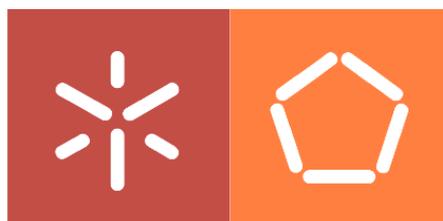


Bárbara Cachada Cardoso

Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos pela Universidade do Minho

Tese realizada sob a orientação da **Doutora Joana Azeredo**
(Departamento de Engenharia Biológica)



UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
(Departamento de Engenharia Biológica)

2004

***Ao Bruno
Aos meus pais
À Tita e à Daniela***

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos os que participaram directa ou indirectamente e que estiveram ao meu lado durante realização deste trabalho. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

À **Doutora Rosário Oliveira** pela a sugestão do tema, que desde logo me interessou e pela a oportunidade da realização deste trabalho.

À **Doutora Joana Azeredo**, pela amizade demonstrada um agradecimento muito especial. Pelo modo empenhado e estimulante com que acompanhou todas as fases do trabalho e pela constante disponibilidade demonstrada para realizar as mais diversas tarefas relacionadas com a orientação e execução do trabalho. Gostaria ainda agradecer todos os seus conhecimentos, conselhos, ideias e as valiosas sugestões apresentadas que de uma forma ou de outra contribuíram para os resultados apresentados.

Gostaria de agradecer ao **Departamento de Engenharia Biológica** da **Universidade do Minho** por ter disponibilizado as instalações e à **Doutora Maria João Vieira** pela disponibilização do laboratório de Microbiologia Aplicada sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Quero agradecer a todos os meus colegas e amigos do laboratório, **Mariana, Salomé, Sanna, Lúcia, Nuno Azevedo, Manuel Simões, Kelly, André e Fernando**, que fizeram com que desde o primeiro momento me sentisse parte integrante daquele grupo de trabalho. E a todos os outros que ao longo deste percurso foram entrando para o grupo de trabalho e que de uma forma ou de outra contribuíram para uma maior motivação e realização deste trabalho. Obrigada por todo o carinho compreensão e ajuda disponibilizada.

A **Mariana...** à Mariana gostaria de agradecer especialmente, mas todos os agradecimentos que possa fazer são poucos quando penso em toda a amizade e ajuda que me disponibilizou. Obrigada por toda a amizade, carinho, alegria, paciência, ajuda, incentivo, sem os quais me teria sido muito difícil atingir o final deste trabalho.

À **Sanna** e à **Salomé** pela sua amizade, por todos os bons momentos passados, pelo carinho e incentivo e por toda a ajuda prestada durante a realização deste trabalho

Ao **Nuno Cerca** e mais uma vez à **Mariana** pela sua ajuda no trabalho prático das longas horas de ensaios “*sem fim*”.

A todos os outros meus amigos em especial à **Gabi** e à **Sandra** pelo seu incentivo à inscrição e realização da especialização e da dissertação deste mestrado, à **Berta** por toda a ajuda disponibilizada e por todas as boleias, e à **Paula** por todos os bons momentos e horas de estudo durante a especialização.

Aos **meus pais**, sem eles nada disto seria possível. Mesmo nas situações mais complicadas o seu apoio foi muito importante para que conseguisse concluir o objectivo a que me propus. Quero ainda agradecer, o apoio financeiro que foi fundamental e sem o qual nada teria sido possível.

Ao **Zé** e à **Tita**, pela disponibilização do carro do Zé para me deslocar. Facilitaram e resolveram muitos problemas de transporte inerentes à realização deste trabalho. Pelas vezes em que não agradei, obrigada...

À **Daniela** por todas as vezes em que baixou o volume do rádio para que eu pudesse trabalhar...

Aos meus tios, **Armindo**, **Firmino**, **Manuel** que sempre me incentivaram e realçaram a importância da realização deste trabalho e em especial à **Guida**, que adorava a leitura e foi minha colega na Universidade do Minho e ao tio **João** que era incansável nas suas pesquisas científicas, estarão sempre no meu pensamento e deixam muita saudade.

Ao **Bruno**, pelo seu apoio incondicional, pela paciência nos dias mais difíceis, pelas horas de espera intermináveis, pelos fins-de-semana perdidos, pelo seu colo, pela sua companhia e por todos os incentivos. Obrigada por me mostrares que era capaz.

Resumo

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Este tipo de infecções é mais comum em indivíduos com o sistema imunitário comprometido e tem vindo a aumentar ao longo dos anos. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente identificada como sendo responsável por este tipo de infecções, no entanto, o número de infecções provocadas por outras espécies de *Candida* ocorre cada vez com mais frequência. Uma das espécies recentemente identificadas, *Candida dubliniensis*, tem estado cada vez mais associada a infecções em doentes infectados com sida. Uma grande parte das infecções provocadas por *Candida* está relacionada com a formação de biofilmes na superfície de dispositivos médicos. As células que constituem os biofilmes apresentam características fenotípicas diferentes das células em suspensão, tais como um aumento de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro.

O principal objectivo deste trabalho foi a avaliação do efeito de dois dos antifúngicos mais utilizados em medicina (anfotericina B e fluconazol) em suspensões celulares e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Este estudo foi dividido em três partes. Numa primeira fase, foram desenvolvidas metodologias experimentais para a determinação da susceptibilidade de biofilme a antifúngicos aplicadas a biofilmes. As duas metodologias desenvolvidas basearam-se na avaliação da susceptibilidade através da determinação da inibição de crescimento celular por turbidimetria e por colorimetria, com a utilização de um sal de “tetrazolium” que reage com células activas. Numa segunda fase foram avaliados os efeitos da anfotericina B e do fluconazol em células suspensas e biofilmes, crescidos no meio indicado pelas normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), o RPMI, e num meio de saliva que representa uma aproximação das condições reais de crescimento das células na boca. Os resultados obtidos revelaram que comparativamente com as suspensões celulares, os biofilmes são mais resistentes aos antifúngicos e que o meio de cultura onde os microrganismos se desenvolvem influencia a sua susceptibilidade. Estes resultados reforçam a ideia de que os estudos realizados na avaliação da susceptibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos deverá ser efectuado tendo em conta o meio e a forma como as células se desenvolvem quando colonizam os seres vivos. Numa fase final do trabalho avaliou-se o efeito que as terapias antifúngicas de longa duração teriam sobre as espécies de *Candida* em estudo, nomeadamente no que respeita às propriedades superficiais e à capacidade de adesão. As células de *Candida* foram crescidas em meios com concentrações subinibitórias de itraconazol e anfotericina B e foi determinada a capacidade de adesão a superfícies orais – hidroxiapatite (que mimetiza o esmalte dos dentes) e acrílico. Este estudo permitiu concluir que embora a hidrofobicidade das células não seja alterada quando estas crescem na presença de antifúngicos, a sua capacidade de adesão é modificada.

Abstract

Yeasts are responsible for the most opportunistic fungal infections in humans. Over the years, there has been an increase in the incidence of candidosis in immunocompromised individuals. Although *Candida albicans* is the most important etiological agent responsible for these infections, the frequency of infections caused by non-*Candida albicans* species is increasing. *Candida dubliniensis* is one of the species recently identified, and has been mismatched with *Candida albicans*. Since *Candida dubliniensis* is most often associated with recurrent episodes of disease in HIV-infected individuals it has been suggested that the recent emergence as a human pathogen may have resulted from selection due to the widespread use of antifungal drug therapy. A variety of manifestations of *Candida* infections are associated with the formation of biofilms on the surface of biomaterials. Cells in biofilms display phenotypic traits that are dramatically different from their free-floating planktonic counterparts, such as increased resistance to anti-microbial agents and protection from host defences.

The principal aim of this work was the determination of the effect of the most common antifungal agents, amphotericin B and fluconazole, on planktonic cells and biofilms formed by *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. This study was divided in three parts. In the first part, a set of experimental methodologies, for the determination of the susceptibility to antifungal agents, was implemented and developed. In these methods, antifungal susceptibility was evaluated by the determination of cell growth inhibition assessed by turbidimetry and using a tetrazolium salt (XTT), which detects active cells. In a second part, the susceptibility of planktonic cells and biofilms to amphotericin B and fluconazole was evaluated in RPMI (medium indicated by the National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and in a medium of artificial saliva (mimic real oral conditions). The results showed that biofilms are more resistance to antifungal agents than planktonic cells and that the cell/biofilm growth media influences the susceptibility of yeast to antifungal agents. These results strengthen the idea that methods to assess antifungal susceptibility should consider cell way of growth (planktonic vs. biofilm) as well as growth conditions closed to that of real ones i.e. in living organisms. In the final part of the work, the effect of lasting antifungal therapies on *Candida* species, namely on its ability to colonize surfaces, was evaluated. Yeast cells were grown under sub-inhibitory concentrations of itraconazole and amphotericin B and its ability to adhere to oral surfaces such as hydroxiapatite (that mimics teeth enamel) and acrylic (used in prosthesis manufacturing) was determined. This study allowed the conclusion that although cell surface hydrophobicity is not altered when cells are grown under sub-inhibitory concentrations of antifungal agents, their ability to colonise oral surfaces is modified.

Lista de Abreviaturas

PCR – Polymerase Chain Reaction (técnica de polimerização em cadeia)

DO – Densidade óptica

XTT – 2,3-bis (2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil) – 5 – (fenilamnocarbonil-tetrazolium)

PMS – Fenazina metosulfato

MP – Membrana plasmática

PVC – Policloreto de vinilo

ATP – Adenosina trifosfato

CLSM – Microscopia confocal laser de varrimento

ARN – Ácido ribonucleico

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MIC₅₀ – Concentração Mínima Inibitória que inibe 50% do crescimento

MIC₈₀ – Concentração Mínima Inibitória que inibe 80% do crescimento

DMSO – Dimetilsulfóxido

MOPS – Ácido 3 – (N-morfolino) propanosulfônico

SDB – Sabouraud-2% Dextrose broth

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures

HAP – Hidroxiapatite

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

MATH – Adesão Microbiana a hidrocarbonetos

Rpm – Rotações por minutos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Índice

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. CANDIDA ALBICANS E CANDIDA DUBLINIENSIS	2
1.1. <i>Candida albicans</i>	2
1.2. <i>Candida dubliniensis</i>	2
1.3. Identificação e diferenciação das espécies	3
2. DIMORFISMO CELULAR	3
3. MEMBRANA PLASMÁTICA	4
4. PAREDE CELULAR	5
4.1. Composição e organização	5
4.2. Interações da parede celular com o hospedeiro	6
5. ADESÃO	6
6. BIOFILMES	7
6.1. Formação de biofilme	8
6.2. Métodos de estudo de biofilme de leveduras	10
6.3. Estudo da Susceptibilidade a Antifúngicos	11
7. AGENTES ANTIFÚNGICOS	12
7.1. Anfotericina B	13
7.2. Fluconazol	14
II. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE CÉLULAS SUSPENSAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DE CANDIDA	15
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos	15
1.2. Determinação da actividade e viabilidade celular	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Meios e preparação de culturas	20
2.1.1.. Meios de cultura	20
2.1.2.. Culturas celulares	20
2.1.3.. Curva de Crescimento	20
2.1.4.. Preparação das células para os ensaios	21

2.1.5.. Formação de biofilme	21
2.2. Determinação actividade celular	22
2.2.1. Actividade por coloração com fluorocromos	22
2.2.2. Actividade por reacção com XTT	23
2.2.2.1. Actividade das células em suspensão	24
2.2.2.2. Actividade do Biofilme.....	24
2.3. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos de células suspensas e biofilmes	24
2.3.1. Preparação das soluções de antifúngicos	24
2.3.2. Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos de células em suspensão por medição da densidade Óptica (DO).....	25
2.3.3. Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos de biofilmes por medição da densidade Óptica (DO)	26
2.3.4.. Determinação de susceptibilidade de células suspensas e biofilme por reacção com XTT	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1. Determinação da Actividade Celular	28
3.1.1. Actividade por utilização fluorocromos.....	28
3.1.2. Determinação da actividade celular por reacção com XTT.....	29
3.2. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos.....	33
III.SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE CÉLULAS SUSPENSAS E BIOFILMES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> E <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i>.....	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. Meios e preparação de culturas	40
2.1.1.. Meios de cultura	40
2.1.2.. Microrganismos	40
2.1.3.. Preparação das soluções de antifúngicos	41
2.2. Ensaio de susceptibilidade	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Método turbidimétrico (Densidade óptica-DO)	42
3.2. XTT	44
4. DISCUSSÃO	47

IV. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS NA ADESÃO E PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> E <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i>.....	51
1. INTRODUÇÃO	51
1.1. Determinação das Propriedades superficiais	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1. Meios e preparação de culturas	54
2.1.1.. Meios de Cultura.....	54
2.1.2..Preparação das soluções de antifúngicos	54
2.2. Crescimento das células de levedura em concentrações subinibitórias de antifúngico.....	54
2.3. adesão.....	55
2.3.1.. Materiais de Adesão	55
2.3.2..Preparação dos materiais de adesão	55
2.3.3.. Ensaio de Adesão	56
2.3.4.. Determinação das propriedades superficiais das leveduras.....	57
3. RESULTADOS.....	58
3.1. Adesão	58
3.2. Determinação das propriedades superficiais das leveduras	59
4. DISCUSSÃO	60
V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	62
1. CONCLUSÕES	62
2. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	63
VI. BIBLIOGRAFIA	65

I. Revisão Bibliográfica

As leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por leveduras em humanos sofreu um grande aumento, especialmente em doentes com o sistema imunitário comprometido (o caso dos doentes com SIDA ou doentes à espera de um transplante) [1,2,3]. Os avanços da medicina vieram permitir que indivíduos com doenças terminais e imunocomprometedoras sobrevivam à custa dos tratamentos aplicados e que de outra forma não sobreviveriam, no entanto, muitos destes pacientes acabam por morrer, não devido à doença de que realmente padecem, mas devido às infecções fúngicas de que são alvo [3].

Os factores de risco que predispõem os doentes a este tipo de infecções incluem o uso de antibióticos de largo espectro, tratamentos de quimioterapia de duração prolongada, imunossupressão do sistema imunitário seguido de um transplante de órgãos, procedimentos cirúrgicos resultantes de tratamentos hospitalares intensivos e prolongados, hemodiálise e diálise interperitoneal em doentes imunocomprometidos. As infecções por leveduras tem também estado associadas à utilização de dispositivos médicos tais como implantes, cateteres vasculares, próteses dentárias, lentes de contacto, bypasses para o coração, ligações artificiais, discos intervertebrais, entre outros [4,5,6,7].

Dados referentes a autópsias de doentes imunocomprometidos revelaram que pelo menos metade destes doentes estava infectada com espécies de *Candida*, um terço com espécies de *Aspergillus* e os restantes continham infecções causadas por espécies de *Cryptococcus* e outros fungos, nomeadamente espécies de *Fusarium* [1].

1. *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

1.1. *Candida albicans*

A *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogénicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que em doentes imunocomprometidos podem ser fatais [8,9,4].

Esta levedura é um organismo comensal estando presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Pode colonizar o tracto intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário, sanguíneo, etc. Contudo, num paciente imunocomprometido, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidiases vaginais e infecções orais ou sistémicas [10].

A candidiase oral é muito comum em pessoas idosas que normalmente usam próteses dentárias. Num estudo realizado na Dinamarca demonstrou-se que cerca de 60% dos indivíduos com mais de 60 anos portadores de placas dentárias sofriam de estomatites dentárias associadas a candidiases orais [11].

Embora as infecções nas mucosas sejam a forma de doença mais comum, as infecções sistémicas provocadas por esta levedura aumentaram particularmente em doentes com o sistema imunitário comprometido em particular doentes infectados com o vírus HIV [11,6].

1.2. *Candida dubliniensis*

A *Candida dubliniensis* foi identificada pela primeira vez em 1995 [12], e está normalmente associada à colonização oral e a infecções em doentes com sida [12,13,14]. No entanto, esta levedura foi também isolada de indivíduos saudáveis, do tracto oral, intestinal, vaginal, respiratório e urinário [13].

Esta espécie é fenotipicamente semelhante à *Candida albicans* [15,12,16,7]. Ambas as espécies formam tubos germinativos quase indistinguíveis, produzem clamidósporos e são resistentes à ciclohexamida [12]. Estas semelhanças levaram a que as duas espécies fossem confundidas e em muitos casos, infecções provocadas por *Candida*

dublinsiensis foram identificados como tendo sido provocados por *Candida albicans* [12,14,16,7].

1.3. Identificação e diferenciação das espécies

Há vários mecanismos para a identificação e diferenciação das duas espécies, testes baseados no fenótipo, que incluem a análise da assimilação de hidratos de carbono, da temperatura de crescimento (a *Candida dublinsiensis* não cresce a 45°C), da diferenciação de colónias em meio CHROMagar *Candida*, pela produção de clamidósporos ligeiramente diferentes que acaba por dar uma morfologia diferente às colónias [12,17,16]. Actualmente a distinção entre as duas leveduras é feita recorrendo a técnicas de PCR ou ADN finger-printing [16].

2. Dimorfismo Celular

A parede celular é responsável pela morfologia final da célula. As espécies de *Candida* podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (característica das leveduras), também chamada de blastóporo ou blastoconídea, ou podem crescer sob a forma filamentosa através da produção de tubos germinativos resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudo-hifas.

Muitos fungos associados a infecções em humanos podem trocar entre duas formas básicas de crescimento tipificado de levedura e forma filamentosa. Esta capacidade de troca entre duas formas distintas é uma característica usual de muitos fungos patogénicos e resulta de modificações na síntese da parede celular. É considerada como sendo uma resposta a alterações do meio ambiente onde a célula está inserida nomeadamente, mudanças nos nutrientes, e aumento da concentração de CO₂.

As espécies de *Candida* têm esta característica de dimorfismo, podendo crescer sob a forma de levedura e também sob a forma filamentosa. A maior parte das espécies de *Candida* mostram uma predominância da forma filamentosa em meios com concentrações baixas de glucose, e concentrações elevadas de CO₂. Pelo contrário, a forma de levedura prevalece quando estas espécies são crescidas em meios com elevadas concentrações de glucose e baixas concentrações de CO₂. Este género tem também a capacidade de produzir, sob condições menos favoráveis para o seu

crescimento, clamidósporos. São estruturas esféricas que apresentam uma parede celular densa, e que se formam em resposta a mudanças de condições ambientais, permitindo que a levedura se adapte a diferentes nichos ecológicos ^[18,19].

3. Membrana Plasmática

As leveduras são organismos eucarióticos e a sua membrana plasmática (MP) é semelhante à dos outros organismos. É uma estrutura dinâmica ^[20] cujas substâncias constituintes estão em constante alteração. A membrana dos eucarióticos é quimicamente constituída na sua maioria por lípidos e proteínas e a maior classe de lípidos presentes, são os esteróis. Actualmente as MP estão inseridas num modelo chamado de mosaico-fluido ^[21,22]. De acordo com este modelo a MP consiste numa bicamada lipídica intercalada por proteínas globulares, as proteínas globulares transmembranares, e ainda constituídas por proteínas globulares extrínsecas e intrínsecas à membrana. Os grupos químicos exteriores das proteínas transmembranares localizados no exterior da MP e as proteínas extrínsecas estão por vezes ligados a cadeiras laterais de polissacáridos e podem ser chamadas de glicoproteínas. Estas cadeias de polissacáridos estão muitas vezes associadas a fenómenos fisiológicos das células ^[23,20,24,25].

Na membrana plasmática das leveduras o esterol predominante é o ergosterol, análogo ao colesterol das células dos mamíferos ^[26]. Esta molécula contribui para diversas funções celulares, sendo importante para a integridade e fluidez da membrana, permitindo que muitas das enzimas da membrana possam exercer correctamente a sua função, incluindo a síntese de quitina, importante para a divisão e crescimento celular ^[27].

Os lípidos, assim como as proteínas membranares têm a capacidade de se moverem através da membrana bilípídica ^[23], contudo os lípidos possuem uma maior facilidade de movimentação. Aparentemente a mobilidade das proteínas depende da fluidez da membrana que é conferida pelos lípidos existentes ^[28,29].

4. Parede Celular

A parede celular das leveduras era considerada como uma superfície quase inerte com a única função de conferir rigidez e protecção ao protoplasto. Actualmente considera-se que tem um papel fundamental e é essencial a quase todos os aspectos da biologia e patogenicidade celular das leveduras. Age como uma barreira de permeabilidade e é a sua estrutura que mantém a forma de levedura e desempenha um papel mediador nas interacções que se estabelecem entre o microrganismo e o ambiente que o rodeia ^[19].

4.1. Composição e organização

Aproximadamente 80 a 90% da parede celular das espécies de *Candida* são constituídas por hidratos de carbono. Há três constituintes básicos que representam a maioria dos polissacáridos da parede celular:

- Polímeros de glucose com ramificações, contendo ligações β -1,6 e β -1,3;
- Polímeros de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) ligados a moléculas de quitina por ligações β -1,4;
- Polímeros de manose ligados covalentemente a manoproteínas;

A Parede celular contém ainda cerca de 6 a 25% de proteínas e 1 a 7% de lípidos. Os componentes estruturais da parede são os β -glucanos e a quitina, formando um esqueleto rígido conferindo rigidez às células. Os polímeros de manose (que se encontram covalentemente ligados a manoproteínas) representam 40% dos polissacáridos e são os principais constituintes das células ^[19].

A composição percentual das paredes celulares é similar nos dois tipos de morfologia, levedura e filamentosa, embora as quantidades relativas de β -glucanos, quitina e mananos variem. Na forma filamentosa as células contêm pelo menos 3 vezes mais quitina do que as células na forma de levedura. Embora a razão de glucanos β -1,6 e β -1,3 na fracção insolúvel seja semelhante na forma de leveduras, na morfologia filamentosa o mesmo não acontece. Neste caso os β -glucanos possuem consideravelmente mais ligações β -1,3. ^[19]

4.2. Interações da parede celular com o hospedeiro

Os dois principais aspectos das interações da célula com o ambiente que a rodeia são, a sua capacidade de adesão às células, tecidos e dispositivos médicos implantados nos hospedeiros e a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro. A adesão das células ao hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo inicial para a infecção. As interações físicas destas leveduras com as células do hospedeiro são mediadas na superfície celular e os constituintes da parede celular que estão implicados nas ligações são denominados de adesinas. Existe uma grande variedade deste tipo de estruturas, daí a capacidade da célula colonizar um variado número de superfícies. Um outro aspecto importante nas interações é a capacidade que as células têm de activar ou desactivar a capacidade de resposta imune do sistema imunitário, tendo implicações directas na patogenezidade de cada espécie. São os mananos e as manoproteínas que desempenham a actividade modulatória mais forte, sendo capazes de regular a acção virtual de todas as defesas do sistema imunitário (células fagocitárias, células mediadoras da imunidade) ^[19].

5. Adesão

A capacidade dos microrganismos, aderirem a células, tecidos ou outro tipo de superfícies expostas à circulação de fluidos, é um pré-requisito para a colonização de um determinado habitat e subsequente infecção. Como tal, a adesão parece ter um papel inicial e fundamental no processo de infecção. Por exemplo, a adesão de *Candida* a superfícies dentárias constitui um passo essencial no desenvolvimento de estomatites dentárias ^[30,31]. A candidíase é normalmente associada à utilização de dispositivos médicos, que acabam por servir de suporte e substrato para o crescimento dos microrganismos ^[6,32].

O processo de adesão às superfícies do hospedeiro envolve factores biológicos e factores não biológicos. No que diz respeito aos factores biológicos a adesão é regulada por mecanismos moleculares específicos (adesinas). Foi já identificado um conjunto de adesinas directamente envolvidas na adesão de *Candida albicans* a epitélio humano ^[30]. Relativamente aos factores não biológicos, incluem-se neste grupo as forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e electrostáticas ^[33,34].

É através da superfície celular dos microrganismos que se processam as interações físico-químicas entre a célula e o hospedeiro. A capacidade das espécies de *Candida* aderirem a superfícies de acrílico tem sido relacionada com a hidrofobicidade da superfície celular. Estudos de adesão de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* a materiais utilizados no fabrico de próteses dentárias revelam que a hidrofobicidade destas leveduras está directamente relacionada com a capacidade de adesão [35,36,37,31]. Estes resultados mostraram que a hidrofobicidade é uma propriedade das leveduras muito importante no seu processo de adesão a superfícies.

6. Biofilmes

Os biofilmes têm vindo a ser estudados ao longo dos tempos e têm-lhes sido atribuídas diversas definições. Recentemente Donnan and Costerton [38] fizeram uma revisão bibliográfica sobre biofilmes e definiram um biofilme como sendo uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolónias e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas numa matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética [39]. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogénicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos [40].

Os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos microrganismos na forma planctónica, no que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas.

As infecções associadas à utilização de implantes médicos invasivos estão relacionadas com a formação de biofilmes nesses dispositivos. As células microbianas podem invadir os tecidos em contacto com o dispositivo ou ser libertadas na corrente sanguínea, causando infecção. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e do meio ou fluido a que os microrganismos estão expostos [32,4]. A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem

conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo. Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células [33].

6.1. Formação de biofilme

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana seguida da qual se dá o processo de maturação do biofilme (Figura 1.1). A fase inicial de adesão caracteriza-se pela aproximação do microorganismo à superfície de adesão. Uma vez atingida a distância crítica ($<1\text{nm}$) a interação entre o microorganismo e a superfície depende do somatório das forças atractivas e repulsivas geradas entre estas duas entidades (forças electrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals). As forças electrostáticas tendem a repelir as duas superfícies, já que a maioria dos microrganismos e superfícies inertes estão carregadas negativamente e as interações de van der Waals têm influência positiva. Este estágio inicial de adesão em que há envolvimento de interações físico-químicas entre as superfícies designa-se de adesão primária [41,38,42].

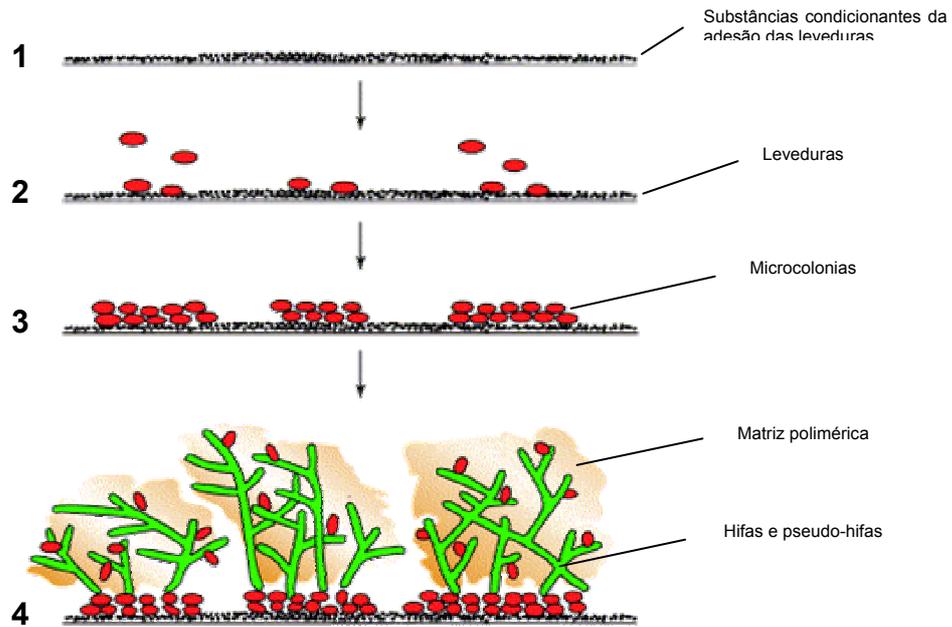


Figura 1.1 – Fases da formação do biofilme de *Candida* numa superfície de um catéter de PVC. **1** – Superfície do cateter com uma camada de substâncias condicionantes da adesão adsorvida. **2** – Adesão primária das leveduras à superfície. **3** – Formação das camadas basais das microcolônias de leveduras, ficando cada microcolônia aderida à superfície. **4** – Conclusão da formação das microcolônias por adição da formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz polimérica extracelular que envolve as células adaptado de Douglas et al, 2003, ^[43].

Num estágio mais avançado do processo de adesão, estabelece-se um conjunto de fenómenos que caracterizam a adesão secundária ^[44]. Nesta fase os microrganismos fracamente aderidos consolidam o processo de adesão, produzindo exopolissacáridos que formam complexos com os materiais da superfície onde aderem e/ou através de receptores específicos localizados na superfície das paredes celulares ou no caso de bactérias também nas extensões celulares (pêlos, fímbrias ou fibrilas). Após a adesão à superfície, dá-se início ao processo de maturação do biofilme. Um biofilme de leveduras maduro contém muitas microcolônias, formadas por espécies de levedura, que são interceptadas por canais de água que permitem a passagem dos nutrientes. Uma característica particular dos biofilmes formados por *Candida* é a mistura de formas que podem estar presentes no biofilme formado por cada uma das espécies. Os biofilmes maduros com um crescimento de cerca de 48 horas consistem numa rede densa de células sob a forma de leveduras, de hifas e pseudo-hifas (Figura 1.1) ^[45].

O crescimento do biofilme está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente e pela difusão desses mesmos nutrientes através da matriz do biofilme, bem como

pela libertação de resíduos. A maturação do biofilme é também controlada por outros factores, onde se incluem o pH interno, a difusão do oxigénio dissolvido e devido a osmolaridade ^[41,46]. No final do processo de maturação, o biofilme acaba por atingir uma massa crítica e é estabelecido um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela libertação de células planctónicas disponíveis para a colonização de outras superfícies. Num biofilme maduro, as células mais próximas da superfície tornam-se inactivas, e numa fase posterior morrem devido à falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigénio e à acumulação de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular ^[47]. Estudos recentes sugerem que o desenvolvimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme são regulados pela expressão de genes da qual é dependente a densidade populacional que é controlada através da transmissão de sinais entre as células. Uma vez atingida a maturação, geram-se no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células ^[38,48].

6.2. Métodos de estudo de biofilme de leveduras

Existem vários métodos usados no estudo de biofilmes formados por leveduras (Tabela 1.1). No que respeita ao crescimento do biofilme, estão descritos diferentes sistemas, de acordo com os objectivos do estudo. A maioria destes métodos foi adaptada dos métodos desenvolvidos para o estudo dos biofilmes de bactérias. Um dos mais simples e dos primeiros a ser descrito envolve o crescimento de populações aderidas a pequenos discos cortados de cateteres ou a bandas de acrílico (usado nos materiais protésicos dentários), colocados no interior de fermentadores ^[42,45,49,50,51].

Para o processamento de um grande número de amostras têm sido utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, nos quais se promove a formação do biofilme. Relativamente à análise quantitativa do crescimento do biofilme, esta pode ser feita por exemplo através do uso de um método colorimétrico que depende da redução dos sais de tetrazolium ou através da incorporação de isótopos [³H] leucina. Os resultados obtidos por estes métodos revelaram excelentes correlações com os resultados obtidos pela quantificação do peso seco dos biofilmes ^[45]. A quantificação do biofilme pode também ser feita por determinação da quantidade de ATP libertada pelas células após ruptura celular ^[50,52], ou pela determinação da actividade respiratória do biofilme ^[52]. Awong et al ^[52] verificaram uma correlação entre os resultados obtidos por estes

dois métodos. Pode ainda ser determinada a quantidade de biofilme formada, através de uma simples leitura da densidade óptica (DO) do biofilme. Estes métodos de quantificação do biofilme podem ser usados na determinação da susceptibilidade aos antifúngicos.

No que respeita à análise da ultra-estrutura do biofilme um dos métodos utilizados para a observação da morfologia do biofilme é a microscopia electrónica de varrimento (SEM) ^[53,45], que no entanto tem a desvantagem da amostra sofrer um processo de desidratação necessário para a sua observação ao microscópio electrónico. Em alternativa a microscopia confocal laser de varrimento (CLSM) permite a observação de biofilmes sem necessidade de desidratação, no entanto esta observação só pode ser efectuada se as células forem marcadas com fluorocromos.

Tabela 1.1 – Métodos de estudo do biofilme de leveduras

Método	Referências
Modelos de crescimento	
Discos de cateteres	[53],[49]
Bandas de acrílico	[50],[51]
Placas de cultura celular de 96 poços	[54]
Filtros de celulose	[53],[55],[56]
Reactor de crescimento	[53],[57]
Análise da Ultra estrutura do biofilme	
Microscopia electrónica de varrimento	[53],[49]
Microscopia confocal de varrimento a laser	[15],[6]
Análise Quantitativa do crescimento do Biofilme	
Peso seco	[23],[49]
Incorporação de isótopos	[23],[49]
Redução de sais de tetrazolium	[53],[49],[51],[54]
Ensaios bioluminescentes de ATP	[50],[52]

6.3. Estudo da Susceptibilidade a Antifúngicos

O estudo da susceptibilidade a antibióticos pode ser usado na descoberta de novas drogas, em estudos epidemiológicos, na definição de novas terapias para o combate das infecções causadas por microrganismos patogénicos ^[58]. Este tipo de estudos está menos desenvolvido no que diz respeito aos antifúngicos relativamente aos antibacterianos. Estes últimos têm servido de suporte científico para a validação dos métodos desenvolvidos para o estudo de susceptibilidade a antifúngicos ^[59,60,61,27,58].

Os testes de susceptibilidade podem ser influenciados por um determinado número de factores onde se incluem o tamanho do inóculo utilizado, o tempo e a temperatura de incubação do microrganismo, o tipo de meio de cultura e o pH que é utilizado. Foi demonstrado que o aumento de concentração do inóculo pode levar a um grande aumento do valor da concentração mínima inibitória (MIC) obtida. A temperatura e o tempo de incubação do antifúngico também podem ter efeitos significativos na determinação do MIC, que tende a aumentar com o aumento do tempo de exposição. O meio utilizado também é muito importante, já que este interage com os agentes antimicrobianos que são utilizados. No caso de meios definidos as interacções com as drogas utilizadas podem ser previstas. Um pH baixo está associado a valores de MIC elevados, sendo para isso importante definir e fixar um determinado valor de pH ^[18].

7. Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos usados no tratamento de micoses invasivas são classificados de acordo com o tipo de acção que exercem sobre as células dos fungos. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se, os polienos (ex. anfotericina B, nistatina); nucleósidos análogos (pirimidinas-fluorotinas ex. 5 -fluorocitosina), azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos ^[62].

Com excepção da 5-fluorocitosina, os antifúngicos actuam ao nível na membrana plasmática inibindo a síntese do ergosterol. O ergosterol, análogo ao colesterol das membranas das células humanas, é o esteroide predominante nas membranas plasmáticas dos fungos ^[27].

Os **polienos** formam complexos com o ergosterol e rompem a membrana plasmática, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana, libertando o conteúdo intracelular acabando por conduzir à morte da célula. Assim, os polienos são classificados de fungicidas e têm um largo espectro de acção fungicida, o mais largo de todos os antifúngicos disponíveis ^[62].

Os **nucleosidos análogos**, inibem o metabolismo das pirimidinas, interferindo com a síntese proteica e do ARN das células ^[62].

Os **azóis** inibem a biossíntese do ergosterol, pela inibição da enzima “14- α -stordimethylase” do citocromo P-450 responsável pela dimetilação do lanosterol ^[62].

As **pneumocandinas-equinocandinas** são fungicidas lipopetídicos cíclicos. Actuam prevenindo a síntese da parede celular através da inibição não competitiva da 1,3- β -D-glucanosintetase que sintetiza um componente estrutural importante da parede celular ^[62].

As **pradimicinas-benanomicinas**, compostos fungicidas, ligam-se às manoproteínas da parede celular provocando a lise osmótica da parede celular, permitindo a libertação dos componentes celulares, em particular do potássio, acabando por conduzir à morte das células ^[62].

As **nicomicinas**, são inibidores competitivos das enzimas celulares que sintetizam a quitina. Estas enzimas são fundamentais para a síntese da parede celular ^[62].

As **alilaminas e tiocarbamatos**, fungicidas sintéticos, inibem a squalenoepoxidase, uma enzima que juntamente com a ciclenociclase converte o squaleno em lanosterol que por sua vez é convertido em ergosterol. Sem este componente estrutural a estrutura e função da parede celular é afectada levando assim à morte das células ^[62].

Na realização deste estudo foram escolhidos dois tipos de antifúngicos, um fungistático que apenas inibe actividade celular e um fungicida que pela a sua acção não só inibe actividade celular como acaba por conduzir as células à morte. Os fungistáticos utilizados foram o itraconazol e o fluconazol, pertencentes ao grupo dos azóis, um dos grupos mais frequentemente prescritos no caso das infecções superficiais. A anfotericina inserida nos grupos dos polienos foi o fungicida escolhido, visto ser o mais comumente utilizado a nível hospitalar no tratamento de infecções sistémicas ^[13].

7.1. Anfotericina B

A **anfotericina** tem vindo a ser usada há mais de 30 anos e mantém-se como um dos antifúngicos de escolha para o tratamento de infecções muito graves, apesar do constante estudo e desenvolvimento de novas drogas. A grande desvantagem deste

agente é o facto de não ser solúvel em água sendo feita uma associação da anfotericina a um detergente deoxilato em tampão fosfato – Fungizone. Contudo, o fungizone, provoca muitos efeitos secundários indesejáveis ao doente [5]. Para combater estes efeitos, têm vindo a ser desenvolvidas alternativas a este combinado. Um exemplo é a criação de associações lipídicas, os lipossomas, que conseguem por sua vez encerrar e transferir grandes doses de anfotericina com menos toxicidade para as células humanas [59].

A anfotericina B pertence ao grupo dos polienos, quem têm como alvo o ergosterol presente nas membranas plasmáticas das leveduras. Este tipo de antifúngico possui uma estrutura anfipática, com um lado hidrofílico e um lado hidrofóbico. Actuam ao nível da membrana, intercalando-se entre as moléculas do ergosterol, formam canais que permitem a passagem dos componentes citoplasmáticos, em especial iões de potássio, provocando um desequilíbrio no gradiente de protões existente entre o interior da célula e o meio exterior, acabando por conduzir à morte da célula [27].

7.2. Fluconazol

O fluconazol é também um dos agentes antifúngicos mais utilizados para o tratamento das infecções causadas por fungos oportunistas, que pela sua acção nas paredes celulares e estrutura da molécula, se insere no grupo dos azóis. Quando administrado, o fluconazol é muito bem tolerado e provoca poucos efeitos secundários. É um dos agentes mais eficazes no tratamento da orofaringe e do esófago, especialmente em doentes com sida ou com cancro, sendo também muito eficaz na candidiase vaginal [62,63,64,65,66]. O fluconazol actua nas células inibindo a síntese do ergosterol ao nível da actividade da “14- α -stordimethylase” do citocromo P-450 responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol [27].

II. Métodos para determinação da susceptibilidade a antifúngicos de células suspensas e biofilmes de espécies de *Candida*

1. Introdução

Um dos objectivos deste trabalho foi a implementação e desenvolvimento de um conjunto de metodologias experimentais para a determinação da susceptibilidade a antifúngicos de células suspensas e biofilmes de espécies de *Candida*. Neste capítulo descrevem-se os fundamentos teóricos das principais metodologias utilizadas bem como os passos de optimização de alguns dos procedimentos utilizados. Por fim, a partir da análise dos resultados obtidos indicam-se as condições experimentais que foram adoptadas no trabalho descrito no capítulo III.

1.1. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos

A avaliação da susceptibilidade a antifúngicos é feita recorrendo à determinação da viabilidade, actividade ou crescimento de células de levedura quando em contacto com o agente. Devido ao elevado número de métodos utilizados na determinação da susceptibilidade de leveduras, o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) estabeleceu um conjunto de procedimentos com o intuito de normalizar as metodologias utilizadas. A Norma M27 foi proposta em 1992 depois de vários centros de investigação terem correlacionado dados relativos a factores essenciais na reprodutibilidade de ensaios interlaboratoriais de determinação de susceptibilidade. Estes factores incluem o tempo de actuação do antifúngico, a preparação e o tamanho do inóculo, o tempo de incubação, a temperatura e a composição do meio de cultura ^[67]. A introdução do documento inicial M27-A (em 1997), actualmente revisto para M27-2A tornou possível a reprodutibilidade e comparação das susceptibilidades aos agentes antifúngicos de leveduras patogénicas, sendo este um dos mais utilizados como método de referência ^[68]. Este método baseia-se na exposição de leveduras a uma série de soluções de concentrações crescentes de um antifúngico preparada num meio de cultura sintético, o RPMI. Este método pode ser feito recorrendo a macrodiluições ou a microdiluições do antifúngico no meio. Uma das evoluções que este método sofreu foi precisamente a passagem das macrodiluições para as microdiluições, em que o volume de amostra necessário é menor, permitindo a

utilização de placas de cultura celular e a análise de um maior número de amostras num mesmo ensaio. Nas duas metodologias (macrodiluição ou microdiluição) as culturas são expostas aos antifúngicos durante um tempo de exposição de 48h findo o qual é determinada a percentagem de redução de crescimento por inspecção visual da turbidez das amostras nas diferentes concentrações de antifúngico. A Norma desenvolvida pelo NCCLS define o conceito de concentração mínima inibitória (MIC – “Minimal inhibitory concentration”), como sendo a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio sólido com agar ou numa diluição feita em meio líquido ^[68].

Têm vindo a ser investigadas um grande número de modificações a este método, uma das quais relativa ao tempo de exposição ao antifúngico. O tempo de exposição foi definido para que pudesse ser feita uma correcta monitorização do crescimento das leveduras quando expostas a um antifúngico. As 48h seriam o tempo apropriado para que a leitura do MIC das espécies de *Candida* permitisse observar 80% de inibição do crescimento. Contudo, numa tentativa de melhorar a relação do MIC com o que se passa *in vivo*, alguns autores sugerem encurtar o tempo de exposição ao agente para 24h, definindo como critério 50% de inibição do crescimento ^[67].

Há ainda outros métodos utilizados na determinação da susceptibilidade de leveduras aos antifúngicos. Alguns dos métodos baseiam-se no crescimento das leveduras em meios sólidos. Nestes métodos são preparadas bandas impregnadas com um gradiente contínuo de antifúngico, que são colocadas à superfície de meio sólido RPMI inoculado previamente com a suspensão celular desejada. As placas são incubadas durante 24h, após as quais é observado o crescimento celular e o MIC é determinado a partir do ponto de intersecção da zona de inibição de crescimento ^[67]. Esta metodologia foi adoptada para um variado número de antifúngicos, contudo, o crescimento não uniforme e a frequente presença de um crescimento mais lento nas extremidades da banda tornam difícil a determinação do ponto em que o antifúngico deixa de actuar ^[60,69,70,71,72,73,74,75,76].

Nos métodos baseados no crescimento celular em meio sólido e na metodologia desenvolvida pelo NCCLS surgem algumas dificuldades na determinação da susceptibilidade a antifúngicos, nomeadamente quando se trata de agentes fungistáticos. A determinação do ponto em que o antifúngico deixa de actuar não é muito precisa, pelo facto de que este tipo de antifúngicos apenas inibir parcialmente o

crescimento, tornando difícil a determinação do ponto a partir do qual deixa de haver actuação do antifúngico. Como tal, e na tentativa de ultrapassar esta dificuldade, alguns autores desenvolveram uma série de métodos alternativos que incluem modificações na metodologia do NCCLS ^[77] incorporando formas de leitura do MIC mais objectivas, por turbidimetria ^[78] e por colorimetria ^[79,80,81,82].

Os métodos colorimétricos baseiam-se na determinação de mudanças de coloração e permitem uma melhor avaliação da concentração a que o antifúngico deixa de actuar, tornando-se por isso uma das metodologias disponíveis mais atractivas. Um exemplo destes métodos é a utilização de um indicador colorimétrico de oxidação-redução “Alamar blue”. Este indicador que inicialmente apresenta uma cor azul, na presença de crescimento celular é reduzido e muda para uma tonalidade vermelha. Um outro método colorimétrico alternativo é o uso de sais de “tetrazolium” (ex. XTT), vulgarmente utilizados para a determinação da actividade celular. Estes sais são incorporados como marcadores colorimétricos de potencial redox, nas células, e quando há actividade celular há uma mudança e coloração. Esta mudança pode ser observada por inspecção visual ou medida por espectrofotometria.

Como a determinação da susceptibilidade a antifúngicos se baseia na avaliação do crescimento celular em diferentes concentrações de antifúngicos, qualquer método utilizado na determinação de viabilidade/actividade celular poderá ser adaptado para estes estudos.

1.2. Determinação da actividade e viabilidade celular

A viabilidade celular tem sido tradicionalmente avaliada pela determinação do número de colónias formadas após o plaqueamento de uma suspensão de células. Nesta metodologia está subjacente o facto de um microrganismo vivo dar origem a uma colónia. Contudo, na presença de agregados microbianos (biofilmes p.ex), e especialmente quando se torna difícil a sua dispersão, a utilização deste método de avaliação de viabilidade poderá dar origem a subestimações do número de células viáveis.

A viabilidade celular também pode ser determinada recorrendo ao uso de fluorocromos, que se ligam a componentes celulares de células viáveis e podem ser detectados por microscopia de epifluorescência ou ainda quantificados por

espectrofluorimetria. Os fluorocromos podem ser utilizados para a marcação do ADN, de mitocôndria e de outros componentes celulares específicos, por ligações indirectas do marcador a moléculas estruturais ou funcionais. A utilização de fluorocromos permite também identificar células metabolicamente activas. Nestes casos o fluorocromo é reduzido a um composto fluorescente na presença de actividade metabólica. Como é o caso “do FUN-1” que entra nas células por difusão passiva e nas células viáveis e metabolicamente activas é concentrado nos vacúolos gerando estruturas cilíndricas e intravacuolares. O FUN-1 é convertido numa sonda fluorescente vermelha nas células metabolicamente activas. À medida que as células vão ficando metabolicamente inactivas a cor vermelha fluorescente fica cada vez mais esbatida até um amarelo fluorescente difuso ^[83].

O uso de um fluorocromo de viabilidade deve ser complementado com o uso de um outro que marca todas as células, viáveis e não viáveis, permitindo obter a fracção de células viáveis numa mistura celular. Um dos fluorocromos usados na quantificação de células de levedura é o SYTO 13 que se liga ao ADN de células viáveis e não viáveis. ^[84]

A determinação da actividade celular pode ser feita recorrendo a testes bioquímicos que medem a actividade de determinadas enzimas, ou a concentração de determinados produtos do metabolismo microbiano. Uma outra forma de avaliar actividade celular é medir a quantidade de substrato consumido num determinado período de tempo. A determinação do consumo de glucose como forma de avaliar a actividade metabólica de leveduras tem sido descrita na literatura ^[85]. A quantificação da glucose existente no meio de crescimento pode ser feita por métodos enzimáticos ou através de métodos que envolvem a quantificação dos açúcares redutores ^[85].

O consumo de oxigénio no meio pode também ser usado para avaliar a actividade celular, através de técnicas de respirometria. Neste método mede-se a quantidade de oxigénio dissolvido no meio de cultura, durante o metabolismo de um determinado substrato. Um outro método muito usado é a determinação da actividade celular por quantificação da adenosina trifosfato (ATP), um componente fundamental na matéria viva, que está envolvido em todas as actividades metabólicas, mas que desaparece logo que a célula morre ^[52].

Os métodos colorimétricos são vulgarmente utilizados na avaliação da actividade de culturas celulares e o uso de sais de tetrazolium representa uma das metodologias mais utilizadas. Os sais de tetrazolium são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o normal aceitador de electrões (O_2) nos processos biológicos de redução. Estes sais são reduzidos a derivados do “formazan” através da aceitação de electrões por acção enzimática (de substâncias do sistema de transporte de hidrogénio), ou por acção química (de transportadores de electrões artificiais). Os transportadores de electrões artificiais utilizados vulgarmente são a menadiona ou metassulfato de fenazina (PMS) e têm como função promover a reacção entre as células e o sal utilizado. ^[86,79,87] Os sais de tetrazolium, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas e nas membranas dos componentes celulares (ex. Mitocôndria) com actividade de desidrogenase e são convertidos a derivados de formazan de cor púrpura ^[2,87,88] Um dos sais mais vulgarmente usados é o 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamnocarbonil-tetrazolium) (XTT). Em células metabolicamente activas o XTT é reduzido a formazan pelas desidrogenases mitocondriais, no citocromo P450 e ainda por oxidases das flavoproteínas. ^[2] Os cristais de “formazan” são solúveis em água, sendo relativamente simples a sua quantificação por espectrofotometria em sobrenadantes celulares. Este aspecto é importante no estudo de biofilmes, porque permite efectuar estudos de susceptibilidade e de avaliação de actividade celular, sem que para tal seja necessário haver destruição da sua estrutura. ^[2]

Todos os métodos descritos são utilizados na sua maioria para o estudo da actividade/viabilidade e da susceptibilidade a antifúngicos de células de levedura em suspensão, contudo, no seu ambiente natural, os microrganismos estão geralmente associados em comunidades e formam biofilmes. Torna-se por isso necessário o desenvolvimento de metodologias expeditas para a determinação da susceptibilidade a antifúngicos em biofilmes. Como tal, o principal objectivo do trabalho descrito neste capítulo foi o desenvolvimento de metodologias para a determinação da susceptibilidade a antifúngicos de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Meios e preparação de culturas

2.1.1. Meios de cultura

Sabouraud-2% Dextrose broth – SDB

O SDB (MERCK) é o meio utilizado com mais frequência para o crescimento de espécies de *Candida* [89,90]. Este meio pode ser utilizado como meio de cultura líquido ou sólido, sendo preparado com uma concentração de 30 g/L. A preparação de meio SDS sólido com adição de 17% (P/V) de agar. Os meios foram esterilizados na a 121°C durante 15 minutos e armazenados a uma temperatura entre 2-5°C.

RPMI-1640

O RPMI (Sigma-Aldrich) é o meio recomendado pelo NCCLS M-27 para a determinação da susceptibilidade a antifúngicos [68]. Foi preparado numa solução tampão de MOPS (Sigma-Aldrich) 0.165M a um pH de 7.0 com uma concentração de 10.24 g/L e esterilizado por filtração com uma membrana de porosidade de 0.22 µm (“Watermann”). Posteriormente o meio foi armazenado a uma temperatura entre 2-5°C.

2.1.2. Culturas celulares

Neste trabalho foram utilizados dois isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B, (cedidos pelo Departamento de Biologia da Universidade do Minho); e duas estirpes de *Candida dubliniensis*, *Candida dubliniensis* CBS 7987 e a *Candida dubliniensis* CBS 7988 adquiridas no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

2.1.3. Curva de Crescimento

Foi elaborada uma curva de crescimento para determinar a fase estacionária do crescimento celular das estirpes. Inicialmente foi preparado um inóculo em meio líquido Sabouraud, a partir de uma placa crescida em meio sólido Sabouraud a 37°C durante 24 horas. O inóculo foi colocado a crescer a 37°C numa incubadora orbital a 150rpm tendo-se retirado amostras ao longo do tempo. Em cada amostragem foi medida a absorvência a 620nm num espectrofotómetro. A curva de crescimento indicou que ao fim de 18h era atingida a fase estacionária do crescimento celular.

2.1.4. Preparação das células para os ensaios

A realização de cada um dos ensaios implicou sempre um processo de preparação das células. Antes de cada ensaio, a cultura celular foi repicada em placas de petri com meio sólido SDB e incubadas a 37° C durante 24 horas. De seguida foi preparado um inóculo em meio líquido SDB que cresceu a 37°C durante 18 horas (que equivale à fase estacionária de crescimento determinada como o descrito no ponto 2.1.3) numa incubadora orbital a 150 rpm.

No fim das 18 horas de crescimento as células foram submetidas a um processo de lavagem, sendo a suspensão centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm e o “pellet” ressuspendido em água ultra-pura estéril. Este procedimento foi repetido duas vezes. No final o sobrenadante foi rejeitado e o “pellet” ressuspendido em água ultra-pura estéril. A concentração de células na suspensão final foi determinada numa câmara de Neubauer. Para cada ensaio, foi preparada uma suspensão com a concentração celular pretendida.

2.1.5. Formação de biofilme

Para a formação do biofilme foi preparada uma suspensão celular com uma concentração final de 1×10^6 cels/mL em RPMI (concentração óptima para formação de biofilme segundo Ramage et al ^[91]). Para a realização dos ensaios foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços.

Como se pode observar no esquema representado na Figura 2.1, em cada poço foram colocados 300 µL da suspensão celular para o crescimento do biofilme e no poço usado para o branco 300 µL de meio. O crescimento do biofilme foi medido ao fim de 30 minutos, 1, 2, 4, 7, 24 e 48 horas. Em cada instante foi retirado o meio de cultura dos poços e colocado meio fresco, sendo de seguida determinada a densidade óptica do biofilme a 620nm. Durante a formação do biofilme o meio existente nos poços foi substituído por meio fresco de 12 em 12 horas.

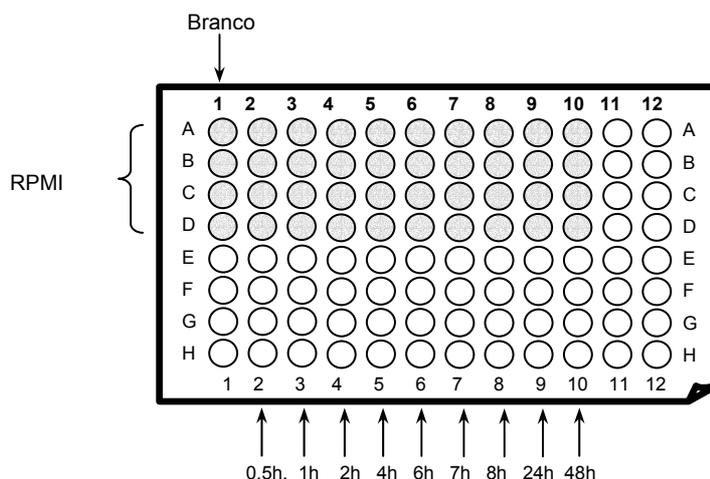


Figura 2.1 – Representação esquemática da placa de cultura celular utilizada no estudo da formação de biofilme.

2.2. Determinação actividade celular

2.2.1. Actividade por coloração com fluorocromos

Para o estudo da determinação da actividade de células aderidas, foram utilizados dois fluorocromos, um dos quais cora todas as células e o outro cora apenas as células que estão viáveis, o SYTO-13 e o FUN-1 respectivamente.

O SYTO-13, referido no item 1.2 cora as células totais, viáveis ou não viáveis de verde fluorescente (utilizando-se uma concentração de 10 mM).

Foi necessário efectuar testes com várias concentrações de corante FUN-1 de forma a determinar o valor óptimo para o estudo da viabilidade das células aderidas. Foram preparadas concentrações de FUN-1 de 10 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e testadas em células aderidas a pastilhas de hidroxiapatite e acrílico.

A adesão das células às pastilhas foi efectuada segundo Henriques et al ^[84], seguida da qual foram pipetadas as diferentes soluções de FUN-1 nos poços onde estavam colocadas as pastilhas de HAP ou acrílico num volume final de 250 μl . As pastilhas foram incubadas durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. O corante foi depois recolhido dos poços e rejeitado. As pastilhas foram observadas por microscopia de epifluorescência, com um filtro de 470nm a 490nm. A determinação da concentração mais adequada foi feita por inspecção visual na qual se usou como critério um bom contraste entre as células e o fundo

Na utilização combinada de FUN-1 e SYTO 13 adicionou-se a cada poço 250µL de cada um dos corantes, FUN-1 (10 – 30 µg/mL) e SYTO-13 (10mM). Seguiram-se 30 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente. As pastilhas foram então observadas no microscópio de epifluorescência com um filtro de 470nm a 490nm e efectuada a distinção entre células viáveis e não viáveis.

2.2.2. Actividade por reacção com XTT

Para otimizar o processo de determinação da actividade celular foi necessário, testar as concentrações óptimas de XTT e PMS. Na Figura 2.2 estão esquematizadas as combinações das concentrações de XTT/PMS testadas.

As células foram preparadas como o descrito na secção 2.1.4. Em cada poço colocaram-se suspensões celulares de concentração entre 1×10^3 e 1×10^8 cels/mL de *Candida albicans* (Figura 2.2).

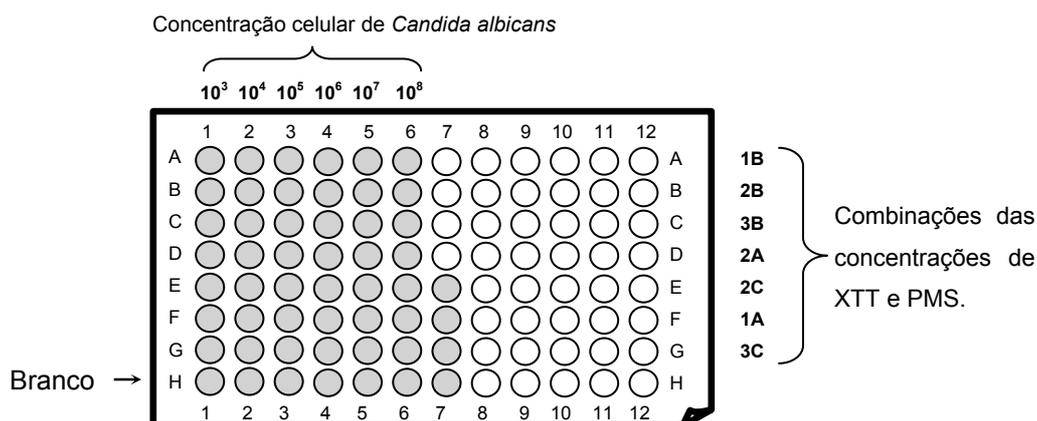


Figura 2.2 – Representação esquemática da placa de cultura celular utilizada no estudo da concentração óptima de XTT e PMS. As concentrações de PMS utilizadas foram 1 – 2µg/mL, 2 – 5µg/mL; 3 – 10µg/mL; as concentrações de XTT utilizadas foram A – 20µg/mL, B – 50µg/mL; C – 100µg/mL

Em cada poço foram colocados 200µl das suspensões celulares preparadas e 50µl das diferentes soluções de XTT/PMS, de acordo com o esquematizado na Figura 2.2. Há várias referências relativas ao tempo de exposição das células ao XTT [86], neste estudo optou-se por testar os tempos de exposição mais usados, 3 e 5 horas. Findo o tempo de incubação, foi efectuada a leitura da absorvência a 490nm [86]. Os testes de actividade utilizando o XTT foram efectuados com células suspensas e com biofilme, de acordo com os procedimentos a seguir descritos.

2.2.2.1. Actividade das células em suspensão

As suspensões celulares foram preparadas de acordo com o descrito na secção 2.1.4 em RPMI numa concentração final de 1×10^3 cels/mL. A incubação deu-se a 150rpm a 37°C. Ao longo do tempo foram retiradas amostras em quadruplicado para duas placas de cultura celular de 96 poços. Numa das placas foi lida a absorvência do conteúdo de cada poço (DO) a 620nm e na segunda fez-se reagir o XTT com as células, pipetando para cada poço 50µL da solução de XTT/PMS definida anteriormente. Após o período de incubação, foi lida a absorvência da solução resultante a 490nm.

2.2.2.2. Actividade do Biofilme

O biofilme foi formado de acordo com o descrito na secção 2.1.5. Em cada instante foi retirado o meio de cultura do poço, e colocados 100µL da solução de XTT/PMS preparada. Depois de um período de incubação de 3 horas no escuro a 37°C, foi determinada a intensidade da reacção do XTT, com o biofilme formado até aquele instante por espectrofotometria a 490nm.

2.3. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos de células suspensas e biofilmes

A determinação da susceptibilidade a antifúngicos pode ser feita recorrendo a vários métodos. Estes métodos podem envolver a simples medição da densidade celular e numa forma mais complexa, a quantificação de actividade/viabilidade de células crescidas em várias concentrações de antifúngicos. Nos pontos que se seguem descrevem-se os métodos testados para a determinação da susceptibilidade de espécies de *Candida albicans* a antifúngicos.

2.3.1. Preparação das soluções de antifúngicos

Os antifúngicos usados foram a anfotericina B (Citomed) e o fluconazol (Supremase - Pentafarma) que foram preparados da forma a seguir descrita.

Fluconazol: foi dissolvida em água uma cápsula de Supremase contendo 150mg/L de fluconazol, para uma concentração stock final de 300µg/L. Esta solução foi dividida em

várias alíquotas e armazenada a – 20°C. Antes de cada ensaio foi descongelada uma alíquota a partir da qual se preparou uma nova solução stock em RPMI com uma concentração de 3µg/L para os ensaios com células em suspensão e de 24µg/mL para os ensaios com biofilme. A partir destas foram preparadas as soluções a testar em cada ensaio (Tabela 2.1).

Anfotericina B: foram dissolvidas em DMSO, 0.001mg de anfotericina B ^[86], para uma concentração stock final de 1000µg/mL sendo depois armazenada a – 20°C. Antes de cada ensaio foi descongelada a solução stock a partir da qual se preparou uma nova solução stock no meio de cultura a testar com uma concentração de 3µg/mL para os ensaios em suspensão, e de 32µg/mL para os ensaios com biofilme. A partir destas foram preparadas as soluções a testar em cada ensaio (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Concentrações de antifúngico preparadas para a determinação do MIC em células em suspensão.

Antifúngico		Concentração de antifúngico (µg/mL)									
Suspensão	Fluconazol	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	1
	Anfotericina B	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	1
Biofilme	Fluconazol	0.125	0.25	0.5	1	1.5	3	4	6	8	12
	Anfotericina B	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	8	16

2.3.2. Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos de células em suspensão por medição da densidade Óptica (DO)

A determinação do MIC, para as células em suspensão, através da leitura da DO foi baseada no método proposto pelo NCCLS em placas de cultura celular de 96 poços ^[68]. As células foram preparadas para o ensaio conforme o descrito na secção 2.1.4.

Em cada placa foi preparado um branco (com 300µL de RPMI), um controlo (com 100µL de suspensão celular e 200µL de RPMI) e nos restantes poços foram colocadas as soluções de antifúngico (com 100µL de suspensão celular e 200µL de solução de antifúngico). Foi utilizada uma placa para cada estirpe e os ensaios foram realizados em quadruplicado.

Depois de preparadas, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Terminado o tempo de incubação, foi lida a absorvência do conteúdo dos poços da placa a 620nm. A percentagem de redução de crescimento foi determinada de acordo com a seguinte relação:

$$\%redução = \frac{(Abs620nm)_{controle} - (Abs620nm)_{amostra}}{(Abs620nm)_{controle}} \times 100 \quad \text{eq. 2.1}$$

Sendo, $\%redução$, a percentagem de redução de crescimento, a $(Abs620nm)_{controle}$, a absorvência do controlo lida a 620nm, e a $(Abs620nm)_{amostra}$, a absorvência da amostra sujeita ao antifúngico lida a 620nm.

2.3.3. Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos de biofilmes por medição da densidade Óptica (DO)

A formação do biofilme foi feita de acordo com o procedimento descrito na secção 2.1.5 durante 24 horas. Depois de formado, o biofilme foi lavado com 300µL de água destilada estéril rejeitando-se o meio de crescimento. Em cada placa foi preparado um branco (num poço sem formação de biofilme, com 300µL de RPMI), um controlo (com 300µL de RPMI) e nos restantes poços foram colocadas as soluções de antifúngico (300µL de solução de antifúngico). Foi utilizada uma placa para cada estirpe e os ensaios foram realizados em quadruplicado.

Depois de preparadas, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas com mudança de meio de 12 em 12 horas. Terminado o tempo de incubação, foi lida a absorvência do conteúdo dos poços da placa a 620nm. A percentagem de redução de crescimento foi calculada de acordo com a equação 2.1.

2.3.4. Determinação de susceptibilidade de células suspensas e biofilme por reacção com XTT

Os ensaios com as células em suspensão e com a formação do biofilme foram efectuados nas mesmas condições descritas anteriormente nas secções 2.3.2 e 2.3.3. A leitura da actividade do biofilme pelo método do XTT foi feita de acordo com o procedimento descrito em 2.2.2. A determinação da percentagem de redução de actividade, foi feita tendo em conta relação:

$$\%redução = \frac{(Abs490nm)_{controle} - (Abs490nm)_{amostra}}{(Abs490nm)_{controle}} \times 100 \quad \text{eq. 2.2}$$

Sendo, $\%redução$, a percentagem de redução de actividade, a $(Abs490nm)_{controle}$, a absorvência do controlo a 490nm, e a $(Abs490nm)_{amostra}$, a absorvência da amostra sujeita ao antifúngico a 490nm.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da Actividade Celular

3.1.1. Actividade por utilização fluorocromos

O uso dos fluorocromos é particularmente útil na determinação da actividade/viabilidade celular *in situ* de células aderidas. O fluorocromo FUN-1 foi desenvolvido para determinar a actividade/viabilidade em suspensões celulares [83], pelo que, foi necessário adaptar este método a células aderidas.

Das várias observações microscópicas efectuadas, a concentração de FUN-1 que permitiu um melhor contraste entre as células aderidas e a superfície, e que corava todas as células viáveis e metabolicamente activas foi de 20µg/mL. Na Figura 2.3 encontram-se apresentadas observações ao microscópio de epifluorescência de células de *Candida albicans* 12A aderidas, numa das observações coradas apenas com FUN-1 (A) e na outra coradas com os dois fluorocromos SYTO 13 e FUN-1 (B) em simultâneo. As células viáveis estão coradas de vermelho e as células não viáveis encontram-se coradas de verde fluorescente.

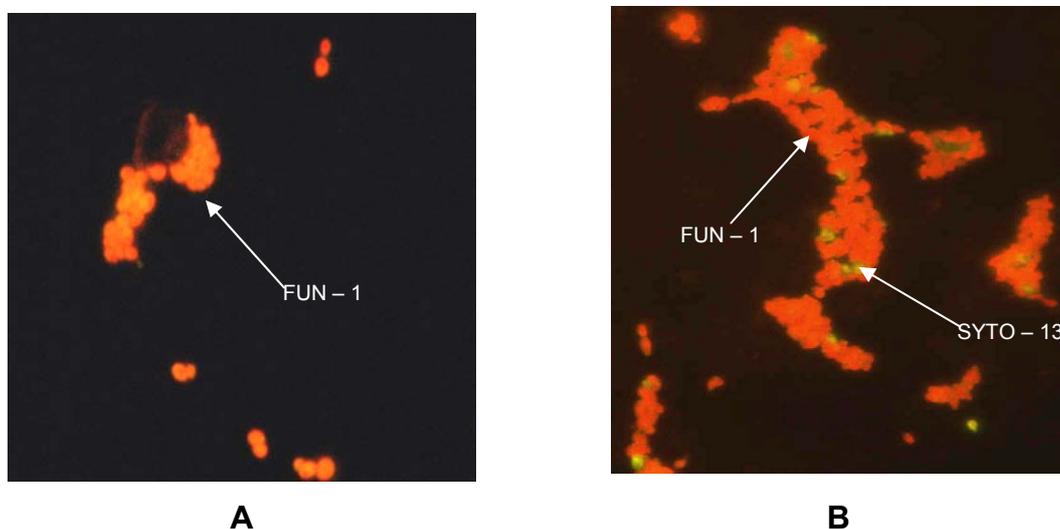


Figura 2.3 – Observação ao microscópio óptico de células aderidas de *Candida albicans* 12A coradas com FUN - 1 (A) numa concentração final de 20µg/mL e com SYTO - 13 (B) numa concentração final de 10mM.

3.1.2. Determinação da actividade celular por reacção com XTT

No método que utiliza o XTT, para a determinação da actividade celular o reagente PMS, por se tratar de um agente redutor, é utilizado para potenciar a reacção de redução do XTT. No entanto, quando se utilizam elevadas concentrações de PMS, podem ser obtidas respostas positivas na ausência de actividade celular [86].

Nos ensaios em que se utilizou várias concentrações de PMS (Figura 2.4) verificou-se que a intensidade de resposta à solução de XTT/PMS foi mais dependente da concentração de XTT do que da concentração de PMS, por isso optou-se por utilizar em ensaios futuros uma concentração de 100µg/mL de XTT e uma concentração de 5µg/mL de PMS, concentrações que correspondem à combinação 2C da Figura.

Na Figura 2.4, também se pode observar que o método do XTT, independentemente das concentrações de XTT e PMS utilizadas, apenas permite detectar a actividade celular a partir de concentrações celulares de 1×10^7 cels/mL.

O tempo de incubação também influencia a intensidade da resposta [86], verificou-se por inspecção visual que para estas estirpes era apenas necessário um tempo de incubação de 3 horas para haver redução do XTT a “formazan”.

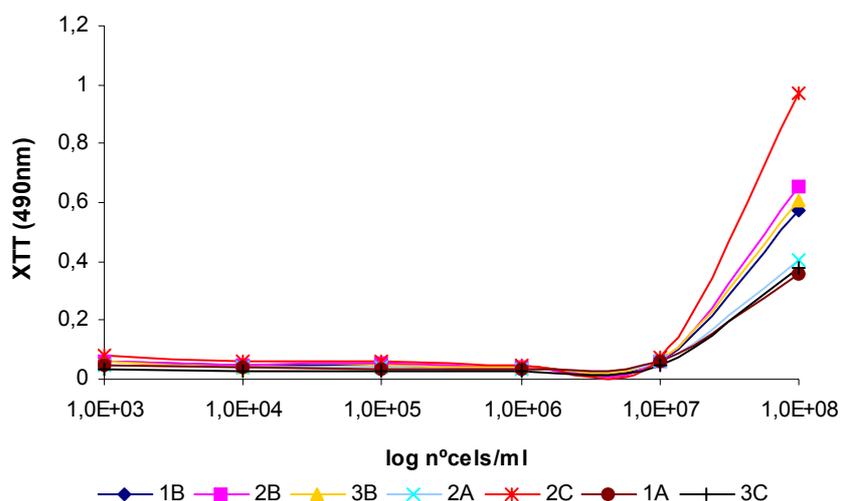


Figura 2.4 – Concentrações de XTT e PMS testadas em função da concentração celular. A combinação das concentrações é **1B** – 2 e 50 µg/mL, **2B** – 5 e 50 µg/mL, **3B** – 10 e 50 µg/mL, **2A** – 5 e 20 µg/mL, **2C** – 5 e 100 µg/mL, **1A** – 2 e 20 µg/mL, **3C** – 10 e 100 µg/mL de PMS e XTT respectivamente.

Kunh et al [2] demonstraram que a intensidade da reacção com o XTT varia com a concentração de células. No entanto, a relação entre a intensidade de reacção com o

XTT e a concentração celular varia de espécie para espécie. Segundo estes autores a resposta da reacção de células de *Candida parapsilosis*, com o XTT é completamente diferente da resposta de reacção de *Candida albicans* com o XTT. Para verificar se existem diferenças entre as várias estirpes em estudo no que diz respeito à reacção com o XTT, fez-se reagir este agente com suspensões de várias concentrações celulares das estirpes em estudo (Figura 2.5).

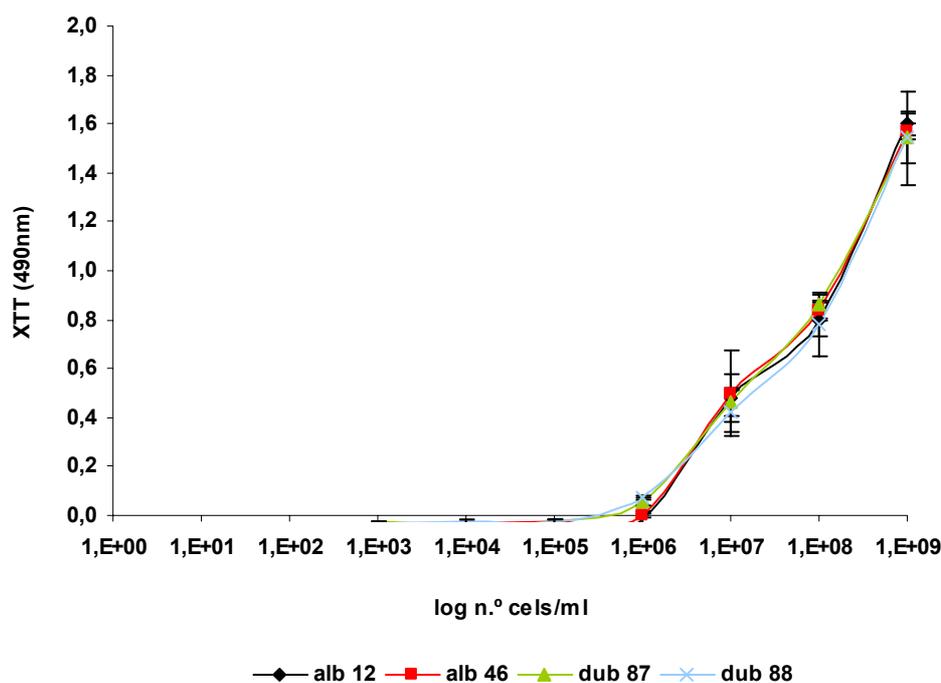


Figura 2.5 – Intensidade de reacção do XTT com as células em suspensão, em função do número de células de *Candida albicans* 12A (alb 12), *Candida albicans* 46B (alb 46), *Candida dubliniensis* 7987 (dub 87) e *Candida dubliniensis* 7988 (dub 88).

Como se pode verificar na Figura 2.5, existe uma relação linear entre a concentração de células e a intensidade de reacção com o XTT semelhante para todas as estirpes. Este resultado permite concluir que as 4 estirpes em estudo, apresentam respostas ao XTT idênticas, o que poderia indicar comportamentos metabólicos semelhantes. Como as espécies de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* são fenotipicamente semelhantes ^[86] parece bastante provável o facto de reagirem com o XTT de forma idêntica.

A linearidade estabelecida entre o número de células e a intensidade de reacção com o XTT poderia permitir validar o método para o biofilme, mas só no caso de se considerar que as células no biofilme se encontram no mesmo estado metabólico, o que é bastante improvável. Contudo, outros estudos referem a utilização de XTT na

quantificação de biofilme formado [54], no entanto, de acordo com Kuhn et al [86] é necessário fazer-se a validação do método para a estirpe que se pretende estudar. Este autor considera que o método do XTT permite determinar de forma expedita a concentração de células presente numa amostra, o que o torna particularmente atractivo na determinação da concentração de células em biofilme, na qual, o método turbidimétrico deve ser cuidadosamente aplicado dado que se quantifica não só as células, mas também a matriz exopolimérica.

Nas Figuras 2.6 e 2.7 encontram-se apresentadas as curvas de formação de biofilmes formados das estirpes de *Candida* avaliadas pelo método turbidimétrico e pelo método que utiliza o XTT. Na Figura 2.6 pode-se observar que a DO aumenta ao longo das 48 horas de formação, embora se verifique um aumento exponencial de crescimento do biofilme nas primeiras 8 horas.

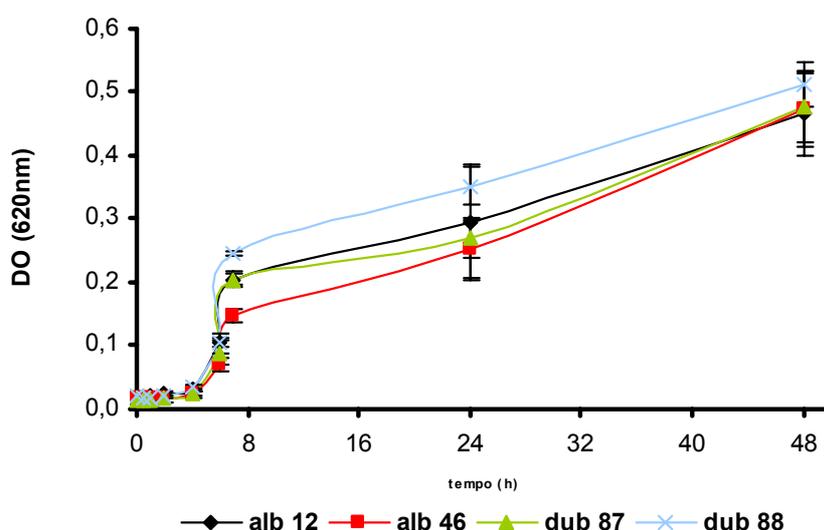


Figura 2.6 Curva de formação de biofilme formado por *Candida albicans* 12A (alb 12), *Candida albicans* 46B (alb 46), *Candida dubliniensis* 7987 (dub 87) e *Candida dubliniensis* 7988 (dub 88) determinada por turbidimetria.

Na curva de formação do biofilme apresentada na Figura 2.6 verifica-se após o aumento exponencial do biofilme estabilização ao fim de 16 horas de crescimento. Esta cinética de formação de biofilmes é muito típica [33], tendo sido também obtida em biofilmes de *Candida dubliniensis* [15]. A fase exponencial é frequentemente designada por fase de crescimento, seguida de uma fase de proliferação e quando o biofilme deixa de crescer atinge a fase de maturação [15]. Este comportamento adequa-se ao esquema de formação de biofilme apresentado no Capítulo I, secção 6.1.

É curioso verificar que enquanto que, pelo método do XTT a fase de maturação está bem definida (Figura 2.7), no caso dos resultados obtidos pelo método turbidimétrico (Figura 2.6), nesta fase o biofilme continua a aumentar, ainda que mais lentamente. O método do XTT permite avaliar a actividade metabólica das células, sendo possível observar-se um aumento da intensidade de actividade metabólica, com o crescimento do biofilme, devido ao aumento do número de células metabolicamente activas. Quando o biofilme atinge a fase de maturação a sua actividade metabólica permanece constante mas elevada, o que reflecte o equilíbrio dinâmico entre a morte e o crescimento celular nesta fase.

Com o método turbidimétrico não é possível distinguir a fase de maturação do biofilme, uma vez que, este método quantifica toda a biomassa que constitui o biofilme. Na fase de maturação existe crescimento e morte celular bem como produção de exopolímero, tudo isto conduz a um aumento da absorvência ao longo do tempo. É importante salientar que os biofilmes foram formados apenas em 48h, tratando-se por isso de biofilmes jovens, sendo pouco provável a ocorrência dos fenómenos de abrasão e destacamento de porções do biofilme características de biofilmes velhos [33].

Como a cinética de formação de biofilme avaliada pelo método turbidimétrico e o que utiliza o XTT é distinta, pode concluir-se que estes dois métodos não podem ser igualmente utilizados na quantificação de biofilmes, uma vez que um avalia a actividade celular (XTT) e outro a quantificação de biomassa (DO)

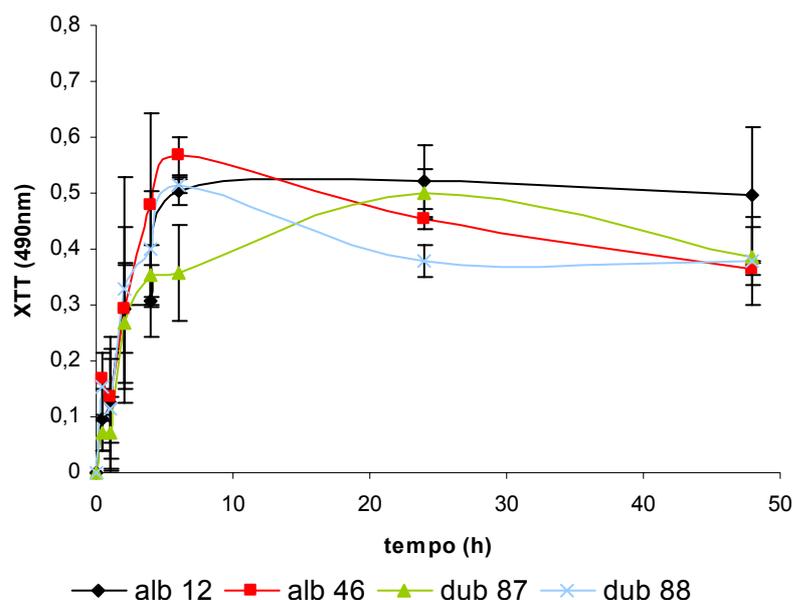


Figura 2.7 – Curva de crescimento de biofilme formado por *Candida albicans* 12A (alb 12), *Candida albicans* 46B (alb 46), *Candida dubliniensis* 7987 (dub 87) e *Candida dubliniensis* 7988 (dub 88) pelo método do XTT.

3.2. Determinação da susceptibilidade a antifúngicos

A maioria dos métodos utilizados na determinação de susceptibilidade de leveduras a antifúngicos têm sido aplicados em células crescidas em suspensão, contudo, na maioria das vezes as leveduras encontram-se no seu habitat natural sob a forma de comunidades microbianas sesséis, formando biofilmes. O aumento de fenótipos de organismos sesséis resistentes a agentes antimicrobianos levou à necessidade de se desenvolver métodos normalizados para o estudo da susceptibilidade de biofilmes [92,93,94,95,96].

Neste estudo foi determinada a susceptibilidade de células suspensas e de biofilme de *Candida albicans* 12A, à anfotericina B e ao fluconazol. A determinação foi efectuada através de dois métodos, o método turbidimétrico (recomendado pelo NCCLS) que se baseia na leitura da densidade óptica (DO) das suspensões celulares e um outro método em que é determinada a actividade celular e que se baseia na leitura da intensidade da reacção do XTT com as células. Os resultados obtidos para cada um dos métodos foram comparados de forma a avaliar a eficácia de utilização do método do XTT em células suspensas e no biofilme em vez do método recomendado pelo NCCLS.

Na Figura 2.8 e 2.9 encontram-se apresentadas as curvas de percentagem (%) de redução de crescimento celular decorrentes da aplicação de diferentes concentrações de fluconazol em suspensões celulares e biofilme de *Candida albicans* 12A, avaliadas pelo método turbidimétrico (DO) e pelo método que utiliza o XTT (XTT).

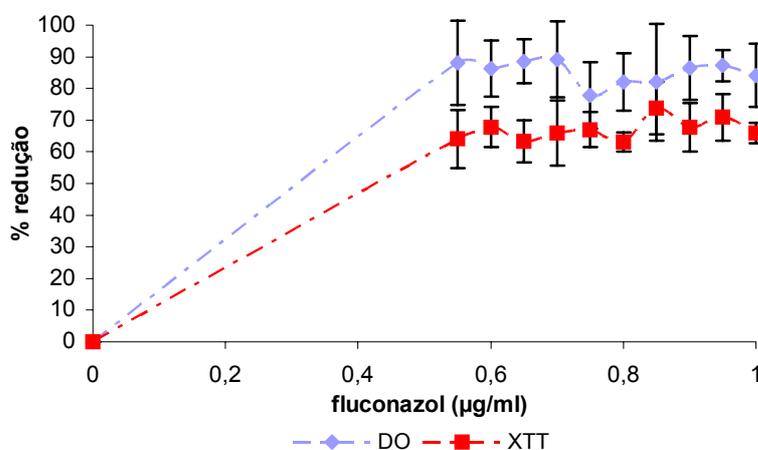


Figura 2.8 – Determinação da % de redução de crescimento de suspensões celulares de *Candida albicans* 12A, após a exposição a várias concentrações de fluconazol, avaliada pelo método turbidimétrico (DO) e do XTT

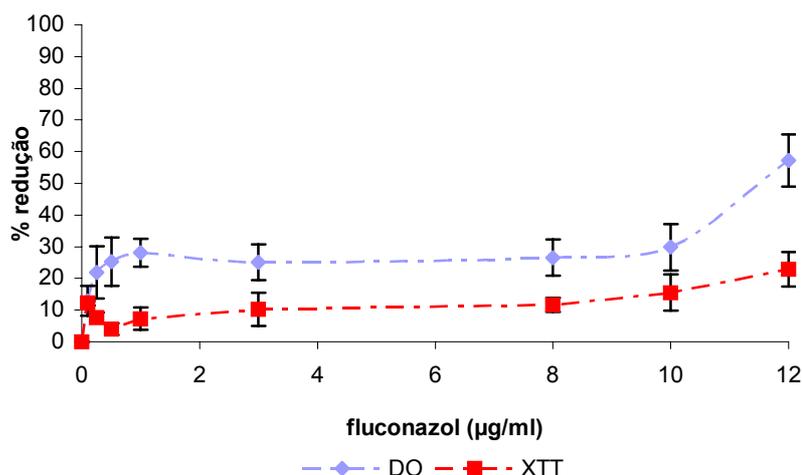


Figura 2.9 – Determinação da % de redução de crescimento celular e actividade metabólica, após a exposição ao fluconazol, pelo método turbidimétrico (DO) e pelo o que utiliza o XTT em biofilme formado por *Candida albicans* 12A (alb 12).

Verifica-se que, tanto para as suspensões (Figura 2.8) como para o biofilme (Figura 2.9), as curvas de percentagem de redução de crescimento celular, avaliadas pela DO e pelo XTT seguem uma tendência semelhante. No entanto, verifica-se que a % de redução avaliada pela DO é superior à avaliada pelo XTT.

Nas Figuras 2.10 e 2.11 estão representados as curvas de % de redução de crescimento celular, decorrentes da aplicação de diferentes concentrações de anfotericina B em suspensões celulares e biofilme de *Candida albicans* 12A, avaliadas pelo método turbidimétrico (DO) e pelo método que utiliza o XTT (XTT).

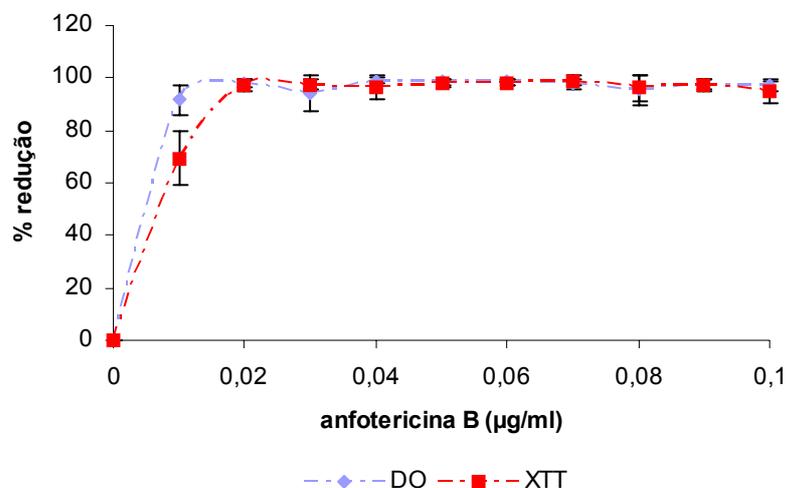


Figura 2.10 – Determinação da % de redução de crescimento celular e actividade metabólica, após a exposição à anfotericina B pelo método turbidimétrico (DO) e pelo método que utiliza o XTT em células suspensas de *Candida albicans* 12A.

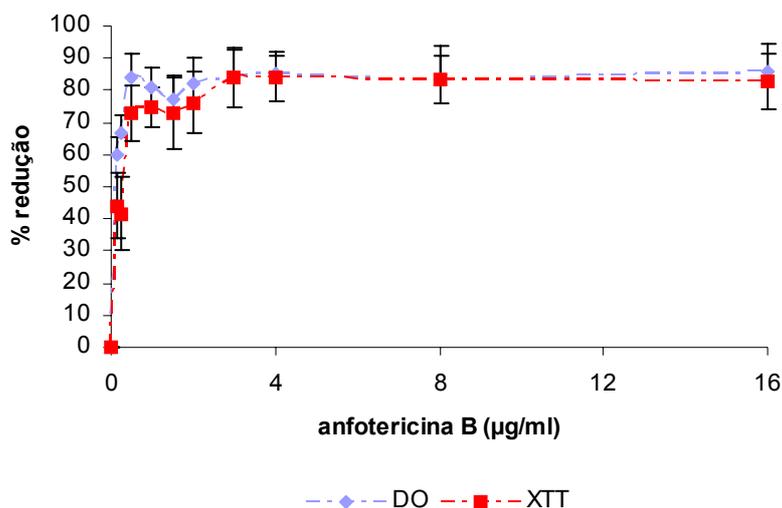


Figura 2.11 – Determinação da % de redução de crescimento celular e actividade metabólica, após a exposição à anfotericina B, pelo método turbidimétrico (DO) e pelo que utiliza o XTT em biofilme formado por *Candida albicans* 12A.

Após a exposição à anfotericina B verifica-se que tanto nas suspensões celulares (Figura 2.10) como o biofilme (Figura 2.11), as curvas de % de redução e como acontece com a exposição ao fluconazol, seguem uma tendência semelhante. Contudo, as diferenças verificadas entre a % redução de crescimento celular avaliada pelo método da DO e pelo método do XTT, neste caso, não são tão marcadas como as que ocorrem no caso da exposição ao fluconazol.

Pode-se ainda verificar que a % de redução de crescimento celular, tanto no biofilme como nas células suspensas, é inferior no fluconazol relativamente à % de redução obtida para a exposição à anfotericina B e que os biofilmes se mostram mais resistentes a estes dois antifúngicos do que as suspensões celulares.

No sentido de uma melhor análise dos resultados obtidos, fez-se um pequeno estudo onde se comparou os valores de absorvência a 620nm e a 490nm (após reacção com o XTT) de suspensões celulares de *Candida albicans* 12A crescidas durante 24 horas a metade do valor teórico da concentração mínima inibitória 0,02µg/mL de anfotericina B e 0,4µg/mL fluconazol [68].

Na Figura 2.12 está representada a relação entre XTT e DO para suspensões celulares de *Candida albicans* 12A crescidas na ausência e na presença de concentrações de antifúngicos equivalentes a metade do valor teórico da concentração mínima inibitória 0,02µg/mL de anfotericina B e 0,4µg/mL fluconazol.

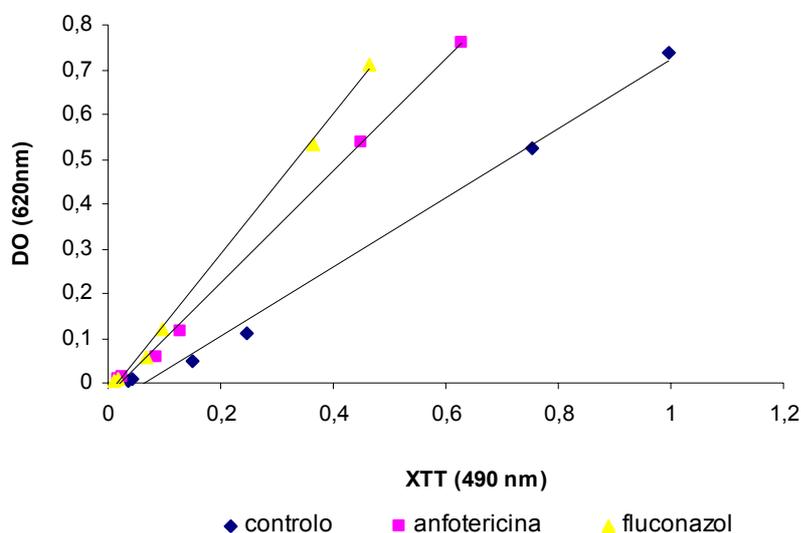


Figura 2.12 – Relação entre DO e XTT de suspensões celulares de *Candida albicans* 12A crescidas em anfotericina B (0,02µg/mL) e fluconazol numa concentração de (0,4µg/mL).

Na presença de anfotericina B e fluconazol verifica-se que a razão DO/XTT aumenta, o que parece ser devido à diminuição da actividade metabólica das células crescidas na presença dos antifúngicos.

Estes dois antifúngicos actuam ao nível da parede celular e estrutura da molécula inibindo a actividade celular, no entanto, têm diferentes formas de actuação. O fluconazol é um agente fungistático que apenas inibe a actividade metabólica da célula e a anfotericina é um agente fungicida que provoca lise celular e conduz à morte das células [27]. As formas de actuação destes antifúngicos parecem explicar os resultados obtidos permitem-nos concluir que, e como seria de esperar, há uma diminuição da actividade celular, traduzida pela relação DO/XTT. Face a estes resultados seria de esperar que a % de redução de crescimento avaliada pela DO fosse superior à % de redução de actividade avaliada pelo XTT.

Na Figura 2.13 encontram-se apresentados os valores teóricos da percentagem de redução de crescimento avaliados pelo método do XTT e pelo turbidimétrico, tendo como base os valores experimentais apresentados na Figura 2.12.

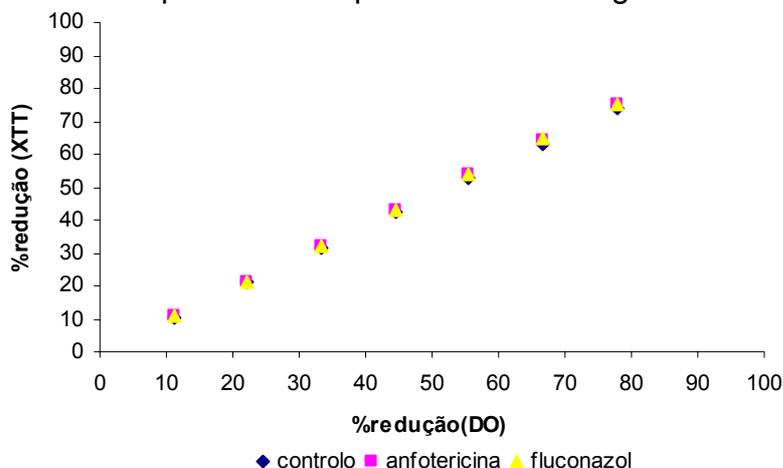


Figura 2.13 – Valores teóricos de % de redução de crescimento avaliados pelo método do XTT e pelo método turbidimétrico.

Como se pode observar na Figura 2.13, a % de redução de crescimento celular é superior quando avaliada pela DO do que quando determinada pelo XTT. Esta diferença é tanto maior quanto maiores forem os valores de % de redução. Quando % de redução avaliada pela DO é de 33%, a avaliada pelo XTT é 32% e quando a % de redução avaliada pela DO é 77%, para o XTT obtém-se 74% de redução.

As diferenças que se verificaram entre a DO e o XTT permitem explicar as diferenças obtidas nos ensaios de determinação da susceptibilidade aos antifúngicos das suspensões celulares e biofilme de *Candida albicans* 12A, no caso do fluconazol, Figuras 2.8 e 2.9 respectivamente e no caso da anfotericina B, Figuras 2.10 e 2.11 respectivamente.

Pode-se ainda verificar que o biofilme se mostrou mais resistente do que as células em suspensão para ambos os antifúngicos utilizados. Esta situação poderá ser explicada pelo facto de os biofilmes serem fenotipicamente diferentes das células que crescem em suspensão. Os biofilmes crescem de uma forma mais lenta e são muito mais densos do que as culturas em suspensão, levando a crer que as células do biofilme possam estar menos predisponíveis para a actuação dos antifúngicos. A análise desta diferença de comportamento entre o biofilme e a suspensão será apresentada com maior detalhe no Capítulo seguinte.

III. Susceptibilidade a antifúngicos de Células Suspensas e Biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

1. Introdução

Candida albicans e *Candida dubliniensis* são fungos patogénicos associados a candidíases de oro-faringe, especialmente em pacientes infectados com o vírus do HIV [97,98,99,100,101].

A infecção do ambiente oral é iniciada pela adesão da célula de levedura às células dos hospedeiros ou aos materiais protésicos que existem na cavidade oral [27,59,9,102]. A capacidade da *Candida albicans* e da *Candida dubliniensis* colonizarem a cavidade oral está associada com as propriedades superficiais da célula e com a presença de saliva no meio [31,15]. Estas duas espécies possuem propriedades superficiais similares e quando em condições de crescimento idênticas, são ambas capazes colonizar o ambiente oral [15].

Uma vez aderidas, *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, crescem sob a forma de biofilme, uma complexa estrutura formada pelas células em diferentes estados metabólicos envolvidas numa matriz polimérica [103,40,67,40,104]. Uma das consequências mais importantes do modo de crescimento do biofilme é uma marcada resistência à terapia antifúngica [15,105,38,92,106,107,108,109]. A resistência antimicrobiana dos biofilmes tem sido atribuída a limitações difusionais da matriz do biofilme ou pela expressão de genes de resistência aos antifúngicos e pela baixa actividade metabólica das células no biofilme, especialmente as células localizadas nas camadas mais profundas [110,49,111,112,113].

Não é ainda claro qual dos factores influencia a resistência dos biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* a antifúngicos, contudo está estabelecido que a resistência aos agentes antifúngicos dos biofilmes destas estirpes é clinicamente relevante, já que as infecções associadas ao biofilme são muitas vezes consequência da terapia convencional com antifúngicos. As concentrações terapêuticas de antifúngicos usadas são determinadas recorrendo a testes de susceptibilidade a

antifúngicos. Como estes testes são condicionados por um conjunto de variáveis, tais como o tamanho do inóculo, o meio de cultura e o tempo de incubação, o “Committee for Clinical Standards” (NCCLS) publicou um conjunto de procedimentos padrão, (ensaios de macro e microdiluições) para testar a susceptibilidade a antifúngicos das leveduras *in vitro*. Contudo, de acordo com o NCCLS os testes são efectuados usando células em suspensão num meio definido ^[68].

Neste estudo foi determinada a susceptibilidade de biofilmes de duas estirpes clínicas de *Candida albicans* e duas estirpes de colecção de *Candida dubliniensis* a um fungicida (anfotericina B) e a um fungistático (fluconazol), sendo depois comparada com a susceptibilidade das suspensões de células das mesmas estirpes.

Os testes de susceptibilidade foram efectuados em RPMI (conforme o recomendado pelo NCCLS) e saliva. Utilizou-se saliva com o intuito de avaliar a influência deste agente na susceptibilidade a antifúngicos, que pode ser relevante nas terapias antifúngicas de infecções orais externas por *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Meios e preparação de culturas

2.1.1. Meios de cultura

Meio de Saliva

O meio de saliva foi preparado adicionando extracto de levedura, peptona e glucose a uma solução de saliva artificial (Gal et al) ^[114] de acordo com a composição descrita na Tabela 3.1. O pH do meio foi ajustado a 6.8, esterilizado a 121°C durante 15 minutos e filtrado com uma membrana de porosidade de 0.22 µm (“Watermann”). O meio foi armazenado a uma temperatura entre 2-5°C.

Tabela 3.1 – Composição do meio de Saliva

Componente	Concentração
NaCl	125.6 mg/L
KCl	963.9 mg/L
KSCN	189.2 mg/L
KH ₂ PO ₄	654.5 mg/L
Ureia	200.0 mg/L
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	763.2 mg/L
NH ₄ Cl	178.0 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	227.8 mg/L
NaHCO ₃	630.8 mg/L
Extracto de Levedura	5000 mg/L
Peptona	5000 mg/L
Glucose	2000 mg/L

2.1.2. Microrganismos

As células foram preparadas de acordo como descrito no Capítulo II item 2.1.4. O inóculo utilizado nos ensaios com células suspensas tinha uma concentração de 1×10^7 cels/mL enquanto que para os ensaios de biofilme a concentração utilizada foi de 1×10^8 cels/mL.

2.1.3. Preparação das soluções de antifúngicos

Os antifúngicos utilizados foram: anfotericina B (Citomed) e fluconazol (Supremase - Pentafarma), preparados como o descrito no Capítulo II secção 2.1.3

Fluconazol: Foi utilizada uma série de soluções de concentrações crescente de fluconazol, de 0 – 1µg/mL e de 0 – 12µg/mL para os ensaios com células em suspensão e biofilme respectivamente.

Anfotericina B: Foi utilizada uma série de soluções de concentrações crescente de anfotericina B, de 0 – 0.1µg/mL e de 0 – 16µg/mL para os ensaios com células em suspensão e biofilme respectivamente.

2.2. Ensaio de susceptibilidade

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados de acordo com o descrito no Capítulo II na Secção 2.3.2, tendo sido a determinação da percentagem de redução do crescimento e actividade celular efectuada através do método turbidimétrico (densidade óptica a 620nm) e da leitura da absorvência após reacção com o XTT (XTT-490nm) com as células em suspensão e os biofilmes. A percentagem (%) de redução de crescimento foi feita de acordo com as expressões indicadas no capítulo II itens 2.3.1 e 2.3.2 (Densidade óptica e XTT respectivamente) e a concentração mínima inibitória (MIC) corresponde à concentração de antifúngico que promove a 50% (MIC₅₀) e 80% (MIC₈₀) de redução do crescimento e actividade celular.

3. Resultados

Neste trabalho foi determinada a susceptibilidade das espécies em estudo à anfotericina B e ao fluconazol. Um dos objectivos deste estudo foi avaliar a influência do meio de saliva ^[114] comparativamente com o meio recomendado pelo NCCLS, o RPMI ^[68] na determinação da concentração mínima inibitória do crescimento das leveduras ^[67]. De acordo com o NCCLS os valores de MIC apresentados referem-se a uma inibição de 80% (MIC₈₀) no crescimento celular. Contudo a redução do tempo de incubação de 48 para 24 horas, origina a que em muitos casos o MIC₈₀ não seja possível determinar, em particular quando se trata de fungistáticos, como é o caso do fluconazol ^[67]. Assim optou-se por apresentar ambos MIC₈₀ e MIC₅₀. A determinação do MIC foi feita recorrendo ao método turbidimétrico e ao método que utiliza o XTT.

3.1. Método turbidimétrico (Densidade óptica-DO)

Podem ser observadas na Tabela 3.2 as gamas de valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ de anfotericina B e fluconazol, determinada em células suspensas e biofilmes, na presença de saliva e de RPMI e obtida pelo método turbidimétrico (DO).

Tabela 3.2 – Gama de valores de MIC de fluconazol, determinados em células suspensas e em biofilme de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B e *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988 através do método turbidimétrico (DO a 620nm).

fluconazol (µg/mL)	MIC ₅₀		MIC ₈₀		
	Suspensão	Biofilme	Suspensão	Biofilme	
SALIVA	<i>Candida albicans</i> 12A	0.2 – 0.4	>12	0.4 – 0.6	>12
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.2 – 0.4	>12	0.3 – 0.6	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.3 – 0.6	11	0.5 – 0.6	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.3 – 0.6	>12	0.5 – 0.8	>12
RPMI	<i>Candida albicans</i> 12A	0.2 – 0.4	>12	0.4 – 0.6	>12
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.2 – 0.4	>12	0.3 – 0.6	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.3 – 0.6	>12	0.5 – 0.6	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.3 – 0.6	0.2	0.5 – 0.8	3

Da análise efectuada aos resultados de MIC₅₀ e MIC₈₀ de fluconazol (Tabela 3.2), salienta-se o facto de que para as células em suspensão na saliva, os valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ estão na mesma gama de valores dos obtidos em RPMI. No que se

refere aos valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ de fluconazol obtidos para o biofilme, não foi possível fazer-se a comparação entre os obtidos nos dois meios de cultura uma vez que concentrações acima de 12µg/mL não eram suficientes para reduzir 50% do crescimento do biofilme e não foram estudadas concentrações superiores, uma vez que concentrações de fluconazol superiores a 10.2µg/mL não entram no plasma não fazendo sentido testá-las^[115]. Verificou-se contudo, uma excepção no valor do MIC₅₀ e MIC₈₀, para a *Candida dubliniensis* 7988.

Na Tabela 3.3 estão apresentadas as gamas de valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ de anfotericina para as células em suspensão e biofilme das estirpes em estudo.

Tabela 3.2 – Gama de valores de MIC de anfotericina B determinados em células suspensas e em biofilme de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B e *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988, através do método turbidimétrico (DO a 620nm).

anfotericina B (µg/mL)		MIC ₅₀		MIC ₈₀	
		Suspensão	Biofilme	Suspensão	Biofilme
SALIVA	<i>Candida albicans</i> 12A	0.006 – 0.01	0.07	0.008 – 0.02	0.3
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.005 – 0.007	0.06	0.009 – 0.01	0.2
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.005 – 0.008	0.05	0.008 – 0.01	1.2
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.008 – 0.02	0.1	0.008 – 0.01	0.5
RPMI	<i>Candida albicans</i> 12A	0.006 – 0.01	0.1	0.008 – 0.02	2.4
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.005 – 0.007	0.1	0.009 – 0.01	3.5
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.005 – 0.008	0.1	0.008 – 0.01	3.6
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.008 – 0.02	0.1	0.008 – 0.01	1.8

Relativamente aos ensaios efectuados com anfotericina B (Tabela 3.2), pode observar-se que os valores de MIC₅₀ e MIC₈₀, de anfotericina para células em suspensão na saliva, estão na mesma gama dos valores obtidos em RPMI tal como no caso do fluconazol.

No biofilme os valores de MIC foram superiores na presença de RPMI, o que sugere que os biofilmes crescidos em RPMI são mais resistentes à anfotericina B do que os desenvolvidos em saliva. Esta observação é particularmente notória para 80% de inibição de crescimento.

3.2. XTT

Na Tabela 3.4 estão apresentadas as gamas de valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ de fluconazol obtidas em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B, *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988, obtidos através da reacção com o XTT.

Tabela 3.4 – Gama de valores de MIC de fluconazol determinados em células suspensas e em biofilme de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B e *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988, através da leitura da intensidade da reacção com o XTT (XTT a 490nm).

fluconazol (µg/mL)	MIC ₅₀		MIC ₈₀		
	Suspensão	Biofilme	Suspensão	Biofilme	
SALIVA	<i>Candida albicans</i> 12A	0.4 – 0.6	>12	0.7 – 1	>12
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.3 – 0.6	>12	0.8 – 1	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.4 – 0.7	>12	0.5 – 1	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.5 – 1	>12	0.8 – 1	>12
RPMI	<i>Candida albicans</i> 12A	0.4 – 0.6	>12	0.7 – 1	>12
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.3 – 0.6	>12	0.8 – 1	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.4 – 0.7	>12	0.5 – 1	>12
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.5 – 1	>12	0.8 – 1	>12

Analisando a Tabela 3.4 pode verificar-se que os valores de MIC₅₀ para as células suspensas em saliva encontram-se na mesma gama de valores do que em RPMI, semelhante ao que se obteve com o método turbidimétrico. Relativamente ao biofilme, tal como acontece com os resultados obtidos pelo método turbidimétrico, 12µg/mL de fluconazol não foram suficientes para inibir 50% e 80% do crescimento das células de levedura.

A gama de valores de MIC obtidos pelo método turbidimétrico foi de uma maneira geral inferior à obtida pelo método que utiliza o XTT. Este resultado era esperado uma vez que foi concluído no estudo apresentado no Capítulo II que a % de redução do crescimento celular avaliada pelo método turbidimétrico (DO) é superior à % de redução da actividade celular avaliada pelo método que utiliza o XTT, consequentemente o MIC obtido pelo método da DO é inferior ao método que utiliza XTT.

Na tabela 3.5 são apresentadas as gamas de valores de MIC₅₀ e MIC₈₀ de anfotericina B obtidos por leitura da intensidade de reacção com o XTT, em células suspensas e biofilme.

Tabela 3.5 – Gama de valores de MIC de anfotericina B determinados em células suspensas e em biofilme de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B e *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988, através da leitura da absorvência da intensidade da reacção com o XTT (XTT a 490nm).

anfotericina B (µg/mL)	MIC ₅₀		MIC ₈₀		
	Suspensão	Biofilme	Suspensão	Biofilme	
SALIVA	<i>Candida albicans</i> 12A	0.008 – 0.02	0.1	0.01 – 0.03	0.4
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.01 – 0.02	0.09	0.03 – 0.1	0.1
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.008 – 0.01	0.2	0.01 – 0.03	1.6
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0.01 – 0.02	0.35	0.01 – 0.04	2.5
RPMI	<i>Candida albicans</i> 12A	0.008 – 0.02	0.3	0.01 – 0.03	2.6
	<i>Candida albicans</i> 46B	0.01 – 0.02	1.1	0.03 – 0.1	1.6
	<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0.008 – 0.01	1	0.01 – 0.03	16
	<i>Candida dubliniensis</i> 7988	>0.1	0.8	>0.1	16

No biofilme os valores de MIC₅₀ de anfotericina B obtidos em meio de saliva são inferiores aos obtidos em RPMI para todas as estirpes.

Foi calculada a taxa de crescimento (µ) de cada uma das estirpes crescidas em suspensão bem como a taxa de formação do biofilme em meio de saliva e RPMI, no sentido de avaliar a sua influência na maior ou menor susceptibilidade aos antifúngicos utilizados. A taxa de crescimento (µ) foi obtida a partir das curvas de crescimento das células em suspensão e da formação do (Figura 3.1 e Figura 3.2).

Na Figura 3.1 verifica-se que os valores de μ dos biofilmes obtidos, nos dois meios de cultura são inferiores aos valores de μ das células em suspensão.

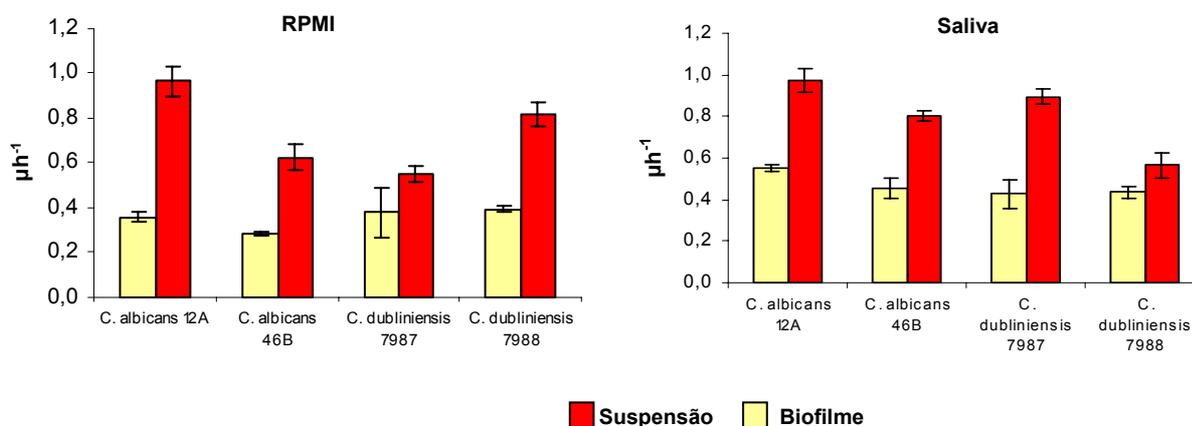


Figura 3.1 – Taxas de crescimento celular e taxas de formação de biofilme de *Candida albicans* 12A, *Candida albicans* 46B, *Candida dubliniensis* 7987 e *Candida dubliniensis* 7988 em RPMI e em Saliva obtidas pelo método turbidimétrico (DO).

Comparando os valores obtidos para os dois meios de cultura, verifica-se em geral as taxas de crescimento das suspensões e biofilmes destas estirpes encontram-se na mesma ordem de grandeza em saliva e em RPMI

Foi calculada a razão entre o XTT e a DO (XTT/DO), das culturas em suspensão e do biofilme no final da fase exponencial de crescimento (Tabela 3.6), com o objectivo de avaliar a razão entre a quantidade de biomassa (DO) e a sua actividade metabólica.

Tabela 3.6 – Razão XTT/DO calculada a partir da razão do valor de absorvência do XTT e da DO ⁽¹⁾.

	XTT/DO			
	Biofilme		Suspensão	
	Saliva	RPMI	Saliva	RPMI
<i>Candida albicans</i> 12A	0,5	1,1	1,8	2,2
<i>Candida albicans</i> 46B	0,3	0,8	1,6	2,7
<i>Candida dubliniensis</i> 7987	0,4	0,8	1,3	3,2
<i>Candida dubliniensis</i> 7988	0,5	0,7	1,9	2,8

⁽¹⁾ Células suspensas recuperadas no final da fase exponencial de crescimento; biofilme formado em 24h

Como se pode observar na Tabela 3.6 os valores da razão XTT/DO do biofilme são inferiores aos das células em suspensão. Verifica-se também que, tanto o biofilme como as suspensões celulares apresentam valores de XTT/DO em RPMI superiores aos em saliva.

4. Discussão

Os biofilmes microbianos são notoriamente mais resistentes do que as células em suspensão, a uma grande variedade de agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos, antisépticos e biocidas industriais. Exemplos disso são os biofilmes formados por bactérias (já muito estudados) que são 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos do que as células em suspensão ^[39]. Em 1995 foi pela primeira vez demonstrado que o mesmo acontece com os biofilmes formados por *Candida albicans* ^[51] num estudo em que o biofilme foi formado em discos de material polimérico utilizado no fabrico de catéteres. Nesse estudo, verificou-se que os antifúngicos utilizados são muito menos activos contra os biofilmes de *Candida albicans*, do que contra as células em suspensão e que as concentrações de antifúngico necessárias para obter 50 % de inibição de actividade metabólica foram 5 a 8 vezes mais altas nos biofilmes do que nas suspensões. Estudos subsequentes demonstraram que o mesmo acontecia para biofilmes de *Candida albicans* formados em superfícies celulósicas ^[55,56], de poliestireno ^[54,15], silicone ^[6], poliuretano ^[116] e acrílico dentário ^[51], ^[117].

O presente estudo teve como objectivo avaliar o efeito da anfotericina B e do fluconazol em células de *Candida albicans* e de *Candida dubliniensis* em suspensão e em biofilme, crescidas em meio com saliva artificial e em RPMI. Numa análise geral aos resultados obtidos verifica-se que todas as estirpes de *Candida* que cresceram em suspensão apresentam elevadas susceptibilidades aos dois antifúngicos utilizados e a gama de valores de MIC obtida está de acordo com o definido pelo NCCLS (MIC <8µg/mL) para estes antifúngicos ^[68]. Relativamente aos resultados obtidos com os biofilmes das estirpes em estudo, nos dois meios de cultura utilizados, verificou-se que apresentam susceptibilidades inferiores às suspensões das mesmas estirpes. Os valores de MIC de fluconazol e anfotericina B dos biofilmes foram cerca de 25 e de 20 vezes superior aos das suspensões, respectivamente.

A diminuição da susceptibilidade do biofilme tem vindo a ser explicada pela ocorrência de diversos mecanismos de resistência que ainda não estão totalmente compreendidos. Têm sido levantadas várias hipóteses sobre os mecanismos de resistência dos biofilmes, uma das quais, referida por Douglas et al ^[118] é a diminuição

da taxa de crescimento das células, particularmente as situadas junto à superfície de adesão. Estes autores realizaram um estudo onde foi comparada a influência de diferentes taxas de crescimento de biofilme (0.02, 0.2 e 0.4h⁻¹) na resistência aos antifúngicos. Os resultados obtidos revelaram que todos os biofilmes eram resistentes aos antifúngicos independentemente da taxa de crescimento a que foram formados. No entanto, estes autores verificaram também que o efeito dos antifúngicos utilizados foi retardado no biofilme formado à menor taxa de crescimento. O mesmo estudo concluiu que as suspensões menos susceptíveis aos antifúngicos possuíam uma menor taxa de crescimento ^[4]. Uma baixa taxa de crescimento é muitas vezes acompanhada de alterações na composição da superfície celular, que, pela expressão de genes de resistência, podem afectar a susceptibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos. Para além disso, a acção dos antifúngicos é pouco eficaz quando as células crescem muito lentamente, uma vez que actuam sobre compostos celulares associados ao crescimento e à actividade metabólica. A taxa de crescimento celular pode ser por isso um modelador importante da acção destes agentes ^[39,119].

Quando se comparam as gamas de valores de MIC de fluconazol e de anfotericina B obtidos para as células em suspensão em RPMI e saliva verifica-se estes são semelhantes nos dois meios, bem como as taxas de crescimento das células em suspensão.

A taxa de formação dos biofilmes foi inferior à taxa de crescimento das células em suspensão e estando a resistência aos antifúngicos associada ao crescimento celular pode-se constatar que a maior resistência do biofilme se pode dever ao mais lento crescimento das células. Evans et al ^[120] verificaram contudo que este efeito só ocorria quando a taxa de crescimento do biofilme era muito baixa e inferior a 0.3 h ^[120].

Neste estudo, a taxa de crescimento parece afectar a resistência do biofilme aos antifúngicos. No entanto, no biofilme o meio de cultura influenciou a resistência à anfotericina, embora as taxas de crescimento não tenham sido muito diferentes nos dois meios estudados.

Outros factores, tais como a expressão de genes de resistência no biofilme, ou limitações difusionais impostas pela matriz polimérica poderiam explicar a maior

resistência dos biofilmes. Alguns autores consideram que as limitações difusionais à penetração do antifúngico através do biofilme, podem ser consideradas um mecanismo de resistência ^[39,121]. A passagem do antifúngico através das diferentes camadas de células e da matriz polimérica faz com que a concentração que atinge as células mais internas do biofilme seja inferior.

No presente estudo, a razão XTT/DO é superior nas células em suspensão, levando a crer que nestas, a actividade celular medida através do método que utiliza o XTT, é superior à actividade do biofilme. A actividade metabólica é um dos parâmetros implicados na resistência de biofilmes bacterianos a antibióticos. No entanto, quando se avalia a susceptibilidade nos dois meios de cultura (Saliva e RPMI) a actividade parece não estar implicada na maior ou menor resistência. Por exemplo a razão entre XTT/DO permitiu verificar que as células se encontram metabolicamente mais activas na presença de RPMI. No entanto, este factor parece não estar a influenciar a susceptibilidade das células na presença de saliva ou RPMI uma vez que ambos os meios, as células são igualmente susceptíveis. Este valor permite também uma indicação da maior ou menor quantidade de biomassa não activa presente na amostra. Neste caso e como seria de esperar, as amostras de biofilme parecem apresentar valores de biomassa superiores aos valores das células em suspensão. No entanto, e embora a matriz possa ter um papel retardador à passagem de alguns compostos através do biofilme, a maior parte dos estudos com biofilmes bacterianos, indicam que a matriz não constitui uma barreira à difusão do agente ^[122]. Douglas et al realizaram estudos no sentido de investigar se a matriz formada pelos biofilmes de *Candida albicans* teria um papel fundamental na sua resistência aos antifúngicos. Nesses estudos, foram comparadas as susceptibilidades de biofilmes crescidos em condições de agitação (com maior formação de matriz) e sem agitação (com menor produção de matriz) e não se verificaram diferenças significativas na susceptibilidade aos antifúngicos, indicando que a matriz não estaria relacionada com a diminuição da susceptibilidade em biofilmes. ^[110]. Por outro lado estudos realizados em biofilmes bacterianos também revelaram que o crescimento das células no biofilme é mais lento do que numa cultura suspensa e que este parâmetro pode determinar a susceptibilidade a antibióticos ^[55,4].

Os meios de Saliva e RPMI parecem não influenciar a susceptibilidade das suspensões celulares, contudo, no caso dos biofilmes estes mostraram-se mais resistentes à anfotericina B em RPMI do que em meio de saliva.

Fazendo uma análise entre a actividade metabólica e a densidade óptica do biofilme verifica-se que o valor XTT/DO é superior em RPMI, este facto pode indicar que, por um lado as células em RPMI estão metabolicamente mais activas, mas por outro que houve maior produção de matriz no biofilme formado em saliva. Isto poderá indicar que a contribuição da matriz para a maior resistência aos antifúngicos não é assim tão significativa, evidenciando que as limitações difusionais podem não ser factores condicionantes à actuação dos antifúngicos. No caso do fluconazol, não foi possível fazer um estudo comparativo entre os dois meios (Saliva e RPMI) pelo facto de em todas as estirpes o valor de MIC de fluconazol obtido ser superior a 12µg/mL.

Os resultados obtidos sugerem que a resistência dos biofilmes formados por *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, tal como nos biofilmes bacterianos, é um processo muito complexo, que inclui uma multiplicidade de factores, não podendo ser explicado por um simples mecanismo molecular.

No seu habitat natural, as leveduras estão associadas em biofilmes e são nitidamente mais resistentes aos antifúngicos do que as células em suspensão, o que em termos clínicos poderá ter sérias implicações. A maior parte das prescrições de antifúngicos são feitas com base em estudos realizados com células em suspensão, sendo as quantidades de antifúngico prescritas, possivelmente inferiores às necessárias para eliminar biofilmes. Por outro lado, é necessário rever as normas do NCCLS no sentido de contemplarem ensaios normalizados para estudos com biofilmes. Um outro aspecto a considerar, é o facto de que os estudos deveriam realizar-se nas condições de crescimento dos microrganismos mais próximas da realidade, como por exemplo, tendo em atenção o meio de cultura utilizado, as condições de temperatura, o pH, etc.

IV. Efeito de concentrações subinibitórias de antifúngicos na adesão e propriedades superficiais de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

1. Introdução

A Candidíase é uma infecção fúngica que pode ser letal em indivíduos imunocomprometidos, em particular doentes com SIDA [123]. Apesar dos tratamentos constantes os doentes com SIDA têm frequentes recaídas e estão muito vulneráveis no que diz respeito a este tipo de infecções [124,125,126]. Assim, é muito vulgar o uso de agentes antifúngicos em profilaxias de longa duração numa tentativa de prevenir as infecções fúngicas prolongando a sua esperança de vida. Contudo, os níveis de antifúngicos presentes nos tecidos e fluidos cerebrospinais dos humanos estão muitas vezes abaixo dos seus níveis fungicidas ou fungistáticos (de acordo com tipo usado), estando presentes em concentrações subinibitórias [127,128,129]. Estes tratamentos, fazem com que o microrganismo se adapte e vá criando resistências aos agentes microbianos mais vulgarmente usados [130].

Vários estudos realizados com bactérias [131] mostraram que existem estruturas superficiais importantes na adesão de bactérias patogénicas, que se modificam ou inclusive chegam a desaparecer quando as bactérias crescem na presença de concentrações subinibitórias de antibióticos. Isto conduz a alterações nas propriedades físico-químicas da superfície celular, principalmente a hidrofobicidade a carga e a composição química que se repercutem de forma significativa na adesão inicial das células aos substratos [131].

No caso das leveduras a sua patogenicidade parece estar relacionada com a sua capacidade de aderir e colonizar um variado número de superfícies, incluindo células de tecidos do hospedeiro. A capacidade de adesão deve-se às suas propriedades superficiais, que por sua vez poderão ser alteradas se a célula for sujeita a concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos, podendo assim ser alterada a sua patogenicidade [130].

1.1. Determinação das propriedades superficiais

O processo de adesão dos microrganismos é um passo fundamental no desenvolvimento da sua patogenicidade. Neste processo células microbianas interagem com a superfície de adesão [132].

As forças atractivas e repulsivas geradas entre as duas superfícies (forças electrostáticas, interacções hidrofóbicas e forças de van der Waals) condicionam o processo de adesão. As forças electrostáticas repelem as duas superfícies já que a maioria dos microrganismos e das superfícies inertes quando imersos numa solução aquosa adquirem carga negativa e as interacções hidrofóbicas têm influência positiva no processo de adesão [33,41,38,42].

A hidrofobicidade pode ser determinada por vários métodos. Através da adesão microbiana a hidrocarbonetos MATH em que as células hidrofóbicas se ligam às moléculas de hidrocarbonetos [133,134,135,136,137,138,31], dos testes de agregação das células na presença de sais ("Salting-out"), em que há uma aglomeração espontânea das células a partir do momento que se junta uma determinada concentração de sais adequada [139,140,31], a cromatografia por interacções hidrofóbicas em que as células hidrofóbicas aderem a uma coluna de cromatografia com grupos hidrofóbicos, [133,141], da adesão a microesferas em que as células aderem a microesferas hidrofóbicas [142,143], e através da medição de ângulos de contacto (CAM) em que são colocadas gotas de águas e outros solventes numa camada de células previamente desidratadas e é medido o ângulo de contacto a gota faz com a camada de células. As células mais hidrofóbicas deverão ter valores de ângulos de contacto com a água superiores a 50° [144,145,31].

A medição do ângulo de contacto da água formado sobre uma camada de células microbianas dá uma indicação qualitativa da hidrofobicidade do microrganismo. Contudo, segundo van Oss et Giese (1995) [146] a hidrofobicidade pode ser quantificada e expressa em SI pela energia livre de interacção entre as duas superfícies do mesmo tipo quando imersas em água, ΔG_{iwi}^{TOT} . Se este valor for negativo a superfície é considerada hidrofóbica, se o valor for positivo a superfície é considerada hidrofílica. O grau de hidrofobicidade pode ser calculado através da seguinte igualdade:

$$\Delta G_{iwi}^{TOT} = \Delta G_{iwi}^{LW} + \Delta G_{iwi}^{AB}$$

Sendo ΔG_{iwi}^{LW} e ΔG_{iwi}^{AB} , as componentes apolar e polar respectivamente, da energia livre de interacção, entre a estirpe (i) e a água (w).

$$\Delta G_{iwi}^{LW} = -2\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} \times \sqrt{\gamma_w^{LW}}\right)$$

O γ_i^{LW} representa a componente apolar da tensão superficial da superfície celular e γ_w^{LW} a da água.

$$\Delta G_{iwi}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_w^- \gamma_i^+}\right)$$

Sendo $\gamma_w^+ \gamma_w^-$ e $\gamma_i^+ \gamma_i^-$ os parâmetros dador (+) e aceitador (-) das componentes polares da tensão superficial para a superfície (i) e para a água (w) respectivamente.

As componentes da tensão superficial da água são: $\gamma_w^{LW} = 21.8mJ/m^2$ e $\gamma_w^{AB} = 51.2mJ/m^2$, sendo $\gamma_w^- = \gamma_w^+ = 25.5mJ/m^2$.

Neste estudo as células de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* foram submetidas a concentrações subinibitórias de anfotericina B e de itraconazol na presença de saliva artificial. O principal objectivo foi o estudo das propriedades superficiais das células crescidas em concentrações subinibitórias de antifúngico e sua capacidade de adesão a materiais utilizados no fabrico de dispositivos médicos dentários (acrílico e hidroxiapatite).

2. Materiais e Métodos

2.1. Meios e preparação de culturas

2.1.1. Meios de Cultura

O microrganismo utilizado foi a espécie de *Candida albicans 46B* e as condições de crescimento foram semelhantes às descritas no Capítulo II na secção 2.1. O meio de cultura utilizado foi a saliva cujo modo de preparação se encontra descrito no Capítulo III, secção 2.1.1

2.1.2. Preparação das soluções de antifúngicos

Os antifúngicos usados foram: anfotericina B (Citomed) e itraconazol (Sporonox – Janssen Pharmaceuticals), preparados de acordo com o descrito no Capítulo II secção 2.1.4.

Anfotericina B: foi preparada em meio de saliva, uma solução de anfotericina B, de 0.01µg/mL.

Itraconazol: foi preparada em meio de saliva, uma solução de itraconazol, de 0.25µg/mL.

2.2. Crescimento das células de levedura em concentrações subinibitórias de antifúngico

Foi preparado uma suspensão celular de acordo com o descrito no Capítulo II secção 2.1.4. Esta suspensão celular foi colocada crescer em meio de cultura de saliva, com ou sem antifúngico (nas concentrações subinibitórias definidas no item 2.1) numa concentração celular final de 1×10^7 cels/mL. As suspensões foram incubadas a 37°C e 100rpm durante 24 horas.

2.3. Adesão

2.3.1. Materiais de Adesão

Os materiais utilizados para os ensaios de adesão foram o acrílico auto – polimerizável (Vertex – Self Curing, Dentimex BV, The Netherlands), representando os materiais protésicos, e a hidroxiapatite (batch P120 – Plasma Biotal; UK), representando o esmalte dos dentes.

2.3.2. Preparação dos materiais de adesão

As placas circulares de hidroxiapatite (HAP) foram preparados com HAP em pó como o descrito por Lopes et al ^[147]. A HAP em pó foi submetida uma pressão de 288Mpa em moldes de aço para formar discos com 14mm de diâmetro e 2mm de espessura usando para cada um 4g de pó de HAP. Os discos foram então colocados num forno cuja temperatura foi aumentando 4°C/min progressivamente até atingir 1300°C, temperatura a que foram mantidos durante 1 hora. Findo o tempo de cozimento o forno arrefeceu naturalmente até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, os discos foram polidos mecanicamente por diferentes lixas com granulometrias decrescentes até ser efectuado um último polimento com uma granulometria de 1µm.

As placas de acrílico foram preparadas como o descrito por Samaranayake e MacFarlane ^[148]. Foram pesadas 1,5g de acrílico em pó e misturadas com 1ml de monómero líquido. De seguida esta solução foi agitada e colocada numa superfície lisa, cobrindo-se a mesma com uma folha de papel de alumínio. Passados 45 segundos, foi colocada uma nova camada da mesma solução sobre a primeira camada. As camadas polimerizaram durante 30 minutos, e depois cortadas em quadrados com 8x8x2mm de dimensão.

As placas de HAP e de acrílico usadas para adesão, depois de serem lavadas com etanol e água ultra-pura estéril, foram previamente submersas em água ultra-pura estéril durante 24 horas à temperatura ambiente secaram depois durante 24 horas a 37°C.

2.3.3. Ensaio de Adesão

As células foram preparadas segundo o descrito em 2.2 centrifugadas e ressuspendidas em água ultra-pura estéril numa concentração celular final de 1×10^7 cels/mL. Foram utilizadas placas de cultura celular de 24 poços e o material usado para a adesão foram as pastilhas de hidroxiapatite e de acrílico preparadas de acordo com o descrito em 2.3.2. As pastilhas foram colocadas nos diferentes poços tal como está representado na Figura 4.1. Em cada poço foram colocados 2 ml da suspensão celular preparada. A placa foi incubada durante 1 hora a 37°C numa incubadora orbital a 100 rpm. Finalizado o tempo de incubação, as células em suspensão foram retiradas e cada poço foi lavado 2 vezes com água estéril.

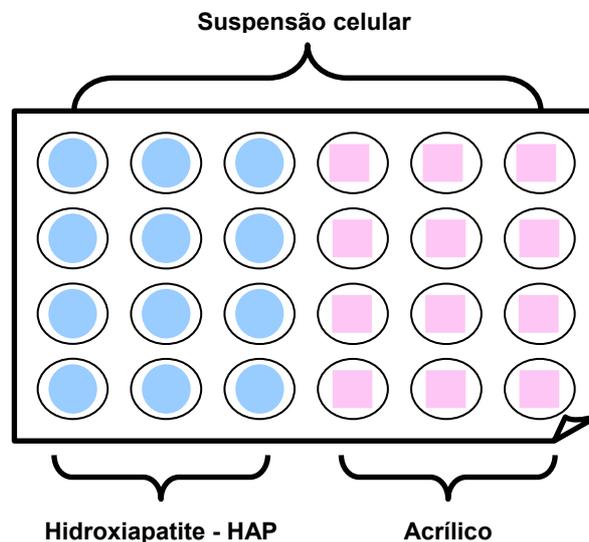


Figura 4.1– Representação esquemática da placa de cultura celular onde se efectuaram os ensaios relativo ao estudo adesão.

Depois de aderidas, as células foram então coradas com um fluorocromo, o SYTO-13. Em cada poço foram colocados $500\mu\text{L}$ de SYTO-13 e a placa foi mantida no escuro durante 15 minutos de forma a assegurar que todas as células aderidas fiquem coradas.

Findo tempo de exposição ao corante, as células foram lavadas para retirar o excesso de corante. As pastilhas foram então observadas ao microscópio de epifluorescência utilizando um filtro de 480 a 490nm e para cada uma foram capturadas 25 imagens a partir das quais foi contabilizado, através de um programa de contagem de imagens (SigmaScan Pro 5), o número de células aderidas a cada placa.

2.3.4. Determinação das propriedades superficiais das leveduras

As células foram preparadas como o descrito em 2.1, de seguida foi preparada uma suspensão de 100ml em água com 1×10^9 cels/mL.

A suspensão celular foi filtrada sob vácuo com uma membrana de 45mm de diâmetro e com 3 μ m de porosidade (“Watermann”). De seguida a membrana foi dividida em três partes iguais que foram colocadas em placas de petri com agar – glicerol, 20 e 10 % (p/v) respectivamente.

As propriedades superficiais das células foram determinadas através da medição dos ângulos de contacto formados sobre a camada de células depositada na membrana por três líquidos diferentes, um polar (água) e dois apolares (formamida e bromonaftaleno). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e cada ensaio foi feito em triplicado, medindo-se pelo menos 10 ângulos de contacto por amostra. A medição dos ângulos de contacto foi feita através da técnica da gota séssil num medidor de ângulos de contacto (OCA 15 PLUS, DATAPHYSICS). As propriedades superficiais foram calculadas através da teoria de van Oss et Giese ^[139] apresentada no ponto 1.1 neste Capítulo.

3. Resultados

3.1. Adesão

Foi efectuado um estudo sobre a capacidade de adesão ao acrílico e à hidroxiapatite das células de *Candida albicans 46B* crescidas durante 24 horas em concentrações subinibitórias de anfotericina B e itraconazol. Na Figura 4.2 podem ser observados o número de células de *Candida* aderidas ao acrílico e à hidroxiapatite, quando crescidas em meio de saliva ou em meio de saliva com anfotericina B e itraconazol.

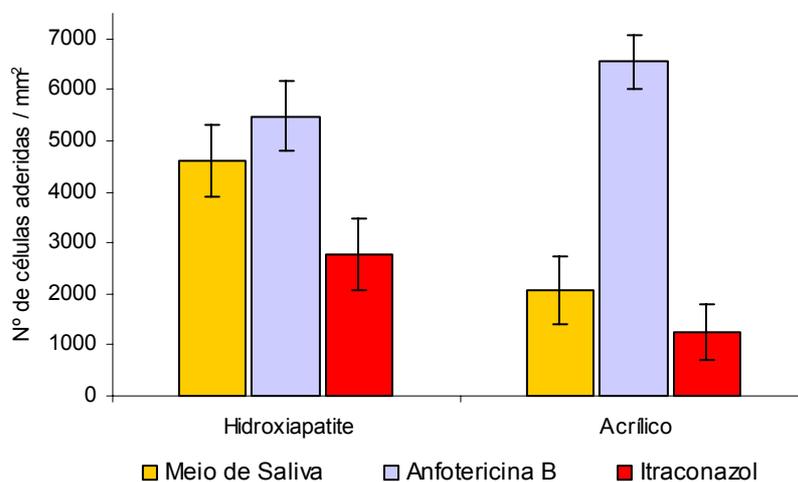


Figura 4.2 – Número de células de *Candida albicans 46B* aderidas à hidroxiapatite e ao acrílico, e crescidas em saliva e saliva com concentrações subinibitórias de anfotericina e itraconazol.

Dos resultados que podem ser observados na Figura 3.1, verificam-se alterações na capacidade de adesão das células de *Candida* quando crescidas nos antifúngicos. A capacidade de adesão das células crescidas em anfotericina B aumenta e a capacidade de adesão das que foram crescidas em itraconazol diminui relativamente ao controlo, no qual células crescem em meio de saliva.

3.2. Determinação das propriedades superficiais das leveduras

O cálculo das componentes de tensão superficial foi feito segundo van Oss e Giese [139] e o grau de hidrofobicidade expresso nas unidades SI e como energia livre de interacção entre duas superfícies celulares (s) imersas em água (w), ΔG_{sws}^{TOT}

Tabela 4.1 – Grau de hidrofobicidade (ΔG_{sws}^{TOT}), parâmetros dador γ^- e aceitador γ^+ de electrões da componente polar de tensão superficial e componente apolar γ^{LW} da tensão superficial das células de *Candida albicans* 46B crescidas em concentrações subinibitórias de itraconazol e anfotericina B.

<i>Candida albicans</i> 46B	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	ΔG_{sws}^{TOT} (mJ/m ²)
Saliva	27.6	4.1	53.1	26.4
Saliva + anfotericina B	26.9	4.7	53,6	25.7
Saliva + itraconazol	33.1	2.3	53.5	26.6

Na tabela 4.1 pode-se observar que os valores de energia livre de interacção, ΔG_{sws}^{TOT} (que define o grau de hidrofobicidade das células) não variam muito entre as células crescidas na ausência e na presença de concentrações subinibitórias de antifúngicos. Relativamente ao valor da componente γ^{LW} verifica-se uma diminuição nas células crescidas em concentrações subinibitórias de anfotericina B e um aumento nas células crescidas em concentrações subinibitórias de itraconazol relativamente ao controlo. No que diz respeito à componente aceitadora de electrões γ^+ , os valores das células crescidas na presença de concentrações subinibitórias de itraconazol foram inferiores aos das células controlo. Observa-se uma diminuição e um aumento dos valores γ^{LW} e γ^+ respectivamente, das células crescidas em meio de saliva com anfotericina B relativamente aos valores das células crescidas em meio de saliva (sem adição de antifúngico).

4. Discussão

Henriques et al ^[84] realizaram um estudo sobre a capacidade de adesão das estirpes utilizadas neste trabalho. Fizeram a sua caracterização físico-química e verificaram que as quatro estirpes tinham comportamentos e propriedades superficiais semelhantes. Assim neste trabalho optou-se por utilizar apenas uma das estirpes em estudo. Foi utilizada uma das estirpes de *Candida albicans*, visto esta espécie ser um dos agentes etiológicos responsáveis pela maioria das Candidiases sistémicas e orais, embora possam também estar envolvidas outras espécies de *Candida* (*Candida dubliniensis*, por ex.). ^[11,149,150] Foram estudadas a capacidade de adesão ao acrílico e à hidroxiapatite e as propriedades superficiais da *Candida albicans* 46B quando crescidas em concentrações subinibitórias de anfotericina B e itraconazol.

Henriques et al ^[84] desenvolveram um outro estudo sobre a capacidade de adesão de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* à hidroxiapatite e ao acrílico na presença de saliva e de água. Este estudo revelou que na presença de saliva se verifica a adsorção de iões fosfato na superfície do acrílico (detectado por espectrometria fotoelectrónica por raio X-XPS), o que conduz a um aumento na capacidade dadora de electrões (γ^-) deste material. Neste estudo também se provou que as células na presença de saliva exibem um ligeiro aumento nos seus grupos aceitadores de electrões (γ^+), sendo o aumento da capacidade de adesão das células na presença de saliva explicado pelo aumento das interacções entre os grupos dadores de electrões (γ^-) do acrílico e os grupos aceitadores de electrões (γ^+) das células. Estes autores verificaram ainda que no caso da hidroxiapatite, a saliva levou ao aumento do número de grupos aceitadores de electrões (γ^+), provavelmente devido à adsorção de sódio e potássio. Verificaram também que o facto de o acrílico adsorver preferencialmente os iões fosfato e a HAP os iões de sódio e de potássio, pode ser explicado pela superior capacidade aceitadora de electrões (γ^+) do acrílico relativamente à da HAP e pelo contrário, a HAP ter uma capacidade dadora de electrões (γ^-) superior à do acrílico ^[84].

Segundo os mesmos autores a capacidade de adesão de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* parece estar relacionada com as capacidades dadoras ou aceitadoras de electrões das células e da superfície. A interacção que se estabelece entre as leveduras e as superfícies orais (HAP e acrílico) é preferencialmente do tipo ácido

base de Lewis (aceitador - dador de electrões) ^[84]. Como estes autores utilizaram os mesmos materiais e as mesmas estirpes deste trabalho, os seus resultados podem ajudar a interpretar os resultados obtidos neste capítulo.

O aumento da capacidade de adesão das células crescidas em concentrações subinibitórias de anfotericina B pode ser explicado pelo aumento do valor da componente γ^+ da superfície das células. As células crescidas em itraconazol apresentam menor capacidade de adesão e uma menor componente γ^+ relativamente ao controlo, isto é, a capacidade aceitadora de electrões destas células diminuiu, levando a uma diminuição da interacção entre as células e a superfície.

Ellepola et al ^[11], estudaram a capacidade de adesão de *Candida albicans* quando exposta a exposições a antifúngicos durante um tempo limitado. Estes autores concluíram que as leveduras quando expostas à anfotericina B diminuía a sua capacidade de adesão. Contudo, a concentração de anfotericina B utilizada nesse estudo era muito superior (0,72 $\mu\text{g/mL}$) à utilizada neste estudo (0,01 $\mu\text{g/mL}$), que provavelmente terá conduzido à lise celular levando a que o número de células aderidas fosse inferior ao do controlo.

Este estudo permitiu concluir que as propriedades superficiais das células são alteradas quando estas são expostas a concentrações subinibitórias de anfotericina B e itraconazol. Tal como Henriques et al demonstraram, a capacidade de adesão das células não parece ser dependente da sua hidrofobicidade uma vez que apesar de não se verificarem alterações entre a hidrofobicidade das células quando crescidas nos antifúngicos, a sua capacidade de adesão foi alterada. Em vez disso, a adesão parece ser explicada pela ocorrência de interacções ácido-base de Lewis entre as componentes aceitadoras de electrões das células e as dadoras de electrões das superfícies.

Em termos clínicos pode-se concluir que as terapias de longa duração com antifúngicos e em particular com anfotericina B conduz ao aumento da capacidade de adesão de *Candida* a superfícies. Estando o fenómeno de adesão relacionado com a virulência desta espécie, não parece ser aconselhável este tipo de prática.

V. Conclusões e Recomendações para trabalho futuro

1. Conclusões

O trabalho desenvolvido teve como objectivo avaliar o efeito de alguns antifúngicos em células suspensas e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Foram realizados estudos de avaliação da susceptibilidade à anfotericina B e fluconazol de suspensões celulares e de biofilmes em dois meios de cultura diferentes (o meio de saliva artificial e o RPMI). Foi também avaliada a capacidade de adesão de uma estirpe de *Candida albicans* quando crescida em condições subinibitórias de antifúngicos.

Os estudos de susceptibilidade permitiram concluir que os biofilmes são muito mais resistentes à anfotericina B e ao fluconazol do que as suspensões celulares das espécies estudadas. Não foi possível no entanto determinar a causa da maior susceptibilidade das suspensões aos antifúngicos utilizados. Os resultados obtidos mostraram que a resistência dos biofilmes formados por *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* resulta de um processo muito complexo, que inclui uma multiplicidade de factores, e que não pode ser explicado por um simples mecanismo molecular.

Os resultados permitiram ainda concluir que a forma séssil ou planctónica das células e o meio de cultura onde se desenvolvem influencia a sua susceptibilidade aos antifúngicos, pelo que, sugere-se que as normas sugeridas pelo NCCLS tenham em conta estes factores.

Foram ainda comparados dois métodos de determinação da susceptibilidade das leveduras aos antifúngicos, o método turbidimétrico e o método que utiliza o XTT. Os resultados obtidos mostraram que os valores de % de redução de crescimento celular obtidos pelo método turbidimétrico são superiores aos valores de % de redução de actividade obtidos pelo método que utiliza o XTT, o que pode ser justificado pelo modo de actuação dos antifúngicos.

No que respeita ao efeito de concentrações subinibitórias de antifúngicos (anfotericina B e itraconazol) na capacidade de adesão e propriedades superficiais de *Candida albicans* 46B, o estudo realizado permitiu concluir que as propriedades superficiais das células são alteradas quando estas se encontram expostas a este tipo de

concentração durante períodos de tempo prolongados. A capacidade de adesão das células não parece ser dependente da sua hidrofobicidade, uma vez que não se verificaram alterações entre a hidrofobicidade das células com ou sem exposição a antifúngicos embora a sua capacidade de adesão tenha sido alterada. Pode concluir-se que a exposição a concentrações subinibitórias de antifúngicos, leva a modificações na capacidade de adesão de leveduras a superfícies, no caso específico da anfotericina, observou-se um aumento da capacidade de adesão *Candida albicans* 46B quando submetida a concentrações subinibitórias deste agente.

2. Recomendações para trabalho futuro

A maior parte das prescrições de antifúngicos são feitas com base em estudos realizados com células em suspensão, sendo as quantidades de antifúngico prescritas, possivelmente inferiores às necessárias para eliminar biofilmes. Por outro lado, é necessário rever as normas do NCCLS no sentido de contemplarem ensaios normalizados para estudos com biofilmes. Um outro aspecto a considerar, é o facto de que os estudos de susceptibilidade se deveriam realizar nas condições de crescimento dos microrganismos mais próximas da realidade, como por exemplo, tendo em atenção o meio de cultura utilizado, as condições de temperatura, o pH, etc. Uma vez que os estudos com células em suspensão estão já muito desenvolvidos, e que no seu habitat natural os microrganismos têm tendência para se agregarem e formarem biofilmes sugere-se como trabalho futuro desenvolver um estudo mais aprofundado sobre a susceptibilidade dos biofilmes formados por estas espécies de leveduras aos antifúngicos e alargar este estudo a um leque mais variado de espécies de leveduras, uma vez que com o uso generalizado de terapias antifúngicas no combate às infecções provocadas por fungos, tem levado ao aparecimento de novas espécies cada vez mais resistentes aos antifúngicos vulgarmente utilizados.

Estes estudos deveriam incluir:

- A avaliação da actuação de diferentes antifúngicos nas várias fases de desenvolvimento de um biofilme, o que poderia permitir uma avaliação mais precisa sobre qual ou quais os possíveis mecanismos de resistência que o biofilme apresenta relativamente aos antifúngicos.

- A avaliação de vários meios de cultura específicos e adequados para a situação e microrganismo. No caso específico de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* é recomendado o uso do meio de saliva artificial, já que o estudo incide sobre o crescimento de espécies de *Candida* no ambiente oral.
- A avaliação das alterações no genoma das células quando na forma de biofilme são sujeitas a antifúngicos para se poder identificar os genes de resistência.
- A avaliação do efeito de agitação na susceptibilidade a antifúngicos de elevado e baixo peso molecular. Este estudo permitiria verificar a influência das limitações difusionais nos mecanismos de resistência.

Seria ainda interessante estudar a capacidade de adesão de outras estirpes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e mesmo de outras espécies de leveduras depois de expostas a concentrações subinibitórias de antifúngicos.

O estudo de outras espécies que não a *Candida albicans* parece ser bastante importante uma vez que existem cada vez mais espécies emergentes como agentes patogénicos.

Por fim seria ainda interessante avaliar o efeito de concentrações subinibitórias noutros factores de virulência de espécies de *Candida*, como a produção de enzimas hidrolíticas, adesão a células epiteliais, imunomodelação do sistema imunitário e interacção com macrófagos.

VI. Bibliografia

1. Chang H.C., Chang J.J., Huang A.H. and Chang T.C. (2003) *Evaluation of a Capacitance Method for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures*. Journal of Clinical Microbiology. 38 (3): 971-976.
2. Kuhn D.M, Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2003) *Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism*. Journal of Clinical Microbiology. 41 (1): 506-508.
3. Selitrennikoff C.P. (2001) *Antifungal Proteins*. Applied and Environmental Microbiology. 67 (7): 2883-2894.
4. Baillie G.S., Douglas L.J. (1998) *Effect of Growth Rate on Resistance of Candida albicans Biofilms to Antifungal Agents*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42 (8): 1900-1905.
5. Brajtburg J., Bolard J. (2003) *Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B*. Clinical Microbiology Reviews. 9 (4): 512-531.
6. Chandra J., Kuhn D.M, Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T. and Ghannoum M.A. (2001) *Biofilm formation by the fungal pathogen candida albicans: development, architecture and drug resistance*. Journal of Bacteriology. 183 (18): 5385-5394.
7. Yang C.W., Barkham T.M.S., Chan F.Y. and Wang Y. (2003) *Prevalence of Candida Species, Including Candida dubliniensis, in Singapore*. Journal of Clinical Microbiology. 41 (1): 472-474.
8. Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Sousa C., Harashima T., Shen W., Wang P., Pan X., Waugh M. and Heitman J. (2000) *Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 (4): 746-785.
9. Gilfillan G.D., Sullivan D.J., Haynes K., Parkinson T., Coleman D.C. and Gow N.A.R. (1998) *Candida dubliniensis: phylogeny and putative virulence factors*. Microbiology. 144 829-838.
10. O'Sullivan J.M., Jenkinson H.F. and Cannon R.D. (2000) *Adhesion of Candida albicans to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal*. Microbiology. 146 41-48.
11. Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P. (1998) *Adhesion of oral Candida albicans isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents*. Archives of Oral Biology. 43 999-1007.

12. Gee S.F., Joly S., Soll D.R., Meis J.F.G., Verweij P.E., Polacheck I., Sullivan D.J. and Coleman D.C. (2002) *Identification of Four Distinct Genotypes of Candida dubliniensis and Detection of Microevolution In Vitro and In Vivo*. Journal of Clinical Microbiology. 40 (2): 556-574.
13. Fitzgerald D.H., Coleman D.C. and O'Connell B.C. (2003) *Susceptibility of Candida dubliniensis to Salivary Histatin 3*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47 (1): 70-76.
14. Odds F.C., Nuffel L.V. and Dams G. (1998) *Prevalence of Candida dubliniensis Isolates in a Yeast Stock Collection*. Journal of Clinical Microbiology. 36 (10): 2869-2873.
15. Ramage G., Walle K.V. and López-Ribot J.L. (2001) *Biofilm formation by Candida dubliniensis*. Journal of Clinical Microbiology. 39 (9): 3234-3240.
16. Mosca C.O., Moragues M.D., Llovo J., Mosaid A., Coleman D.C. and Ponton J. (2003) *Casein Agar: a Useful Medium for Differentiating Candida dubliniensis from Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology. 41 1259-1262.
17. Mosaid A., Sullivan D.J., Salkin I., Shanley D. and Coleman D.C. (2001) *Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar*. Journal of Clinical Microbiology. 39 (1): 323-327.
18. Brown A.J.P. (2003) *Expression of Growth Form-Specific Factors during Morphogenesis in Candida albicans*. (7): 87-122.
19. Chaffin W.L, López-Ribot J.L., Casanova M, Gozalbo D. and Martinez J.P. (1998) *Cell Wall and Secreted Proteins of Candida albicans: Identification, Function and Expression*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (1): 130-180.
20. Smith R., Oldfield E. (1984) *Dynamic Structures of Membranes by Deuterium NMR*. Science. 225-280.
21. Singer S.J., Nicholson J.N. (1972) *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membrane*. Science. 175 720.
22. Singer S.J. (1974) *Molecular Organization of Membranes*. Annu.Rev.Biochem. 43 805-
23. Robertson D. (1981) *Membrane Structure*. J.Cell Biol. 91 1895-1981.
24. Seelig J., Seelig A. (1980) *Lipid Conformation in Model Membranes and Biological Membranes*. Q.Rev.Biophys. 13 19.
25. Papahadjopoulos D., Poste G. and Vail W.J. (1979) *Studies on Membrane-fusion with Natural and Model Membranes*. Methods Membr.Biol. 10 1
26. Dube J., Setterfield G., Kiss G. and Lusena C.V. (1973) *Fate of the Plasma Membrane of Saccharomyces cerevisiae During Cell Rupture*. Can.J.Microbiol. 19 285-

27. White T.C., Marr K.A. and Bowden R.A. (1998) *Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (2): 382-402.
28. Edidin M. (1974) *Rotational and Translational Diffusion in Membrane*. *Annu.Rev.Biophys.Bioeng*. 3 179
29. Cherry R.J. (1979) *Rotational and Lateral Diffusion in Membrane*. *Biochim Biophys Acta*. 559 289-
30. Waters M.G.J., Williams D.W., Jagger R.G. and Lewis M.A.O. (1997) *Adherence of Candida albicans to experimental denture soft lining materials*. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 77 (3): 306-312.
31. Henriques M., Gasparetto K., Azeredo J. and Oliveira R. (2002) *Experimental methodology to quantify Candida albicans cell surface hydrophobicity*. *Biotechnology Letters*. 24 1111-1115.
32. Donlan R.M. (2001) *Biofilms and Device-Associated Infections*. *Emerg.Infect.Dis*. 7 (2):
33. Dunne W.M. (2003) *Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?* *Clinical Microbiology Reviews*. 15 155-166.
34. Holmes A.R., McNab R. and Jenkinson H.F. (1996) *Candida albicans Binding to the Oral Bacterium Streptococcus gordonii Involves Multiple Adhesin-Receptor Interactions*. *Infection and Immunity*. 64 (11): 4680-4685.
35. Miyake Y, Fugita Y, Minagi S. and Suginaka H. (1996) *Surface Hydrophobicity and adherence of Candida to acrylic surfaces*. *Micribios*. 46 7-14.
36. Panagoda G.J., Ellepola A.N.B. and Samaranyake L.P. (1998) *Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of Candida parapsilosis and Candida albicans*. *APMIS*. 106 736-742.
37. Ener B., Douglas L.J. (1992) *Correlation between cell--surface hydrophobicity of Candida albicans and adhesion to buccal epithelial cells*. *Fems Microbiol.Lett*. 78 37-42.
38. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. and Lappin-Scott H.M. (2003) *Microbial biofilms*. *Annu.Rev.Microbiol*. 49 711-745.
39. Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 167-193.
40. Kuhn D.M, Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2002) *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. *Infection and Immunity*. 70 (2): 878-888.
41. Carpentier B., Cerf O. (2003) *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. *Journal Appl.Bacteriol*. 75 499-511.

42. ZoBell C.E. (2003) *The influence of solid surface on the physiological activities of bacteria in sea water*. Journal of Bacteriology. 33 86
43. L.Julia Douglas. (2004) *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology. 11 (1): 30-36.
44. An Y.H., Dickinson R.B. and Doyle R.J. (2003) *Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections*. 1-27.
45. Hawser S.P., Douglas L.J. (2003) *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*. Infect.Immun. 62 915-921.
46. O'Toole G.A., Kolter R. (2003) *Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens*. Mol.Microbiol. 28 449-461.
47. La Tourette Prosser B., Taylor D., Dix B.A. and Cleeland R. (2003) *Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31 1502-1506.
48. Costerton J.W., Lappin-Scott H.M. (2003) *Introduction to microbial biofilms*. Microbial biofilms. (1 Ed.):
49. Hawser S.P., Douglas L.J. (1995) *Resistance of Candida albicans biofilms to antifungal agents in vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39 (9): 2128-2131.
50. Nikawa H. (2003) *The role of saliva and serum in Candida albicans biofilm formation on denture acrylic surfaces*. Microb.Ecol.Health Dis. 9 35-48.
51. Chandra J. (2003) *Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro*. Journal Dent.Res. 80 903-908.
52. Awong J., Bitton G. and Koopman B. (1985) *ATP Oxygen Uptake Rate and INT-dehydrogenase activity of Actinomycete foams*. Wat.Res. 19 917-921.
53. Baillie G.S., Douglas L.J. (2003) *Candida biofilms and their susceptibility to antifungal agents*. Methods in Enzymology. 310 644-656.
54. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L. and López-Ribot J.L. (2001) *Standardized Method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (9): 2475-2479.
55. Baillie G.S., Douglas J. (1998) *Iron-limited biofilms of Candida albicans and their susceptibility to Amphotericin B*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42 (8): 2146-2149.
56. Baillie G.S., Douglas L.J. (2003) *Role of dimorphism in the development of Candida albicans biofilms*. J.Med.Microbiol. 48 671-679.
57. Cotter G., Kavanagh K. (2000) *Adherence mechanisms of Candida albicans*. British Journal of Biomedical Science. 57 241-249.
58. Rex J.H., Pfaller M.A., Walsh T., Chaturvedi V., Espinel-ingroff A., Gannoum M.A., Gosey L.L., Odds F.C., Reinaldi M.G., Sheehan D.J. and Warnock D.W. (2001)

Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. Clinical Microbiology Reviews. 14 (4): 643-651.

59. Ghannoum M.A., Rice L.B. (1999) *Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance. and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance*. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4): 501-517.

60. Chen S.C., O'Donnel M.L., Gordon S. and Gilbert G.L. (1996) *Antifungal susceptibility testing using the E test: comparison with the broth macrodilution technique*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 37 265-273.

61. Vanden Bossche H., Drommer F., Improvisi I., Lozano-Chiu M., Rex J.H. and Sanglard D. (1998) *Antifungal drug resistance in pathogenic fungi*. Medical Mycology. 36 119-128.

62. Andriole V.T. (1999) *Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 44 151-162.

63. Andriole, V. T., Remington, J and Swartz, M. (1998) *Current and future therapy of invasive fungal infections. In Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. Blackwell Sciences. 18 19-36.

64. Groll, A. H., Piscitelli, S C and Walsh, T J. (2004) *Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development*. 500. Advances in Pharmacology. 44 343-500.

65. Bodey, G. P. (1993) *Antifungal agents. In Candidosis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Raven Press. 371-406.

66. Bodey, G. P. (1996) *Antifungal agents. In Current ID Drugs*. Current Medicine. 229-248.

67. Sheehan, D. J., Hitchcock, C A and Sibley, C M. (1999) *Current and Emerging Azole Antifungal Agents*. Clinical Microbiology Reviews. 12 (1): 40-79.

68. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard NCCLS M27-A2*. 22 (15):

69. Colombo A.L., Barchiesi F., McGough D.A. and Rinaldi M.G. (1995) *Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing*. Journal of Clinical Microbiology. 33 (535): 540

70. Espinel-ingroff A., Pfaller M., Erwin M.E. and Jones R.N. (1996) *Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose*. Journal of Clinical Microbiology. 34 848-852.

71. Favel A., Michel-Nguyen A., Chastin C., Trousson F., Penaud A. and Regli P. (1997) *In vitro susceptibility pattern of Candida lusitanae and evaluation of the Etest method*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 39 591-596.

72. Pfaller M.A., Messer S.A., Bolmstrom A., Odds F.C. and Rex J.H. (1996) *Multisite reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates*. Journal of Clinical Microbiology. 34 1691-1693.
73. Posteraro B., Romano L., Sanguinetti M., Masucci L., Morace G. and Fadda G. (2000) *Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method*. Diagnostic Microbiology Infectious Diseases. 38 29-36.
74. Sewell D.L., Pfaller M.A. and Barry A.L. (2003) *Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and Etest antifungal susceptibility tests for fluconazole*. Journal of Clinical Microbiology. 32 2099-2102.
75. Wanger A., Mills K., Nelson P.W. and Rex J.H. (1995) *Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant Candida isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39 2520-2522.
76. Warnock D.W., Johnson E.M. and Rogers T.R.F. (1998) *Multi-centre evaluation of the Etest method for antifungal drug susceptibility testing of Candida spp. and Cryptococcus neoformans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 42 321-331.
77. Sanati, H., Messer, S A, Pfaller, M, Witt, M, Larsen, R, Espinel-Ingroff, A and Ghannoum, M. (1996) *Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of Cryptococcus neoformans against fluconazole*. Journal of Clinical Microbiology. 34 (5): 1280-1282.
78. Pfaller, M. A., Messer, S A and Coffmann, S. (1995) *Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870*. Journal of Clinical Microbiology. 33 (5): 1094-1097.
79. Hawser S.P., Norris H., Jessup C.J. and Ghannoum M.A. (1998) *Comparison 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-5-[(Phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized national committee for clinical laboratory standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents*. Journal of Clinical Microbiology. 36 (5): 1450-1452.
80. Pfaller, M. A., Barry, A L. (1994) *Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates*. Journal of Clinical Microbiology. 32 (8): 1992-1996.
81. Pfaller, M. A., Vu, Q, Lancaster, M, Espinel-Ingroff, A, Fothergill, A, Grant, C, McGinnis, M R, Pasarell, L, Rinaldi, M G and Steele-Moore, L. (1994) *Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates*. Journal of Clinical Microbiology. 32 (7): 1625-1628.
82. Tiballi, R. N., He, X, Zarins, L T, Revankar, S G and Kauffman, C A. (1995) *Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing*. Journal of Clinical Microbiology. 33 (4): 915-917.

83. Wenisch C., Linnau K.F., Parschalk B., Zedtwitz-Liebenstein K. and Georgopoulos A. (1997) *Rapid Susceptibility Testing of Fungi by Flow Cytometry Using Vital Staining*. Journal of Clinical Microbiology. 35 (1): 5-10.
84. Henriques M., Azeredo J. and Oliveira R. (2003) *Adhesion of Candida albicans and Candida dubliniensis to acrylic and hydroxyapatite*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces.
85. Riesselman, M. H., Hazen, K C and Cutler, J E. (2000) *Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay*. Journal of Clinical Microbiology. 38 (1): 333-340.
86. Meletiadiis J., Mouton J.W., Meis J.F.G., Bouman B.A., Donnelly J.P., Verweij P.E. and Network E. (2001) *Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species*. Journal of Clinical Microbiology. 39 (9): 3402-3408.
87. Tellier, R., Krajden, M, Grigoriev, G A and Campbell, I. (1992) *Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 36 (8): 1619-1625.
88. Hawser S. (1996) *Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent Candida albicans to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised C. albicans cells*. J Med Vet Mycol. 34 (2): 149-152.
89. Kirkpatrick W.R., López-Ribot J.L., Mcatee R.K. and Patterson T.F. (2000) *Growth Competition between Candida dubliniensis and Candida albicans under Broth and Biofilm Growing Conditions*. Journal of Clinical Microbiology. 38 (2): 902-904.
90. Arthington-Skaggs B.A., Lee-Young W., Ciblak M.A., Frade J.P., Brandt M.E., Hajjeh R.A., Harrison L.H., Sofair A.N. and Warnock D.W. (2003) *Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing Candida Isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46 (8): 2477-2481.
91. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., LWickes B.L. and López-Ribot J.L. (2001) *Standardized Method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (9): 2475-2479.
92. Costerton J.W., P.S.Stewart and Edgerton M. (4 A.D.) *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science. (283): 1318-1322.
93. Gander, S. (2004) *Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. (37): 1047-1050.
94. Gilbert P., J.Das and Ibrahim A.S. (2004) *Biofilm susceptibility to antimicrobials*. Adv.Dent.Res. (11): 160-167.
95. Hoyle, B. D., J.William Costerton. (2004) *Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms*. Pub.Drug Res. (37): 91-105.
96. Stickler D. (2004) *Biofilms*. Curr.Opin.Microbi. (2): 270-275.

97. Coleman, D. D. S. B. H. K. H. M. H. D. S. D. B. G. M. C. M. a. L. O. (2004) *Molecular and phenotypic analysis of Candida dubliniensis: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients*. Oral diseases. 3(Suppl. 1): S96-S101.
98. Coleman D.C., Sullivan D.J. and Mossman J.M. (1997) *Candida dubliniensis*. Journal of Clinical Microbiology. 35 (11): 3011-3012.
99. Jabra-Rizk M.A., Baqui A.A.M.A., Kelley J.I., Falkler W.A., Merz W.G. and Meiller T.F. (1999) *Identification of Candida dubliniensis in a Prospective Study of Patients in the United States*. Journal of Clinical Microbiology. 37 (2): 321-326.
100. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A., JR, Merz W.G., Baqui A.A.M.A., Kelley J.I. and Meiller T.F. (2000) *Retrospective Identification and Characterization of Candida dubliniensis Isolates among Candida albicans Clinical Laboratory Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Individuals*. Journal of Clinical Microbiology. 38 (6): 2423-2426.
101. Kirkpatrick W.R., Revancar S.G., Mcatee R.K., López-Ribot J.L., Fothergill A.W., McCarthy Dora, Sanche S.E., Cantu R.A., Rinaldi M.G. and Patterson T.F. (1998) *Detection of Candida dubliniensis in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates*. Journal of Clinical Microbiology. 36 (11): 3007-3012.
102. Klotz S.A. (1994) *The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of Candida albicans yeast cells to substrates*. FEMS Microbiology Letters. 120 257-262.
103. Kuhn D.M, Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A. (2002) *Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46 (6): 1773-1780.
104. L.Julia Douglas. (2004) *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology. 11 (1): 30-36.
105. Carlsson J. (2004) *Bacterial metabolism in dental biofilms*. Adv Dent Res. 11 (1): 75-80.
106. Gander, S. (2004) *Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. (37): 1047-1050.
107. Gilbert P., J.Das and Ibrahim A.S. (2004) *Biofilm susceptibility to antimicrobials*. Adv.Dent.Res. (11): 160-167.
108. O'Toole G.A., L.A.Pratt, P.I.Watnick, D K N, V.B.Weaver and R.Kolter. (2004) *Genetic approaches to study of biofilms*. Methods in Enzymology. (310): 91-109.
109. Watnick, P., R.Kolter. (2004) *Biofilm, city of microbes*. Journal of Bacteriology. (182): 2675-2679.

110. Baillie G.S., Douglas J. (2000) *Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 46 397-403.
111. Holmes A.R., Cannon R.D. and Jenkinson H.F. (2004) *Interactions of Candida albicans with bacteria and salivary molecules in oral biofilms*. Journal Ind.Micrbiol. (15): 208-213.
112. Nikawa H., H.Nishimura, Hamada T., Kumagai H. and L.P.Samaranayake. (2004) *Effects of dietary sugars and saliva ans serum on Candida biofilm formation on acrylic surfaces*. Mycopathologia. (139): 87-91.
113. Nikawa H., H.Nishimura, Hamada T., Kumagai H. and L.P.Samaranayake. (2004) *Effects of modified pellicles on Candida biofilm formation on crylic surfaces*. Mycoses. (42): 37-40.
114. Gal J., Fovet Y. and Adib-Yadzi M. (2001) *About a synthetic saliva for in vitro studies*. Talanta. 53 1103-1115.
115. Dismukes W.E. (2004) *Introduction to Antifungal drugs*. Clinical Infectious Diseases. (30): 653-657.
116. Lewis, R. E., Kontoyiannis, D P, Darouiche, R O, Raad, I I and Prince, R A. (2002) *Antifungal Activity of Amphotericin B, Fluconazole, and Voriconazole in an In Vitro Model of Candida Catheter-Related Bloodstream Infection*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46 (11): 3499-3505.
117. Mah, T.-F. C., O'Toole, G A. (2004) *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol. (9): 34-39.
118. L.Julia Douglas. (2004) *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology. 11 (1): 30-36.
119. Mah, T.-F. C., O'Toole, G A. (2004) *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol. (9): 34-39.
120. Evans, D. J., Allison, D G, Brown, M R and Gilbert, P. (1990) *Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to cetrimide*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 26 (4): 473-478.
121. Mah, T.-F. C., O'Toole, G A. (2004) *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol. (9): 34-39.
122. Mah, T.-F. C., O'Toole, G A. (2004) *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol. (9): 34-39.
123. Hazen K.C., Mandell G., Coleman E. and Wu G. (2000) *Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters. 183 89-94.
124. Spitzer E.D., A.Casadevall, S.G.Spitzer and L.F.Freundlich. (1993) *Persistence of the initial infection in recurrent cryptococcal meningitis*. Lancet. 341 595-596.

125. Zuger A., E.Louie, R.S.Holzman, J.J.Rahal and M.S.Simberkoff. (1986) *Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: diagnostic features and outcome of treatment*. Ann.Intern.Med. 104 234-240.
126. Nosanchuck D.Joshua, Wendy Cleare, Franzot P.Sarah and Casadevall Arturo. (2004) *Amphotericin B and Fluconazol Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of Cryptococcus neoformans at Subinhibitory Concentrations*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43 (2): 233-239.
127. Collette N., P.Van der Auwera, F.Meunier, C.Lambert, J.P.Sculier and A.Coune. (1991) *Tissue distribution and bioactivity of amphotericin B administered in liposomes to cancer patients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 27 535-548.
128. Dugoni B.M., B.J.Guglielmo and H.Hollander. (1989) *Amphotericin B concentrations in cerebral spinal fluid in patients with AIDS and cryptococcal meningitis*. Clin.Pharmacol. 8 220-221.
129. Louria D.B. (1958) *Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man*. Antibiot.Med.Clin.Ther. 5 295-301.
130. Nosanchuck D.Joshua, Wendy Cleare, Franzot P.Sarah and Casadevall Arturo. (2004) *Amphotericin B and Fluconazol Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of Cryptococcus neoformans at Subinhibitory Concentrations*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43 (2): 233-239.
131. Gallardo-Moreno A.M. (2003) *Estudio de los parámetros físico-químicos en el proceso de adhesión de microorganismos a biomateriales. Influencia de factores externos*.
132. Chamberlain A.H.L. (1992) *Biofilms - Science and Technologie*. (2):
133. Doyle RJ. (2000) *Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection*. Microbes and infection. 2 391-400.
134. Rosemberg M., Gutnick D. and Rosemberg E. (1980) *Adherence of bacteria to hydrocarbon: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity*. FEMS Microbiology Letters. 7 29-33.
135. Rosemberg M. (1991) *Basic and Applied Aspects of Microbial adhesion at the hydrocarbon:water interface*. Critical Reviews in Microbiology. 18 159-173.
136. Rosemberg M. (1984) *Bacterial Adherence to Hydrocarbons: a Useful Technique for Studying Cell Surface Hydrophobicity*. FEMS Microbiology Letters. 22 289-295.
137. Rosemberg M., Buividis I.A. and Ellen R.P. (1991) *Adhesion of Actinomyces viscosus to Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis-coated Hexadecane Droplets*. Journal of Bacteriology. 173 2581-2589.
138. Rodrigues A.G., Mardh P.A., Pina-Vaz C., Martinez-de-Oliveira J. and Fonseca A.F. (1999) *Germ tube formation changes surface hydrophobicity of Candida cells*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 7 222-226.

139. Lindhal M., Faris A. and Hjerten S. (1981) *A New Test Based on 'Salting Out' to Measure Relative Surface Hydrophobicity of Bacterial Cells*. *Biochim.Biophys.* 677 471-476.
140. Tomita M., Matsusaki S., Endo R. and Miyamura S. (1993) *The Salting-out Test to Identify Virulent Yersinia pseudotuberculosis*. *Zbl.Bakt.* 279 231-238.
141. Smyth C.J., Jonsson P., Olson E., Söderling O., Rosengren J., Hjertén S. and Eadström T. (1978) *Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic Escherichia coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography*. *Infect.Immun.* 22 462-472.
142. Hazen K.C., Hazen B.W. (1987) *A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within Candida albicans populations*. *Journal of Microbiological Methods.* 6 289-299.
143. Mafu A.A., Roy D., Savoie L. and Goulet J. (1991) *Bioluminescence Assay for Estimating the Hydrophobic Properties of Bacteria as Revealed by Hydrophobic Interaction Chromatography*. *Applied and Environmental Microbiology.* 57 1640-1643.
144. Benoit E., Guellil A., Block J.C. and Bessiere J. (1998) *Dielectric Permittivity Measurement of Hydrophilic and Hydrophobic Bacterial Suspensions: a Comparison with the Octane Adhesion Test*. *Journal of Microbiological Methods.* 32 205-211.
145. van der Mei H.C., Bos R. and Busscher H.J. (1998) *A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 11 213-221.
146. van Oss C.J., Giese R.F. (1995) *The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals*. *Clay Minerals.* 2 347-369.
147. Lopes M.A., Knowles J.C., Santos J.D., Monteiro F.J. and Olsen I. (2000) *Direct and indirect effects of P2O5 glass reinforced-hydroxyapatite composites on the growth and function of osteoblast-like cells*. *Biomaterials.* 21 1165-1172.
148. Samaranayake L.P., MacFarlane T.W. (1980) *An in-vitro study of the adherence of Candida albicans to acrylic surfaces*. *Archives of Oral Biology.* 25 603-609.
149. Garber G.E. (1994) *Treatment of oral Candida mucositis infections*. *Drugs.* 47 734-740.
150. Scully C., El-kabir M. and Samaranayake L.P. (1994) *Candida and oral Candidosis: a review*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 5 125-157.