

ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DE CANDIDEMIA SISTÊMICA EXPERIMENTAL SERIADA

Thiago Henrique Fermiano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Glaucia Sayuri Arita, Daniella Renata Faria, Karina Mayumi Sakita, Franciele Abigail Vilugron Rodrigues, Isis Regina Grenier Capoci, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (co-orientadora), Érika Seki Kioshima (Orientador)
e-mail: th.fermiano@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/ Maringá, PR

Área: Microbiologia/ Subárea: Micologia

Palavras-chave: Candidemia, *C. albicans* e fatores de virulência.

Resumo

Candida albicans habita comensalmente superfícies de epitélios e mucosas, porém quando ocorrem desequilíbrios nesses sistemas, como supressão do sistema imune, terapia com antibióticos e uso de dispositivos invasivos, podem facilitar a invasão e dano tecidual causando infecções graves e fatais. Entretanto, o aparecimento da doença não depende apenas da susceptibilidade do indivíduo, mas também dos fatores relacionados à levedura e sua adaptação a diferentes nichos durante o processo de infecção. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a candidemia experimental seriada em modelo murino, no qual as leveduras recuperadas dos rins foram utilizadas para infecções seriadas e para ensaios de virulência como filamentação e atividade enzimática de fosfolipase e proteinase. Os resultados apontaram um aumento no perfil de filamentação desde a primeira passagem, bem como uma modulação na produção de enzimas líticas que contribuem para o processo de invasão e desenvolvimento da infecção por este patógeno.

Introdução

Candida albicans habita comensalmente nas superfícies das mucosas do trato gastrointestinal e vaginal sem causar danos, porém quando há um desequilíbrio nesses sistemas, como a supressão do sistema imune, terapia com antibióticos, cirurgia gastrointestinal e o uso de dispositivos invasivos, podem facilitar a invasão e dano tecidual (Cheng et. al, 2007; Perlroth et. al, 2007). Cheng et al, 2007 e Lüttich et. al, 2013 realizaram infecções sistêmicas seriadas em camundongos com *C. albicans* isoladas do baço e do rim, respectivamente. Os primeiros autores obtiveram um isolado mutante com deficiência em genes da cadeia respiratória após a quinta passagem. Por outro lado, Lüttich et. al observou alterações fenotípicas que sugerem a ocorrência de microevolução. A adaptação aos diferentes nichos

tem gerado tanto alterações genéticas quanto fenotípicas. Assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar alguns fatores de virulência de *C. albicans*, como secreção de enzimas hidrolíticas e habilidade de filamentação, após candidemia sistêmica seriada, no modelo experimental murino, com intuito de entender possíveis mecanismos desenvolvidos pelo patógeno no curso da infecção.

Materiais e métodos

3.1 Candidemia experimental seriada

Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM (CEUA 7261020418). Quatro camundongos Balb/c fêmeas foram inoculados intravenosamente com cepa padrão SC5314 de *C. albicans* ($3,5 \times 10^5$ UFC). Após cinco dias de infecção, os animais foram eutanasiados e os rins pesados e homogeneizados em tampão (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% glicerol v/v, pH 8,30), plaqueados em SDA e incubados por 24 horas à 37°C para a determinação da carga fúngica. As leveduras recuperadas dos rins, denominadas P1, foram utilizadas para o preparo de um novo inóculo para infecção de mais quatro animais. Assim, as leveduras recuperadas desses camundongos foram denominadas P2. Este esquema foi realizado até a obtenção de P5. A carga fúngica foi expressa em unidade formadora de colônia (UFC) por peso do órgão.

3.2 Determinação da filamentação

Um inóculo de 1×10^6 leveduras/mL foi preparado com as colônias recuperadas do rim dos camundongos e incubado em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) por 4 horas à 37°C. A porcentagem de filamentação foi determinada pela contagem de 100 células por amostra, em duplicata, sob microscópio óptico (400x).

3.3 Ensaios de fosfolipase e proteinase

Uma alçada das colônias recuperadas dos rins dos camundongos a cada passagem, foi inoculada nos meios previamente esterilizados de fosfolipase contendo gema de ovo e de proteinase contendo albumina de soro bovino (BSA). As placas foram incubadas por 7 dias à 37°C. O valor de Pz foi calculado dividindo-se o halo da colônia pelo halo colônia mais a zona de precipitação. Assim, quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5, utilizando o teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão

Em relação aos resultados da carga fúngica, foi possível observar um aumento significativo em P4 ($p = 0,0003$) e P5 ($p = 0,003$) em relação a P1, cujo os valores foram de 2.98 \log_{10} UFC/g órgão para P1 à 5,22 para P4 e 4,41 para P5. Para as demais passagens, essa diferença não foi encontrada, como pode ser observado na **Figura 1A**.

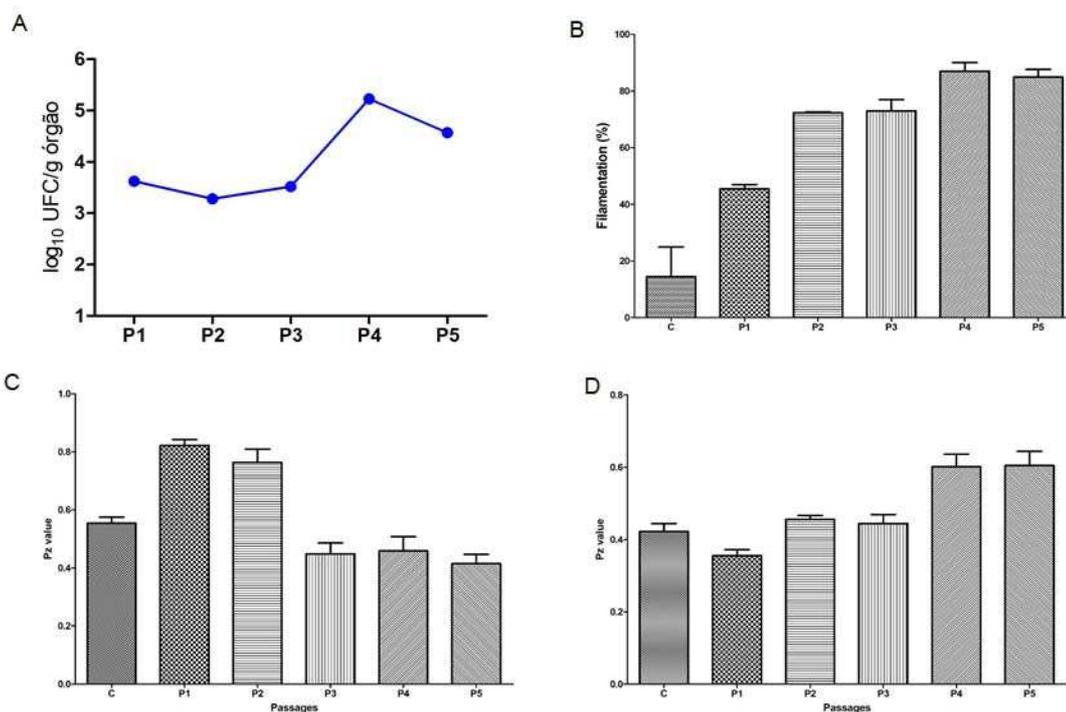


Figura 1. (A) Carga fúngica de leveduras retiradas do rim de camundongos após candidemia experimental seriada. **(B)** Perfil de Filamentação de leveduras retiradas do rim de camundongos com candidemia experimental seriada. **(C)** Atividade enzimática da fosfolipase de leveduras retiradas do rim de camundongos com candidemia experimental seriada. **(D)** Atividade enzimática de proteinases de leveduras retiradas do rim de camundongos com candidemia experimental seriada.

A capacidade de filamentação apresenta um papel importante para o desenvolvimento da infecção. Como mostrado na **Figura 1B**, é possível observar um aumento significativo no perfil de filamentação ao longo das passagens, em relação ao controle (sem passagem), atingindo o maior valor após a quarta passagem (87%).

Os ensaios de atividade enzimática avaliaram a capacidade das leveduras em expressarem enzimas capazes de degradar fosfolipídeos e proteínas. A cepa padrão apresentou atividade de proteinase com valor de Pz de 0,55. Houve uma diminuição na secreção de fosfolipases nas duas primeiras passagens cujos valores de Pz foram 0,82 e 0,76 para P1 e P2, respectivamente (**Figura 1C**). A partir de P3, a capacidade da levedura em

produzir fosfolipases foi recuperada, com valores de Pz igualando se a cepa padrão (0,44, 0,45 e 0,41 para P3, P4 e P5, respectivamente). Em relação aos resultados de proteinase, apresentados na **Figura 1D**, a cepa padrão apresentou um valor de Pz de 0,42. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e as passagens P1 (0,35), P2 (0,45) e P3 (0,44), mantendo a atividade proteolítica. Entretanto, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nas passagens finais P4 (0,60) e P5 (0,60). Desta forma, foi possível observar uma modulação nos perfis de virulência das leveduras recuperadas dos rins dos camundongos com candidíase sistêmica seriada.

Conclusões

O presente estudo permite uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência desenvolvidos pelo patógeno no curso da infecção, bem como da microevolução apresentada pela levedura em contato com o hospedeiro. Uma vez que, apresentou um perfil de filamentação aumentado desde a primeira passagem e produção de enzimas líticas que contribuem para o processo de invasão. Ainda, diante da crescente de casos e gravidades das infecções por *C. albicans*, mais estudos são necessários para melhor compreensão das variações genotípicas e fenotípicas que ocorre nessas leveduras no curso do processo infeccioso.

Agradecimentos

Agradecemos a todos do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Ao CNPQ, como instituto fomentador da pesquisa científica. Ademais, aos ensinamentos dos orientadores e demais membros atuantes nesse projeto.

Referências

- Cheng S, Clancy CJ, Zhang Z, Hao B, Wang W, Iczkowski KA, et al. **Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue.** Cellular Microbiology 2007;9(2):492–502.
- Perlroth J, Choi B, Spellberg B. **Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment.** Med Mycol 2007;45(4):321–46.
- Lüttich A, Brunke S, Hube B, Jacobsen ID. **Serial passaging of *Candida albicans* in systemic murine infection suggests that the wild type strain SC5314 is well adapted to the murine kidney.** PLoS ONE 2013;8(5):e64482.