



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SANDRA SAYURI NAKAMURA

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura
Candida glabrata

Maringá
2012

SANDRA SAYURI NAKAMURA

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura

Candida glabrata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANDRA SAYURI NAKAMURA

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura

Candida glabrata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Melyssa Fernanda Norman Negri
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Defesa em: Dezembro de 2012.
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIAS

À minha amada família
Ao meu eterno amor Willian

AGRADECIMENTOS

A Deus que sabiamente me guiou onde quer que eu fosse para que este sonho se tornasse realidade;

Aos meus pais, Haruo Mauro Nakamura e Judite Mikie Kikuta Nakamura, um amor incondicional, sem limite. Jamais mediram esforços, trabalho, noites sem dormir, dias sem descanso para a realização deste sonho!!!

Ao meu futuro esposo Willian Fukumoto de Vasconcelos. Um companheiro que junto chorou, sofreu, estudou, não dormiu, não comeu, viajou, sentiu saudade, cansaço e agora juntos vamos sorrir e rir com esta conquista!!!!

Aos meus irmãos Simone Harumi Nakamura e Henrique Massaharu Nakamura, pelo apoio e incentivo todos os dias.

Aos meus futuros sogros.

Ao meu bebê Nina, um animalzinho que mesmo sem falar a língua dos homens, me ensinou que com amor podemos entender qualquer linguagem.

À minha orientadora Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pela oportunidade, carinho, amizade. A nossa mãe da micologia.

Aos amigos Pat, Janine, Eliane, Eliana, Paulo, Lilian, Fran, Dri, Pâmela, Waylla.

Aos amigos, funcionários e professores que conheci ao longo desta caminhada!!!! Professoras Dr^a. Valéria Patussi e Dr^a. Eliana Shimautti, Meire e Celina do laboratório de Citologia Clínica, a nossa querida Olivia sempre tão dedicada e paciente!

À CAPES

Muito Obrigada à todos!!!

EPÍGRAFE

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota de água.
(Madre Teresa de Calcutá)

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura

Candida glabrata

Resumo

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento de infecções fúngicas em humanos comprometendo diferentes sítios, incluindo a candidíase vulvovaginal (CVV) que é uma infecção de vulva e vagina que acomete 25% da população feminina em geral. Estima-se que 75% das mulheres terão pelo menos um episódio de CVV na vida. A espécie mais comum é *Candida albicans*, mas tem aumentado a incidência de CVV por *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) principalmente *Candida glabrata*. Apesar disso, os estudos são geralmente voltados para *C. albicans* enquanto *C. glabrata* é pouco conhecida, exceto pela sua resistência inata aos azóis. Neste cenário o objetivo deste trabalho foi a avaliação genotípica e a análise de alguns fatores de virulência em *C. glabrata* isoladas de CVV. Foram analisados 60 isolados de *C. glabrata* pertencentes a um banco de leveduras da micoteca da Universidade Estadual de Maringá-Maringá, Paraná. Após a identificação clássica das leveduras foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica frente à fluconazol, itraconazol, nistatina e anfotericina B de acordo com o documento M27-A3. A avaliação genotípica foi feita por PCR-RAPD com os iniciadores OPA18, P4 e OPE18 que mostraram bom índice de similaridade entre si. Foram determinadas as seguintes características fenotípicas: hidrofobicidade da superfície celular, aderência sobre diferentes superfícies como poliestireno, anel vaginal e em células epiteliais vaginais humanas e a capacidade de formar biofilme. Não encontramos nenhuma correlação entre os fatores de virulência analisados, bem como não houve agrupamento genotípico de relevância. Ao contrário, chamou a atenção a diversidade em todos os resultados, sugerindo uma expressiva plasticidade fenotípica e genotípica de *C. glabrata* isolada de CVV. Essa característica, ainda não relatada, deve refletir a alta capacidade de adaptação dessa espécie a diferentes pressões seletivas e possivelmente justifique o aumento de sua incidência.

Palavras-chave: *C. glabrata*, fatores de virulência, biofilme, aderência, RAPD

Phenotypic and genotypic diversity in vaginal isolates of *Candida glabrata*

Abstract

Over the last few years there has been an increase in the number of fungal infections affecting different sites in human including the vulvovaginal candidiasis (VVC) that is an infection of vulva and vagina affecting 25% of woman. It is estimated that 75% of women will have at least one episode of fungal vaginitis. *Candida albicans* is the most common species, but it has been increasing the incidence of VVC by non-*albicans* *Candida*, especially *C. albicans*. Moreover there has been observed an increase in the incidence of vulvovaginal candidiasis in non-*albicans* *Candida* species. *C. glabrata* is little known except by their innate resistance to azoles. In this scenario the objective of this study was the genotypic evaluation and the analysis of some virulence factors in *C. glabrata* isolated from VVC. We analyzed 60 isolates of *C. glabrata* which are maintained in a bank of yeasts at Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. For the genotypic characterization was used the PCR-RAPD assay by using the primers OPA18, P4 and OPE18, which showed a good similarity index. It was not found correlation between the analyzed virulence factors as well there was no genotypic grouping of relevance. The other hand, the diversity of the results was highlighted, suggesting an expressive phenotypic and genotypic plasticity of *C. glabrata* isolated from VVC. That characteristic, which was not related until the present, might reflect the high capacity of adaptation of this specie to different selective pressure and it probably can justify the increase of its incidence.

Keywords: *C. glabrata*, virulence factors, biofilm, adherence, RAPD

FICHA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador OPA18 para isolados de <i>Candida glabrata</i>	37
Figura 2 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador P4 para isolados de <i>Candida glabrata</i>	38
Figura 3 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador OPE18 para isolados de <i>Candida glabrata</i>	39
Figura 4 Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de leveduras isoladas de candidíase vulvovaginal de acordo com o quadro clínico da mulher.....	40
Tabela 1 Aderência de isolados clínicos da espécie <i>Candida glabrata</i> em superfície de poliestireno de acordo com o padrão de hidrofobicidade da superfície celular (HSC).....	41
Tabela 2 Aderência de quatro isolados vulvovaginais de <i>Candida glabrata</i> em diferentes superfícies e a capacidade de formar biofilme bem como sua característica de hidrofobicidade da superfície celular (HSC).....	42
Tabela 3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quatro antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo (CLSI) em 60 amostras de <i>C. glabrata</i> isoladas de candidíase vulvovaginal	43

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): Mycoses (artigo 1) disponível em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0507/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0507/homepage/ForAuthors.html)

SUMÁRIO

1. Capítulo I	12
1.1. Candidíase vulvovaginal	12
1.2. <i>Candida</i> spp	12
1.3. <i>Candida glabrata</i>	13
1.4. Genotipagem pela técnica de Amplificação Randômica de DNA Polimórfico	13
1.5. Fatores de virulência	14
1.6. Hidrofobicidade de superfície celular (HSC)	14
1.7. Aderência e formação de biofilme	15
1.8. Plasticidade fenotípica	15
1.9. Justificativa	16
1.10. Objetivos	16
1.11. Referências	16
2. Capítulo II	21
2.1. Artigo: Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura <i>Candida glabrata</i>	22
2.2. Figuras	37
2.3. Tabelas	41
3. Capítulo III	44
3.1. Conclusões	44
3.2. Perspectivas futuras	45
4. Anexo	46

CAPÍTULO I

CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Nos últimos trinta anos tem aumentado a incidência de infecções fúngicas em humanos (Lass-Llol, 2009) tanto infecções de pele, cabelo, unhas, mucosa quanto infecções sistêmicas. Há inúmeros fatores que contribuem, como a própria prática médica, com tratamentos que deprimem o sistema imunológico do paciente, processos invasivos e uso de antibióticos de grande espectro de ação (Hagerty *et al.*, 2003; Kojic e Darouiche, 2004). Havia um predomínio das candidíases causadas por *Candida albicans* (Calderone, 2002), no entanto, nas últimas duas décadas este quadro vem mudando, sendo cada vez mais frequente espécies *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) (Manzano-Gayosso, 2008; Ruan e Hsueh, 2009) como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Samaranayake *et al.*, 2002; Bassetti *et al.*, 2006). Contudo, é importante ressaltar que existem variações na distribuição das espécies de acordo com a região geográfica (Colombo *et al.*, 2007).

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção de vulva e vagina que causa vários desconfortos físicos e econômicos para a mulher além de interferir na atividade sexual (Sobel *et al.*, 1998; Eschenbach e David, 2004). Esta infecção acomete 25% da população feminina em geral, e é a segunda maior causa de distúrbios genitais femininos (Galle e Gianinni, 2004; Rosa e Rumel, 2004). Estima-se que cerca de 75% das mulheres terão ao menos um episódio de vaginite fúngica durante a vida reprodutiva, destas 40 a 50% teriam uma segunda infecção e 5% delas desenvolveriam a forma recorrente (CVVR) (Fidel e Sobel, 1996; Ferrer, 2000; Schaller, 2006) embora as condições que favoreçam a recorrência sejam ainda desconhecidas. A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes na prática diária em ginecologia e sua incidência tem aumentado sensivelmente. Representa 20-25% das infecções vaginais e é precedida apenas pela vaginose bacteriana (Corsello *et al.*, 2003).

Candida spp

O gênero *Candida* é colonizador ubíquo dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Esta levedura reside primariamente no trato gastrointestinal, mas também pode ser encontrada como comensal na vagina, uretra e pele. Pertence ao reino Fungi e ao filo Deuteromycotina (Sidrim e Roccha, 2004). Este gênero atualmente possui em torno de 200 espécies, e caracteriza-se por serem micro-organismos unicelulares, eucariotos. A reprodução é assexuada, por brotamento. As células são globóides, elipsóides ou cilíndricas. As espécies

do gênero *Candida* podem apresentar hifas ou pseudohifas (Sidrim e Roccha, 2004). Estudos indicam que em CVV, *Candida albicans* é a espécie mais frequente, respondendo por 80 a 90% dos casos (Dan *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2005). Entretanto nos últimos anos tem se verificado a crescente incidência por espécies CNCA (Martens, *et al.*, 2004, Tamura *et al.*, 2007; Paiva *et al.*, 2012), principalmente *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi* (Ozcan *et al.*, 2006) indicando uma tendência de mudança na etiologia da CVV após décadas de predomínio por *C. albicans* (Martens *et al.*, 2004).

Candida glabrata

Depois de classificada no mesmo gênero, *C. glabrata* e *C. albicans* foram separadas em espécies distintas. No entanto, entre *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* existem grandes características sugerindo assim uma proximidade entre essas espécies (Calderone e Fonzi, 2001).

C. glabrata apresenta-se apenas na forma leveduriforme, fermenta e assimila glicose e trealose. Além disso, trata-se de uma espécie haplóide (Fidel *et al.*, 1999). Entre a *C. glabrata* e *C. albicans* há uma diferença marcante, a presença de hifas (Calderone e Fonzi, 2001).

Até alguns anos *C. glabrata* foi considerada um micro-organismo não patogênico. No entanto, recentemente houve uma mudança para o quadro patogênico (Hajjeh *et al.*, 2004) tornando-se assim um micro-organismo emergente (Li *et al.*, 2007). *C. glabrata* se destaca entre as espécies CNCA, pois é a segunda espécie mais frequente como agente de CVV. Esse fato confere grande importância para o estudo dessa espécie e a busca por novas opções terapêuticas devido à sua maior tolerância aos azóis, principalmente o fluconazol (Sojakova *et al.*, 2004).

Apesar deste cenário, os estudos sobre a etiofisiopatogenia da CVV têm sido centrados em *C. albicans*. Pesquisas relacionadas especificamente a *C. glabrata* em CVV são escassos e de extrema importância. A característica hidrofóbica dessa espécie está intimamente relacionada com a sua capacidade de aderência em dispositivos médicos (Tamura *et al.*, 2007). Além disso, na maioria dos casos de infecção por *C. albicans* a espécie mais encontrada em casos de co-infecção é *C. glabrata*.

GENOTIPAGEM

O estudo da epidemiologia molecular é de grande importância. Uma variedade de métodos de genotipagem de leveduras estão disponíveis. Entre outros métodos, a técnica de Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD) é bastante utilizada e útil em estudos

de microevolução, patogenicidade e epidemiologia. Estudos epidemiológicos recentes vêm mostrando o aumento na incidência de *C. glabrata* em CVV (Mahamouudi *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dessa alta incidência, existem poucos relatos na literatura que associam genotipagem e fatores de virulência.

A tipagem molecular deve permitir a discriminação de isolados não relacionados, reconhecer a mesma cepa em isolados independentes e finalmente identificar isolados altamente relacionados, mas não idênticos como aqueles que se diferem por microevolução. A técnica de RAPD é destaque na tipagem molecular na avaliação da relação de cepas do gênero *Candida* spp na qual a utilização de iniciadores pequenos, em média 10 pares de bases (Soll, 2000; Koga-Ito *et al.*, 2006) gerando uma árvore filogenética ou dendrograma (Marol e Yucesoy, 2007) e um índice de similaridade (S_{AB}) que varia entre 0 e 100 no qual valores entre 0.001 e 0-9 representam coeficientes crescentes de similaridade entre as amostras (Soll, 2000). RAPD é uma técnica comparável a outras metodologias mais complexas mesmo em situações onde não há evidência fenotípica de diferenciação entre os mesmos (Koga-Ito *et al.*, 2006).

FATORES DE VIRULÊNCIA

O desenvolvimento da CVV é o resultado de uma interessante relação parasita/hospedeiro. Pois além dos fatores inerentes à mulher como AIDS, *diabetes mellitus*, uso de antibiótico terapia ou de anticoncepcionais orais, algumas propriedades intrínsecas das leveduras consideradas como fatores de virulência também estão envolvidas na sua capacidade de causar CVV.

Entre outros, a hidrofobicidade de superfície celular (HSC), aderência a tecidos humanos, capacidade de formar biofilme são atributos classificados entre os mais importantes na virulência de *Candida* spp (Fidel *et al.*, 1999).

São frequentes estudos *in vitro* sobre leveduras em células epiteliais orais (Polaquini *et al.*, 2006; Roumen, 2007). No entanto, o comportamento, especialmente de CNCA sobre células epiteliais vaginais humanas (CEVH), ainda é pouco conhecido e conseqüentemente, os mecanismos pelos quais a colonização do epitélio vaginal por leveduras evolui para CVV.

HIDROFOBICIDADE DA SUPERFÍCIE CELULAR

A hidrofobicidade da superfície celular (HSC) é um fator de virulência expresso por leveduras do gênero *Candida* spp. A HSC é afinidade ou aversão que o micro-organismo tem à água, que no geral está relacionada aos mecanismos de aderência. Quanto mais hidrofóbico

o micro-organismo há uma tendência a maior capacidade de adesão, no entanto esse não é o único fator envolvido, pois há interferência de outras forças que podem interferir nesse processo. A interação entre o micro-organismo e a superfície em contato são dependentes entre si (Anil *et al.*, 2001).

ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma infecção por *Candida* spp é a aderência na superfície iniciando assim a colonização. A aderência atua a favor do micro-organismo para o estabelecimento da doença passando de colonização à infecção. Inúmeros fatores participam na aderência como propriedades protéicas (Chaffin, 2008) e bioquímicas da membrana celular (Anil *et al.*, 2001). O biofilme é descrito como uma superfície de associação de micro-organismos recobertos por uma matriz que juntos se tornam mais resistentes à entrada de medicamentos (Baillie e Douglas, 2000; Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003); e facilita a distribuição de nutrientes (Al-Fattani e Douglas, 2006) e resistência imunológica do hospedeiro (Mukherjee e Chandra, 2004) sendo assim considerado um fator de virulência. Em um estudo recente Davit *et al.* (2010) constataram que a formação tridimensional do biofilme está relacionado com as cepas envolvidas bem como a superfície de contato.

PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A doença causada por *C. glabrata* e o seu tratamento não acompanham a mesma velocidade, devido à escassez de conhecimento sobre a espécie e sua resistência inata ao fluconazol. A mudança de estado comensal para patológico depende de inúmeros fatores, dentre eles a alta capacidade de adaptação, ou seja, a plasticidade (Desai, *et al.*, 2011). Desai *et al.*,(2011) ao compararem o sequenciamento de *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram a existência de 337 genes ortólogos, dentre elas a família de genes EPA(genes regulados por ácidos graxos) que codificam proteínas de aderência as quais possivelmente sejam as mesmas utilizadas na interação *C. glabrata* e a célula do hospedeiro. Segundo Gallegos- Garcia *et al.* (2012) ao analisarem *C. glabrata* em diferentes condições foi possível observar mudanças significativas na expressão dos subtipos dos genes família EPA. Cepas de *C. glabrata* em contato com superfícies inanimadas como poliestireno expressam o EPA1 (Li *et al.*, 2007) ao passo que no contato e aderência em célula expressam o EPA6 (Castano *et al.*, 2005; De Groot *et al.*, 2008), o que lhe confere grande capacidade na instalação de uma infecção.

JUSTIFICATIVA

Estima-se que cerca de 75% das mulheres terão um episódio de vaginite fúngica durante a vida reprodutiva. A CVV acomete 25% da população feminina em geral. A espécie mais frequente é *C. albicans*, no entanto, tem se notado redução de casos por *C. albicans* e um aumento na ocorrência de casos por espécies CNCA, sendo *C. glabrata* a segunda espécie mais encontrada em CVV. Além dos fatores relacionados ao hospedeiro, existem propriedades intrínsecas das leveduras que promovem sua habilidade de causar CVV. Adesão aos tecidos do hospedeiro e a produção de biofilmes são importantes atributos de virulência de espécies de *Candida* spp. Porém, os mecanismos específicos pelos quais as leveduras causam CVV não estão completamente compreendidos. Pesquisas relacionadas especificamente com *C. glabrata* em CVV são escassas, além disso, pouco se sabe sobre sua epidemiologia molecular relacionando com fatores de virulência como a formação de biofilme, hidrofobicidade e aderência.

OBJETIVOS

GERAL

O objetivo deste trabalho foi analisar genotipicamente amostras de *C. glabrata* isoladas de candidíase vulvovaginal e tentar correlacionar com a capacidade de aderência, formação de biofilme e hidrofobicidade da superfície celular.

ESPECÍFICOS

Realizar estudos sobre caracterização molecular de *C. glabrata* isoladas de exudato vaginal.

Avaliar alguns atributos de virulência tais como hidrofobicidade de superfície celular, capacidade de aderência em poliestireno, anel vaginal, células epiteliais humanas, formação de biofilme em isolados vaginais de *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

AL-FATTANI, M. A. E L. J.; DOUGLAS. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.999-1008, 2006.

ANIL, S.; ELLEPOLA, A.N.B; SAMARANAYAKE, L.P. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. **Oral Diseases**, v.7, p.119-122, 2001.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, n.3, Sep, p.397-403, 2000.

BASSETTI, M., RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M.P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. Epidemiological trend in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC infectious diseases**, v.6, p.21-26, 2006.

CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives *Candida* and Candidiasis. **ASM Press**, p.15-25, 2002.

CALDERONE, R. A. e FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiology**, v.9, n.7, Jul, p.327-35, 2001.

CASTANO, I., S.; PAN, S.J.; ZUPANCIC, M.; HENNEQUIN, C.; DUJON, B.; CORMACK, B.P. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. **Molecular Microbiology**, v.55, p.1246-1258, 2005.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.72, n.3, Sep, p.495-544, 2008.

CHANDRA, J., KUHN, M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A.D. M. Kuhn, *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.18, Sep, p.5385-94, 2001.

COLOMBO, A. L., T.; GUIMARÃES, T.G; SILVA, L.R.B.F.; MONFARDINI, L.P.A.; CUNHA, A.K.B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control and Hospital Epidemiology**, v.28, p.570-576, 2007.

CORSELLO, S.; SPINILLO, A.R.; OSNENGO, G.; PENNA, C.; GUASCHINO, S.; BELTRAME, A.; BLASI, N.; FESTA, A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, n. 1, p. 66-72, 2003.

DAN, M.; F. POCH, F.; LEVIN, D.. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* *Candida* species among asymptomatic women. **Medical Mycology**, v.40, n.4, p.383-6, 2002.

DAVIT, Y.; ILTIS, G.; DEBENEST, G.; VERAN-TISSOIRES, S.; WILDDENSCHILD, D.; GERINO, M.; QUINTARD, M. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography. **Journal of Microscopy**, v.242, n.1, Apr, p.15-25, 2010

DE GROOT, P. W. J., E. A.; KRANEVELD, E.A.; YIN, Q.Y.; DEKKER, H.L.; GROB, U.; CRIELLARD, W.; KOSTER, C.G.; BADER, O.; KLIS, F.M.; WEIG, M. The cell wall on the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **Eukaryotic Cell**, v.7, p.1951-1964, 2008.

DESAI, C., J.; MAVRIANOS, J.; CHAUHAN, N. *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. **FEMS Yeast Research**, v.11, n.7, Nov, p.595-601, 2011.

Douglas, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v.11, p.30-36, 2003.

ESCHENBACH, M. D. E DAVI, A. Chronic Vulvovaginal Candidiasis. **The new England Journal of Medicine**, v.351, p.851-852, 2004.

Ferrer, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **Internacional Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.71, p.21-27, 2000.

Fidel, P. L., Jr. e SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Microbiology Review**, v.9, n.3, Jul, p.335-48, 1996.

FIDEL, P. L., JR.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Review**, v.12, n.1, Jan, p.80-96, 1999.

GALLE, L. C. E GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e Susceptibilidade de leveduras vaginais **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v.40, p.229-236, 2004.

GALLEGOS-GARCIA, V., S.; PAN, S.J; JÚAREZ-CEPEDA, J.J.; RAMÍREZ-ZAVALA, R.; MARTIN-DEL-CAMPO, M.B.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, V.; CASTANO, I.; CORMACK, B.; PENAS, A. A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*. **GENETICS**, v.4, p.1285-1297, 2012.

HAGERTY, J. A., J. ORTIZ, O.; REICH, D.; MANZARBEITIA, C. Fungal infections in solid organ transplant patients. **Surgical infections**, v.4, p.263-71, 2003.

HAJJEH, R. A., A. N.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BENJAMIN, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.Y.; BRANDT, M.E.; WARDNOCK, D.W. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1519-1527, 2004.

Koga-Ito, C. Y., J. P. Lyon, J.P.; VIDOTTO, V.; RESENDE, M.A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v.162, p.219-223, 2006.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009.

Li, F., M. J. Svarovsky, M.J.; KARLSSON, A.J.; WAGNER, J.P.; MARCHILLO, K.; OSHEL, P.; ANDES, D.; PALECEK, S.P. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.931-939, 2007.

MAHAMOUUDI, M. R.; ZAFARGHANDI, S; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.155, p.199-203, 2011.

Manzano-Gayosso, P. Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. **Revista Medical Del Instituto Mexicano Del Seguro Social**, v.46, p.603-610, 2008.

MAROL, S. E M. YUCESYOY. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v.51, p.40-49, 2007.

MARTENS, M. G., HOFFMAN, P.M.B.A.; EL-ZAATARI, M. Fungal species changes in the female genital tract. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v.8, n.1, Jan, p.21-4, 2004.

Mukherjee, P. K. e Chandra, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Updates**, v.7, p.301-309, 2004.

Ozacan SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Wilke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. **APMIS**, 114: 139-45, 2006

PAIVA L.C.F.; VIDIGAL, P.G.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, 43: 497-502, 2012.

POLAQUINI, S. R.; SVIDZINSKI, T.I.E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, v.51, n.6, Jun, p.482-90, 2006.

RICHTER, S. S.; GALASK, R.P.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, May, p.2155-62, 2005.

ROSA, M. L. e RUMEL, D. Fatores associados à Candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, p.65-70, 2004.

ROUMEN, F. J. The contraceptive vaginal ring compared with the combined oral contraceptive pill: a comprehensive review of randomized controlled trials. **Contraception**, v.75, n.6, p.420-9, 2007.

RUAN, S. Y. E HSUEH, P.R. Invasive Candidiasis: An overview from Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.108, p.443-451, 2009.

SAMARANAYAKE, L. P., FIDEL, P.L.; NAGLIK, J.R.; SWEET, S.P.; TEANPAISAN, R.; COOGAN, M.M.; BLIGNAUT, E.; WANZALA, P. Fungal infections associated with HIV infection. **Oral Disease**, v.8 Suppl 2, p.151-60, 2002.

SCHALLER, M. *Candida albicans*-interactions with the mucosa and the immune system. **J Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.4, n.4, Apr, p.328-36; quiz 337-8, 2006.

SIDRIM, J. J. e ROCCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2004

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R.W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W.J.; NYIRJESY, P.R.; REED, B.D.; SUMMERS, P.R. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOJAKOVA, M.; LIPTAJVA, D.; BOROVSKY, M.; SUBIK, J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. **Mycophatologia**, v.157, p.163-169, 2004.

Soll, D. R. The ins and outs of DNA fingerprint the infectious fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.332-370, 2000.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M.F.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, Jan-Feb, p.91-3, 2007.

CAPÍTULO II

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura

Candida glabrata

Diversidade fenotípica e genotípica em isolados vaginais da levedura
Candida glabrata

Sandra Sayuri Nakamura¹, Patrícia de Souza Bonfim - Mendonça¹, Adriana Fiorini³, Lilian Cristiane Baeza³, Márcia Edilaine Lopes Consolaro², Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{1,2,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ² Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicada à Farmácia, ³Divisão de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá

*Autor para correspondência: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, bloco T20 sala 203 87020-900 Maringá/PR, Brasil

Phone: +55 44 3011 48 09

FAX: +55 44 3011 49 59

E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

Resumo

Nos últimos anos tem ocorrido aumento nas infecções fúngicas em humanos incluindo a candidíase vulvovaginal (CVV), uma infecção de vulva e vagina que acomete 25% da população feminina em geral. Estima-se que 75% das mulheres terão pelo menos um episódio de CVV na vida. A espécie mais comum é *Candida albicans*, mas tem aumentado a incidência de CVV por *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) principalmente *C. glabrata*. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil genotípico e analisar alguns fatores de virulência em *C. glabrata* isoladas de CVV. Foram incluídos no estudo 60 isolados pertencentes à micoteca da Universidade Estadual de Maringá-Maringá, Paraná. Foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica frente à fluconazol, itraconazol, nistatina e anfotericina B de acordo com o documento M27-A3. A avaliação genotípica foi feita por PCR-RAPD com os iniciadores OPA18, P4 e OPE-18. Foi determinada a hidrofobicidade da superfície celular, aderência sobre diferentes superfícies e a capacidade de formar biofilme. Não encontramos nenhuma correlação entre os fatores de virulência analisados e não houve agrupamento genotípico relevante. A diversidade dos resultados sugere uma expressiva plasticidade fenotípica e genotípica das leveduras. Essa característica, ainda não relatada, deve refletir a alta capacidade de adaptação dessa espécie a diferentes pressões seletivas e possivelmente justifique o aumento de sua incidência.

Palavras- chave: *Candida glabrata*, RAPD, fatores de virulência, biofilme, aderência, antifúngicos

INTRODUÇÃO

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção de vulva e vagina que acomete 25% da população feminina em geral. É a segunda maior causa de distúrbios genitais femininos [1, 2]. Estima-se, que 75% das mulheres terão ao menos um episódio de vaginite fúngica durante a vida reprodutiva, destas 40 a 50% teriam uma segunda infecção e 5% delas desenvolveriam a forma recorrente (CVVR) [3-5].

Numerosos estudos indicam que *Candida albicans* é a espécie mais frequente, respondendo por 80 a 90% dos casos de CVV [6-8]. Entretanto nos últimos anos tem se verificado a acentuada incidência de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) [7], principalmente *C. glabrata* [7, 9-11] indicando uma tendência na mudança da etiologia da CVV após décadas de predomínio de *C. albicans* [7].

É necessário aprimorar o entendimento das razões porque *C. glabrata* está emergindo como agente de CVV. *C. glabrata* é eficiente em aderir sobre células epiteliais vaginais humanas (CEVH) [12] e dispositivos como anel vaginal [13]. Paiva *et al.* [14] avaliaram fatores de virulência em espécies isoladas de CVV incluindo *C. glabrata*. Entretanto essa questão ainda precisa ser mais bem elucidada, seriam interessantes mais estudos sobre fatores de virulência em *C. glabrata* de origem vaginal.

Apesar da importância de *C. glabrata* na etiopatogenia da CVV muito pouco é conhecido sobre este cenário, pois os estudos sobre CVV têm sido centrados em *C. albicans*. O objetivo deste estudo foi analisar genotipicamente *C. glabrata* isoladas de amostras vaginais e avaliar a capacidade de aderência, formação de biofilme e hidrofobicidade da superfície celular.

MATERIAS E MÉTODOS

Micro-organismos

Foram analisados 60 isolados clínicos vaginais de *C. glabrata* de pacientes atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá UEM (UEM) e que estão mantidas na micoteca do laboratório de Micologia Médica da UEM. Essa coleção representa 29% das leveduras isoladas de amostras vaginais no período.

As leveduras foram conservadas a -20 °C em Sabouraud dextrose caldo (SDC) contendo 50% de glicerol. Para os ensaios, todos os isolados clínicos foram reativados e a sua

identificação confirmada como *C. glabrata* pela metodologia clássica: fermentação, assimilação de carboidratos e morfologia em ágar fubá suplementado com Tween 80 a 1%.

Extração de DNA genômico

As leveduras foram cultivadas *overnight* a 25 °C em meio SDC e o DNA genômico foi extraído como descrito por Chong *et al.* [15], com algumas modificações; a quantidade e pureza foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro A_{260} e $A_{260/280}$, respectivamente, além de visualização em gel de agarose a 0,7% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mmol l⁻¹, Ácido bórico 90 mmol l⁻¹, EDTA 2 mmol l⁻¹ pH 8,0).

PCR- RAPD

O DNA genômico foi amplificado usando os iniciadores OPA18 (5' AGCTGACCGT3'), P4 (5'-CATCTTCTGGGAGGTAGC-3') e OPE18 (5' GGACTGCAGA 3') (Gibco BRL), conforme descrito por Lockhart *et al.* [16]. O volume final da reação de PCR-RAPD foi de 25µl, no qual continham 0,4µl de DNA (10ng µl⁻¹), 0,4 µMol l⁻¹ de iniciador, 0,2 mMol l⁻¹ de dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1X de tampão MgCL₂ e 1,2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As reações foram conduzidas em termociclador (Applied Biosystems). A desnaturação inicial ocorreu a 95 °C por 5 minutos, em seguida foram realizados 42 ciclos cuja temperatura de desnaturação era 95 °C por 1 minuto, anelamento 36 °C por 1 minuto e uma temperatura final de extensão a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foi realizado controle negativo que consiste na ausência de DNA genômico.

O produto da PCR-RAPD foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão 0,5X TBE (Tris-base 90 mmol l⁻¹, Ácido bórico 90 mmol l⁻¹, EDTA 2 mmol l⁻¹ pH 8,0) e a corrida eletroforética realizada na seguinte condição: 110V, 60mA por 90 minutos. A visualização das bandas foi feita em transluminador UV (Loccus Biotecnologia, Br) as imagens foram capturadas pelo software de captura de imagem (L-PixImage, USA). Os géis foram corados com 1µg ml⁻¹ de brometo de etídio (BIOBASIC INC, CA). O padrão de peso molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen®, São Paulo, Brasil). Somente bandas reprodutivas e intensas foram utilizadas para a análise.

Os perfis de PCR-RAPD foram analisados pelo software Bionumerics® versão 4,6 (Applied Maths). A similaridade foi verificada pelo coeficiente (S_{AB}) entre os padrões para cada par de isolados A e B e foi calculada com a fórmula $S_{AB} = 2E / (2E + a + b)$, onde E é o número de bandas comuns nos padrões de A e B, a é o número de bandas no padrão de a sem

correlatos em padrão *B*, e *b* é o número de bandas no padrão *B* sem correlação no padrão *A*. A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*). Um valor da S_{AB} 1,00 indica que o padrão de bandas para a linhagem *A* é idêntica à *B*; valores entre 0,80-0,99 representam isolados clínicos muito semelhantes, mas não idênticos, e pode sugerir a microevolução de uma única estirpe; valores de S_{AB} menor que 0,80 representam linhagens independentes [15].

Determinação da hidrofobicidade em superfície celular (HSC)

A HSC foi determinada pelo teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH) com algumas modificações [17]. Inicialmente os isolados clínicos foram cultivados em meio YPD (*Yeast-Peptone-Dextrose*), composto por extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%. As leveduras foram ressuspensas em tampão fosfato salina (PBS) em uma densidade óptica (DO) de 0,5 a 620 nm (Baush & Lomb). A partir desta suspensão, 1,3 ml foram pipetados para tubos de vidro e, 100 µl de cada tubo foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark). Foi realizada uma leitura inicial da DO a 620 nm em leitora de microplaca. Ao volume de 1,2 ml restante nos três tubos, foi adicionado 0,3 ml de n-octano. A mistura foi agitada vigorosamente em vortex por 3 minutos e em repouso por 15 minutos para separação das fases. Na sequência, 100 µl da fase aquosa inferior de cada tubo foi cuidadosamente retirado e transferido para poços de uma nova microplaca e a leitura final da DO foi obtida sob as mesmas condições. Tubos sem leveduras serviram como controle. A porcentagem de HSC foi definida através da fórmula %HSC = $(1 - \text{DO da fase aquosa final} / \text{DO inicial da suspensão de leveduras}) \times 100$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a interpretação dos resultados adotou-se: Valores < 40% hidrofóbica (HO); entre 40 e 60% hidrofobicidade intermediária (IN) e > 60% hidrofílica (HI).

Formação de biofilme e avaliação da biomassa total

A capacidade de produzir biofilme e avaliação da biomassa total foram realizadas segundo a metodologia descrita por Shin *et al.* [18], com algumas modificações. A partir de uma cultura recente de cada levedura, em SDA por 18-24 horas a 35 °C, foi preparada uma suspensão de leveduras em solução salina (NaCl 0,85%) estéril (SSE), ajustadas a uma concentração de $3,7 \times 10^7$ (UFC ml⁻¹) por meio de contagem em hemocitômetro, e 20 µl da suspensão de células foram distribuídos em cada poço de uma microplaca de 96 poços, complementando com 180 µl de SDC com 8% de glicose. Os testes foram realizados em

quadruplicata, tendo como controle a cepa *C. glabrata* ATCC 2001. A microplaca foi incubada em Shaker (Nova Ética, Br) por 60 rpm a 35 °C por 24 horas. Em seguida foram realizadas duas lavagens com água destilada e feita leitura na leitora de microplacas (Expert plus-ASYS, UK) a 405 nm. De acordo com a transmitância encontrada, os isolados clínicos foram classificados em: 1+ (%T <5); 2+ (%T = 20 a 35); 3+ (%T = 35 a 50); 4+ (%T ≥ 50).

Aderência de *C. glabrata*

Os ensaios de biofilme e de HSC foram usados para triagem da coleção de *C. glabrata* obtidas de CVV para a realização de ensaios mais específicos. Foram escolhidos quatro isolados clínicos de acordo com a formação de biomassa total e hidrofobicidade, sendo duas leveduras hidrofóbicas e duas hidrofílicas (uma pouco e outra bastante eficiente para a produção de biofilme) em cada categoria, que, juntamente com a cepa ATCC 2001, foram avaliadas em triplicata nas próximas etapas do estudo. Os isolados de mulheres com sintomas de CVV receberam a nomenclatura “S” e as leveduras isoladas de mulheres assintomáticas receberam a nomenclatura “A”.

Aderência de *C. glabrata* em poliestireno

O estudo de aderência de *C. glabrata* sobre microplacas de poliestireno com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) foi realizado segundo Raut *et al.* [19], com algumas modificações. As leveduras foram cultivadas em meio de cultura YPD. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado em câmara de hemocitômetro em 1×10^5 ml⁻¹ em PBS e 100 µl dessa suspensão foram incubados, sob agitação a 50 rpm em Shaker (Nova Ética, SP) por 90 minutos a 37 °C. Após a aderência foram realizadas três lavagens com PBS a fim de retirar as leveduras fracamente ou não aderidas. A avaliação da aderência foi feita pela média da contagem das UFC em 10 campos microscópicos (UFC campo⁻¹) em microscópio de luz invertida (Olympus CK 40, objetiva de 40X).

Aderência de *C. glabrata* em anel vaginal

Foi executado o protocolo descrito por Camacho *et al.* [13] onde, a partir de cultivos recentes das leveduras em SDA, foram preparadas suspensões em SSE contendo $2,0 \times 10^7$ UFC ml⁻¹. O anel vaginal (Nuvaring®) foi cortado rigorosamente em tamanhos iguais (0,5 cm). Cada fragmento do anel vaginal foi colocado em contato com a suspensão de leveduras sob agitação (1 hora, 120 rpm a 37 °C) e posterior lavagem para separar as leveduras não

aderidas. As leveduras aderidas ao fragmento de anel vaginal foram removidas com o auxílio de pérolas de vidro e semeadas em SDA para contagem de UFC que desenvolveram.

Aderência de *C. glabrata* em células epiteliais vaginais humanas (CEVH)

CEVH foram obtidas de voluntária saudável, com ciclo menstrual regular e em idade reprodutiva e não estava usando nenhum medicamento. O ensaio foi realizado conforme descrito por Irie *et al.* [12] e envolveu cultivo das leveduras em YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado com galactose. A seguir co-incubação de volumes e concentrações iguais de leveduras e CEVH $2,0 \times 10^5$ a 30 rpm em agitador Shaker a 37 °C por 1 hora. As células foram então lavadas duas vezes em PBS por centrifugação a 1000 g por 10 minutos. Foram preparadas lâminas em duplicata para cada isolado, as quais foram coradas com cristal violeta e a seguir pela técnica de Papanicolau. Foram consideradas aderidas as leveduras que apresentavam nítida interação com as CEVH, evidenciadas por um halo claro ao seu redor. Os resultados foram avaliados sob dois parâmetros: a porcentagem de CEVH que tinham leveduras aderidas e o número de leveduras aderidas por CEVH.

Teste de sensibilidade

Microdiluição em caldo (MC): foram utilizados os antifúngicos fluconazol (Pfizer®), itraconazol (Janssen), nistatina (Sigma) e anfotericina B (Bristol – Myers Squibb). Soluções estoques foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) ou água de acordo com a solubilidade de cada antifúngico e realizadas 10 diluições seriadas conforme o documento M27–A3 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (Gibco) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico - MOPS (Sigma) pH 7,0 e, suplementado com 2% de glicose, como proposto pelo documento EUCAST.

Para o preparo do inóculo as leveduras foram suspensas em SSE e a concentração ajustada em espectrofotômetro para obter a concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células mL^{-1} . O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (Nunclon, Delta, UK) onde as suspensões com leveduras foram testadas com as soluções antifúngicas a 35 °C por 48 horas. Como controle foi utilizado a cepa padrão *C. glabrata* ATCC 2001. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Expert plus - ASYS) a 490 nm. A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de promover 50% de inibição para os azólicos e 90% de inibição para anfotericina B [19]. CIM₅₀ e CIM₉₀ foram consideradas como a concentração capaz de inibir 50% e 90% respectivamente da população estudada.

A definição dos pontos de corte seguiu o determinado no suplemento do documento M27-A3 – M27-S325 e para os antifúngicos não inclusos, essa interpretação foi baseada em outras referências para anfotericina B [20] e cetoconazol [21]. Os resultados foram expressos em: sensível (S), sensível dependente da dose (SDD) e resistente (R).

Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA para a comparação dos resultados dos isolados com o nível de 95% de confiança. Os testes foram realizados por um software o Graph Pad Prism® versão 5,0.

RESULTADOS

PCR-RAPD

Foram gerados três dendrogramas (Fig. 1-3) de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, em pares de bases (pb), pela técnica de PCR-RAPD, com os três iniciadores distintos OPA-18, P4 e OPE-18. Os iniciadores OPA-18 e P4 forneceram maior coeficiente de similaridade (S_{AB}) $0,593 \pm 0,191$ e $0,564 \pm 0,189$, respectivamente. O iniciador OPE18 apresentou valor de $S_{AB} = 0,529 \pm 0,242$. Para a análise dos dendrogramas um S_{AB} de 0,80 é o limítrofe para relacionar isolados fúngicos [15].

Não houve correlação epidemiológica de acordo com a análise dos dendrogramas, entre os isolados estudados para os iniciadores OPA-18 e P4 mesmo com a formação de poucos *clusters*. Com o iniciador OPE-18 o S_{AB} foi menor em relação aos demais. Ao correlacionar os três dendrogramas, não foi encontrado nenhuma identidade.

Determinação da hidrofobicidade da superfície celular (HSC)

Em uma visão geral, a população de *C. glabrata* avaliada mostrou uma tendência à hidrofília (66,7%). Porém, foram encontrados isolados clínicos com HSC intermediária e também hidrofóbicos com valores de 23,3% e 10%, respectivamente. Segundo a Figura 4, o perfil de HSC foi independente se a levedura foi isolada de mulheres com ou sem sintomas de CVV.

Aderência de *C. glabrata* em poliestireno

O número de leveduras aderidas ao poliestireno variou entre 51 e 568 UFC campo⁻¹ microscópico. Ao relacionar esses dados com a característica de HSC obteve-se a seguinte

distribuição: HO = $176,2 \pm 14,91$ UFC campo⁻¹, IN = $146,4 \pm 23,22$ UFC campo⁻¹ e FI = $135,7 \pm 36,63$ UFC campo⁻¹. Para facilitar a interpretação, os resultados de UFC campo⁻¹ das contagens foram agrupados e estão apresentados na Tabela 1.

Aderência de *C. glabrata* em anel vaginal e CEVH

Em relação à capacidade de aderência de *C. glabrata* sobre anel vaginal, os resultados oscilaram entre $0,83 \times 10^4$ e $8,41 \times 10^4$ UFC ml⁻¹. Houve diferença estatisticamente significativa entre os cinco isolados avaliados ($p < 0,0001$). Entretanto o resultado desse parâmetro não apresentou qualquer relação nem com a capacidade de formar biofilme sobre poliestireno, nem quanto à HSC ou presença de sintomas da mulher. A Tabela 2 mostra a comparação entre os quatro isolados clínicos escolhidos aleatoriamente e a cepa ATCC 2001.

Aderência sobre células epiteliais vaginais humanas (CEVH)

O número de leveduras aderidas por cada CEVH variou de 1,04 a 1,31, sem diferença significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, a porcentagem de CEVH que permitiram a aderência de *C. glabrata* oscilou entre 4,5 e 27%, com média de $16,10 \pm 7,82$.

A diversidade encontrada entre os quatro isolados clínicos de *C. glabrata* obtidos de amostras vaginais, sob cinco parâmetros fenotípicos, considerados atributos de virulência, podem ser vistos resumidamente na Tabela 2.

Avaliação da biomassa total do biofilme

Isolados vaginais de *C. glabrata* exibiram variabilidade quanto à biomassa total do biofilme (de + a ++++), entretanto, no geral, a característica é de alta biomassa total, pois a maioria dos isolados (70%) foi altamente eficiente em formar biofilme (++++).

Teste de sensibilidade

Os resultados quanto à variação das CIM, os dados revelam perfil de resistência, principalmente aos azólicos, dentre eles o fluconazol. Este foi o antifúngico que apresentou maior variabilidade ($0,25-64 \mu\text{g ml}^{-1}$), com CIM₅₀ e CM₉₀ elevadas (32 e $64 \mu\text{g ml}^{-1}$) respectivamente, refletindo em altos índices de resistência (15%) e de sensível dose-dependente (73,33%). Comportamento semelhante foi observado para itraconazol. Já os poliênicos mostraram taxas de sensibilidade superiores a 90%, especialmente anfotericina B (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Este estudo mostra pela primeira vez a diversidade genotípica e fenotípica de *C. glabrata* isoladas de amostras vaginais. Esta análise foi feita tendo como base a análise de PCR-RAPD e também de alguns atributos de virulência. Ambos os parâmetros exibiram grande variabilidade entre os isolados, sem tendência de agrupamento em relação a nenhuma das características avaliadas.

A escassez de publicações com esse foco torna difícil uma abordagem comparativa, porém é possível discutir nossos achados da seguinte forma: Nenhum atributo da levedura foi associado quanto ao quadro clínico da mulher, ou seja, as leveduras não foram diferentes conforme a origem, colonização (assintomáticas) ou infecção (CVV).

A genotipagem com a técnica de Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD) é bastante utilizada e, de grande importância na etiopatogenia de um agravo. Esta técnica tem sido útil em estudos sobre microevolução, patogenicidade e epidemiologia da candidíase [22]. PCR-RAPD é rotineiramente utilizada para relacionar isolados fúngicos [15], segundo Jain *et al.*, [23] essa técnica fornece informações epidemiológicas equivalentes a outros métodos moleculares desde que seja calculado o coeficiente S_{AB} . Até onde sabemos, nosso estudo é inédito na avaliação molecular por PCR-RAPD de isolados vaginais de *C. glabrata*, com os iniciadores OPA-18, P4 e OPE-18. Segundo Chong *et al.* [15], quanto menor o S_{AB} , menor será a correlação entre as amostras. Em estudos realizados por Wenjin e Yifu [24] e Boldo *et al.* [25] também não foram encontrados genótipos predominantes para a técnica de PCR-RAPD.

A HSC é um fator de virulência expresso por leveduras do gênero *Candida* spp. A HSC é afinidade ou aversão que o micro-organismo tem à água, o que possivelmente está relacionada a fenômenos de aderência. O primeiro passo para o desenvolvimento de uma infecção por *Candida* spp é a aderência na superfície iniciando assim a colonização [26].

Em nosso estudo, com relação à HSC, apesar de existirem isolados clínicos hidrofóbicos houve uma tendência à hidrofilia (66,7%). Esta característica diverge do que tem sido observado em estudos prévios com essa espécie, tanto por Paiva *et al.* [14] com *C. glabrata* vaginal, quanto por Camacho *et al.* [27]. Contudo, ambos estudos empregaram uma única amostra deste micro-organismo, isolado da vagina e trato urinário, respectivamente. Avaliando uma coleção maior, este estudo deixou claro que a HSC de *C. glabrata* de origem vaginal é independente do quadro clínico, contrariando autores que associam maior virulência de leveduras com característica hidrofóbica [28]. Entretanto, conforme a Tabela 1, é possível

observar uma relação entre a HSC e a capacidade de aderência ao poliestireno, confirmando outros achados encontrados por Paiva *et al.* [15] e Camacho *et al.* [25].

De fato os resultados quanto à HSC, muitas vezes parecem conflitantes, porque essa é uma variável multifatorial. Conforme descrito por Samaranayake *et al.* [29], leveduras da espécie *C. glabrata* quando cultivadas a 25 °C tendem a ser hidrofóbicas e, quando cultivadas a 35 °C, tendem a ser hidrofílicas, de acordo com nossos resultados. Essa temperatura foi utilizada em nosso estudo por ser próxima à temperatura corpórea. O método usado para determinação de HSC também costuma variar, nós optamos pela afinidade ao hidrocarboneto, que é muito utilizada [28, 33, 34]. No entanto, fica claro que HSC não é o único parâmetro a ser analisado quanto ao arsenal de virulência de *C. glabrata*.

Paralelamente, ficou evidente a grande variação quanto à capacidade de aderência dessas leveduras ao poliestireno, apesar da presença de genes de aderência na superfície celular da levedura e da capacidade de formar biofilme [30], são evidentes as propriedades individuais dessa população.

A capacidade de aderência de *C. glabrata* sobre anel vaginal variou significativamente ($p < 0,0001$) entre os isolados e não houve correlação entre HSC e quadro clínico. Camacho *et al.* [14] concluíram que *C. glabrata* foi a espécie de *Candida* isolada de CVV que mais aderiu no anel vaginal. Dispositivos médicos são substratos ideais para servir como reservatórios de micro-organismos para colonização, que ao formar biofilmes se tornam importantes para o desenvolvimento de doenças fúngicas [31, 32]. Além disso, é conhecido que as características do material como metal e plástico podem interferir nessa propriedade e consequentemente na colonização e na eficiência do tratamento antimicrobiano [31].

Em relação à aderência sobre CEVH, a quantidade de leveduras aderidas por células e a porcentagem de CEVH que permitiu a aderência de *C. glabrata*, os resultados reforçam os achados de Irie *et al.* [12]. Na verdade embora *C. albicans* tenha maior capacidade de aderir sobre CEVH que *C. glabrata*, aparentemente há uma compensação pelo fato das células hospedeiras variarem quanto à maior ou menor afinidade pelos diferentes isolados dessa espécie. Assim, parece que a interação agente/hospedeira seja importante nesse mecanismo e que há variações intra-espécie. Embora dependente do tipo de célula e de seus constituintes *C. glabrata* adere bem sobre CEVH [30]. De fato, *C. glabrata* vem sendo relacionada à alta capacidade de aderir às células do epitélio urinário [30] bem como em diferentes superfícies inertes [31], confirmando a habilidade dessa espécie em aderir tanto em superfícies hidrofóbicas quanto hidrofílicas.

Já a formação de biofilme está associada à composição da membrana celular e às interações entre as células. Além disso, a expressão de genes de aderência também é essencial para a formação do biofilme, desde que para a instalação de um quadro patológico primeiramente ocorre a aderência do micro-organismo à superfície da célula para posterior formação de biofilme [33].

A alta capacidade de produzir biofilme dessa coleção não seguiu o padrão observado por Shin *et al.*, [18], onde os autores observaram que *C. glabrata* não foi eficiente em produzir biofilme, porém deve ser ressaltado as diferenças quanto à origem dos isolados. Em estudo anterior, nós também encontramos fraca capacidade de *C. glabrata* de origem vaginal formar biofilme [14], entretanto foi o resultado de um único isolado clínico. Pathak *et al.* [34], analisando isolados clínicos de *C. glabrata* obtida de candidíase de orofaringe mostraram alta capacidade de formar biofilme para as leveduras analisadas [34]. A formação de biofilme é influenciada por diversos fatores como as condições locais, características da superfície [35, 36], presença de enzimas de aderência bem como a disponibilidade de substrato, carboidratos e pH mais ou menos favorável [37]. Características do micro-organismo também devem ser levadas em conta além do local da infecção ou capacidade de aderência *in vitro* [18, 31, 38, 39].

Ficou claro que os atributos de virulência isoladamente não justificam os relatos contundentes que *C. glabrata* é a segunda espécie mais frequente em CVV [7, 9-11, 40, 41]. Assim foi necessário avaliar o comportamento desses isolados vaginais quanto à resistência aos antifúngicos. Dentre as drogas analisadas, os poliênicos mostraram maior eficiência *in vitro* e menor variabilidade, com taxas de sensibilidade superiores a 90%, especialmente anfotericina B (97%). Porém, nós encontramos resistência inata aos azólicos, como descrito por Tamura *et al.*[42] em casos de candidemia. Resultados semelhantes foram encontrados por Pfaller *et al.* [43] ao analisarem *C. glabrata* obtidas de diferentes sítios anatômicos e regiões geográficas. Os autores relatam que 32,3% dos isolados eram resistentes ao fluconazol observaram uma queda na susceptibilidade frente ao fluconazol e variação das CIM, ao longo dos anos. É evidente a pressão que os antifúngicos usados em tratamentos exercem sobre as características das leveduras, é possível que no caso da CVV ocorra exatamente o mesmo, ou seja, a alta frequência de *C. glabrata* em exudatos vaginais não esteja relacionada a atributos de virulência, como é o caso de *C. albicans*, mas sim ao reflexo da pressão seletiva exercida pelos antifúngicos, principalmente fluconazol, que é largamente utilizado no combate aos sintomas da CVV [44]. A alta capacidade de *C. glabrata* em produzir biofilme agrava a preocupação com o tratamento, uma vez que é consenso que micro-organismos organizados

na forma de biofilme adquiriram maior resistência aos antimicrobianos [37]. O biofilme formado por *C. glabrata* é tão resistente aos antifúngicos quanto o biofilme formado por *C. albicans* [45].

A Tabela 2 demonstra a grande variabilidade quanto à capacidade de aderência de *C. glabrata* sobre várias superfícies, desde abióticas (poliestireno e anel vaginal) quanto bióticas (CEVH), além disso, essas propriedades não guardaram nenhuma correlação com HSC ou capacidade de formar biofilme. Este perfil fenotípico foi confirmado pelos resultados de RAPD com os três iniciadores avaliados e, suporta a hipótese da intensa plasticidade entre os isolados clínicos de *C. glabrata*, reforçando a idéia de que a colonização, bem como o desenvolvimento da doença, é isolado dependente e está relacionado à interação de cada um com as células hospedeiras especificamente.

C. glabrata é uma levedura cuja mudança do estado comensal para patológico depende de inúmeros fatores como a alta capacidade de adaptação, ou seja, a plasticidade fenotípica [46]. É possível que a presença e expressão de genes da família EPA estejam associados à alta capacidade de adaptação dessa espécie. Segundo Li *et al.* [47] estes genes codificam proteínas de aderência de acordo com as diferentes superfícies de contato inanimada.

Conclusão

A presença de sintomas de CVV não está associada a características fenotípicas e genotípicas de isolados vaginais de *C. glabrata*. Além disso, não há um perfil definido quanto aos fatores de virulência estudados. Dentre os isolados analisados não houve presença de leveduras idênticas e nem de um perfil genotípico predominante, demonstrando assim a grande diversidade fenotípica e genotípica de *C. glabrata* de CVV.

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Referências

- 1 Galle LC, Gianinni MJS. Prevalência e Susceptibilidade de leveduras vaginais *Jornal Brasileiro de Patologia Médica* 2004; **40**: 229-36.
- 2 Rosa ML, Rumel D. fatores associados à Candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2004: 65-70.
- 3 Schaller M. [Candida albicans--interactions with the mucosa and the immune system]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006; **4**: 328-36; quiz 37-8.

- 4 FERRER J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Internacional Journal Of Gynecology & Obstetrics* 2000; **71**: 21-7.
- 5 Fidel PL, Jr., Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; **9**: 335-48.
- 6 Dan M, Poch F, Levin D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* *Candida* species among asymptomatic women. *Med Mycol* 2002; **40**: 383-6.
- 7 Martens MG, Hoffman P, El-Zaatari M. Fungal species changes in the female genital tract. *J Low Genit Tract Dis* 2004; **8**: 21-4.
- 8 Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2155-62.
- 9 Eschenbach MD, David A. Chronic Vulvovaginal Candidiasis. *The New England Journal Of Medicine* 2004; **351**: 851-2.
- 10 Ozcan SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Wilke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS* 2006; **114**: 139-45.
- 11 Ferraza MH, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2005; **27**: 58-63.
- 12 Irie MMT, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TIE. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *Journal of clinical laboratory analysis* 2006; **20**: 195-203.
- 13 Camacho DP, Consolaro ME, Patussi EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TI. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception* 2007; **76**: 439-43.
- 14 Paiva LCF, Vidigal PG, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro ME. assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron* 2012; **43**: 497-502.
- 15 Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 657-66.
- 16 Lockhart SR, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA, Soll DR. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. *Microbiology* 1997; **143 (Pt 12)**: 3733-46.
- 17 Raut J, Rathod V, Karuppayil SM. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*; **51**: 131-6.
- 18 shin JH, kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparasion of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal Of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 1244-8.
- 19 Rex JH, Alexander BD, Andes D. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of Yeasts. *Approved Standad Clinical and Laboratory Standarts Institute* 2008; **3**.
- 20 Özçelik B, Kaynak F, Cesur S, Sipahi B, Sultan N. In vitro activities of voriconazole as a triazole derivative and caspofungin as an equinocandin were compared with those of some antifungal agents against *Candida* Species isolated from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* 2007; **60**: 302-4.
- 21 Abbes S, Sellami H, Sellami A, et al. Microsatellite analysis and susceptibility to FCZ of *Candida glabrata* invasive isolates in Sfax Hospital, Tunisia. *Med Mycol*; **49**: 10-5.
- 22 Soll DR. The Ins And Outs Of DNA Fingerprint The Infectious Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; **13**: 332-70.
- 23 Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; **41**: 113-9.
- 24 Wenjin Q, Yifu S. Epidemiological study on vaginal *Candida glabrata* isolated from pregnant women. *Scand J Infect Dis* 2006; **38**: 49-54.
- 25 Boldo XM, Villa-Tanaca L, Zuniga G, Hernandez-Rodriguez C. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4799-804.

- 26 ANIL S, ELLEPOLA ANB, Samaranayake LP. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Diseases* 2001; **7**: 119-22.
- 27 Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TI. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia* 2007; **163**: 261-6.
- 28 Hazen KC, Brawner DL, Ricssclman MH, Jutili MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissue. *Infect Immun* 1991; **59**: 907-12.
- 29 Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, et al. Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* 2002; **8 Suppl 2**: 151-60.
- 30 CASTANO I, PAN S, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 2005; **55**: 1246-58.
- 31 Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 881-90.
- 32 Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 2002; **110**: 601-10.
- 33 Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 241-7.
- 34 Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non - *Candida albicans* species on acrylic substrate. *Journal of Applied Oral Science* 2012: 70-5.
- 35 Dranginis AM, rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; **71**: 282-94.
- 36 Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 340-5.
- 37 Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases* 2008; **4**: 582-90.
- 38 DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *TRENDS MICROBIOL* 2003; **11**: 30-6.
- 39 Tournu H, Van Dijck P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *Int J Microbiol* 2012; **2012**: 845352.
- 40 Ozcan SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Willke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS* 2006; **114**: 139-45.
- 41 Sojakova M, Liptajova D, Borovsky M, Subik J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathologia* 2004; **157**: 163-9.
- 42 Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Inuma Y, Ichiyama S. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 283-9.
- 43 Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*; **49**: 396-9.
- 44 Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal Clinical of Microbiol* 2004; **42**: 4419-31.
- 45 Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3259-66.
- 46 Desai C, Mavrianos J, Chauhan N. *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. *FEMS Yeast Res* 2011; **11**: 595-601.
- 47 LI F, SVAROVSKY MJ, KARLSSON AJ, et al. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *EUKARYOTIC CELL* 2007; **6**: 931-9.

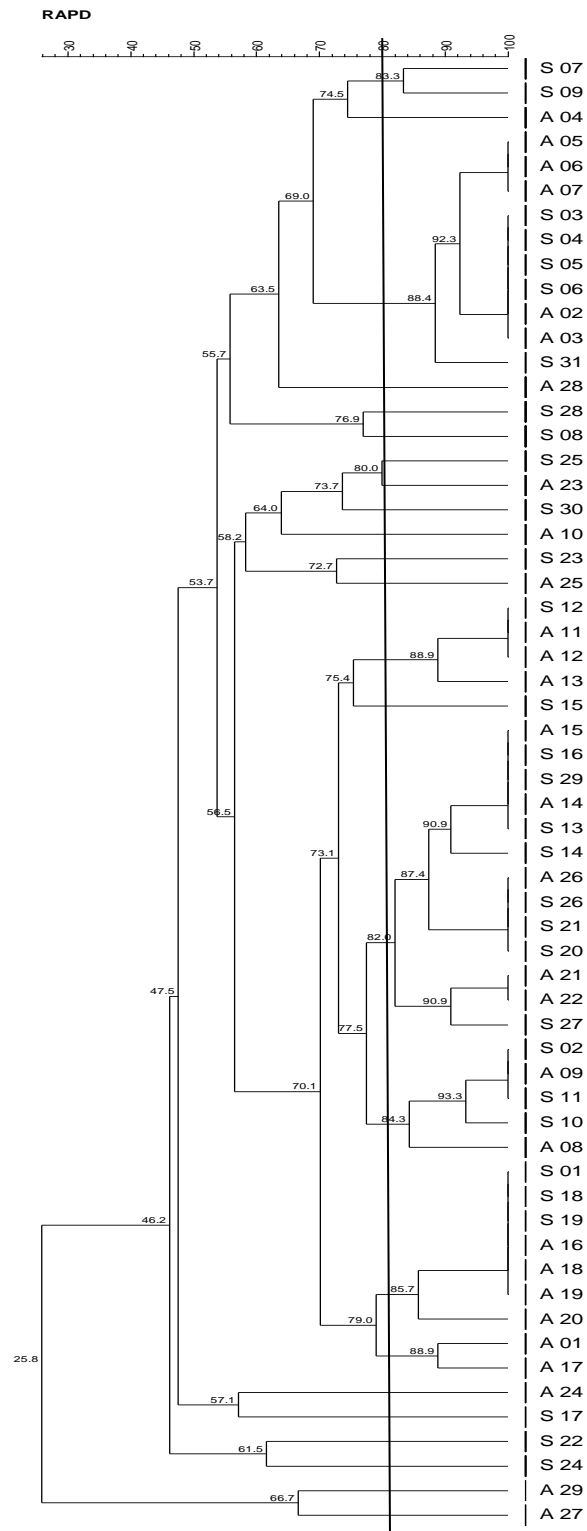


Figura 1 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador OPA18 para 60 isolados de *Candida glabrata*, pelo agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice. $S_{AB} = 59,29 \pm 19,19$. S= leveduras isoladas de mulheres com candidíase vulvovaginal; A= leveduras isoladas de mulheres assintomáticas. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 80%.

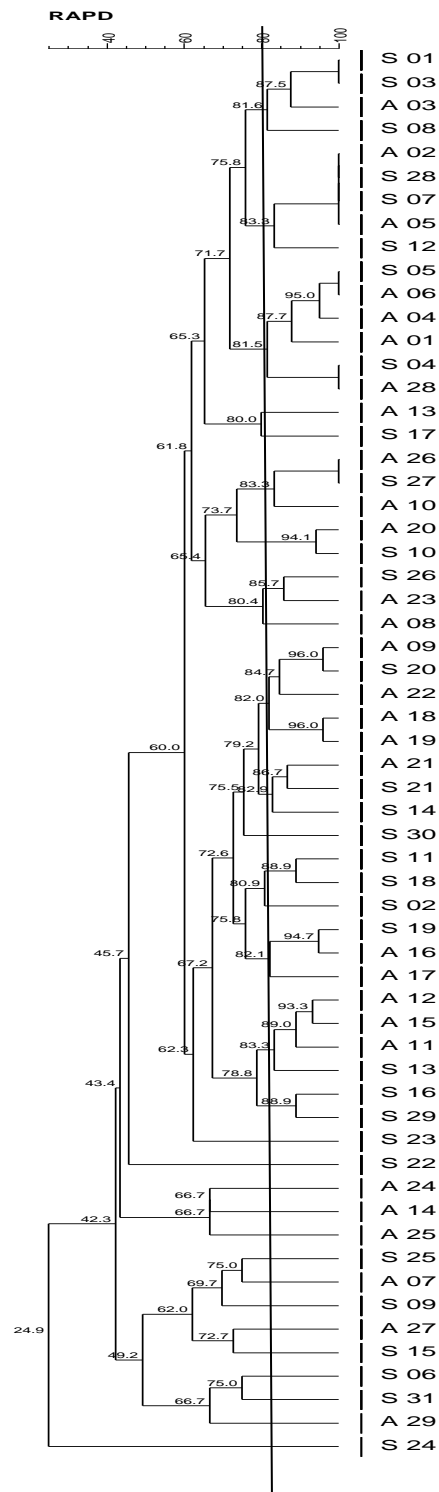


Figura 2 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador P4 para 60 isolados de *Candida glabrata*, pelo agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice $S_{AB} = 56.46 \pm 18.93$. S= leveduras isoladas de mulheres com candidíase vulvovaginal; A= leveduras isoladas de mulheres assintomáticas. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 80%.

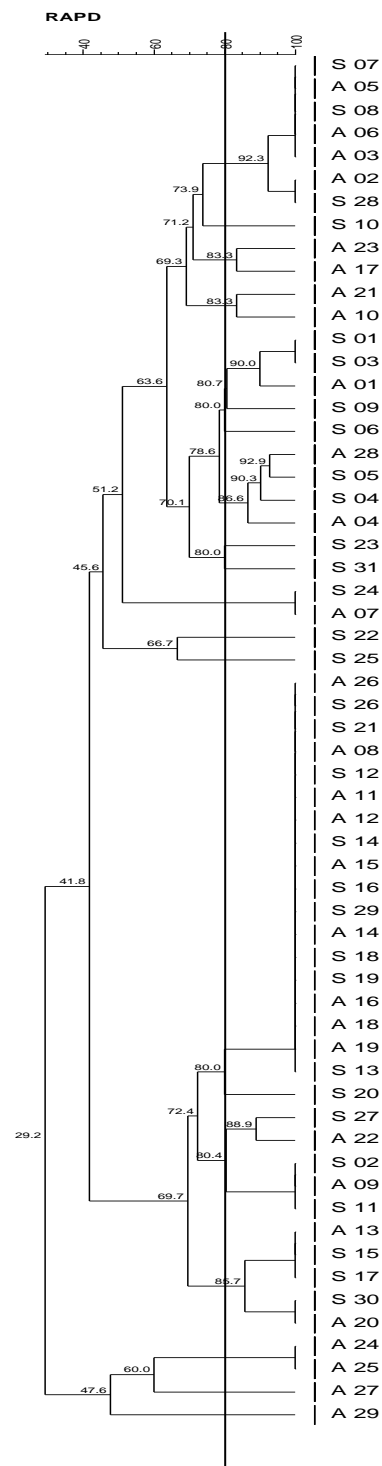


Figura 3 Dendrograma gerado a partir da amplificação do iniciador OPE-18 para 60 isolados de *Candida glabrata*, pelo agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice. $S_{AB} = 0,529 \pm 0,242$. S= leveduras isoladas de mulheres com candidíase vulvovaginal; A= leveduras isoladas de mulheres assintomáticas. A linha vertical divide o dendrograma a partir do nível de similaridade de 80%.

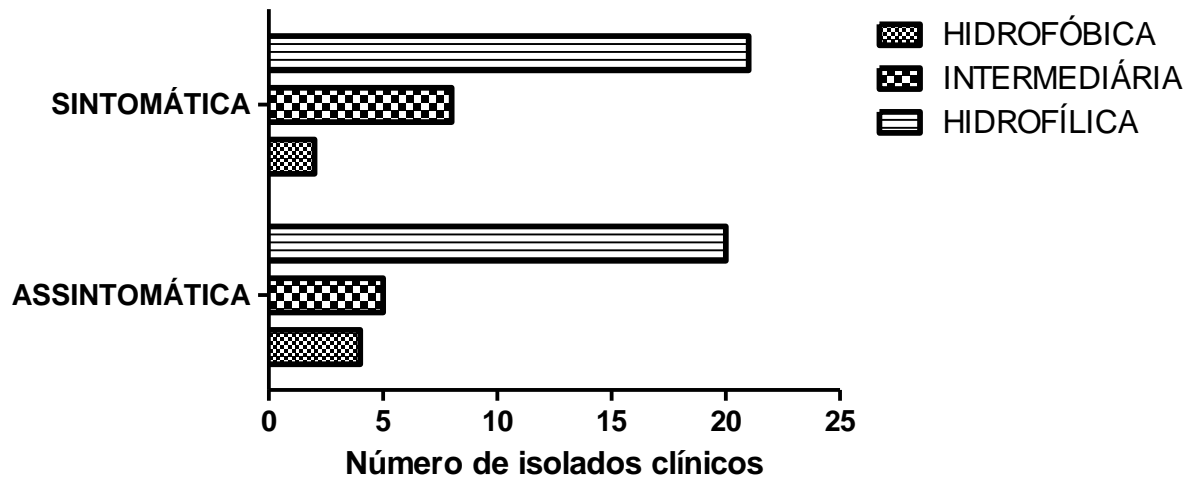


Figura 4 Perfil de hidrofobicidade de leveduras isoladas de candidíase vulvovaginal de acordo com o quadro clínico da mulher. Os perfis de hidrofobicidade foram classificados em hidrofóbico (<40%), hidrofobicidade intermediária (40-60%) e hidrofílica (>60%).

Tabela 1 Aderência de 60 isolados clínicos vaginais da espécie *Candida glabrata* sobre superfície de poliestireno de acordo com o padrão hidrofobicidade da superfície celular (HSC).

HSC	Aderência UFC campo ⁻¹ *		
	<100	100-200	>200
Hidrofóbico (n=06)	33,3%	33,4%	33,3%
Intermediário (n=14)	28,5%	64,3%	7,2%
Hidrofílico (n=40)	10%	65%	25%

*UFC campo⁻¹ = unidades formadoras de colônias por campo microscópico (400X).

Tabela 2 Aderência de quatro isolados vulvovaginais de *Candida glabrata* em diferentes superfícies e a capacidade de formar biofilme bem como sua característica de hidrofobicidade.

<i>C. glabrata</i> isoladas de candidíase vulvovaginal					
Amostra	HSC	Biofilme	Aderência em placa*	Aderência em anel vaginal 10 ⁴ UFC ml ⁻¹	CEVH com aderência§
S 10	HI	1+	1,48±16,99	4,584±0,29	4,5±0,5
S 29	HI	4+	253±32,86	1,47±0,45	21±03
A 01	HO	1+	50±5,63	6,50±1,08	14±03
A 22	HO	4+	291±45,34	1,92±0,44	27±01
ATCC2001	HO	4+	186,3±30,59	3,90±0,60	14±01

* Número de unidades formadoras de colônias por campo microscópico

§ Porcentagem de células epiteliais vaginais humanas que permitiram leveduras se aderirem

S= levedura isolada de mulher com candidíase vulvovaginal; A= leveduras isoladas de mulheres assintomáticas; HI= Hidrofílica; HO= Hidrofóbica

Tabela 3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quatro antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo (CLSI) em 60 amostras de *Candida glabrata* isoladas de candidíase vulvovaginal

Antifúngicos	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Variação	Interpretação		
				Sensível	SDD*	Resistente
		($\mu\text{g/mL}$)				
<i>Fluconazol</i>	32,0	64,0	0,25 - 64	11.67%	73.33%	15%
<i>Itraconazol</i>	0,25	2,0	0,03 – 8,0	18.33%	60%	21.67%
<i>Nistatina</i>	2,0	4,0	0,05 – 8,0	90%	10%	-
<i>Anfotericina B</i>	1,0	1,0	0,25 – 4,0	97%	-	3%**

CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidos como a CIM capaz de inibir 50% e 90% de crescimento dos isolados, respectivamente.

Os valores de variação correspondem respectivamente a menor e a maior CIM de cada droga.

*SDD: Sensível dose-dependente

** Isolados não sensíveis

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES:

1. Características genóticas e fenóticas de *Candida glabrata* isoladas de candidíase vulvovaginal (CVV) são isolados dependentes;
2. O perfil genotípico das leveduras, obtido pela técnica de PCR-RAPD apresentou alta variabilidade;
3. Houve uma grande variabilidade fenotípica em relação aos fatores de virulência como aderência, formação de biofilme e hidrofobicidade de superfície celular;
4. *C. glabrata* apresentou diversidade na capacidade de aderência tanto em superfície hidrofóbica (anel vaginal, poliestireno) quanto hidrofílica (células vaginais humanas);

PERSPECTIVAS FUTURAS

Entender o comportamento de *Candida glabrata* na formação de biofilme é a chave para o desenvolvimento de medidas preventivas para a candidíase. Estudos adicionais são necessários para estabelecer quais são os fatores que estimulam a expressão de genes da família EPA uma vez que cepas da espécie *C. glabrata* demonstraram ser isolado dependente. Além disso, novos estudos são necessários para compreender a grande plasticidade fenotípica exercida por *C. glabrata*. Também será necessário analisar outros fatores de virulência em conjunto com a susceptibilidade *in vitro* destes isolados frente aos antifúngicos disponíveis no mercado. A realização de estudos de aderência em poliestireno, anel vaginal e células epiteliais vaginais humanas com um número maior de isolados clínicos, a fim de se observar um perfil de aderência, também é um dado a ser considerado.

Anexo

Normas revista Mycoses

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0507/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0507/homepage/ForAuthors.html)

DOWNLOADS: Copyright Transfer Agreement Form, Colour Work Agreement Form

Please note it is **NOT** necessary to upload the Copyright Transfer Agreement form with submission of your manuscript. **You will be invited to submit if your manuscript is accepted for publication.**

GENERAL

Mycoses is dedicated to the publication of manuscripts on topics concerning medical or veterinary mycology. Studies on plant pathology or mycological papers on fungi not related to human or veterinary medicine do not lie within the scope of *Mycoses* and will not be accepted. Manuscripts may be published as original communication of normal or short length (Short communication). The submission of review articles both of the mini-review and the full-length type is particularly encouraged. Only papers submitted in English will be accepted (this does not exclude the Latin text required for the description of new species or genera).

The editors reserve the right not to accept papers unless adherence to the principles given in the *Declaration of Helsinki* and the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* (DHEW Publication NIH) is clear.

No charge is made for publication but authors will be required to pay for extensive alterations to agreed papers at proof stage.

EARLY VIEW

Mycoses is covered by Wiley-Blackwell's Early View articles for articles that are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts are submitted to *Mycoses* online, i.e. electronically, from the corresponding author's *Mycoses* Scholar One Manuscript (formerly known as Manuscript Central) account. You will need your files in an electronic format, an Internet connection, and a user ID and password for the site. To begin a new submission, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/myc> and log in or create an account to get your user ID and password. Full instructions are provided on the site.

If assistance is needed, the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Ann O'Mahony

Mycoses Editorial Office

MYCedoffice@wiley.com

MYCedoffice@gmail.com

ELECTRONIC SUBMISSION

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files plus separate figure files. JPEG, TIFF or EPS files are acceptable for submission, but only high-resolution JPEG, TIFF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. Figure tags should be included in the file.

Manuscripts should be formatted as described in *Mycoses*' Author Guidelines (below). When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letter, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

For more information on preparing manuscripts for online submission, please read the detailed instructions at <http://mc.manuscriptcentral.com/myc>. Additional help is available by emailing support@scholarone.com/.

Authors are encouraged to provide names of potential reviewers for their manuscript. All acceptable material submitted for publication is forwarded to the Deputy Editor in charge of the particular field who together with two further referees makes a judgement on the paper. The votes of the independent referees as well a preliminary suggestion of acceptance or rejection is forwarded by the Deputy Editor to the Editors who make the final decision on

their individual specialty. Authors must inform the Editors of any possible conflict of interest capable of influencing their judgement and if necessary, a disclaimer will be included.

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Authors resubmitting manuscripts should follow the same procedures as for submission of new manuscripts. If accepted, papers become the copyright of the journal.

After acceptance please make sure that the final manuscript and the figure files are uploaded. **The figures must be high-resolution scans** (JPEG, TIFF or EPS files). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

ORIGINAL ARTICLES AND REVIEWS

Text

Authors should aim for a concise readable style. Spelling should follow the *Concise Oxford Dictionary*, and *The Oxford Dictionary for Writers and Editors*. The Editors reserve the right to make corrections, both literary and technical, to the papers.

All pages must be numbered consecutively in the upper right-hand corner of each page. Starting with the title page as p.1, the pages should be numbered in the following order: title page, summary and key words, text, acknowledgements, references, tables, figure legends.

The following items should each start on a separate page.

Title Page

This should bear (1) the title, (2) the names of all authors, (3) the institutions of origin with brief addresses, (4) a short title of not more than 50 characters (including spaces) to be used as a running head, (5) a list of up to eight key words for indexing purposes, and (6) the name and full postal address (with phone and fax numbers and e-mail address) of the author who will be responsible for reading the proofs (the corresponding author). The corresponding author must keep the Mycoses office informed of any change in details until the paper is published. Authors should keep a copy of their manuscript.

Summary

Normally in less than 210 words, this should indicate clearly the scope and main conclusions of the paper. Original articles should have a structured abstract, comprising the five headings: Background, Objectives, Patients/Methods, Results and Conclusions.

Main Text

Papers should be divided into sections headed (1) introduction, (2) materials and methods (or patients and methods/subjects and methods if human patients/subjects were used), (3) results, (4) discussion (5) acknowledgements, and (6) Conflict of Interest. Avoid an excess of sub-headings - two further divisions, if necessary, should be adequate.

The introduction should explain why the work was done and briefly introduce the scope and contents of the paper. Essential details should be included in materials and methods, including experimental design and statistical analysis. Results should be recorded in the past tense. The discussion should present the author's results in the broader context of other work on the subject. Acknowledgements should be as brief as possible.

References

Please verify your references before submission and send them as a plain, unstructured list. We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. All references must be cited in numerical order in the text following the Vancouver system. The numbers of references should appear in the text in brackets e.g. [1, 21] or [1-4]. If giving the names of authors in the text the following form should be used: Brown & Smith [1] or Brown *et al.* [2] if there are more than two authors. Unpublished observations and personal communications may be included in the text only.

The reference list should show the references in numerical order as they appear in the text. References should include the following: (1) authors (surname followed by initials), (2) year, (3) title of (a) article or (b) chapter, (4) editors (if a book), (5) title of (a) journal or (b) book, (6) volume number, (7) place of publication and name of publisher (if a book), and (8) first and last page numbers of (a) article or (b) chapter. Journal titles should be abbreviated according to the system adopted in *Index Medicus*.

The following format should be used:

JOURNAL ARTICLES

(List all authors if six or fewer, list the first three then add *et al.* if there are seven or more).

Sharma A, Saple DG, Surjushe A, Rao GRR, Kura M, Ghosh S, Bolmall C *et al.* Efficacy and tolerability of sertaconazole nitrate 2% cream vs. miconazole in patients with cutaneous dermatophytosis. *Mycoses* 2011;54: 217-222.

BOOKS

Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes BL, Fell JW. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: Heitman, J, Kozel, T, Kwon-Chung, KJ, Perfect, J.

&Casadevall, A. (eds) *Cryptococcus: from Human Pathogen to Model Yeast*. ASM Press, Washington DC, USA, 2011:3-15.

Work that has been submitted but not accepted for publication should not appear in the reference list but may appear in the text as unpublished observations. Work that has been accepted but not published should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear followed by '(in press)' plus DOI. Further details should be supplied as soon as possible.

TABLES

These must be numbered consecutively with Arabic numerals and typed on separate sheets carrying an appropriate legend and presented in a way that makes the table self-explanatory.

Numerical results should be expressed as means with the relevant standard errors and/or statistically significant differences, quoting probability levels (P-values). Three significant figures are usually sufficient for mean values and standard errors should be quoted two or three more decimals than the mean.

The only lines appearing in the table should be horizontal and all decimals should be aligned in columns. The placement of all tables should be indicated in the text, being referred to as Table 1 or Tables 2 and 3.

FIGURES

Figures should be numbered in sequence in Arabic numerals as they appear in the text. Labels, lettering and symbols etc. must be professionally prepared and should be uniform. Lines should be of sufficient thickness to stand reduction (no less than 4 mm wide for a 50% reduction), and letters should be a minimum of 14 pt Times New Roman or an equivalent size. Acceptable symbols for experimental points are $\bar{}$, r , o , \sim , p , ϕ . The symbols $+$ and \times will not be accepted.

Legends should be typed on a separate sheet and consist of a short title together with a brief explanatory paragraph. The legend must make the meaning of each figure understandable without further reference to the text. Photomicrographs should state the original magnification.

The position of all figures should be indicated in the text and should be referred to as Fig. 1 or Figs 1 and 3. Figure 1 should be written out in full if at the beginning of a sentence.

COLOUR PHOTOS

These can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). It is the policy of *Mycosest* for authors to pay the full cost for the reproduction of their **colour** artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, the production office must receive a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the internet. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form please contact the Editorial Office and they will be able to e-mail or fax the form to you. Once complete, please return the form to the Production Editor by mail to this postal address: **Ryan Cheong, Production Editor, Journal Content Management, John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd, 1 Fusionopolis Walk, #07-01, Solaris South Tower, Singapore 138628**. If you choose to convert your figures to black and white please send correspondence to the Production Editor at myc@wiley.com or via fax at +65 66438599. Any article received by Blackwell Publishing with colour artwork will not be published until the form has been returned or correspondence indicating conversion to black and white has been sent to the Production Editor.

ELECTRONIC ARTWORK

Vector graphics (e.g. line artwork) should be saved in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. photographs) in Tagged Image File Format (TIFF). Please do not use any pixel-oriented programs. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher.

Full details of submission of figures in electronic format are available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

If figures have more than one part, each part should be labelled (preferably) in the top left-hand corner with lower-case letters in parentheses e.g. a figure with two parts would be labelled (a) and (b). In the text this should be referred to as Fig. 1a or Figs 2a, b. Figures should be planned to fit the printed column, i.e. 7.9 cm wide for single column and 16.5 cm wide for double column.

Photographs can be up to twice the reproduction size and must be unmounted glossy prints showing good detail and moderate contrast.

UNITS, SYMBOLS and ABBREVIATIONS

SI (Système International) units should be used and should conform with the lists printed *Units, Symbols and Abbreviations - A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* 4th edn as published by the Royal Society of Medicine. Nomenclature of disease should follow the *International Classification of Disease*, published by the World Health Organization, as far as possible.

When first mentioned, cumbersome medical names should be abbreviated for later reference in the text. Latin bi-nominals should abbreviate the genera to the initial letter after the first mention unless it begins a sentence.

Doses of drugs should be given as unit weight per body weight, e.g. mmol kg⁻¹. Rates should be expressed with negative indices. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. mmol l⁻¹, not mM.

Numerals are to be used from 10 upwards; and the 24-hour clock, e.g. 21.00 hours, should be used.

MATERIALS

The source of all materials used should be given stating company, city and country.

Verification of the identity of living specimens used must take place through sequencing, or by consultation of taxonomists working at a reference centre. Specimens analyzed must remain accessible for later reference. Strains should be deposited in one of the major culture collections, and sequences in a public data bank. Collection and sequence numbers must be cited in the text. It is recommended that new taxa are deposited in MycoBank. Descriptions of new taxa must comply with the rules of the International Code of Botanical Nomenclature.

CASE REPORTS

Case Reports may be submitted but only those which are **RARE** or of **EXCEPTIONAL INTEREST** will be considered. Please upload Case Reports in the same format as Original Articles.

LETTERS TO THE EDITOR

There are no keywords required. The references must be integrated into the text (Author AA et al, Journal 2008, 1:242) or (Book Author AA, Book Title, 2nd Edition, Publisher, Place 2010). Letters to the Editor are considered for publication (subject to editing and abridgment) if they do not contain material that has been submitted or published elsewhere.

Letters in reference to a Journal article must not exceed 200 words (excluding references) and must relate to articles published in *Mycoses* within the past three years.

A letter can have no more than 5 references and one figure or table (References should be incorporated into the body of the text)

A letter can be signed by no more than three authors

You will be asked to include your full address and email.

COPYRIGHT ASSIGNMENT

Authors are no longer required to assign copyright in their paper. Instead authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Wiley-Blackwell and *Mycoses*. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement). Please download the Copyright Transfer Agreement form and send it to the Production Editor via email: myc@wiley.com or fax: +65 66438599

PROOFS

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

ONLINEOPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article freely available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding

agency's preferred archive. Please visit <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html> for further information about OnlineOpen. **Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.**

OFFPRINTS

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

AUTHOR MATERIAL ARCHIVES POLICY

Please note that unless specifically requested, **Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

AUTHOR SERVICES

NEW: Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services: Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit www.authorservices.wiley.com/bauthorfor more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Lastupdate: July 2012