

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA HIKARI MIRANDA NAKAHARA

Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose

Ribeirão Preto

2022

GABRIELA HIKARI MIRANDA NAKAHARA

Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose

Versão Original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como requisito parcial para
obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Área de Concentração: Patologia
Básica

Orientador: Prof. Dr. Alan Grupioni
Lourenço

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Nome: NAKAHARA, Gabriela Hikari Miranda Nakahara

Título: Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã Dentista.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Dedico este trabalho aos meus pais
por todo o apoio e amor e ao Pink, meu
eterno companheiro, onde quer que esteja.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por todas as oportunidades que me foram dadas.

Ao corpo docente, pelo compartilhamento de tanto conhecimento e experiências, que tornou essa jornada única.

Ao meu orientador, pela oportunidade, dedicação, apoio e paciência com a minha pessoa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, por todo o esforço que fizeram para me dar a oportunidade de concluir meus estudos.

Aos meus amigos Bárbara do Bem Balbino, Rodolfo Maestrello Zerbato e Thainá Nasato Fioravanti, que viveram esses cinco anos de graduação intensamente comigo e foram essenciais para a minha trajetória.

RESUMO

NAKAHARA, G. H. M. **Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Alguns estudos têm verificado maiores comorbidades relacionadas às espécies de *Candida* em pacientes com tuberculose (TB). No entanto, poucos trabalhos avaliaram o impacto da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* sobre a prevalência e virulência da *Candida* spp. na cavidade oral. Este estudo avaliou a prevalência e a virulência das espécies de *Candida* isoladas de 15 pacientes com TB e 15 pacientes sistemicamente saudáveis. Os participantes com TB foram avaliados em dois diferentes momentos: com menos de 45 dias de tratamento e com mais de 120 dias de tratamento anti-TB. As diferentes espécies de *Candida* isoladas do enxaguado bucal desses pacientes foram avaliadas quanto sua prevalência, quantificação, capacidade de formação de biofilme, produção de proteinase e fosfolipase e capacidade de formação de pseudohifas. Os participantes com TB apresentaram maiores Unidades Formadoras de Colônias e prevalência de diferentes espécies de *Candida*, sobretudo após 120 dias de tratamento anti-TB. As *Candida albicans* isoladas de pacientes com TB possuem maior atividade de fosfolipase e proteinase do que aquelas isoladas de pacientes saudáveis. As *Candida albicans* e não *albicans* apresentaram fatores de virulência semelhantes. O diagnóstico clínico de TB, assim como o tempo de tratamento anti-TB, estiveram associados ao maior carregamento e prevalência de diferentes espécies de *Candida*, assim como com o aumento da atividade das fosfolipases e proteinases de *Candida albicans* isoladas desses pacientes. O aumento da prevalência, quantificação e virulência de *Candida* isolada de paciente com TB, atenta para o maior risco de lesões orais e disseminações sistêmicas em pacientes com TB.

Palavras-chave: *Candida*. Tuberculose. Prevalência de *Candida* spp. Tratamento antituberculose.

ABSTRACT

NAKAHARA, G. H. M. **Prevalence and virulence of *Candida* spp. in patients with tuberculosis**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Some studies have verified greater comorbidities related to *Candida* species in patients with tuberculosis (TB). However, few studies have evaluated the impact of *Mycobacterium tuberculosis* infection on the prevalence and virulence of *Candida* spp. in the oral cavity. The present study evaluated the prevalence and virulence of *Candida* species isolated from 15 patients with TB and 15 systemically healthy patients. Participants with TB were evaluated at two different times: for less than 45 days of treatment and more than 120 days of anti-TB treatment. The different *Candida* species isolated from the mouthwash of these patients were evaluated for their prevalence, quantification, capacity to form biofilm, production of proteinase and phospholipase, and capacity to form pseudohyphae. Participants with TB had higher Colony-forming Unit and prevalence of different *Candida* species, especially after 120 days of anti-TB treatment. *Candida albicans* isolated from TB patients have greater phospholipase and proteinase activity than those isolated from healthy patients. *Candida albicans* and non-*albicans* showed similar virulence factors. The clinical diagnosis of TB, as well as the duration of anti-TB treatment, were associated with higher transport and prevalence of different *Candida* species, as well as with increased activity of *Candida albicans* phospholipases and proteinases isolated from these patients. The increase in the prevalence, quantification and virulence of *Candida* isolated from a TB patient points to the increased risk of oral lesions and systemic dissemination in TB patients.

Keywords: *Candida*. Tuberculosis. Prevalence of *Candida* spp. Anti-tuberculosis treatment.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVO.....	13
2.1	Objetivos gerais.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	População.....	14
3.2	Controle de vieses.....	14
3.3	Métodos clínicos.....	15
3.3.1	Anamnese.....	16
3.3.2	Exame físico intra e extraoral.....	16
3.3.3	Coleta do enxague bucal.....	16
3.4	Análise da prevalência e quantificação de <i>Candida</i> spp. em pacientes saudáveis e em pacientes com TB.....	16
3.4.1	Quantificação de <i>Candida</i> spp.....	17
3.4.2	Identificação das espécies de <i>Candida</i> spp.....	17
3.4.2.1	Identificação por CHROMagar™.....	17
3.4.2.2	Extração do DNA das leveduras.....	17
3.4.2.3	Reação de PCR.....	18
3.5	Estudo da virulência de isolados de <i>Candida</i> spp. de pacientes saudáveis e com TB.....	19
3.5.1	Avaliação do metabolismo celular.....	19
3.5.2	Avaliação da produção de proteinase e fosfolipase.....	19
3.5.3	Avaliação de formação de hifas.....	20
3.6	Análise estatística.....	20
4.	RESULTADOS.....	22
4.1	Diversidade de espécies de <i>Candida</i> nos grupos estudados.....	23

4.2 Carreamento de <i>Candida</i> spp. nos grupos estudados.....	24
4.3 Estudo da virulência das diferentes espécies de <i>Candida</i> isoladas de pacientes sistemicamente saudáveis e com diagnóstico clínico de TB.....	24
4.4 Estudo da virulência entre as diferentes espécies de <i>Candida</i> isoladas dos participantes do estudo	31
5. DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS*	38

1. INTRODUÇÃO

Recentes estudos têm verificado um aumento nas comorbidades relacionadas à *Candida* spp. em pacientes com tuberculose (TB) (Latha et al., 2011; Chen et al., 2015). Estudos observacionais transversais constataram um maior número de casos de candidíase em pacientes com TB, assim como maior carreamento de espécies de *Candida* na cavidade oral (Shiboski et al., 2014; Astekar et al., 2016). Muito possivelmente, essas alterações estejam relacionadas ao tratamento antibiótico de longa duração ministrado para o tratamento da TB (De Vriese et al., 1998; Rekha et al., 2005). De nosso conhecimento, não existem estudos que verifiquem a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência de diferentes espécies de *Candida* na cavidade bucal, tampouco sobre a influência do diagnóstico clínico da TB e de seu tratamento sobre a virulência de espécies de *Candida*.

A OMS reconhece a tuberculose como a doença infecciosa que mais mata, superando a infecção pelo HIV e a malária juntos. A população mais vulnerável à TB são os indivíduos infectados com HIV, indivíduos privados de liberdade, indivíduos em situações de rua e indígenas. Em 2015, 4.543 óbitos decorreram da TB no Brasil (Brasil, 2017).

A TB é causada por uma micobactéria, a *Mycobacterium tuberculosis*, que pode acometer uma série de órgãos e sistemas, sendo a forma pulmonar a responsável pela manutenção e transmissão da doença (Castelo Filho et al., 2004). A TB ativa é predominante no sexo masculino (67%) e atinge prioritariamente a faixa de 20 a 49 anos. Cerca de 80% dos casos são pulmonares, e 20% são extrapulmonares (Piller, 2012).

O tratamento da TB envolve o uso de antimicrobianos por tempo prolongado, podendo durar mais de dois anos, e algumas vezes associados ao uso de corticosteroides. O tratamento da TB requer associação antimicrobiana e muitas vezes supervisão da administração das drogas, devido ao tratamento longo e baixa adesão. O esquema terapêutico mais comum, denominado de esquema básico é dividido em duas fases. Na primeira fase, fase intensiva, faz-se o uso de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (RIPE). Esta fase tem duração média de 2 meses e visa reduzir a transmissão, a morbidade e a resistência microbiana. A segunda fase, denominada de fase de manutenção, é àquela em que o bacilo está em crescimento lento. Esta fase tem o objetivo de eliminar os bacilos persistentes

proporcionando uma cura efetiva e duradoura da TB. Nesta fase, o número de antimicrobiano é reduzido, sendo geralmente utilizadas a Rifampicina e a Isoniazida (RI) com duração média de 4 meses (Castelo Filho et al., 2004).

A patogênese da TB, associada com o longo uso de antibióticos, torna-se fator preditivo para superinfecções fúngicas e não raramente encontramos relatos de infecções fúngicas associadas à TB pulmonar ativa (Astekar et al., 2016; Fontalvo et al., 2016; Chen et al., 2015). A prevalência de casos de co-infecção de TB pulmonar e *Candida* é de cerca de 15-32% em diferentes estudos (Naz; Tariq, 2004; Vargas-Montiel, 1999).

A *Candida* compreende um grande gênero de mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 20 estão associadas a patologias humanas, dentre elas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Dadar et al., 2018). Embora presente de maneira comensal no trato digestivo e, sobretudo, na cavidade oral, alguns estudos mostraram que a colonização oral assintomática pode levar à lesão oral ou tornar-se uma fonte de infecções disseminadas (Lockhart et al., 1999; Vargas et al., 2002; Fidel et al., 2006). As infecções sistêmicas provocadas pela *Candida* possuem uma taxa de mortalidade de 40% (Guerrero et al., 2016).

Não apenas o estado imunológico e comorbidades estão associados à prevalência da *Candida*. Outros fatores relacionados à levedura, denominados fatores de patogenicidade ou virulência, influenciam a forma como a infecção é apresentada e sua gravidade (Riceto et al., 2015). Entre os principais fatores de virulência da *Candida* spp., está a formação de hifas, a produção de exoenzimas, proteinases e fosfolipases e a capacidade de formação de biofilme. Estes fatores auxiliam na evasão das defesas do hospedeiro e na instalação da infecção (Sardi et al., 2013; Mello et al., 2016).

A formação de biofilme confere uma maior resistência aos antimicrobianos e proteção contra as defesas do hospedeiro (Mello et al., 2016), já a produção de enzimas e a formação de pseudohifas são responsáveis por danos na membrana celular do hospedeiro, propiciando sua aderência e invasão para camadas celulares mais profundas dos tecidos (Lyon et al., 2006). Embora a gravidade das infecções por *Candida* tenha sido atribuída à imunodeficiência dos hospedeiros, estudos genotípicos e fenotípicos têm demonstrado grande associação entre a seleção natural de cepas e respectivo aumento de virulência com colonização de *Candida* (Mane et al., 2012).

Devido ao relatado aumento na prevalência de *Candida* spp. em pacientes com TB e devido ao risco de *Candida* spp. comensais serem fontes para sua disseminação sistêmica, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, faz-se necessário o estudo da população de espécies de *Candida* spp. na cavidade bucal desses pacientes. Da mesma forma é fundamental o estudo dos fatores predisponentes para esse aumento, como por exemplo, diagnóstico clínico da TB, tempo de tratamento anti-TB, dentre outros.

1. OBJETIVO

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a prevalência, quantificação e virulência de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de indivíduos com TB em diferentes fases do tratamento anti-TB, comparando-os aos indivíduos sistemicamente saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a influência do diagnóstico clínico da TB e do tempo de tratamento anti-TB sobre quantificação e prevalência das diferentes espécies de *Candida* spp. na cavidade bucal.

2.2.2 Avaliar e comparar os fatores de virulência entre as diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes sistemicamente saudáveis e de pacientes em diferentes fases do tratamento anti-TB. Da mesma forma, verificar se os fatores de virulência entre as mesmas espécies sofrem alterações de acordo com a presença de diagnóstico clínico de TB e do tempo de tratamento anti-TB. Serão avaliados os seguintes fatores de virulência: capacidade de formação de biofilme; produção de proteinases; produção de fosfolipases; capacidade de formação de pseudohifas e hifas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

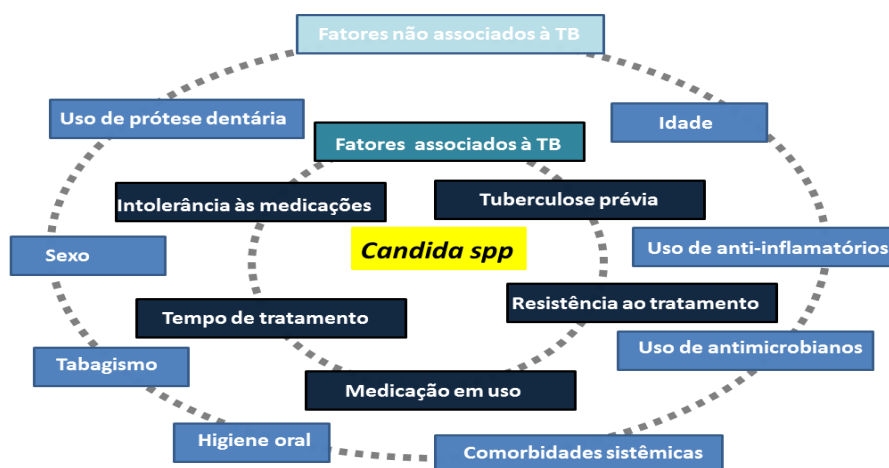
3.1 População

Pacientes em seguimento no ambulatório de moléstias infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) ou na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) foram convidados para este estudo. Foram incluídos 15 participantes com diagnóstico clínico de TB e 15 participantes sem diagnóstico clínico de TB. Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e deram seu consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FORP (CAAE 87787018.0.00005419) e do HCFMRP-USP (CAAE 8978018.0.300115440).

3.2 Controle de vieses

Além dos objetivos dessa pesquisa, outros fatores podem influenciar a prevalência de *Candida spp.* na cavidade oral, como exemplificados na figura 1.

Figura 1 – Diagrama de causalidade.



Fonte: Lourenço (2019).

A fim de diminuirmos os possíveis fatores de confusão, os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes fatores de inclusão:

1. Pacientes sistemicamente saudáveis: não apresentar envolvimento sistêmico que possa interferir na prevalência e na contagem de *Candida spp.*, como diabetes mellitus, tratamento antineoplásico ou estado de imunossupressão; não ter feito uso de medicação antimicrobiana e anti-inflamatória nos últimos 3 meses; não

apresentar envoltimentos protéticos extensos, como uso de prótese total ou uso de prótese parcial removível com cobertura palatina.

2. Pacientes com TB: além de seguirem os mesmos critérios descritos para os pacientes sistemicamente saudáveis, os pacientes apresentaram TB confirmada por exame de cultura do escarro, teste rápido molecular e/ou baciloscopia.

Para diminuirmos a influência de outros fatores, o grupo de pacientes sistemicamente saudáveis e o grupo de pacientes com TB foram pareados por idade, sexo e número de tabagistas. Para diminuir a influência da condição oral no estudo, os dois grupos foram pareados pelo índice de CPO-D (Número médio de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados) e de PSR (Periodontal Screening Index). Para tanto, os participantes sistemicamente saudáveis foram selecionados com base no índice de COP-D e PSR encontrados nos participantes com TB.

Os participantes foram divididos em dois grupos de acordo com a presença de diagnóstico clínico de TB.

Grupo controle: composto por 15 pacientes sem diagnóstico clínico de TB.

Grupo TB: composto de 15 participantes com diagnóstico clínico de TB.

A fim de verificarmos a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência, contagem, virulência da *Candida* spp., os participantes do grupo TB foram avaliados duas vezes em tempos distintos.

Tempo 1: foram coletadas amostras de enxaguado bucal de pacientes diagnosticado com TB em tratamento antibiótico há menos de 45 dias.

Tempo 2: foram coletadas amostras de enxaguado bucal dos mesmos pacientes do tempo 1, quando estes estivessem sob tratamento antibiótico por mais de 120 dias.

Os tempos limítrofes de 45 dias e 120 dias foram estabelecidos de acordo com os resultados prévios encontrados por Querido e colaboradores em 2011 e Astekar e colaboradores em 2016.

3.3 Métodos clínicos

Os participantes foram submetidos a exame clínico-anamnésico e coleta das amostras, como se segue:

3.3.1 Anamnese

Os participantes foram submetidos a um questionário sobre suas condições médico-odontológicas. Algumas questões foram dirigidas diretamente ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e história odontológica. Informações sobre tempo de TB, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso e sintomatologia persistente foram obtidas por meio de consulta ao prontuário médico.

3.3.2 Exame físico intra e extraoral

No exame físico extraoral foram avaliados linfonodos, alterações cutâneas faciais e alterações perilabiais. No exame intrabucal foram avaliados: língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole e tonsilas. Número de dentes cariados, perdidos e obturados compuseram o índice COP-D; Avaliação Periodontal Simplificada (PSR) foi realizada utilizando sonda periodontal modelo 621, determinada pela Organização Mundial da Saúde (WHO-621), seguindo os critérios estabelecidos pela American Dental Association e a American Academy of Periodontology, 1992.

3.3.3 Coleta do enxague bucal

A contagem de *Candida* spp. foi realizada nas amostras de enxágue bucal com tampão fosfato-salino (PBS) pela técnica descrita por Samaranayake, em 1986. Um dia antes da coleta, foram preparados frascos contendo 10mL de PBS (pH7,3, 0,1M) esterilizados em autoclave. Esses frascos contendo PBS estéril foram acondicionados em temperatura de 4°C até seu uso. O participante foi convidado a realizar bochecho com 10mL de PBS por 60 segundos e expectorar dentro de um coletor universal. O coletor universal foi acondicionado à 4°C e conduzido imediatamente ao laboratório, onde foi centrifugado (2000g por 10 minutos). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido depositado no fundo do tubo falcon ressuspenso em PBS até que se atingisse 1mL de solução. A partir desse 1mL de solução realizou-se a análise da prevalência e quantificação de *Candida* spp.

3.4 Análise da prevalência e quantificação de *Candida* spp. em pacientes saudáveis e em pacientes com TB

3.4.1 Quantificação de *Candida* spp.

A quantificação da *Candida* spp. foi realizada no enxaguado bucal. Para tanto, 100µL de amostra pura do enxaguado e diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} foram semeadas em duplicata em placas de Petri de cultura com Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol e incubadas em estufa de cultura à 37°C por 48 horas. As culturas positivas foram contadas e obtidas as médias das duplicatas para a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A UFC foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $UFC = (\text{colônias encontradas} \times 10^n) / \text{quantidade em mL da solução utilizada}$; sendo n o valor absoluto da diluição.

3.4.2 Identificação das espécies de *Candida* spp.

3.4.2.1 Identificação por CHROMagar™

Para a identificação das espécies de *Candida*, 100µL de amostras do enxaguado bucal e de suas diluições foram semeados em placa de Petri contendo CHROMagar *Candida*™ (Difco, Detroit, USA), à 37°C por 48 horas. O meio CHROMagar™ identificou de maneira presuntiva as espécies de *Candida* baseadas nas diferentes tonalidades que essas adquiriram. Uma colônia de cada cor foi expandida em caldo Sabouraud Dextrose e armazenada com 15% de glicerol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em freezer -80°C, para posterior confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para o PCR, foi realizada a extração do DNA de todas as espécies isoladas dos pacientes e dos DNAs das seguintes cepas comerciais *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 90018), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. dubliniensis* (ATCC 7987) para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição.

3.4.2.2 Extração do DNA das leveduras

Alíquota das *Candidas* isoladas de pacientes e das cepas comerciais foram semeadas em estrias múltiplas em placa de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Após 24 horas de crescimento, uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio com 10mL de caldo Sabouraud Dextrose. Após 24 horas, os respectivos tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3200g. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise (200 mM de Tris-HCl; 250 mM de NaCl; 25 mM de EDTA; 0,5% de Solução de Dodecil Sulfato de Sódio), associados à 500µg

de pérolas de vidro (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), de 425-600µm de diâmetro, lavadas previamente com ácido clorídrico. As amostras foram levadas a agitador e homogeneizadas por 10 minutos. Todo o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL com 500µL de fenol-clorofórmio (1:1) (*Sigma*). Em seguida, os microtubos foram novamente agitados, por 10 minutos e centrifugados a 2000g por 10 min. A fase aquosa obtida desta centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5mL e a ela foi adicionado 1mL de isopropanol (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Uma nova centrifugação foi realizada e o *pellet* resultante foi lavado com 500µL de etanol a 70% (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Após nova centrifugação por 5 minutos, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 50 µL de água ultra pura e submetidas a um tratamento com 20µg/mL de RNase (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*) em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Após o tratamento, 1µL de cada amostra foi diluída em 49µL de água e quantificada em espectrofotômetro (*BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Nagaokakyo, Quioto, Japão*). A medida da absorbância foi realizada em 260nm e 280nm e a razão 260/280 determinou a pureza da amostra. A integridade do DNA foi avaliada aplicando-se as amostras em gel de agarose (*Agargen, Torrejon de Ardoz, Espanha*). Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas à -20°C.

3.4.2.3 Reação de PCR

A reação de PCR foi conduzida pela amplificação parcial (IGS2) e total do IGS através de *primers* descritos por Cornet et al., 2011. Utilizamos os *primers* para a amplificação parcial do IGS (IGS2): 5'-TTAACTACAGTTGATCGGAC-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) para as espécies de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. A amplificação total do IGS: 5'-CGATCTGCTGAGATTAAG-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) foi realizada para a identificação da *Candida parapsilosis*. Para amplificação, utilizamos um mix contendo 10pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5nmol de dNTP (*Qiagen, Hilden, Alemanha*), 1,5U *Taq polymerase* (*Sigma*), 10% de tampão da *Taq polymerase* (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), e 50ng de DNA, em um volume final de 25µL, que foi submetido à ciclagem térmica com desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 48°C, 2 minutos e 30 segundos à 72°C e um passo de alongação final de 5 minutos à 72°C. O produto da amplificação foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição para

determinação do polimorfismo dos fragmentos de restrição necessários para a identificação das espécies de *Candida*. Para tanto utilizamos: enzima NlaIII (*New England BioLabs, Massachusetts, USA*) para o IGS2 e enzima AluI (*Invitrogen, Waltham, MA*) para o IGS. A análise de cada matriz de gel foi realizada por meio de comparação visual dos padrões de bandas das cepas que foram identificadas com as cepas de referência e com o padrão de peso molecular.

3.5 Estudo da virulência de isolados de *Candida* spp. de pacientes saudáveis e com TB

3.5.1 Avaliação do metabolismo celular

A capacidade de formação de biofilme das *Candidas* isoladas foi avaliada de acordo com a atividade metabólica. Para tanto, formou-se biofilme com as colônias isoladas em placa de poliestireno de 96 poços de fundo em U. Foram preparadas suspensões contendo 1×10^6 células de leveduras por mL de RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (*LGC Biotecnologia*) e tamponado com 0,165M de MOPS (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Em seguida, 100 μ l das suspensões foram plaqueadas e incubadas à 37°C. A atividade metabólica foi avaliada por ensaio XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] que se baseia na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de converterem o sal tetrazólio XTT (amarelo) em um produto solúvel em água (laranja). O XTT à 1mg/ mL em PBS foi adicionado na razão de 20:1 em solução de menadiona (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*) à 0,4 mM diluída em acetona (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). As placas foram incubadas à 37° em ambiente escuro por 2h e a leitura obtida à 492nm.

3.5.2 Avaliação da produção de proteinase e fosfolipase

Inicialmente, o caldo de cultura Sabouraud Dextrose foi inoculado com uma concentração de 10^6 cél/mL das diferentes espécies de *Candida* e incubado à 37°C por 24 horas. Após esse período, 1mL de suspensão celular foi transferido para microtubos e centrifugado à 6000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise da produção de protease e o resíduo sólido para a análise da produção da fosfolipase.

A quantificação da proteínase foi realizada através de kit fluorimétrico *EnzChek® Protease Assay Kit (Molecular Probe, Oregon, USA)*. Em uma placa de 96

poços foram adicionados 100µL do sobrenadante e 100µL da solução caseína *BODIPY* diluída 20 vezes em tampão de digestão. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas em área protegida da luz. A leitura da fluorescência foi realizada em fluorímetro (*Synergy II, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA*), com excitação de 485nm e emissão em 538nm. Juntamente foi realizada curva padrão para a determinação enzimática.

Para a avaliação da produção de fosfolipase, o material sólido obtido por centrifugação foi ressuspenso em tampão de lise (2M TrisHCl, 1 M CaCl₂, pH 7,4) e posteriormente levado à agitação por 20 segundos e novamente centrifugado por 5 minutos à 10000rpm (*centrifuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*). A avaliação da produção de fosfolipase foi realizada por meio do kit fluorimétrico *Amplex Red® Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay (Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)* segundo recomendações do fabricante. Para tanto, 100µL de solução, contendo 2% de Amplex Red (20mM), 1% de Horseradish Peroxidase, 2% de Alkaline Phosphatase, 1% de Choline Oxidase, 0,78% de Lecitina e 93,2% de tampão de digestão, foi adicionada à 100µL do lisado em cada poço de placa de 96 poços. A placa foi mantida à 37°C em estufa por 3 horas em região protegida de luz. A leitura da fluorescência foi realizada em fluorímetro (*Synergy II, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA*) com excitação em 544nm e emissão em 590nm. Os valores obtidos foram comparados com os valores de fluorescência dos controles positivos fornecidos pelo fabricante.

3.5.3 Avaliação de formação de hifas

Um volume de 3×10^6 células/mL foi transferido para 5mL de meio 199 indutor de hifas (*LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (*LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). Após incubação à 37°C por 3 horas sob agitação de 80rpm (*centrifuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*) foi procedido a contagem de leveduras e hifas em câmara de Neubauer (*HBG, Alemanha*), com objetiva de 10x a 40x em microscópio óptico (*Bio-Focus Saintifik SDN BHD, Petaling Jaya, Malásia*).

3.6 Análise estatística

As análises dos resultados foram realizadas com o auxílio da assessoria estatística e com a utilização do software GraphPad Prism 5. Todos os testes tiveram

nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Para verificarmos a prevalência de cada espécie de *Candida* nos pacientes sistemicamente saudáveis (Grupo 1), comparando com as prevalências encontradas durante o tempo 1 e tempo 2 do grupo de pacientes com TB (Grupo 2) utilizamos o teste qui-quadrado. Da mesma maneira verificamos as diferenças de prevalências de espécies de *Candida* entre os tempos 1 e 2 dos pacientes com TB. Ainda, comparamos as UFC obtidas no grupo 1 com as obtidas no grupo 2 durante o tempo 1 e no tempo 2 utilizando o teste de Mann Whitney, e comparamos a contagem de UFC obtida nos tempo 1 e 2 do grupo 2 utilizando o teste de Wilcoxon.

Para estudo da virulência entre as diferentes espécies e de cada espécie nos diferentes grupos estudados utilizamos os seguintes testes: capacidade de formação de biofilme – Teste Anova (one-way) e pós-teste de Tukey; produção de fosfolipase, proteinase e formação de hifas – Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.

3. RESULTADOS

Participaram do estudo 30 indivíduos: 15 participantes sem diagnóstico clínico de TB e 15 participantes com diagnóstico clínico de TB pulmonar. A pesquisa foi baseada na coleta de enxaguado bucal dos 15 participantes com diagnóstico clínico de TB em dois tempos: quando estavam com menos de 45 dias de tratamento (tempo 1) e quando completaram mais de 120 dias de tratamento anti-TB (tempo 2). Já entre os participantes sem diagnóstico clínico de TB as análises foram realizadas em uma única coleta de enxaguado bucal.

Os dados demográficos e clínicos dos participantes estão sumarizados na Tabela 1. As análises dos dados demográficos e clínicos demonstram homogeneidade entre os participantes com diagnóstico clínico de TB (grupo TB) e os participantes sistemicamente saudáveis (grupo controle). A média de idade dos participantes com TB foi de 38 (\pm 16,6) e dos participantes sem diagnóstico clínico de TB foi de 41 (\pm 16,9) anos. No grupo TB e no grupo controle, 66,6% dos participantes foram homens. No entanto, o fluxo salivar dos participantes com TB foi menor do que o fluxo salivar dos participantes sistemicamente saudáveis ($p=0,005$), como pode ser verificado na Tabela 1.

Dentre os participantes com TB, 93% estavam em tratamento do esquema básico da TB com Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol durante a primeira fase do tratamento (tempo 1) e Rifampicina, Isoniazida na segunda fase do tratamento (tempo 2).

Tabela 1 – Perfil demográfico e clínico dos participantes incluídos no estudo.

(continua)

	TB	Controle	P valor
Participantes	15	15	
TB pulmonar	15	0	
Idade	38 (\pm 16,6)	41 (\pm 16,9)	0,60
Homens (%)	66,6	64,3	1,00
Mulheres (%)	33,3	35,7	1,00
PSR	2 (\pm 1)	1 (\pm 0,8)	0,28
Fluxo salivar (mL/min)	1 (\pm 0,6)	1,7 (\pm 0,5)	0,005

Tabela 1 – Perfil demográfico e clínico dos participantes incluídos no estudo.

(conclusão)

	TB	Controle	P valor
CPO-D	8,2 (\pm 5,9)	10,2 (\pm 7,2)	0,88

4.1 Diversidade de espécies de *Candida* nos grupos estudados

No grupo de pacientes sem TB, a prevalência de *Candida* spp. foi de 33,3%, sendo a *Candida albicans* presente em 26,7% dos participantes e a *Candida dubliniensis* em 13,3%. Em um único participante foi isolado as duas espécies. Uma maior prevalência e diversidade de espécies de *Candida* foram encontradas no grupo TB, sobretudo no tempo 2, quando comparado ao grupo controle ($p=0,001$, teste Qui-quadrado), como identificado na Tabela 2.

No tempo 1 do grupo TB, a prevalência de *Candida* spp. foi de 86,7%, já no tempo 2 esse número foi elevado para 100%.

A *Candida albicans* foi mais prevalente no grupo TB ($p=0,011$), com prevalência no tempo 1 e no tempo 2 de 80%. O mesmo ocorreu com a *Candida tropicalis* ($p=0,017$), que não esteve presente no grupo controle e esteve presente em 6,7% dos participantes no tempo 1 e em 33,3% no tempo 2 do grupo TB.

A prevalência da *Candida dubliniensis* foi de 13,3% no grupo controle, 6,7% no tempo 1 e de 26,7% no tempo 2 do grupo TB. A *Candida glabrata* não foi identificada em nenhum dos participantes do grupo controle ou no tempo 1 do grupo TB, no entanto, foi isolada na cavidade oral de 2 (13,3%) participantes do tempo 2.

Tabela 2 – Prevalência das diferentes espécies de *Candida* nos grupos estudados.

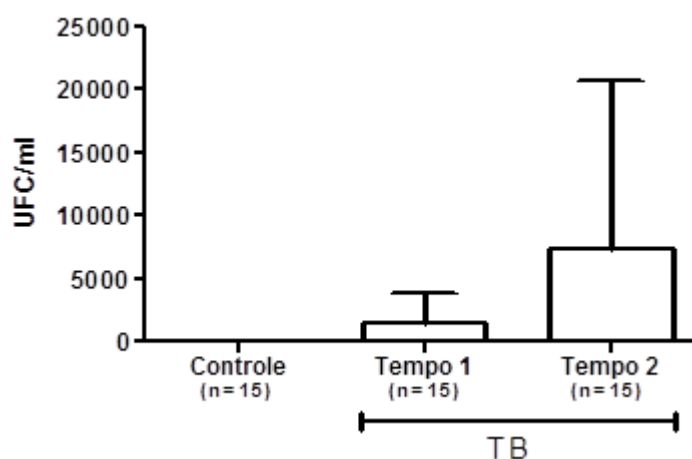
	Controle	TB		P valor
		Tempo 1	Tempo 2	
<i>Candida</i> spp.	33,3%	86,7%	100%	0,001*
<i>C. albicans</i>	26,7%	80%	80%	0,011*
<i>C. tropicalis</i>	-	6,7%	33,3%	0,017*
<i>C. dubliniensis</i>	13,3%	6,7%	26,7%	0,306
<i>C. glabrata</i>	-	-	13,3%	0,123

*Teste Qui-Quadrado

4.2 Carreamento de *Candida* spp. nos grupos estudados

A contagem de UFC de *Candida* spp. esteve maior nos participantes com diagnóstico clínico de TB, quando comparados ao grupo controle ($p=0,0002$, teste de Kruskal Wallis). Os participantes sem diagnóstico clínico de TB tiveram média de 9 ± 17 UFC/ml, enquanto os quinze participantes com tuberculose no tempo 1 tiveram média de 1540 ± 1670 UFC/ml e, no tempo 2 a UFC foi elevada para 7344 ± 14207 UFC/ml, como demonstrado na Figura 2. No entanto, no grupo TB, embora numericamente mais elevado, a UFC do tempo 2 não foi estatisticamente superior ao do tempo 1 ($p=0,426$ – Wilcoxon matched pairs signed rank test).

Figura 2 - Média das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro entre os participantes sem diagnóstico clínico de TB e nos participantes com TB no tempo 1, com menos de 40 dias de tratamento, e no tempo 2, com mais de 120 dias de tratamento anti-TB ($p=0,0002$, teste de Kruskal Wallis).



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).

4.3 Estudo da virulência das diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes sistemicamente saudáveis e com diagnóstico clínico de TB

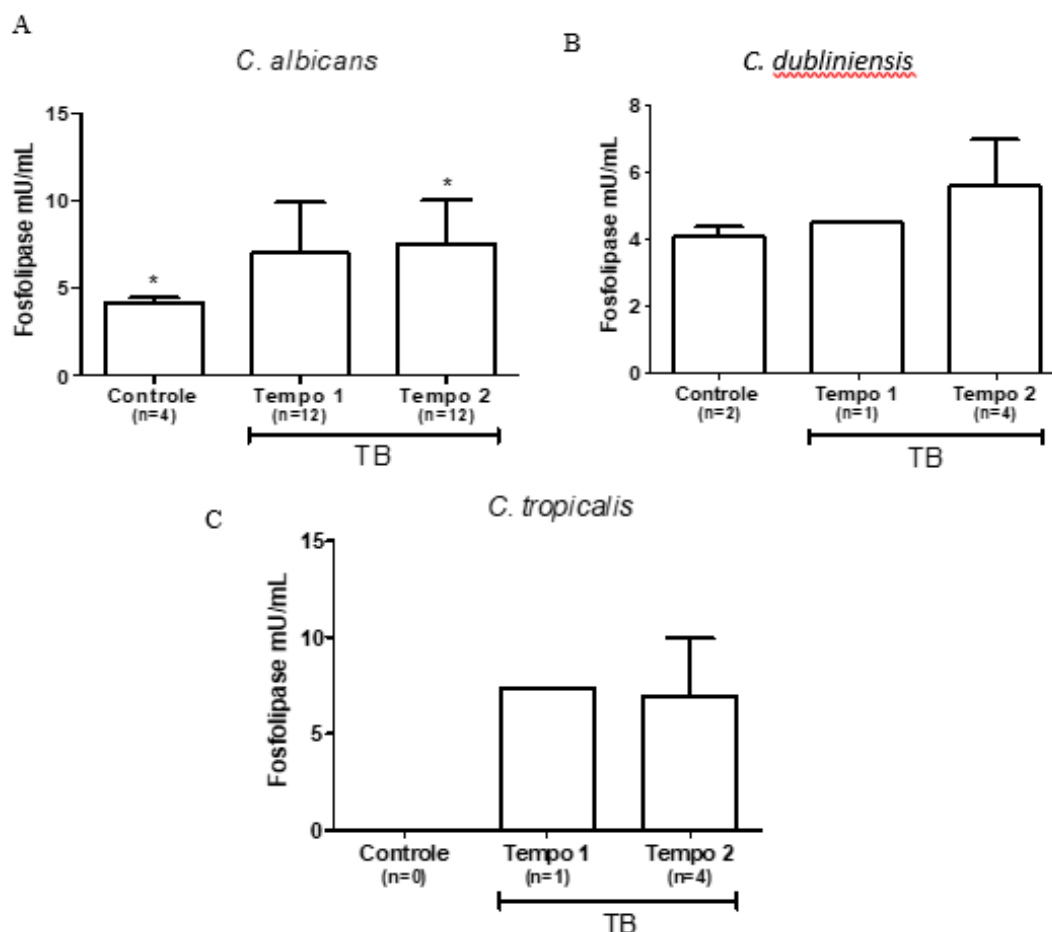
Para a determinação da virulência das diferentes espécies de *Candida*, foram analisados quatro parâmetros: atividade de proteinase, atividade de fosfolipase, atividade de biofilme pelo ensaio XTT e formação de hifas. Vale destacar que em alguns participantes não foram isoladas nenhuma colônia de *Candida* spp., sobretudo no grupo controle, e que os estudos sobre a virulência se baseiam apenas naqueles participantes que tiveram colônias de diferentes espécies de *Candida* isoladas.

Os isolados de *Candida albicans* dos pacientes com TB apresentaram maior atividade de fosfolipase quando comparado ao grupo controle, sobretudo àquelas

isoladas durante o tempo 2 ($p=0,034$ – teste de Kruskal Wallis). No grupo controle ($n=4$), a atividade de fosfolipase foi de $4,2 (\pm 0,3)$ mU/mL, enquanto no grupo TB, essa atividade foi aumentada para $7,0 (\pm 2,8)$ mU/mL no tempo 1 ($n=12$) e para $7,6 (\pm 2,5)$ mU/mL no tempo 2 ($n=12$) ($p=0,034$), como demonstrado na Figura 3A.

Nas demais espécies de *Candida* não foram verificadas diferenças na atividade de fosfolipase entre os grupos estudados. Para a *Candida dubliniensis*, a média de atividade para o grupo controle ($n=2$) foi de $4 (\pm 0,3)$ mU/mL, já para o com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 ($n=1$) a média de atividade de fosfolipase foi de $4,5$ mU/mL e $5,6 (\pm 1,4)$ mU/mL no tempo 2 ($n=4$) ($p=0,134$), como demonstrado na Figura 3B. A *Candida tropicalis* foi isolada apenas nos pacientes com TB. As médias de atividade de fosfolipase foram $1,8$ mU/mL para o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 ($n=1$) e $6,9 (\pm 3)$ mU/mL para no tempo 2 ($n=4$), como demonstrado na Figura 3C. A *Candida glabrata* foi isolada apenas em dois pacientes com TB sob tratamento a mais de 120 dias (tempo 2) e apresentou média de atividade de fosfolipase de $4,7 (\pm 1,3)$ mU/mL.

Figura 3 – (A) Atividade de fosfolipase de *Candida albicans* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,034$). (B) Atividade de fosfolipase de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,134$). (C) Atividade de fosfolipase de *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).

n: número colônias isoladas.

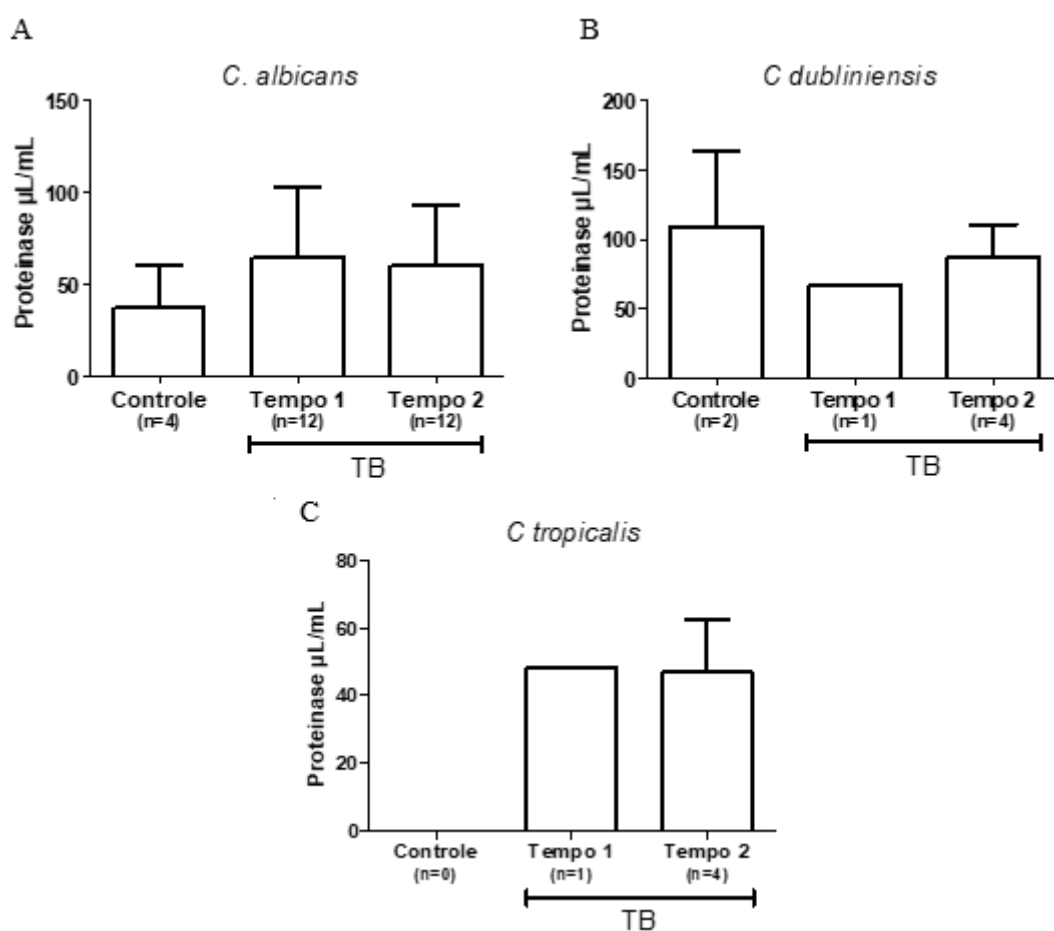
*Significância estatística – Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

A atividade de proteinase foi maior nas *C. albicans* isoladas no grupo TB, quando comparada ao grupo controle, muito embora, sem significância estatística ($p=0,348$). A atividade média de proteinase foi de $37,5 (\pm 22) \mu\text{L/mL}$ para o grupo de pacientes sem diagnóstico clínico de TB ($n=4$). No entanto, entre os pacientes com TB, a atividade de proteinase foi aumentada para $63,9 (\pm 38,7) \mu\text{L/mL}$ no tempo 1 ($n=12$) e para $60,1 (\pm 32,2) \mu\text{L/mL}$ no tempo 2 ($n=12$) de tratamento anti-TB, como demonstrado na Figura 4A.

Também não verificamos diferença nas atividades da proteinase das demais espécies de *Candida* entre os grupos estudados, como demonstrado na Figura 4B e 4C. Para a *Candida dubliniensis*, as médias obtidas para atividade de proteinase

foram de 109,5 ($\pm 54,4$) $\mu\text{L/mL}$ para o grupo controle (n=2), 66,8 $\mu\text{L/mL}$ para o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 (n=1) e 86,6 ($\pm 24,2$) $\mu\text{L/mL}$ para o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 2 (n=4) (p=0,526). A *Candida tropicalis* foi isolada apenas entre os participantes com TB e apresentou atividade de proteinase de 12 $\mu\text{L/mL}$ no tempo 1 (n=1) e 46,9 ($\pm 15,5$) $\mu\text{L/mL}$ no tempo 2 (n=4) (Figura 4C). A *Candida glabrata* não foi isolada no grupo controle e no grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1. No tempo 2, esta espécie foi isolada em dois participantes com atividade de proteinase média de 37,1 ($\pm 29,4$) $\mu\text{L/mL}$.

Figura 4 – (A) Atividade de proteinase de *Candida albicans* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 (p=0,348). (B) Atividade de proteinase de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 (p=0,526). (C) Atividade de proteinase de *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

A capacidade de formação de biofilme foi semelhante entre os diferentes grupos estudados. As médias de formação de biofilme de *Candida albicans* foram de

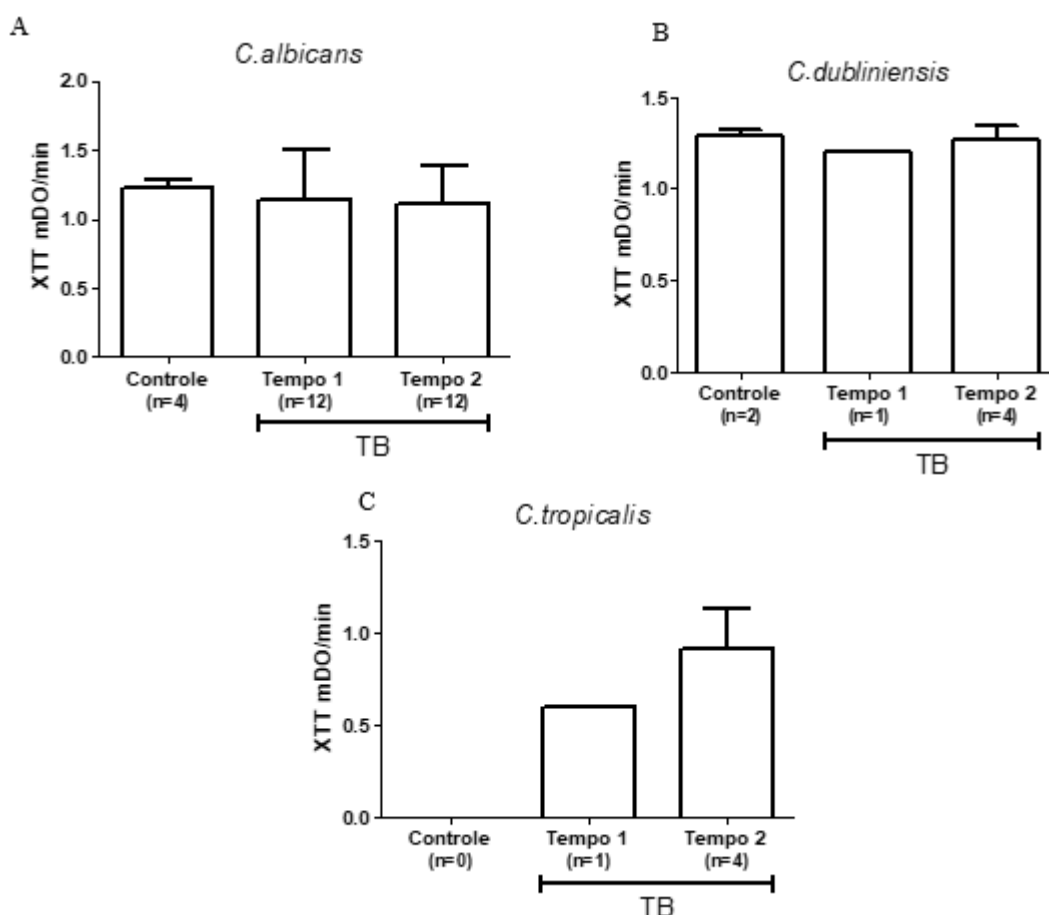
1,2 ($\pm 0,05$) mDO/min para o grupo controle (n=4), 1,1 ($\pm 0,4$) mDO/min para o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 (n=12) e 1,1 ($\pm 0,3$) mDO/min no tempo 2 (n=12) ($p=0,925$, teste de Kruskal Wallis) (Figura 5A).

Para a *Candida dubliniensis*, as médias obtidas no ensaio XTT foram de 1,3 ($\pm 0,03$) mDO/min no grupo controle (n=2), 1,2 mDO/min para o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 (n=1) e 1,3 ($\pm 0,07$) mDO/min no tempo 2 ($p=0,526$) (Figura 5B).

A *Candida tropicalis* não foi isolada entre os pacientes sem o diagnóstico clínico de TB. Entre os pacientes com TB, a capacidade de formação de biofilme foi de 0,1 mDO/min no tempo 1 (n=1) e 0,9 ($\pm 0,2$) mDO/min no tempo 2 (n=4) (Figura 5C).

A *Candida glabrata* não foi isolada tanto nas amostras do grupo controle quanto no grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1, obtendo média de 1,1 ($\pm 0,1$) mDO/min em duas colônias isoladas no tempo 2 do grupo com diagnóstico clínico de TB.

Figura 5 – (A) Capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,925$). (B) Capacidade de formação de biofilme de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes sem diagnóstico clínico de TB e de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,526$). (C) Capacidade de formação de biofilme de *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

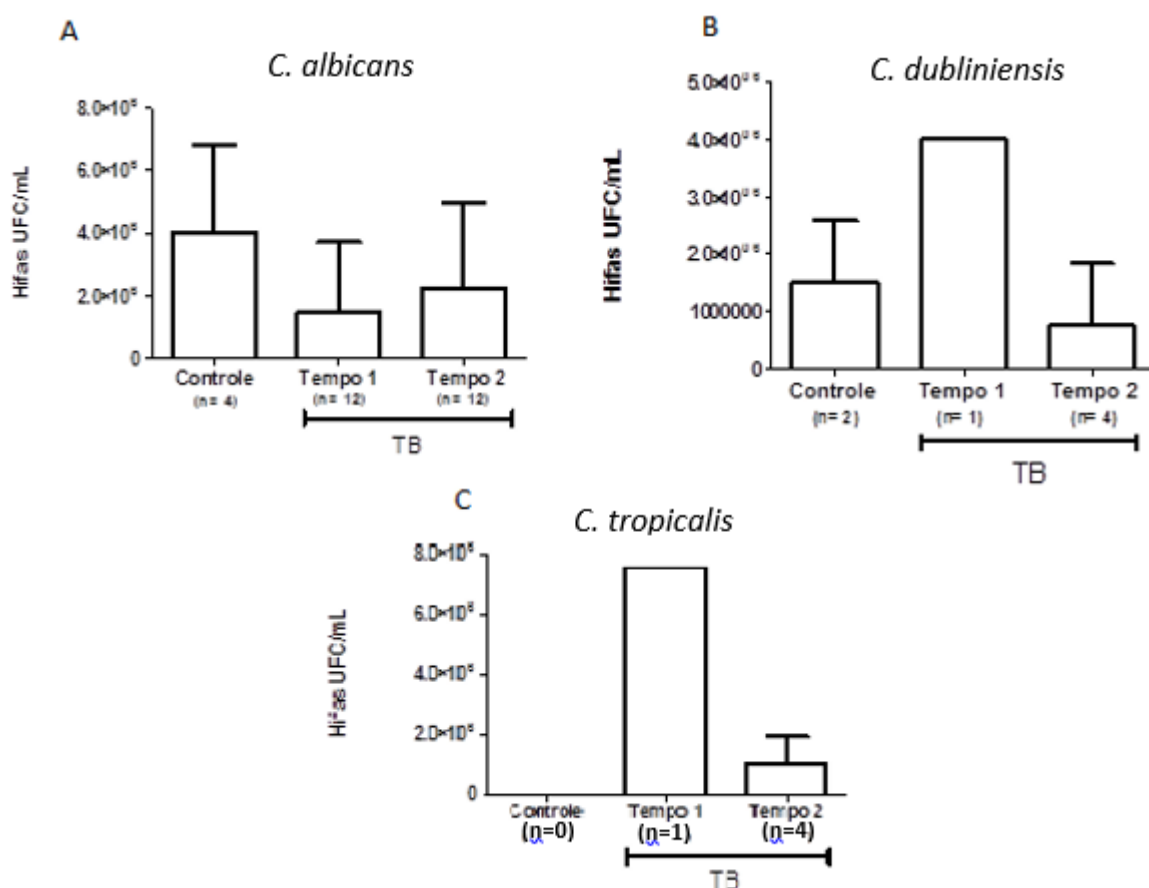
A capacidade de formação de hifas também foi semelhante entre as *Candida* spp. isoladas dos diferentes grupos de pesquisa. A capacidade de formação de hifas de *Candida albicans* isoladas no grupo controle foi de $4,0 \times 10^6$ ($\pm 2,7 \times 10^6$) UFC/mL, enquanto o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 ($n=12$) obteve $1,4 \times 10^6$ ($\pm 2,2 \times 10^6$) UFC/mL e, no tempo 2, $2,2 \times 10^6$ ($\pm 2,7 \times 10^6$) UFC/mL (Figura 6A).

A capacidade de formação de hifas de *Candida dubliniensis* isoladas também foram semelhantes entre os grupos estudados ($p=0,216$). O grupo controle ($n=2$) obteve média de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, já o grupo com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 ($n=1$) obteve $4,0 \times 10^6$ UFC/mL e no tempo 2 ($n=4$), $7,5 \times 10^6$ UFC/mL (Figura 6B).

Já a formação de hifas nas amostras de *Candida tropicalis* ocorreu apenas entre os grupos com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 (n= 1) e 2 (n=4). O primeiro obteve maior média de $7,5 \times 10^6$ UFC/mL e o segundo, $1,0 \times 10^6$ ($\pm 9,2 \times 10^5$) UFC/mL (Figura 6C).

As duas colônias de *Candida glabrata* isoladas no tempo 2 do grupo com diagnóstico clínico de TB apresentaram capacidade de formação de hifas de $1,2 \times 10^6$ ($\pm 1,7 \times 10^5$) UFC/mL.

Figura 6 – (A) Comparação de formação de hifas de isolados de *Candida albicans* entre o grupo controle e os grupos com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,181$). (B) Comparação de formação de hifas de isolados de *Candida dubliniensis* entre o grupo controle e os grupos com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2 ($p=0,216$). (C) Comparação de formação de hifas de isolados de *Candida tropicalis* nos grupos de participantes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 e 2.



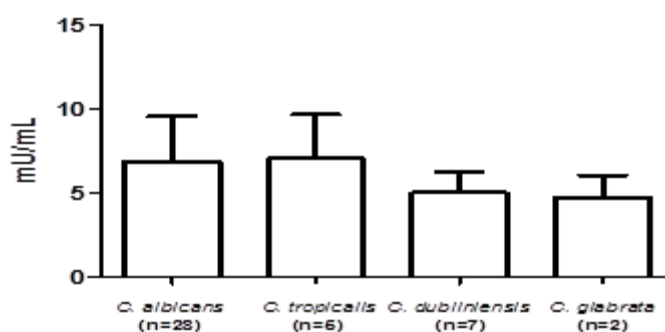
Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

4.4 Estudo da virulência entre as diferentes espécies de *Candida* isoladas dos participantes do estudo

A diferença na virulência entre as espécies foi mensurada a partir da média dos fatores de virulência de cada espécie, independentemente do grupo em que foram isoladas.

As diferentes espécies de *Candida* apresentaram atividade de fosfolipase semelhantes. A *Candida albicans* (n=28) apresentou atividade média de fosfolipase de 6,8 ($\pm 2,7$) mU/mL, enquanto que a *Candida tropicalis* (n=6) apresentou a segunda maior média de 7,0 ($\pm 2,6$) mU/mL, seguido da *Candida dubliniensis* (n=7) com 4,9 ($\pm 1,3$) mU/mL, e por último a *Candida glabrata* (n=2) com 4,7 ($\pm 1,3$) mU/mL ($p=0,188$) (Figura 7).

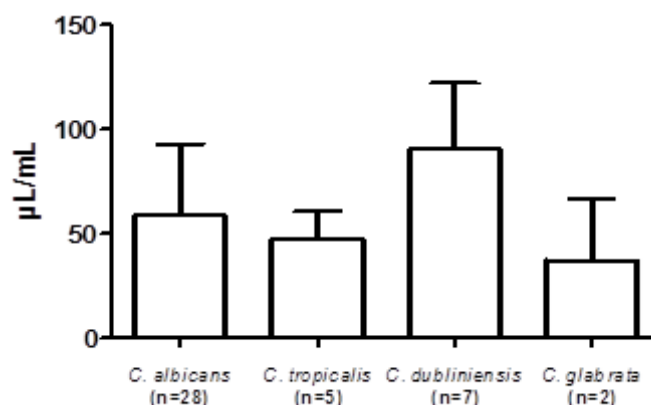
Figura 7 – Avaliação da atividade de fosfolipase em isolados das diferentes espécies de *Candida* ($p=0,188$).



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

Em relação à atividade de proteinase, a *Candida dubliniensis* (n=7) foi a que apresentou a maior média em relação as demais espécies com 90,3 ($\pm 31,8$) μ L/mL. A segunda espécie com maior atividade da proteinase foi a *Candida albicans* (n=28) com 58,5 ($\pm 34,1$) μ L/mL, seguida da *Candida tropicalis* (n=6) com 47,1 ($\pm 13,5$) μ L/mL e da *Candida glabrata* (n=2) com média de 37,1 ($\pm 29,4$) μ L/mL ($p=0,063$, teste de Kruskal Wallis) (Figura 8).

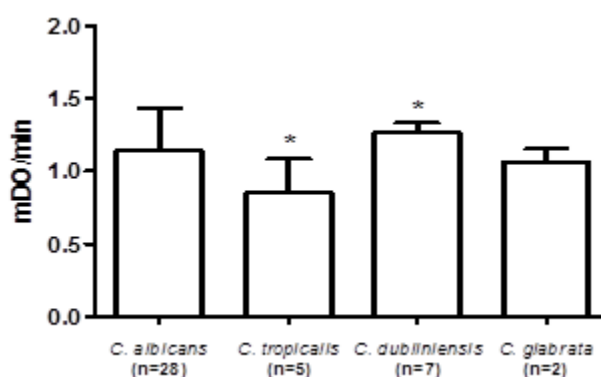
Figura 8 – Avaliação da atividade de proteinase em isolados das diferentes espécies de *Candida* ($p=0,063$).



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

Em relação ao ensaio XTT, a *Candida tropicalis* foi a que apresentou menor capacidade de formação de biofilme com média de 0,8 ($\pm 0,2$) mDO/min. Já a *Candida albicans* ($n=28$), a *Candida dubliniensis* ($n=7$) e a *Candida glabrata* ($n=2$) apresentaram capacidade de formação de biofilme semelhantes: 1,1 ($\pm 0,3$) mDO/min; 1,2 ($\pm 0,1$) mDO/min e 1,0 ($\pm 0,09$) mDO/min, respectivamente, como ilustra a Figura 9 ($p=0,054$).

Figura 9 – Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelo ensaio XTT em isolados das diferentes espécies de *Candida* ($p=0,054$).

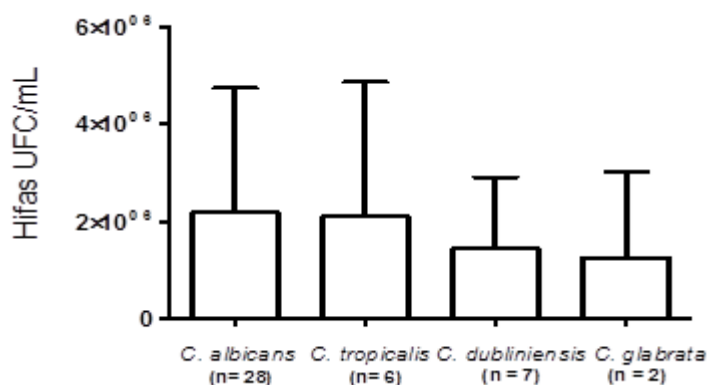


Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

As diferentes espécies de *Candida* apresentaram capacidade de formação de hifas semelhantes ($p=0,962$), como ilustra a Figura 10. A *Candida albicans* ($n=28$)

apresentou média de formação de hifas de $2,1 \times 10^6$ ($\pm 2,5 \times 10^6$) UFC/mL, a *Candida tropicalis* (n=6) obteve média de $2,0 \times 10^6$ ($\pm 2,7 \times 10^6$) UFC/mL, seguidas da *Candida dubliniensis* (n=7), com capacidade de formação de hifa média de $1,4 \times 10^6$ ($\pm 1,4 \times 10^6$) UFC/mL e a *Candida glabrata* (n=2) com média de $1,2 \times 10^6$ ($\pm 1,7 \times 10^6$) UFC/mL (p=0,962).

Figura 10 – Avaliação da formação de hifas em isolados de diferentes espécies de *Candida* spp.



Fonte: Elaborado pela Autora (2019).
n: número colônias isoladas.

4. DISCUSSÃO

Nosso estudo verificou maior prevalência e diversidade de espécies de *Candida* entre os pacientes com TB pulmonar quando comparados aos participantes sistemicamente saudáveis. A TB pulmonar é uma doença destrutiva crônica dos pulmões, onde a necrose caseosa associada à fibrose leva a formação de cavidades e dilatações bronquiectásicas. As cavidades pulmonares formam uma região ideal para a manutenção do *Mycobacterium tuberculosis*, assim como para diversos outros microrganismos, incluindo a *Candida albicans* que é isolada frequentemente no escarro de pacientes com TB e, embora não seja fator clínico significativo nas doenças pulmonares, pode ser responsável por complicações graves (Latha et al., 2011). Pacientes diagnosticados com TB apresentam maior risco de morte, mesmo após o tratamento da TB, em decorrências das sequelas pós-tuberculose e vulnerabilidade (Ranzani et al., 2019). Estudos observacionais transversais verificam maior prevalência de candidíase em pacientes com histórico de TB e maior carreamento de espécies de *Candida* na cavidade oral destes pacientes (Naz et al, 1999; Vargas-Montiel et al, 1999). A associação de infecção por *Candida* com um preditor de mortalidade em pacientes infectados pelo HIV (Gustafson et al., 2007) e sua maior prevalência em pacientes co-infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* e pelo HIV, nos fez atentar para o estudo da influência do diagnóstico de TB sobre a prevalência, carreamento e virulência de *Candida* spp. em pacientes com TB.

No presente estudo, avaliamos a prevalência de *Candida* spp. em dois diferentes momentos do tratamento anti-TB. A maioria dos pacientes (93%) estava em tratamento do esquema básico da TB, ou seja, utilizavam Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol durante a primeira fase do tratamento e Rifampicina, Isoniazida na segunda fase do tratamento. Somente um participante de nosso estudo estava em esquema alternativo de tratamento anti-TB. Esses esquemas são administrados quando o paciente cria resistência ao *Mycobacterium tuberculosis* ou intolerância as medicações (Rabahi, 2017). Nosso trabalho verificou maior prevalência de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes com TB, tanto no início do tratamento, denominado de fase intensiva, como na segunda fase do tratamento anti-TB, denominada de fase de manutenção, em comparação ao grupo controle. Astekar e colaboradores, em 2016, também verificaram maior prevalência de *Candida* spp. em pacientes com TB, no entanto, esse trabalho não faz referência ao tipo de

antimicrobiano ou o tempo de tratamento anti-TB. Querido e colaboradores, em 2011, verificaram maior prevalência de *Candida* spp. em pacientes sob tratamento anti-TB há mais de 45 dias (72%) comparada à prevalência de 52% entre pacientes sem diagnóstico clínico de TB.

Nosso trabalho verificou um aumento de prevalência de *Candida* não-*albicans* no tempo 2 no grupo TB, comparado ao tempo 1. Segundo Kali et al., em 2013, muitos pacientes com TB pulmonar têm coinfeção com *Candida* spp., e o aumento na prevalência de espécies não-*albicans* pode estar associada à resposta inadequada às drogas antituberculares. Nossos resultados corroboram com esses achados, visto que, especialmente nos pacientes com maior tempo de tratamento anti-TB (tempo 2), verificamos o aumento da prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, dentre elas a *C. tropicalis* (33,33%), *C. dublinenses* (26,66%) e a *C. glabrata* (13,33%).

A contagem de UFC de *Candida* spp. esteve aumentada nos participantes com diagnóstico clínico de TB no tempo 1 ($15,39 \times 10^2$ UFC/mL) e no tempo 2 ($73,44 \times 10^2$ UFC/mL), quando comparada ao grupo controle ($0,092 \times 10^2$ UFC/mL). Não encontramos outros trabalhos que relatem a quantificação das espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes com TB. Embora o aumento de contagem de UFC não tenha resultado no aparecimento de lesões clínicas, é importante destacar que a colonização oral pode tornar-se fonte para disseminações sistêmicas (Lockhart et al., 1999; Vargas et al., 2002; Fidel et al., 2006). As mensurações das UFC na cavidade oral de pacientes com TB são superiores ao encontrado na cavidade oral de pacientes com HIV, doença na qual sua relação com a *Candida* foi mais estudada e é mais entendida. Menezes et al. (2014) verificou uma média de $9,8 \times 10^2$ UFC/mL de *Candida* spp. em pacientes infectados pelo HIV.

Em relação à virulência, verificamos que os isolados de *Candida albicans* dos pacientes com TB apresentaram maior atividade de fosfolipase e de proteinase quando comparados ao grupo controle. No entanto, entre as *Candidas* não-*albicans*, não verificamos diferenças na atividade de fosfolipase e de proteinase entre os grupos estudados. Kumar e colaboradores, em 2009, descrevem a atividade de fosfolipase e proteinase como um fator determinante da patogenicidade da *Candida* spp. A fosfolipase aumenta a capacidade da *Candida albicans* de penetrar em barreiras protetoras e, conseqüentemente, de causar danos (Monod et al, 2002). Alguns estudos relatam que durante a interação com o hospedeiro, a *C. albicans* modifica seu perfil transcricional para se adaptar aos ambientes desfavoráveis (Calderone et al.,

2001; Hube, 2004) sendo considerada como a principal causa de candidíase oportunista.

A capacidade de formação de biofilme e hifas das diferentes espécies foi semelhante entre os grupos estudados. Desconhecemos outro trabalho que tenha avaliado a capacidade da formação de biofilme ou de hifas de espécies de *Candida* isoladas de pacientes com TB.

Da perspectiva biológica, as espécies de *Candida* e de micobactéria apresentam poucas características em comum. As *Candida* spp. são microrganismos eucariontes (fungos leveduriformes) com genoma diploide, divisão celular assexuada com formação possível de pseudohifas. As micobactérias são microrganismos procariontes, de genoma haploide e divisão por cissiparidade. No entanto, ambos os microrganismos são colonizadores crônicos exclusivos dos seres humanos, além de provocarem doença em uma minoria relativa da população. Estima-se que 30% da população mundial seja co-infectada por *Candida* e *Mycobacterium* e 90% não apresenta sinais e sintomas clínicos das doenças (Robinson; Huppler, 2017).

A associação sinérgica promotora do crescimento de *Candida* e *M. tuberculosis* foi documentada experimentalmente (Kali et al, 2013). Muito provavelmente esse sinergismo ocorra devido ao estímulo de Receptores Padrões Associados aos Patógenos (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) semelhantes no hospedeiro. Os PRRs ativados pela *Candida* e pelo *Mycobacterium* incluem receptores do tipo Toll, receptores de lectina tipo C e receptores citosólicos tipo NOD. O reconhecimento pelo mesmo PRR desencadeia vias de sinais sobrepostas que culminam com a secreção de citocinas similares que podem romper o equilíbrio desses microrganismos (Robinson; Huppler, 2017). Além disso, o aumento concomitante desses dois microrganismos pode ser explicado pelo desenvolvimento da leucopenia. Drogas anti-TB possuem vários efeitos colaterais, principalmente no sistema hematológico. Estudos recentes demonstraram que antibióticos como a rifampicina apresentam capacidade de realizar ligação com macromoléculas plasmáticas, formando imunocomplexos responsáveis pela lise de leucócitos e desenvolvimento do quadro de leucopenia (De Vriese et al., 1998; Rekha et al., 2005). Outros estudos também verificaram respostas leucopênicas semelhantes relacionadas à isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifapentina e levofloxacina (Lin et al., 2015; Lee et al., 2005). Todos esses antimicrobianos são largamente utilizados para o tratamento da TB. A leucopenia, sobretudo a neutropenia, é um fator

preponderante para o desenvolvimento das formas variadas de manifestações clínicas da candidíase mucocutânea, assim como para suas formas disseminadas (Trautwein-Weidner et al., 2015; Robinson; Huppler, 2017).

Em conclusão, nosso trabalho verificou que o diagnóstico clínico de TB e o tempo de tratamento anti-TB, estiveram associados ao maior carreamento e prevalência de diferentes espécies de *Candida*, assim como o aumento de fatores de virulência, tais como a atividade de fosfolipase e proteinase de *Candida albicans* isoladas desses pacientes. O aumento da prevalência, quantificação e virulência de *Candida* isolada de paciente com TB atenta para o maior risco de lesões orais e disseminações sistêmicas nesses pacientes, uma vez que a *Candida* comensal da cavidade oral se torna patogênica quando ocorre mudança na interação entre a levedura e o hospedeiro.

REFERÊNCIAS*

American Dental Association, American Academy of Periodontology. Periodontal Screening and Recording training program kit. Chicago; 1992.

Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya GV. Prevalence and Characterization of Opportunistic Candidal Infections among Patients with Pulmonary Tuberculosis. J Oral Maxillofac Pathol. 2016; 20(2):183-9.

Brasil. Boletim Epidemiológico Da Secretaria De Vigilância Em Saúde.2017;48(8). Available: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 02 mar. 2019.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology, Cambridge. 2001; 9(7):327-335.

Castelo AF. II consenso brasileiro de tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. J. Bras. Pneumol. 2004; 30(Supl. 1):S2-S56. 9.

Chen XH, Gao YC, Zhang Y, Tang ZH, Yu YS, Zang GQ. Tuberculosis infection might increase the risk of invasive candidiases in immunocompetent patient. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015; 57(3):273-5.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - an update. Microb Pathog. 2018; 117:128-138.

De Vriese AS, Robbrecht DL, Vanholder RC. Rifampicin-Associated Acute Renal Failure: Pathophysiologic, Immunologic and Clinical Features. Am J Kidney Dis. 1998; 31:108-15.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Fidel PL Jr. *Candida*-Host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res.* 2006; 19:80-4.

Fontalvo DM, Jiménez Borré G, Gómez Camargo D, Chalavé Jiménez N, Bellido Rodríguez J, Cuadrado Cano B, Navarro Gómez S. Tuberculosis pulmonary and Candidiasis Co-Infection Present In A Previously Healthy Patient. *Colomb Med (Cali).* 2016; 47(2):105-8.

Guerrero HT, Espinosa IM, Ibarra MG, Garcia MA. Distribution of *Candida* species and molecular typing of *C. albicans* isolates in a Mexico City tertiary care hospital from 2011 to 2013. *Open J. Med. Microbiol.* 2016; 6:66-79.

Gustafson P, Gomes VF, Vieira CS, Samb B, Naucér A, Aaby P, Lisse I. Clinical predictors for death in HIV-positive and HIV-negative tuberculosis patients in Guinea-Bissau. *Infection.* 2007; 35(2):69-80.

Hube B. From commensal to pathogen: stage and tissue specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 1–6.

Kali A, Charles MP, Noyal MJ, Sivaraman U, Kumar S, Easow JM. Prevalence of *Candida* Co-Infection in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Australia's Med J.* 2013; 316(8):387-91.

Kumar VG, Latha R, Vedhagiri K, Sathiamoorthi T, Jayarani G, Sasikala R, Selvin J, Natarajaseenivasan K. Phospholipase C, Proteinase And Hemolytic Activities Of *Candida* spp. Isolated From Pulmonary Tuberculosis Patients. *Journal De Mycologie Médicale.* 2009; 19:3-10.

Latha R, Sasikala R, Muruganandam N, Babu V. Study on the shifting patterns of non-*Candida albicans* *Candida* in lower respiratory tract infections and evaluation of the CHROMagar in identification of the *Candida* species. *J Microbiol Biotech Res.* 2011; 1:113-9.

Lee SW, Lee SM, Yoo CG. Leukopenia during treatment with first-line anti-tuberculosis medication. *Respiration*. 2005; 72:660-1.

Lin FS, Wu MY, Tu WJ, Pan HQ, Zheng J, Shi JW, Fei ZT, Zhang RM, Yan WG, Shang MQ, Zheng Q, Wang MJ, Zhang X. A cross-sectional and follow-up study of leukopenia in tuberculosis patients: prevalence, risk factors and impact of anti-tuberculosis treatment. *J Thorac Dis*. 2015; 7:2234-42.

Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Sool DR. Natural Defenses Against *Candida* Colonization Breakdown In The Oral Cavities Of The Elderly. *J Dent Res*. 1999; 78:857-68.

Lyon JP, De Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(5):632-8.

Mane A, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Med Microbiol*. 2012; 61(Pt 2):285-90.

Mello TP, Aor AC, Gonçalves DS, Seabra SH, Branquinha MH, Santos AL. Assessment of biofilm formation by *Scedosporium Apiospermum*, *S. Aurantiacum*, *S. Minutisporum* and *Lomentospora Prolificans*. *Biofouling*. 2016; 32(7):737-49.

Menezes, Ralciane De Paula Et Al. Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV. 2014.

Monod M, Borg-Von ZM. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*. 2002; 81:114-28.

Naz SA, Tariq P. Study of the trend in prevalence of opportunistic *Candida* coinfections among patients of pulmonary tuberculosis. *Pak J Bot*. 2004; 36:857–62.

Piller, Raquel VB. Epidemiologia da Tuberculose. Pulmão RJ. 2012; 21(1):4-9.

Querido SM, Back-Brito GN, Dos Santos SS, Leão MV, Koga-Ito CY, Jorge AO. Opportunistic microorganisms in patients undergoing antibiotic therapy for pulmonary tuberculosis. Braz J Microbiol. 2011; 42(4): 1321-8.

Rabahi M, Fouad et al. Tuberculosis Treatment. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2017; 43(6): 472-486.

Ranzani OT, Rodrigues LC, Bombarda S, Minto CM, Waldman EA, Carvalho CRR. Long-term survival and cause-specific mortality of patients newly diagnosed with tuberculosis in São Paulo state, Brazil, 2010-15: a population-based, longitudinal study. Lancet Infect Dis. 2019; S1473-3099(19)30518-3.

Rekha VV, Santha T, Jawahar MS. Rifampicin Induced Renal Toxicity During Retreatment Of Patients With Pulmonary Tuberculosis. J Assoc Physicians India. 2005; 53: 811-3.

Riceto ÉB, Menezes RP, Penatti MP, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. Rev Iberoam Micol. 2015; 32(2): 79-82.

Robinson RT, Huppler AR. The goldilocks model of immune symbiosis with *mycobacteria* and *Candida* colonizers. Cytokine. 2017; 97:49-65.

Samaranayake LP, Macfarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A Comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of Yeast, *Coliform* and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. J Oral Pathol. 1986; 15: 386–388.

Sardi JCO et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology. 2013; 62:10-24.

Shiboski CH, Chen H, Ghannoum MA, Komarow L, Evans S, Mukherjee PK, Isham N, Katzenstein D, Asmelash A, Omozoarhe AE, Gengiah S, Allen R, Tripathy S, Swindells

S. AIDS clinical trials group network and Oral HIV/AIDS research alliance. Role of oral candidiasis in TB and HIV Co-Infection: AIDS Clinical Trial Group Protocol A5253. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014; 18:682-8.

Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Nur S, Diethelm P, Leibund S, Gut- Landmann S. IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunol.* 2015; 8:221–31.

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

Vargas-Montiel, Vargas-Camino N, Molero M, Urbina M, Urdaneta A. *Candida* in biological human samples. *Rev Ivest Clin.* 1999; 40:245-55.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

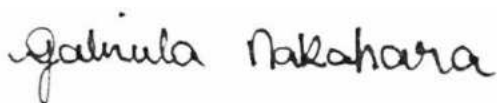
Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Gabriela Hikari Miranda Nakahara	
Nº USP: 10349300	Período: 9º período
Telefone de contato: (19) 98952-7887	E-mail USP: gabriela_nakahara@usp.br
<u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Alan Grupioni Lourenço	
Departamento: DBBO	
Área de conhecimento: Patologia	
Subárea: Doença infecciosa	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Alan Grupioni Lourenço, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Gabriela Hikari Miranda Nakahara



Alan Grupioni Lourenço

