



LEVEDURAS CLÍNICAS ISOLADAS DE PACIENTES EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: AVALIAÇÃO QUANTO À CAPACIDADE DE ADERÊNCIA

Michellangelo Nunes¹
michellangelonunes@gmail.com

Melyna Chaves Leite de Andrade²
melynaleite@gmail.com

Franz de Assis Graciano dos Santos³
franz.assis@gmail.com

Michele Maria Gonçalves de Godoy⁴
michelegodoy@oi.com.br

Rejane Pereira Neves⁵
rejadel@yahoo.com.br

RESUMO

Casos de candidíase sistêmica tem sido cada vez mais comum entre as infecções fúngicas invasivas, acarretando altos índices de óbitos, sobretudo em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. Candidíase sistêmica ocorre por consequência no desequilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro e pela exposição a fatores predisponentes. Estudos têm demonstrado que a capacidade de se aderir às células do tecido hospedeiro é o evento inicial na patogênese de infecções, conferindo diferentes graus de virulência ao agente. O objetivo deste trabalho foi conhecer a capacidade de aderência de *Candida* spp. isoladas a partir de pacientes internados em UTI. Para os ensaios, foram utilizadas células epiteliais obtidas da cavidade bucal de doador clinicamente são. Os resultados foram classificados em níveis diferentes de aderência: forte, fraca e sem aderência da área superficial da célula epitelial humana. Neste estudo, diferentes espécies de *Candida* foram capazes de aderir a superfícies de células epiteliais humanas. Apesar disso a propriedade de aderência não está diretamente relacionada a espécie, mas certamente a fatores específicos de cada microrganismo.

Palavras-chave: sepse, infecção fúngica, candidíase, patogenicidade, virulência.

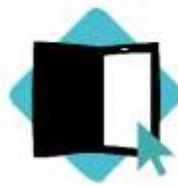
¹Professor do Centro Universitário Estácio do Recife.

²Biomédica. Pós-Graduanda do PPG Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

³Biomédico. Pós-Graduando do PPG Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Médica Intensivista. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

⁵Biomédica. Docente do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.



ABSTRACT

Cases of systemic candidiasis have been increasingly common among invasive fungal infections, leading to high death rates, especially in patients admitted to the intensive care unit. Systemic candidiasis occurs because of the host immune system imbalance and exposure to predisposing factors. Studies have shown that the ability to adhere to host tissue cells is the initial event in the pathogenesis of infections, conferring different degrees of virulence to the agent. The objective of this work was to know *Candida* spp. isolated from ICU patients. For the assays, epithelial cells obtained from the clinically healthy donor oral cavity were used. Results were classified into different levels of adherence: strong, weak and non-adherent to the surface area of the human epithelial cell. In this study, different *Candida* species were able to adhere to human epithelial cell surfaces. Nevertheless, the adhesion property is not directly related to species, but certainly to specific factors of each microorganism.

Key words: sepsis, fungal infection, candidiasis, pathogenicity, virulence.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a incidência de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) que se manifestam após 48 horas de internação ou até 72 horas após alta, tem aumentado grandemente, acarretando altos índices de mortalidade, sendo constantes em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (LI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2015). Dados europeus mostraram a prevalência de 19,5% de infecções em pacientes hospitalizados nesse setor, frente à 5,2% de infecções adquiridas em outras unidades de internação (SINÉSIO *et al.*, 2018; KLINGSPOR *et al.*, 2015).

Neste contexto destacam-se os casos de infecções fúngicas, sobretudo os casos de candidíase sistêmica, responsável por altos índices de óbitos em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas, internados em UTI (DOI *et al.*, 2016). Candidíase sistêmica ocorre por consequência no desequilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro e pela exposição a fatores predisponentes como uso de dispositivos médicos invasivos; uso prolongado de antibióticos de amplo espectro; tempo de permanência hospitalar e tratamentos invasivos indispensáveis ao paciente (KELLY *et al.*, 2015).

Ainda que outras espécies de fungos possam causar múltiplos quadros clínicos em pacientes de UTI, as espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria desses casos, sobretudo em pacientes imunossuprimidos. Historicamente, *C. albicans* é a espécie mais incidente, contudo mudanças pouco esclarecidas têm mostrado que outras espécies de *Candida* tiveram aumento em suas frequências nos últimos anos incluindo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (CANTÓN *et al.*, 2013; PAPPAS *et al.*, 2018).

As leveduras do gênero *Candida* possuem capacidade em desenvolver diversos mecanismos para expressar seus fatores de virulência, mecanismos complexos ainda não totalmente esclarecidos (LEITE DE ANDRADE *et al.*, 2017). O que já está bem estabelecido, é que um patógeno deve apresentar alguns fatores de virulência para que a infecção se estabeleça no hospedeiro, como a adesão a células hospedeiras, propagação do microrganismo e danos as células do hospedeiro através da secreção de enzimas hidrolíticas (LEITE, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2014).



A capacidade de aderir firmemente em diferentes superfícies, incluindo células e superfícies abióticas, como dispositivos médicos invasivos, é uma característica importante detectada em algumas espécies de *Candida* (DE GROOT *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2013). O primeiro fenômeno para a instalação da doença por leveduras do gênero *Candida* é a aderência deste microrganismo às células do hospedeiro ou até mesmo outros tipos de superfícies. A etapa de adesão é designada como essencial para a sobrevivência desses microrganismos em hospedeiros humanos, contribuindo como fonte de disseminação nos casos de infecções fúngicas sistêmicas (MAYER *et al.*, 2013; SARDI *et al.*, 2013; MELLINGHOFF *et al.*, 2018; NÚÑEZ-BELTRÁN *et al.*, 2017). A adesão e proliferação de leveduras do gênero *Candida* estabelecem um sério problema na prática clínica, tornando a terapêutica mais difícil e mantendo o paciente exposto a um maior tempo de internação hospitalar (ÍÑIGO; DEL POZO 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a expressão da virulência de isolados clínicos de *Candida* através da capacidade de aderência a superfície de células epiteliais humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas dezessete cepas de leveduras clínicas isoladas de pacientes adultos, com candidíase invasiva, internados em Unidade de Terapia Intensiva. Todas as cepas foram identificadas e pertencem ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os testes de aderência foram baseados em Kimura e Pearsall (1978) e Sobel *et al.*, (1981). Células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de doador jovem, clinicamente isento de cáries. Em todas as etapas relacionadas a este ensaio foi utilizado o tampão fosfato salino (PBS) para lavagem e suspensão das células. As suspensões celulares obtidas foram mantidas sob refrigeração, a fim de evitar alterações celulares.

Os isolados de *Candida* foram crescidos “overnight” em meio NGY (neopeptona 1g/L; dextrose 4g/L; extrato de levedura 1g/L) e mantidos a temperatura de 35 °C. Em seguida, as células de leveduras foram lavadas com 2 mL de PBS por três centrifugações seguidas a 1580 rpm por 10 minutos e resuspendidas para uma concentração final de 5×10^6 cels/mL.

As amostras de células epiteliais bucais humanas foram coletadas com auxílio de *Swab* estéril friccionado por 2 min na cavidade oral e transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de PBS, centrifugadas três vezes e resuspendidas para uma concentração final de 5×10^5 cels/mL. Anterior aos ensaios, as células de leveduras e as células epiteliais foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações.

As células epiteliais bucais humanas e as células de leveduras foram misturadas (1:1) e em seguida, incubados a 35 °C, sob agitação de 200 rpm, por 2h. O produto final foi fixado em formalina a 10% e em seguida foi realizada a microscopia direta, através de preparação de lâminas coradas com Azul de Metileno.

Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos observados onde foram avaliadas 100 células epiteliais com relação à percentagem de sua área superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência (+++) para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência (++) para adesão até 49% da área de superfície e sem aderência visível (+). Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata para cada isolado testado.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa foi conduzida após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos sob o registro CAAE 52033315.8.0000.5208.

Dentre os diversos fatores de virulência presentes em leveduras do gênero *Candida*, a etapa de adesão a células hospedeiras e/ou dispositivos médicos invasivos vem sendo uma característica importante identificada no início do processo infeccioso em humanos. Em nossos resultados, todos os isolados testados foram avaliados com relação à área superficial aderidas pelas leveduras clínicas e determinadas como forte (+++), fraca (++) e sem aderência visível (+).

A Tabela 1 demonstra a classificação quanto ao perfil de adesão às células epiteliais humanas pelas leveduras clínicas do gênero *Candida*. De acordo com o gradiente de classificação, das dezessete cepas, apenas 07 (41%) não apresentaram capacidade de adesão, 05 (29%) isolados apresentaram fraca capacidade de adesão e 05 (29%) isolados se destacaram apresentando forte capacidade em aderir-se às células epiteliais humanas.

Nesta pesquisa, algumas cepas, principalmente as de *C. tropicalis*, apresentaram forte capacidade em aderir as células epiteliais, como ilustrado na Figura 1C. Em um estudo realizado por Menezes *et al.*, (2013) ao analisar a capacidade de aderência de isolados clínicos de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, foi observado que 79% dos isolados apresentaram propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão. Esses dados corroboram com nossos achados, onde em nossa pesquisa, cepas clínicas de *C. tropicalis* se destacaram na produção deste fator de virulência.

Diferentemente do nosso estudo, Borges *et al.*, (2018) relataram uma forte adesão e propriedades de proliferação em cepas de *C. parapsilosis* através da aderência em dispositivos invasivos, essa forte adesão não foi vista em nossos resultados (Figura 1A;1B). Esses dados resultam que a expressão deste fator de virulência apresenta variações de acordo com a patogenicidade de cada cepa desta espécie.

Lima-Neto *et al.*, (2011), correlacionaram a capacidade de aderência em cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* às células epiteliais bucais humanas, mostrando que a diferença individual entre as linhagens estava relacionada com um alto teor de um carboidrato específico presente na superfície celular. Dados esses podem justificar a inespecífica capacidade dos nossos isolados clínicos de *C. parapsilosis* em aderir a superfície de células hospedeiras.

Figura 1: Ausência de aderência (A); fraca aderência (B) e forte aderência (C) de leveduras do gênero *Candida* às células epiteliais humanas coradas com azul de metileno (400x).

Tabela 1: Avaliação da capacidade de aderência a células epiteliais humanas de isolados clínicos de *Candida* spp.

Cepas	Espécies	Capacidade de aderência
C01	<i>C. glabrata</i>	+
C02	<i>C. glabrata</i>	+
C03	<i>C. tropicalis</i>	++
C04	<i>C. parapsilosis</i>	+
C05	<i>C. glabrata</i>	+
C06	<i>C. orthopsilosis</i>	+++
C07	<i>C. norvegensis</i>	+
C08	<i>C. albicans</i>	++
C10	<i>C. tropicalis</i>	+++
C11	<i>C. tropicalis</i>	+++
C12	<i>C. albicans</i>	++
C15	<i>C. glabrata</i>	++
C16	<i>C. tropicalis</i>	+++
C17	<i>C. albicans</i>	++
C18	<i>C. albicans</i>	+++
C20	<i>C. glabrata</i>	+
C21	<i>C. orthopsilosis</i>	+

Legenda: Sem aderência (+); Fraca aderência (++); Forte aderência (+++).



Estudos mostram que a capacidade de aderência nas diversas espécies de *Candida* é divergente. Isto explica por que alguns isolados colonizam mais frequentemente superfícies mucosas do que outros (TSUI *et al.*, 2016). Adicionalmente podem ser observadas diferenças de adesão dentro de cepas de uma mesma espécie, pois a possibilidade de mudar o próprio fenótipo tem sido descrita em relação ao gênero *Candida* e pode modular alguns fatores de virulência, inclusive a aderência. Entretanto, os mecanismos que possibilitam esta mudança fenotípica ainda necessitam ser esclarecidos, é provável que estejam associados à riqueza de nutrientes e expressão de genes de adesinas ou de outras proteínas (TIMMERMANS *et al.*, 2018).



A maioria dos estudos descreve a aderência de *C. albicans* a células epiteliais, mas outras espécies já começam a receber a mesma atenção. No estudo de Silva-Dias e colaboradores (2015) investigaram esta propriedade em *C. albicans* e *Candida* não *C.*

albicans, mostrando que a diferença individual entre as linhagens é extremamente dependente do substrato e das condições de crescimento utilizadas, além de estar relacionada com a composição da parede celular. Dados esses podem justificar a inespecífica capacidade dos nossos isolados clínicos em aderir a superfície de células hospedeiras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no método experimental utilizado e nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que diferentes espécies de *Candida* foram capazes de aderir a superfícies de células epiteliais humanas. Os dados aqui obtidos também expõem que a propriedade de aderência não está diretamente relacionada a espécie, mas certamente a fatores específicos de cada microrganismo e à resposta do hospedeiro. Sendo assim, faz-se necessário estudos mais aprofundados a fim de esclarecer melhor os fatores de virulência do gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

BORGES, K. R. A., PIMENTEL, I. V., LUCENA, L. C. L. S., SILVA, M. A. C. N., MONTEIRO, S. G., MONTEIRO, C. A., NASCIMENTO, M. D. S. B. & BEZERRA, G. F. B. Adhesion and biofilm formation of *Candida parapsilosis* isolated from vaginal secretions to copper intrauterine devices. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 60, e59. 2018.

CANTÓN, E, PEMÁN, J, HERVÁS, D, ESPINEL-INGROFF, A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. **J Antimicrob Chemother** 68: 864–868. 2013.

DE GROOT, P. W. J. *et al.* Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481. 2013.

DOI AM, PIGNATARI ACC, EDMOND MB, MARRA AR, CAMARGO LFA, SIQUEIRA RA, *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**. 11(1):e0146909. 2016.

ÍNIGO, M., DEL POZO, J.L. Fungal biofilms: From bench to bedside. **Rev Esp Quimioter** 31: 35-38. 2018.

KELLY *et al.* The Epidemiology and Diagnosis of Invasive Candidiasis Among Premature Infants. **Clin Perinatol**. 42:105-17. 2015.

KIMURA, L.H, PEARSALL, N.N. Adherence of *Candida albicans* to Human Buccal Epithelial Cells. **Infection and Immunity**. 21(1): 64-68, 1978.



KLINGSFOR, A.M., TORTORANO, J.P., WILLINGER B., B., SENDID, A., VELEGRAKI, C., KIBBLER, J.F., SABINO, M.R., RUHNKE, M., ARIKAN-AKDAGLI, S., SALONEN, J., DÓCZI, I. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). **Clinical Microbiology and Infection**. 21:1. 2015.

LEITE DE ANDRADE MC, SOARES DE OLIVEIRA MA, SANTOS FDAGD, XIMENES VILELA PDB, DA SILVA MN, MACÊDO DPC, *et al.* A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. **PLoS ONE**. 12(11): e0188020. 2017.

LEITE, M.C. **Formação de biofilme por leveduras emergentes: desenvolvimento, arquitetura e resposta ao tratamento**. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife-PE, 2016.

LI, D. *et al.* Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of china: an 8 year case control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1-8, 2017.

LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I.C., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses** 54(1): 23–29. 2011.

MAYER F.L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence** 4: 119–128. 2013.

MELLINGHOFF, S.C., HARTMANN, P., CORNELLY, F.B. *et al.* Analyzing candidemia guideline adherence identifies opportunities for antifungal stewardship. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 37: 1563. 2018.

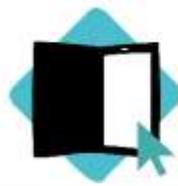
MENEZES, V.M., FARIAS-VALE, I.N., MONTEIRO, S.G., GONÇALVES, L.H.B., FIGUEIREDO, P.M.S., MONTEIRO, C.A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical** 42(3): 289-300. 2013.

MONTEIRO, D. R. *et al.* 2014. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 114:410–412.

NÚÑEZ-BELTRÁN A., LÓPEZ-ROMERO E., CUÉLLAR-CRUZ M., Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. **Microbial Pathogenesis**. 107:293-303, 2017.

PAPPAS, P.G., LIONAKIS, M.S., ARENDRUP, M.C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nature reviews | disease primers**. 4, 2018.

SARDI JC, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANNINI MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm



formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol** 62:10-24. 2013.

SILVA-DIAS, A., MIRANDA, I.M., BRANCO, J., MONTEIRO-SOARES, M., PINA-VAZ, C. RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Front. Microbiol.** 6:205. 2015.

SINÉSIO, M. C. T. *et al.* FATORES DE RISCO ÀS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA. *Cogitare Enfermagem*, [S.l.], v. 23, n. 2, 2018.

SOBEL JD, MYERS PG, KAYE D, LEVISON ME. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. **J Infect Dis.** Jan:143(1):76-82. 1981.

SOUZA, E.S., BELEI, R. A., CARRILHO, C.M.D.M., MATSUO, T., YAMADA-OGATTA, S.F., ANDRADE, G., PERUGINI, M.R.E., PIERI, F.M., DESSUNTI, E.M., KERBAUY, G. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto Contexto Enferm, Florianópolis.** 24(1): 220-8. 2015.

TIMMERMANS, B.; DE LAS PEÑAS, A.; CASTAÑO, I.; VAN DIJCK, P. Adhesins in *Candida glabrata*. **J. Fungi** 4, 60, 2018.

TSUI, C., KONG, E.F., JABRA-RIZK, M.A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease.** 74(4). 2016.