina Trifosfatada, dCTP - desoxiCitidina Trifosfatada, dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada, dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada) na concentração de 10 mM (Invitrogen). Em seguida, foi preparado um segundo mix com 2 µl de ditionitrito (DTT) 0,1 M, 4 µl de tampão 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub>, 15 mM) e 1 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase) (Invitrogen).

Para a síntese de cDNA, ao primeiro mix foi adicionado 1 µg de RNA (no volume de 11 µl, com adição de água qsp 11 µl quando necessário). Os tubos foram colocados no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) a 65°C por 4 minutos e 30 segundos. Levou-se ao cooler por 20 segundos para evitar anelamentos inadequados e adicionou-se 7 µl do segundo mix, tornando o volume final para 20 µl. A mistura voltou para o termociclador continuando o programa a 37°C por 50 minutos para promover o anelamento do oligonucleotídeo e, um ciclo de 95°C por 5 minutos promoveu a inativação da enzima e a remoção do oligonucleotídeo.



Terminando a reação, as amostras foram retiradas do termociclador e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para futuras análises em PCR em tempo real.

#### **4.8 Investigação da Expressão Gênica por PCR em tempo real e análise dos dados**

A expressão relativa do gene alvo *ERG11* dos isolados de *C. albicans* foi investigada por ensaio de RT-PCR em tempo real utilizando o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) no ABI StepOne™ Real-Time PCR Systems (*Applied Biosystems*).

Entre os vários métodos propostos para normalizar os dados de RT-qPCR, o principal é a utilização de genes de referência. A expressão devida desses genes não deve ser afetada pelas condições estudadas, como por exemplo, o número de cópias do transcrito, a célula tem que se manter constante (JIANG et.al, 2016). Diante do exposto, foi escolhido como gene de referência *Actina (ACT1)* pelo fato de ser um gene constitutivo de membrana, devido sua expressão ser diretamente relacionada à integridade celular e sobrevivência da célula.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram delineados a partir de sequências disponíveis no banco de dados GenBank e estão descritos na tabela 2. A amplificação dos genes foi realizada após os testes de validação das condições de termociclagem e concentração dos oligonucleotídeos. A eficiência e especificidade destes, foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 10  $\mu\text{l}$ , nas seguintes condições: 1 ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (desnaturação), 40 ciclos ( $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos) e ( $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto) para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e extensão dos fragmentos, seguido de curva de dissociação padrão.

Cada amostra foi analisada em triplicata. Os valores de expressão do gene alvo nos três tratamentos e na ausência de fluconazol foram normalizados pela expressão do gene constitutivo *ACT1*. A expressão relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . A eficiência para cada gene foi calculada através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

#### 4.9 Análise Estatística

Os dados relativos ao efeito dos tratamentos com e sem fluconazol na expressão gênica do *ERG11*, foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc), através do one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni's. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão da média. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo são apresentados a seguir.

### 5.1 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequencias geradas foram comparadas aquelas depositadas no Genbank, apresentando total identidade 100% (94/94) com *C. albicans* SC5314 para *ACT1* (acesso XM\_019475182.1) e alta identidade 94% (68/72) com *C. albicans* SC5314 para *ERG11* (acesso XM\_711668.2) (Apêndice I). Validando desta forma os oligonucleotídeos utilizados para a PCR quantitativa.

### 5.2 Determinação da CIM das cepas selecionadas

De acordo com o documento EUCAST Technical Note on fluconazole (2008), os isolados são classificados como sensíveis quando os valores da concentração inibitória mínima (CIM) são iguais ou inferiores a 2 µg/mL e resistentes, quando o crescimento é inibido por concentrações maiores que 4 µg/mL. Deste modo, em leitura espectrofotométrica realizada após 24 horas (Apêndice II), os 8 isolados e a cepa padrão *C. albicans* ATCC 10231 foram classificados como sensíveis. O resultado obtido para a cepa padrão ATCC 6258 (*C. krusei*) permaneceu dentro do limite recomendado como cepa resistente controle do teste, CIM de 16 µg/mL a 64 µg/mL para fluconazol (Tabela 3).

**Tabela 3** – Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol e classificação quanto à sensibilidade dos isolados utilizados, de acordo com as diretrizes do documento EUCAST em leitura realizada após 24 horas

Nº da amostra	Fontes de Colonização	<i>Candida spp.</i>	Microdiluição em Caldo µg/mL	
			Leitura - 24h	Classificação
10231	ATCC	<i>C.albicans</i>	1	S
6258	ATCC	<i>C. krusei</i>	16	R
500	L.C	<i>C.albicans</i>	0.125	S
521	Jaleco	<i>C.albicans</i>	0.125	S
1020	Jaleco	<i>C. albicans</i>	0.125	S
31	P.C	<i>C. albicans</i>	0.125	S
121	P.C	<i>C. albicans</i>	0.125	S
220	P.C	<i>C. albicans</i>	0.25	S
221	P.C	<i>C. albicans</i>	0.25	S
257	P.C	<i>C. albicans</i>	0.125	S

Legenda: ATCC, American Type Culture Collection; L.C, lençol de colchonete; P.C, ponta de cateter; Classificação quanto à sensibilidade; S Sensível; R Resistente

### 5.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade de células dos isolados selecionados, nos tratamentos da CIM, 1/2 e 1/4 da CIM de fluconazol e na ausência deste, no tempo ( 0 horas) e após 24 horas do cultivo são mostrados na tabela 4. Observou-se crescimento celular em 24 horas de incubação em todos os tratamentos.

Segundo o protocolo disponível no site da Thermo Fisher Scientific, a viabilidade calculada pelo número de células, utilizando-se o corante azul de Tripán deve ser  $\geq 95\%$ . Verificou-se que quantidades de células inviáveis não foram significativas, mostrando percentuais abaixo de 3% em todos os tratamentos, após 24 horas de exposição com o antifúngico.

**Tabela 4** – Viabilidade (%) dos isolados de *C. albicans*, após cultivo em diferentes tratamentos: A, CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol; nos tempos zero e 24 horas de crescimento

	<b>Zero horas de crescimento</b>	<b>24 horas de crescimento</b>
<b>Isolado</b>	<b>Viabilidade %</b>	<b>Viabilidade%</b>
500 A	100.00%	100.00%
500 1/4	95.45%	100.00%
500 1/2	98.15%	98.55%
500 CIM	100.00%	97.44%
10231 A	100.00%	100.00%
10231 1/4	96.43%	100.00%
10231 1/2	97.00%	100.00%
10231 CIM	96.43%	98.95%
31 A	98.15%	98.81%
31 1/4	100.00%	99.17%
31 1/2	96.67%	98.39%
31 CIM	98.08%	97.27%
221 A	100.00%	99.57%
221 1/4	96.77%	99.78%
221 1/2	100.00%	99.49%
221 CIM	98,28%	98.11%

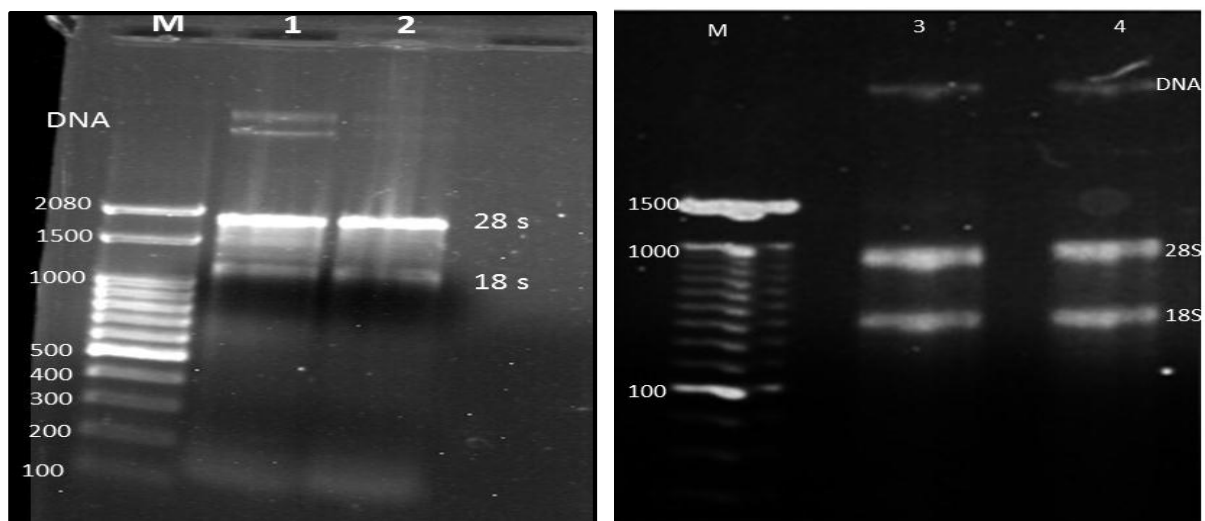
Legenda: A = ausente; CIM = concentração inibitória mínima;

#### 5.4 Avaliação da integridade do RNA extraído

A análise da extração de RNA dos isolados de *C. albicans* foi realizada com a quantificação espectrofotométrica para se avaliar a pureza do mesmo e eletroforese em gel de agarose 1%, observando suas bandas características e degradação. Segundo (SCIENTIFIC, 2012), as relações 260/280nm e 260/230 nm são medidas de pureza de ácidos nucleicos, estas geralmente caracterizam o RNA como "puro" em valores de aproximadamente 2,0. Em relação às leituras espectrofométricas, o RNA extraído dos isolados cultivados em todos os tratamentos foram considerados de boa qualidade, uma vez que as razões entre absorbâncias 260/280 e 230/260 apresentaram média igual a 2,0 e 1,86, respectivamente.

A observação do gel, permitiu identificar uma molécula de RNA íntegra, com a presença de apenas duas bandas fortemente marcadas representando o RNA ribossomal (28S e 18S). A visualização possibilitou ainda observar a presença de bandas fracamente marcadas na região superior, semelhante a DNA (Figura 3). Procedeu-se com o tratamento com DNase I para se obter melhores níveis de pureza e tal propósito foi alcançado após a verificação em novas quantificações em nanodrop.

**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando bandas 28S e 18S de RNA



Fonte: Do autor

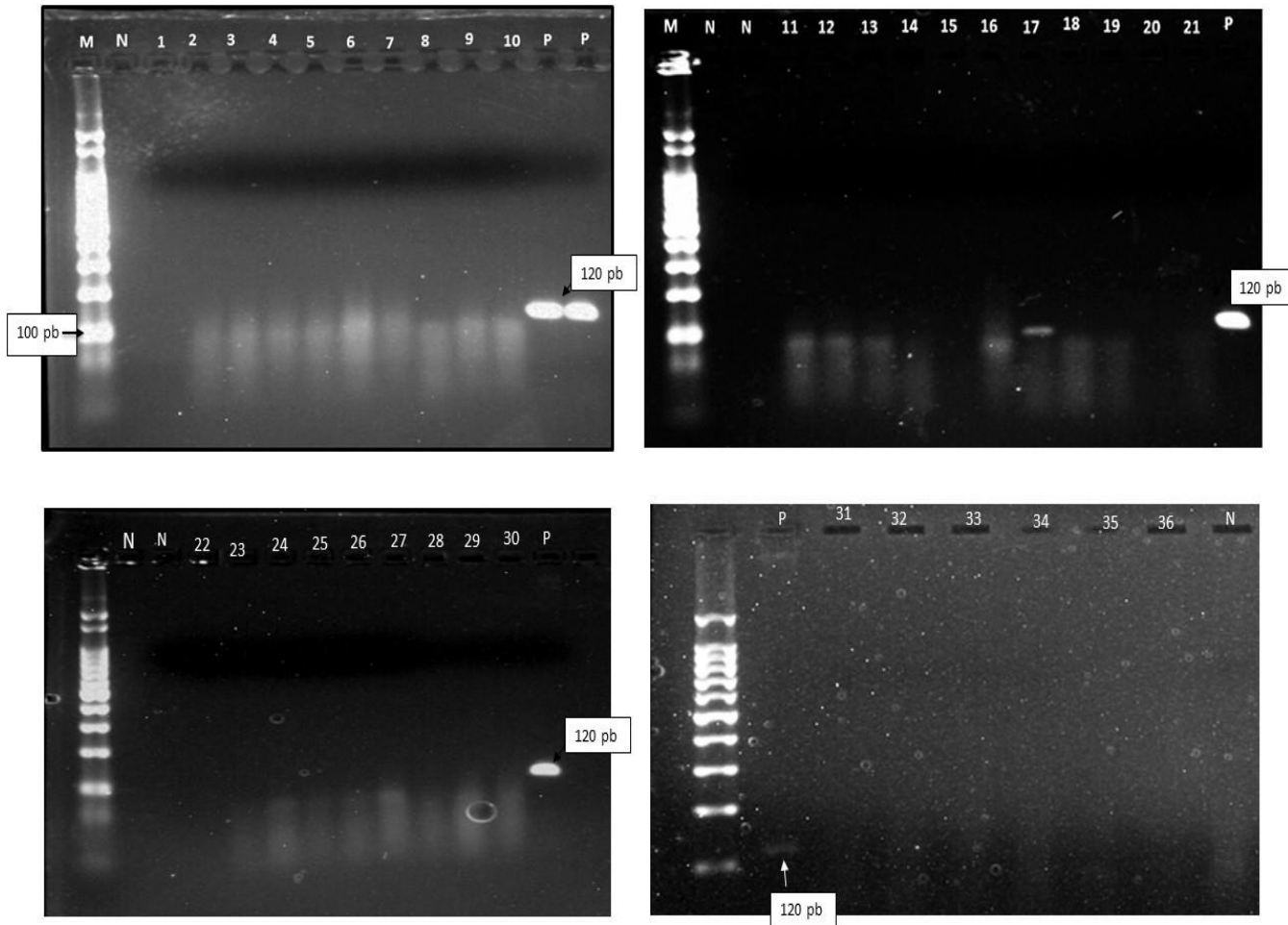
Legenda: M= Marcador de peso molecular (100 pb – Ladder, Ludwig Biotec) 1, 2, 3 e 4 = isolado 500 após cultivo com 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol, na ausência e na concentração inibitória mínima de fluconazol, respectivamente.

## 5.5 Amplificação de DNA

A PCR semiquantitativa foi realizada para todos os isolados em todos os tratamentos, para verificar a inexistência de DNA contaminante (Figura 4). Apenas na amostra 257 com 1/4 da CIM de fluconazol (canaleta 17), foi observada uma banda de amplificação de DNA. Esta foi purificada novamente com DNase I. Nas canaletas 11, 12, 13 e 16, correspondentes aos isolados 220 1/4 da CIM de FLU, 220 1/2 da CIM de FLU, 500 e 257 sem fluconazol não houve bandas de amplificações definidas,

porém como é necessário um RNA totalmente livre de contaminação, também foram novamente purificadas, amplificadas e então seguiu-se para a transcrição reversa.

**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR semiquantitativa de todos os isolados nos diferentes tratamentos previamente purificados com DNase I.



Fonte: Do autor

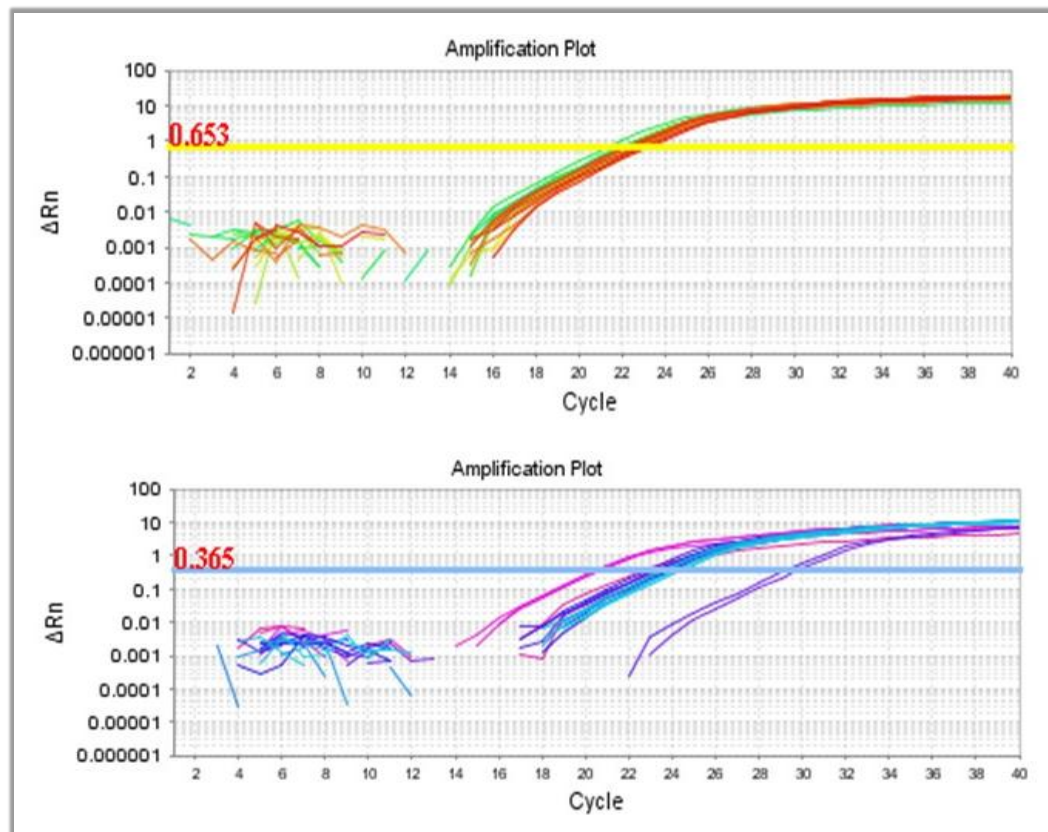
Legenda: M= Marcador de peso molecular (100 pb – Ladder, Ludwig Biotec), P= Positivo, N= Negativo, 1 a 36= isolados cultivados na CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol e também na ausência deste antifúngico.

## 5.6 Avaliação da expressão gênica de *ERG11*

### 5.6.1 Dados PCR quantitativa

A PCR quantitativa possibilitou analisar a expressão gênica diferencial de *ERG11* de todos os isolados nos diferentes tipos de tratamentos após 24 horas de incubação. Após o cálculo do perfil de amplificação de cada isolado, utilizou-se o mesmo número mínimo de ciclos para amplificação (Threshold) de cada gene para todas as análises (Figura 5).

**Figura 5-** Curvas de amplificação dos genes *ACT1* e *ERG11* de *C. albicans*.



Fonte: Do autor

Nota: As linhas que ultrapassaram o "Threshold" correspondem às curvas de amplificação

### 5.6.2 Análise e interpretação dos resultados da PCR quantitativa

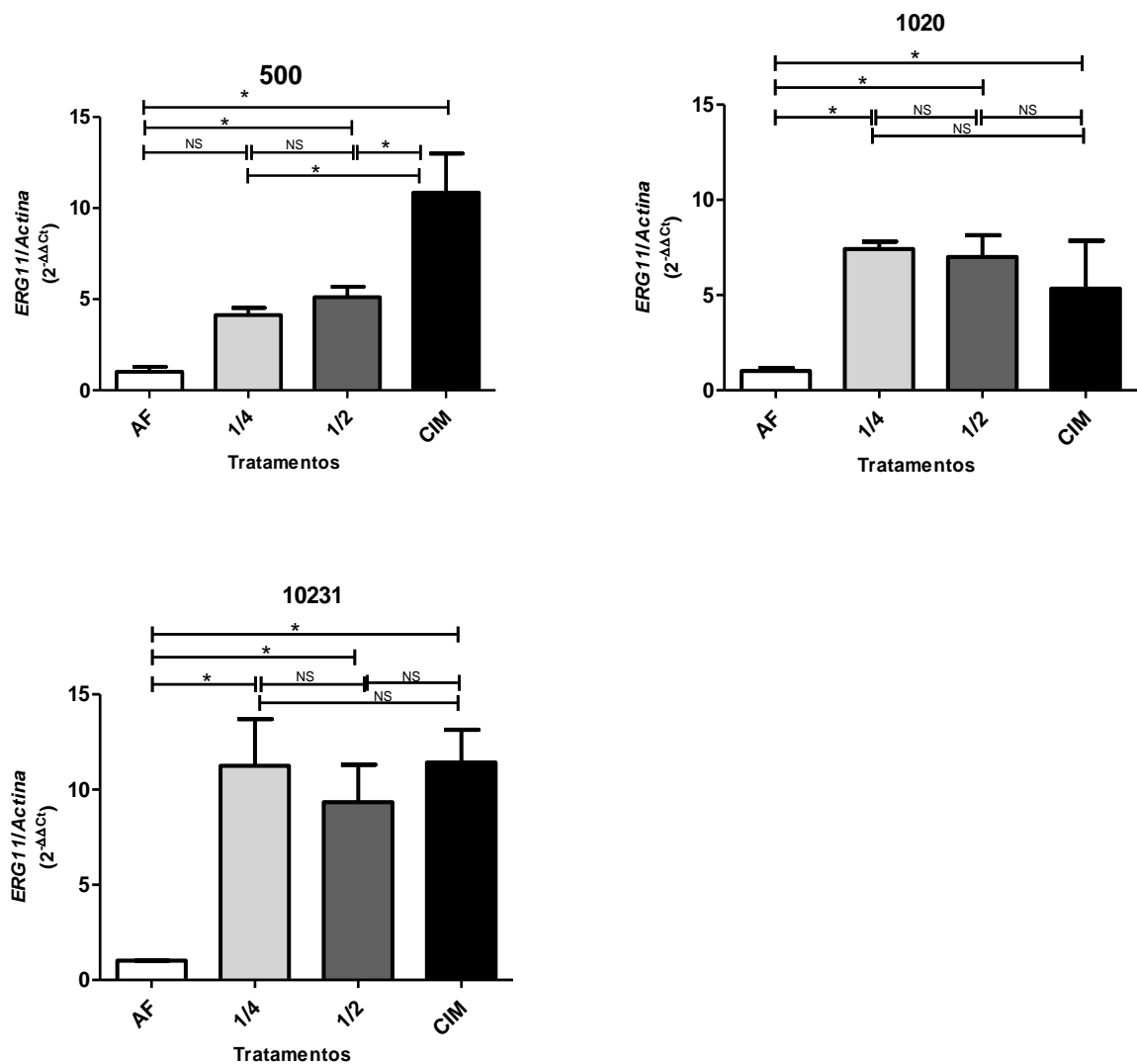
Os gráficos gerados dos níveis relativos de expressão gênica após a normalização com gene constitutivo *ACT1* nos tratamentos com CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol e na ausência de FLU nos isolados clínicos (31, 121, 220, 221, e 257),

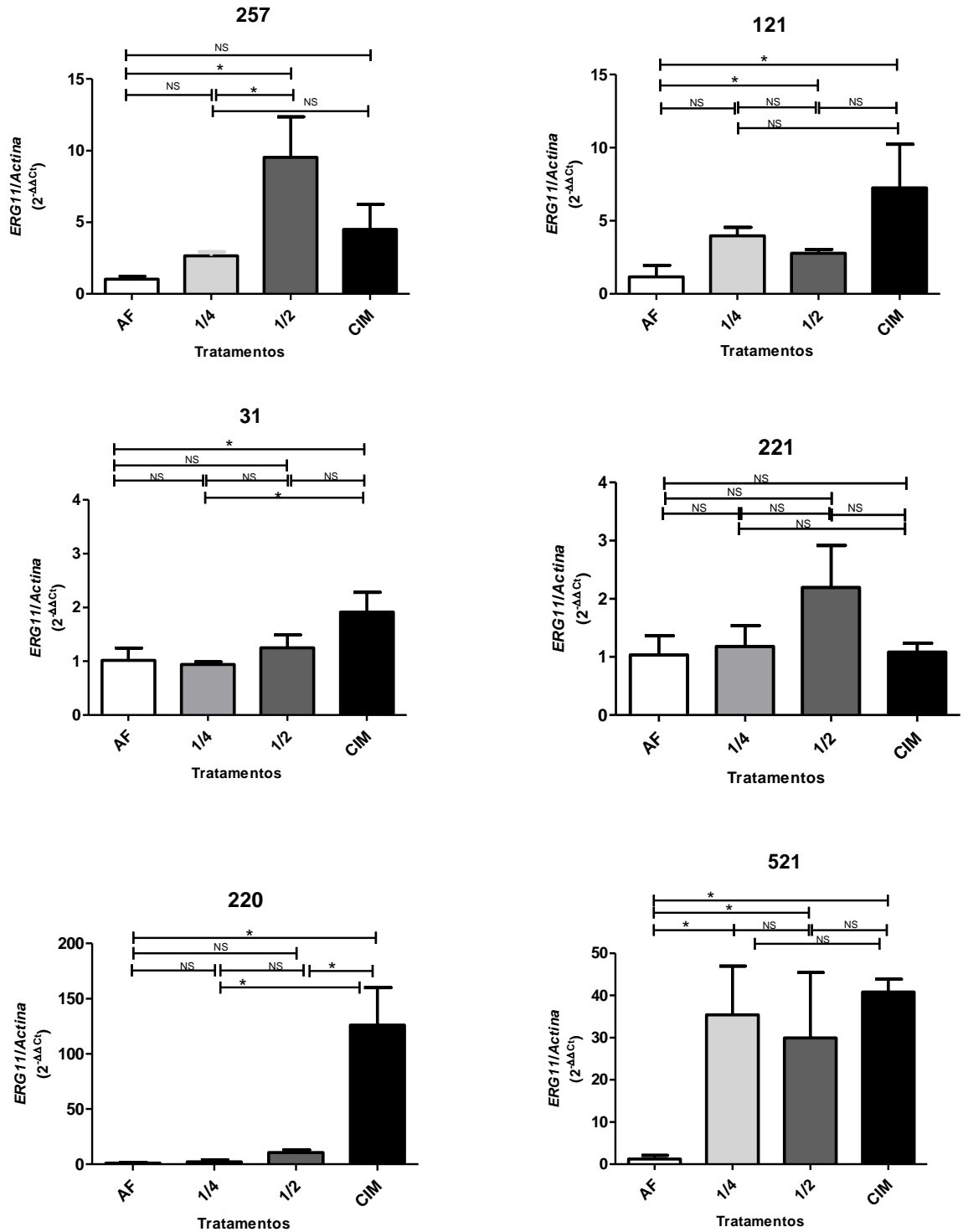


de colonização de ambiente hospitalar (500, 521 e 1020) e a cepa padrão ATCC 10231 podem ser vistos na figura 6.

Com exceção do isolado 31 quando tratado com 1/4 da CIM de fluconazol, observou-se em todos os demais isolados, independente da origem de isolamento, um aumento de expressão do gene *ERG11* em relação aos tratamentos com CIM, 1/4 e 1/2 de CIM de FLU quando comparados na ausência do antifúngico (Figura 6). Este aumento ocorreu em uma faixa muito ampla em que o menor valor de expressão foi de 1,086 (221 CIM) e o maior de 126,105 (220 CIM).

**Figura 6** – Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos isolados cultivados por 24 horas, na ausência de fluconazol (AF) e na presença da CIM, 1/4 e 1/2 da CIM do mesmo antifúngico.





Nota: Os dados (média ± desvio padrão) são representativos de triplicatas, foram normalizados pelo gene *ACT1* e expressos em relação ao isolado controle (AF), através do método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  com correção da eficiência. (NS, não significativo; \*P<0.05)

Considerando cada um dos tratamentos na presença de fluconazol, observou-se ampla variação nos níveis de expressão gênica do *ERG11*. Na concentração inibitória mínima, houve uma enorme variação de 1,086 a 126,10. Na presença da concentração subinibitória 1/2 da CIM do antifúngico, houve variação entre 1,246 a 29,97 vezes e por último, 1/4 da CIM, a variação foi entre 0,937 a 35,44 vezes (Tabela 5).

Verificando ainda o comportamento nos três tratamentos com fluconazol, com 1/4 da CIM, o isolado 521 foi o que apresentou maior expressão detectada de *ERG11* (média 35,44). Em relação ao tratamento com 1/2 da CIM o isolado 521 também apresentou maior expressão (média 29,97). Já na concentração inibitória foi o 220 com maior expressão (média 126,10).

Interessante ressaltar o comportamento do isolado 31 que obteve menor expressão quando tratado com 1/4 da CIM do fluconazol em relação a ausência de antifúngico (Tabela 5).

**Tabela 5** – Valores de expressão diferencial do gene *ERG11* nos tratamentos com CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de fluconazol, e com ausência do antifúngico, normalizados pelo gene constitutivo *ACT1*.

Isolado	Média ± SD			
	CIM	1/4 da CIM	1/2 da CIM	AF
257	4,512 ± 1,746	2,650 ± 0,295	9,535 ± 2,837	1,015 ± 0,216
121	7,237 ± 2,998	3,972 ± 0,586	2,787 ± 0,244	1,174 ± 0,783
220	126,105 ± 33,762	2,249 ± 1,752	10,523 ± 2,449	1,131 ± 0,667
31	1,915 ± 0,367	0,937 ± 0,049	1,246 ± 0,240	1,017 ± 0,228
221	1,086 ± 0,153	1,177 ± 0,357	2,190 ± 0,728	1,034 ± 0,329
500	10,843 ± 2,151	4,129 ± 0,398	5,120 ± 0,576	1,023 ± 0,268
521	40,794 ± 3,056	35,436 ± 11,537	29,970 ± 15,457	1,121 ± 0,875
1020	5,332 ± 2,512	7,415 ± 0,394	6,989 ± 1,154	1,008 ± 0,156
10231	11,416 ± 1,728	11,239 ± 2,469	9,339 ± 1,963	1,000 ± 0,019

Legenda: SD = desvio padrão; CIM= concentração inibitória mínima; AF= ausência de fluconazol

Para melhor interpretação e apresentação dos dados, foi confeccionada uma tabela (6) com a relação de tratamentos com e sem diferença significativa. A expressão do gene *ERG11* parece não seguir algum tipo de padrão específico nos isolados, uns expressam mais ou menos que outros comparando um determinado tratamento. No entanto, agrupando os isolados provenientes de origem clínica e colonização hospitalar, pode-se observar que alguns comportamentos coincidem. Dentre os de origem clínica, nenhum apresentou diferença significativa na expressão comparando o tratamento com 1/4 da CIM de fluconazol e ausência deste antifúngico. Os isolados 31, 121 e 220 (ponta de cateter) obtiveram o mesmo perfil nas concentrações CIM, 1/4 e 1/2 da CIM em relação ao tratamento na ausência de FLU e 1/2 em relação a 1/4. Porém, o 220 quando cultivado com a concentração mínima inibitória expressou 111,5 vezes a mais do que quando cultivado na ausência do antifúngico. Já o 121 e o 31 expressaram 6,16 e 1,88 vezes mais, respectivamente (Tabela 6).

Os isolados de origem ambiental 521 (jaleco), 1020 (jaleco) e a cepa padrão ATCC 10231 apresentaram o mesmo perfil de expressão com diferenças significativas e não significativas entre os mesmos tratamentos com o antifúngico. Os resultados destes isolados ainda se assemelham com o 500 (lençol de colchonete) quando se comparam os tratamentos com CIM e AF e 1/2 com AF. Vale ressaltar que os isolados de origem ambiental obtiveram diferença nas concentrações inibitórias e subinibitórias correspondente a 1/2 de FLU em relação à ausência de FLU. Sobressaiu-se neste grupo o isolado 521 tratado com CIM, 1/4 e 1/2 da CIM de FLU, apresentado expressão 29,26, 24,75 e 33,69 vezes a mais que o mesmo cultivo com ausência do antifúngico. Sendo que os outros isolados deste mesmo grupo teve nessa mesma comparação a maior expressão 11,42 vezes a mais que o AF (Tabela 6).

A diferença na abundância relativa de transcritos não foi significativa entre todos os tratamentos com antifúngico no isolado 221 e, também não foi significativa entre 1/2 e 1/4 da CIM de fluconazol, com exceção apenas do isolado 257 (Tabela 6).

Observou-se ainda que o tratamento nas concentrações inibitórias mínimas quando comparados ao tratamento sem fluconazol, apenas não influenciaram de forma significativa entre os isolados 257 e 221.

**Tabela 6** - Dados de expressão de todos os isolados de *C. albicans* nos diversos tratamentos cultivados por 24 horas na ausência e presença de fluconazol.

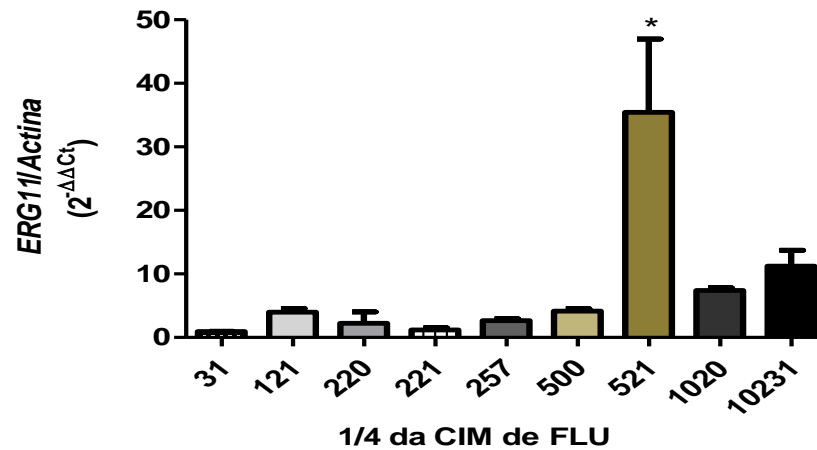
Grupo	nº isolado	Tratamentos					
		AF			¼		½
		1/4	1/2	CIM	1/2	CIM	CIM
Clínicos	31			1.883		2.042	
	121			6.165			
	220			111.496		56.067	11.984
	257		9.391		3.598		0.473
	221						
Colonização	500		5.004	10.596		2.626	2.118
	521	29.263	24.749	33.688			
	1020	7.35588	6.934	5.290			
ATCC	10231	11.2377	9.338	11.415			

Legenda: AF= ausência de fluconazol; ATCC= American Type Culture Collection; CIM= concentração inibitória mínima; Clínicos= isolados clínicos; Colonização= isolados de colonização de ambientes hospitalares; Em cinza= Tratamentos sem diferença estatística; Em vermelho= Tratamentos com diferença estatística.

Nota: Os valores na caixa em vermelho são a relação de expressão dos tratamentos na terceira linha em comparação aos tratamentos da segunda linha.

Considerando a expressão do gene *ERG11* dos isolados de *C.albicans*, pode-se observar que existem diferenças na resposta às concentrações de fluconazol, que se refletiu em valores de expressão relativas do gene distintos entre os isolados. A exposição desses a 1/4 da CIM de fluconazol resultou em maior expressão do 521, e este apresentou diferença significativa comparada aos demais isolados, os quais foram estatisticamente semelhantes (Figura 7).

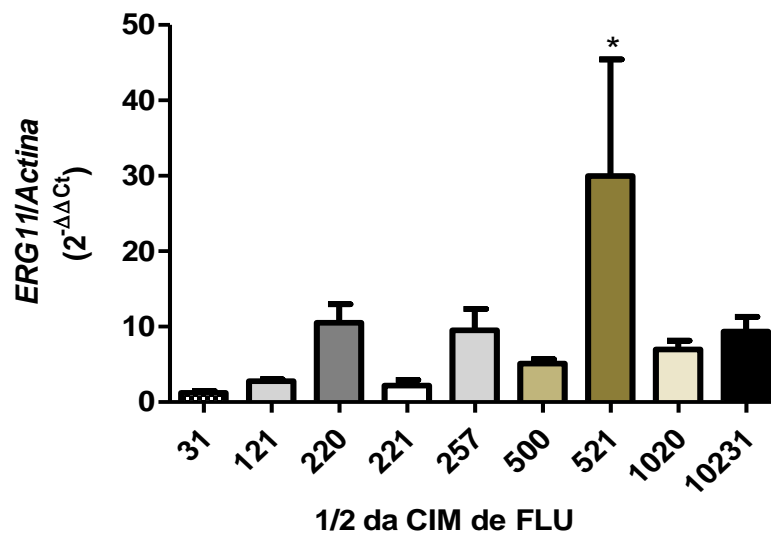
**Figura 7** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença de 1/4 da CIM de fluconazol e comparados entre si.



Nota: Os dados (média  $\pm$  desvio padrão) são representativos de triplicatas e foram normalizados pelo gene *ACT1*; \* isolado significativamente diferente dos demais  $P < 0.05$ .

Quando expostos a 1/2 da CIM, o mesmo comportamento foi observado, novamente a maior expressão foi do isolado 521, que apresentou diferença significativa em relação aos demais, os quais foram estatisticamente semelhantes (Figura 8)

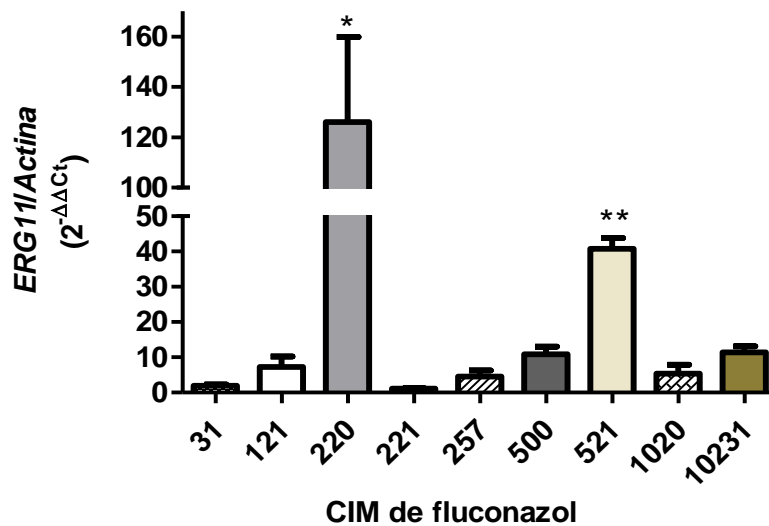
**Figura 8** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença de 1/2 da CIM de fluconazol e comparados entre si.



Nota: Os dados (média  $\pm$  desvio padrão) são representativos de triplicatas e foram normalizados pelo gene *ACT1*; \* isolado significativamente diferente dos demais  $P < 0.05$ .

No entanto, no tratamento com a concentração inibitória mínima de fluconazol, os níveis relativos de expressão gênica do isolado 220 foi a maior, revelando grande diferença com os demais. Neste isolado a expressão foi 3,091 vezes maior que do segundo mais expresso, o 521. E, este apresentou diferença significativa com os isolados 31, 221, 257 e 1020 (Figura 9).

**Figura 9** - Abundância relativa de mRNA analisada por qPCR dos oito isolados e a cepa padrão 10231 cultivados por 24 horas, na presença da concentração inibitória mínima de fluconazol e comparados entre si



Nota: Os dados (média  $\pm$  desvio padrão) são representativos de triplicatas e foram normalizados pelo gene *ACT1*; \* \*\* isolados significativamente diferentes entre si e dos demais  $P < 0.05$ .

## 6 DISCUSSÃO

Os azóis há muitos anos, são prescritos para infecções por *Candida* spp. Há algum tempo vem sendo observado insucesso nos tratamentos, e alguns estudos têm relatado que uma das razões é a resistência de *Candida* spp. a agentes antifúngicos (Leonardelli et al., 2017; MEIS et al., 2016; MONROY-PÉREZ et al., 2016). Este fato alerta para a necessidade de se desenvolver estratégias para prevenir a disseminação dessas linhagens entre os fungos, pois, como observado em bactérias, hoje algumas estão disseminadas e fora de controle. Diante dessas indagações, as investigações do potencial e dos mecanismos genéticos que acarretam à persistência das espécies de *Candida* a um antifúngico são imprescindíveis para a eficaz utilização deste.

Recentemente descrita, a imagem global da candidemia foi ampliada com a emergência da espécie *Candida auris*, resistente a múltiplos fármacos. Reconhecida em 2009 a partir de um espécime de canal auditivo no Japão, *C. auris* foi relatada em outros países como África do Sul, Coreia do Sul, Índia, Paquistão, Colômbia, Venezuela, Reino Unido e EUA (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Mesmo com aumento de candidíases provocadas por espécies não *Candida albicans*, alguns estudos como Da Silva-Rocha et al., (2014) apontam que a prevalência no Brasil, tanto de isolados clínicos quanto de colonização é de *Candida albicans*.

A capacidade de um microrganismo para se adaptar depende de suas habilidades e varia de acordo com as condições de exposição, como a presença ou ausência de fármacos que podem estimular a expressão de seus atributos de virulência (SILVA, 2014). Sabe-se que o fluconazol sendo fungistático, pode permitir o desenvolvimento de resistência adquirida de *C. albicans* no decorrer de um tratamento, porém não foram encontrados na literatura, os mecanismos de resistência quando este é administrado em variadas concentrações. Ainda segundo Bassetti; Peghin; Timsit (2016), o fluconazol é utilizado no tratamento de candidemia e para o tratamento de pacientes não críticos sem exposição prévia a azóis, e sem evidência de colonização com um isolado que tenha reduzida sensibilidade a azóis. Dessa forma, neste trabalho foi proposto analisar um dos mecanismos de resistência de *C. albicans*, a superexpressão de *ERG11*, com administração deste antifúngico em



concentrações pré-definidas, observando-se uma resposta que poderia ser semelhante à resposta clínica de pacientes sob tratamento.

O *ERG11* é um gene reconhecidamente envolvido em mecanismos de resistência de *Candida* spp., como superexpressão e mutações. Encontra-se na literatura, esses mecanismos relacionados a cepas resistentes. Segundo Eddouzi et al. (2013), *C. albicans* por muito tempo permaneceu como espécie sensível ao fluconazol, mas alguns estudos apontaram desenvolvimento de resistência ao mesmo antifúngico. Assim, este estudo investigou o comportamento de isolados sensíveis, observando um mecanismo que poderia levar ao desenvolvimento de resistência ao fluconazol. Corroborando com este fato, um estudo com isolados de *C. albicans* de um paciente internado com AIDS demonstrou que à medida que a resposta clínica do paciente ao tratamento diminuiu ao longo de um tempo, as CIMs de fluconazol para estes isolados aumentaram. Segundo o autor Wu et al., (2000), a diminuição da sensibilidade foi associada a mecanismos como: aumento da expressão do gene *MDR1* e *CDR1*, mutação pontual no gene *ERG11* e aumento da expressão do gene *ERG11*.

No teste de sensibilidade realizado neste trabalho, os isolados revelaram-se sensíveis ao fluconazol, e os valores das CIMs foram pelo menos quatro vezes menores que o ponto de corte indicado no documento EUCAST Technical Note on fluconazole (2008), com exceção da cepa padrão ATCC 10231 que foram duas vezes menores. A sensibilidade da ATCC 10231 já havia sido observada em outros estudos como Xu et.al (2015) e Jose et al., (2006), sendo que neste último, a CIM foi a mesma deste trabalho (1 µg/mL).

De acordo com Navarathna et al., (2005), subinibitória significa uma concentração que causa uma proeminente diminuição na turbidez, mas ainda permite algum crescimento celular. Pensando nas condições de exposição dos isolados utilizadas neste estudo, foi determinada a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripan, este permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células não viáveis. O intuito foi verificar qual seria a influência de diferentes concentrações de fluconazol em exposição por 24 horas sobre isolados de *C. albicans*. Os resultados mostraram que a inviabilidade não foi significativa mostrando percentuais abaixo de 3% em todos os tratamentos. Mesmo o referido antifúngico sendo fungistático, foi de suma importância para este estudo que o fluconazol não

tivesse matando as células no tempo de incubação proposto, pois após este período, é que se extraiu o material genético (mRNA) para as análises. Este período de incubação permitiu avaliar como os isolados estariam respondendo às condições adversas a eles (a exposição de diferentes concentrações de antifúngico) na transcrição de genes, como o *ERG11*.

Após a extração de RNA, fez-se uma verificação da integridade da molécula, além da mesma se apresentar de boa qualidade, sem degradação (Figura 5), percebeu-se a presença de bandas fracamente marcadas na regiões superiores dos géis, semelhante a DNA. A partir destes, pode-se constatar a importância do tratamento com DNase I, uma vez que essa endonuclease remove DNA genômico de amostras de RNA antes de aplicações em RT-qPCR e com intuito de obter melhores níveis de pureza, o tratamento foi realizado. A partir do material genético extraído, a enzima transcriptase reversa sintetiza o DNA complementar (cDNA) e diante da importância de não se levar DNA contaminante para reações de transcrição reversa, neste estudo, foram realizados ensaios para se avaliar a ausência de tal DNA contaminante através de ampliações deste produto. Nessa reação levou-se 100 ng de RNA de cada isolado e, na presença DNA, o mesmo iria amplificar e aparecer sua banda característica posteriormente na eletroforese em gel de agarose. Com base nos resultados, obteve-se total confiabilidade em prosseguir com os experimentos posteriores (reações de síntese de cDNA e análises por qPCR). Estas medidas foram tomadas, considerando que para avaliação de níveis relativos de expressão, essencial para a precisão de RT-qPCR é a correção de erros resultantes da preparação e processamento da amostra, incluindo a quantidade de RNA inicial, os processos de limpeza e a síntese de cDNA (JIANG et al., 2016).

Em geral, a avaliação dos níveis relativos de expressão realizados na PCR quantitativa, revelou que o comportamento de todos os isolados, em todos os tratamentos com fluconazol, foi de tendência de aumento de expressão de *ERG11* comparados à ausência de FLU. Este mesmo desempenho foi observado anteriormente por Eddouzi et. al (2013), em um estudo que verificou a expressão de *ERG11* de um isolado clínico resistente ao fluconazol (CIM 8 µg/mL) comparado a cepa padrão SC314 sensível a fluconazol (CIM 0.0625 µg/mL). Surpreendentemente a expressão de *ERG11* na cepa SC314 foi maior, com grande diferença. Porém quando os mesmos foram incubados com fluconazol, os níveis de expressão

aumentaram, sendo que o aumento do resistente equiparou-se com os níveis da cepa padrão, o aumento foi de 7 e 2 vezes mais para o isolado e cepa, respectivamente.

Observou-se neste estudo, aumento de expressão do gene *ERG11* nos isolados de *C.albicans* com a exposição ao fluconazol, porém o perfil de expressão entre os isolados diferiu. Os valores de expressão e a comparação em relação às diferenças significativas entre os tratamentos foram distintos. Com exceção dos isolados 521 e 1020 provenientes da mesma fonte de colonização de ambiente hospitalar (jaleco de profissional de saúde) e da cepa padrão ATCC 10231 que apresentaram exatamente o mesmo perfil de expressão comparando as diferenças entre os tratamentos, sendo claramente observado na tabela 6. Importante observar que as diferenças de expressão destes, quando cultivados na presença de fluconazol, foram grandes em relação ao tratamento na ausência deste. Considerando o processo de colonização à infecção, ressalta-se o cuidado de higienização e manipulação no ambiente hospitalar, pois estes isolados em contato com pacientes imunodeprimidos, que estiverem recebendo dosagens profiláticas de fluconazol, poderão responder dessa mesma forma.

Entre os isolados clínicos, pequenas dosagens de fluconazol parecem não surtir efeito em relação a expressão gênica de *ERG11*, uma vez que os mesmos não apresentaram expressão com diferença significativa quando cultivados com 1/4 da CIM de FLU em comparação ao tratamento sem este antifúngico. O mesmo comportamento ocorreu quando estes isolados foram cultivados com 1/2, com exceção apenas do isolado 257.

Observou-se níveis muito baixos de expressão relativa do isolado 221, a expressão detectada também apresentou aumento quando tratadas com 1/2 e 1/4 da CIM de fluconazol, porém sem diferença significativa entre nenhum dos tratamentos com fluconazol. Considerando alguns trabalhos anteriores da área, este isolado pode vir a apresentar resistência a azóis por outros mecanismos de resistência, como mutação de *ERG11*, como foi o caso observado por Xu et. al (2015).

Em geral, a maior dose de fluconazol (CIM) foi a que mais influenciou os isolados a expressarem *ERG11*, seguidos dos tratamentos com 1/2 e 1/4 da CIM. Apenas dois isolados não apresentaram grande diferença em comparação com CIM e ausência de FLU (257 e 221), porém já apresentaram quando comparada à dosagem menor, com 1/2 da CIM em relação a ausência. O isolado 1020 foi o único

que quando cultivado com 1/4 da CIM de FLU expressou níveis mais elevados do gene alvo. A cepa ATCC 10231 quase equipararam as expressões quando os cultivos foram a CIM e 1/4 da CIM de FLU.

Há relatos na literatura mostrando que muitos isolados clínicos de *C. albicans* superexpressam *ERG11*. Em outros casos, o nível de superexpressão é mínimo, dificultando a avaliação do impacto direto dessa superexpressão no fenótipo resistente (BERKOW; LOCKHART, 2017). Corroborando com este estudo, foi observado comportamentos tão diferentes dos isolados 31 e 220, o primeiro teve seu valor máximo de expressão (1,915) e o segundo apontou seu valor máximo (126,105). Além do mesmo isolado 31, quando cultivado com 1/4 da CIM de fluconazol apresentou expressão menor (0,937) do que quando cultivado na ausência do mesmo (1,017).

Correlacionando os comportamentos dos isolados de fontes de colonização de ambiente hospitalar e dos isolados clínicos, observa-se que ambos possuem tendência à resistência pela superexpressão de *ERG11*, sendo fundamental estimular o uso racional dos agentes antifúngicos no ambiente hospitalar.

É importante apontar que uma das causas mais frequentes afetando os pacientes imunocomprometidos, é a colonização por *Candida* spp. a partir de cateteres permanentes (ANTINORI et al., 2016). Somando desta forma à literatura, os dados obtidos neste estudo, em que isolados de colonização de ambiente hospitalar, também possuem tendência a resistência com superexpressão gênica de *ERG11* através de exposição com fluconazol implica que, tanto quanto estimular o uso racional dos agentes antifúngicos, é o cuidado com higienização e manipulação dos agentes de saúde no ambiente hospitalar, pois é neste que se encontram a maioria dos pacientes imunodeprimidos.

Os resultados deste estudo corroboram com Bassetti; Peghin; Timsit, (2016), o qual citou que embora no passado doses menores de terapia antifúngica fossem consideradas úteis para evitar efeitos colaterais, doses adequadas são agora consideradas primordiais para evitar o desenvolvimento da resistência.

## 7 CONCLUSÕES

A expressão gênica de *ERG11* de todos os isolados de *C.albicans* frente a exposição com os tratamentos de fluconazol equivalentes a CIM, 1/4 e 1/2 da CIM e também na ausência de FLU foi detectada. Os resultados das quantificações diferem entre cada isolado, porém observou-se níveis aumentados de expressão de todos os isolados nos três tratamentos com fluconazol. Dessa forma, o antifúngico foi capaz de elevar a expressão relativa de *ERG11* de isolados de *C. albicans*, independentemente da fonte de isolamento ou dosagens de fluconazol utilizadas. Esses dados implicam que pacientes infectados com esses isolados de *C.albicans* e tratados com doses menores de fluconazol podem sofrer com posteriores resistência desse microrganismo in vivo.

Os efeitos das concentrações de fluconazol em *C. albicans* foram muito dependentes de cada isolado. Em geral, nas concentrações inibitórias mínimas houve maior expressão gênica de *ERG11*.

Os isolados clínicos não diferiram na tendência de resistência a fluconazol, (superexpressando *ERG11*) de cepas de colonização de ambiente hospitalar.

O surgimento da resistência dos isolados de *C.albicans* ao fluconazol implica ser uma consequência inevitável das pressões seletivas impostas por este antifúngico.

É de fundamental importância estimular o uso racional dos agentes antifúngicos, em especial o fluconazol no ambiente hospitalar, visando diminuir a ocorrência de infecção por *Candida* spp. e conseqüentemente a resistência deste microrganismo, mas especialmente, promover a terapia mais adequada e com isso elevar a sobrevida destes pacientes.

A expressão aumentada de *C. albicans*, provenientes de isolados clínicos e de colonização de ambiente pré-tratados com fluconazol, deve ser relevante para o cuidado de manipulação e higienização no ambiente hospitalar e uso terapêutico e profilático deste antifúngico.

## RERERÊNCIAS

ANTINORI, S. et al. European Journal of Internal Medicine Candidemia and invasive candidiasis in adults : A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, [S.I.], 2016.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; TIMSIT, J. The current treatment landscape : candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.I.], p. 13–22, 2016.

BERKOW, ELIZABETH L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species : a current perspective. **Infection and Drug Resistance**. [S.I.], p. 237–245, 2017.

Bíblia sagrada. A.T. Salmos. ed. 204. São Paulo: Editora Ave-Maria, 2014, cap. 8.

Calderone A. R.; Clancy J. C.; **Candida and Candidiasis**. 2 ed. ASM Press, 2011.

CALVET, H.M; YEAMAN, M.R.; FILLER, S.G. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential in vitro model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v.41, n.3, p.535 – 539, 1997.

Carvalho, V. O. **Identificação e análise de mutações no gene *ERG11* de isolados de *Candida* susceptíveis e e resistentes ao fluconazol**. 2011. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina, São Paulo, 2011.

CHENG, M.-F. et al. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **BMC infectious diseases**. Londres, v. 5, p. 22, 2005.

CLAUDINO, A. L. R. **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Candida* spp DE CAVIDADE BUCAL QUANTO AOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES E OBTENÇÃO DE MUTANTES HETERORESISTENTES À ANTOTERICINA B E FLUCONAZOL**, 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UNIFAL, Alfenas, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasil, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

DA SILVA-ROCHA, W. P. et al. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC oral health**. Londres, v. 14, n. 1, p. 20, 2014.

DANTAS, S. et al. ScienceDirect Cell biology of *Candida albicans* – host interactions. **Current Opinion in Microbiology**. [S.l.], v. 34, p. 111–118, 2016.

EDDOUZI, J. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

ELIAKIM-RAZ, N. et al. International Journal of Infectious Diseases Epidemiology , microbiology , clinical characteristics , and outcomes of candidemia in internal medicine wards — a retrospective study. **International Journal of Infectious Diseases**. [S.l.], v. 52, p. 49–54, 2016.

FERREIRA, A. V. **Comparação do perfil associado à virulência e da sensibilidade antifúngica entre amostras de *Candidas* spp. em casos de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar**, 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UNIFAL, Alfenas, 2011.

FRANÇA, F. D. **Avaliação das linhagens vero e mdck na sinalização celular e como alternativas para estudo da nefrotoxicidade utilizando anfotericina b**, 2008, 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FUENTES, M. et al. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. **Revista Chilena Infectología**. Chile, v. 31, n. 5, p. 511–517, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Brasil, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GOW, N. A. R.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**. [S.l.], v. 15, n. 4, p. 406–412, 2012.

GROSSMAN, N. T. et al. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Isolates from a U.S. Surveillance System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 59, n. 2, p. 1030–1037, 2015.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**. [S.I.], v. 8, p. 5–10, 2014.

HARVEY, R.A; FISHER, B.D; CORNELISSEN, C.N. **Microbiology**. China: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

HE, X. et al. Overexpression of Both *ERG11* and *ABC2* Genes Might Be Responsible for Itraconazole Resistance in Clinical Isolates of *Candida krusei*. **Plos One**. São Francisco, v. 10, n. 8, p. e0136185, 2015.

JIANG, C. et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.I.], v. 68, n. December 2012, p. 778–785, 2013.

JIANG, M. et al. Evaluation of Suitable Internal Control Genes for RT-qPCR in Yak Mammary Tissue during the Lactation Cycle. **Plos one**. São Francisco, p. 1–13, 2016.

JOSE, M. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**. Londres, p. 1367–1373, 2006.

KOFLA, G.; RUHNKE, M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. **Journal of Microbiological Methods**, [S.I.], v. 68, n. 1, p. 178–183, 2007.

LIESCHE, J.; MAREK, M.; GÜNTHER-POMORSKI, T. Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. **Frontiers in Microbiology**. Lausanne, v. 6, n., p. 1–8, 2015.

MAGALHÃES, Y. C. et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. **Brazilian Journal of Microbiology**. Uberaba, v. 123, p. 117–123, 2015.

MEIS, J. F. et al. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B:**



**Biological Sciences.** Londres, v. 371, n. 1709, p. 20150460, 2016.

MONROY-PÉREZ, E. et al. High Virulence and Antifungal Resistance in Clinical Strains of *Candida albicans*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.** Canadá, v. 2016, p. 1–7, 2016.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> >. Acesso em: 14 novem. 2016

NAVARATHNA, D. H. M. L. P. et al. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** [S.l.], p. 1156–1159, 2005.

NEUFELD, P.M. Manual de Micologia Médica: Técnicas de Básicas de Diagnóstico. 1. ed. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Qualidade, 1999, p.1, 214.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE.** São Francisco, v. 8, n. 3, 2013.

PARKER, J. E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. **J Chem Biol.** [S.l.], p. 143–161, 2014.

PAULA, S. B. DE et al. Original Article Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. **The Journal of Infection in Developing Countries.** Itália, 2015.

PEMÁN, J. et al. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. **Revista Iberoamericana de Micología,** [S.l.], v. 28, n. 2, p. 91–99, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine.** Tucson, v. 125, n. 1 SUPPL., p. S3–S13, 2012.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters.** [S.l.], v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RICARDO, E. et al. In Vivo and In Vitro Acquisition of Resistance to Voriconazole by *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 58, n. 8, p. 4604–4611, 2014.

ROMANOWSKA, E. et al. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. **Journal of Medical Microbiology**. Londres, v. 64, n. 6, p. 610–619, 2015.

ROSSI, S. A. “**Caracterização do gene *ERG11* envolvido na resistência de *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii* às drogas azólicas e identificação de novos alvos a partir de produtos naturais**”. 2011.105f. Dissertação (Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Araraquara, 2011.

SANTANA, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**. Salvador, v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. Londres, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013.

SCIENTIFIC, T. F. Interpretation of Nucleic Acid 260 / 280 Ratios. **Thermo Scientific**. p. 7707, 2012.

SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000 Research**. Londres, v. 5, n. 0, p. 1–7, 2016.

SILVA, N. C. Análise de aspartato protease (Sap) como fator associado à virulência de linhagens de *Candida albicans* e *Candida não albicans*. **Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**. 2013.

SILVA, N. C. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**. [S.l.], p. 1–11, 2014.

STRZELCZYK, J. K. et al. Nucleotide substitutions in the *Candida albicans* ERG11 gene of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates. **Acta biochimica Polonica**. Warszawa, v. 60, n. 4, p. 547–52, 2013.

VAZQUEZ, J. A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization : an Epidemiologic Study. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 36, n. 2, p. 421–426, 1998.

WEI, X.; MILEWSKI, S.; WILLIAMS, D. W. A novel in vitro assay for assessing efficacy and toxicity of antifungals using human leukaemic cells infected with *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**. [S.l.], p. 177–187, 2015.

WU, T. A. O. et al. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase , a Virulence Factor , by *Candida albicans* Isolates following Growth in Subinhibitory Concentrations of Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 44, n. 5, p. 1200–1208, 2000.

XU, Y. et al. *ERG11* mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. **Archives of Microbiology**. [S.l.], v. 197, n. 9, p. 1087–1093, 2015.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**. Londres, p. 1–12 2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Alinhamento realizado no BLAST a partir de sequências dos genes *ACT1* e *ERG11*

Candida albicans SC5314 actin (*ACT1*), partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_019475182.1](#) Length: 1131 Number of Matches: 1

Range 1: 909 to 1002 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(94)	3e-40	94/94(100%)	0/94(0%)	Plus/Minus
Query 1	TGGTGGAGCAATAATCTTAACTTTTCATAGAAGATGGAGCCAAAGCAGTAATTTCCCTTTTG	60		
Sbjct 1002	TGGTGGAGCAATAATCTTAACTTTTCATAGAAGATGGAGCCAAAGCAGTAATTTCCCTTTTG	943		
Query 61	CATACGTTTCAGCAATACCTGGGAACATGGTAGTA	94		
Sbjct 942	CATACGTTTCAGCAATACCTGGGAACATGGTAGTA	909		

Candida albicans SC5314 sterol 14-demethylase (*ERG11*), partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_711668.2](#) Length: 1587 Number of Matches: 1

Range 1: 1302 to 1373 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
108 bits(58)	2e-20	68/72(94%)	3/72(4%)	Plus/Minus
Query 1	GAAG-AACCACTTTAG-AACTTTCCCAAACCCATAATCAACTTCATCAGAAGAGTTAAAT	58		
Sbjct 1373	GAAGAAACCCCTTTAGAACTTTCCCAAACCCATAATCAACTTCATCAGAAGAGTTAAAT	1314		
Query 59	GAAACAGA-TTA	69		
Sbjct 1313	GAAACAGAATTA	1302		

**APÊNDICE B** - Microplaca do teste de sensibilidade com finalidade de obtenção da CIM de fluconazol para os isolados de *Candida albicans*

Concentrações de Flu em  $\mu\text{g/mL}$

