



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA TERRA MARUYAMA

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *C. albicans* EM UM
MODELO *in vitro* DE CANDIDÍASE SUPERFICIAL.**

LONDRINA
2013

CAMILA TERRA MARUYAMA

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *C. albicans* EM UM
MODELO *in vitro* DE CANDIDÍASE SUPERFICIAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Odontologia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Sérgio Couto de
Almeida.

LONDRINA
2013

CAMILA TERRA MARUYAMA

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *C. albicans* EM UM
MODELO *in vitro* DE CANDIDÍASE SUPERFICIAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Odontologia da Universidade
Estadual de Londrina.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr Phileo Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 18 de outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, ao meu orientador não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade.

Aos professores que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais que de forma particular incentivaram e ajudaram.

Aos colegas que me fizeram avançar pela força que me dispensaram.

“Um trabalho tem sentido para uma pessoa quando ela o acha importante, útil e legítimo.”

Edgar Morin

MARUYAMA, Camila Terra. **Avaliação da virulência de *C. albicans* em um modelo *in vitro* de candidíase superficial.** 2013. 28 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Candida albicans é uma espécie de fungo comensal normalmente presente nos humanos. No entanto condições predisponentes podem conduzir à invasão desde as células epiteliais até os tecidos mais profundos, causando infecção sistêmica. A invasão das células epiteliais pode ocorrer de duas formas, por endocitose induzida, na qual as células epiteliais, que não são fagocíticas, endocitam o fungo e o internalizam, e por penetração ativa, em que o fungo agride a membrana epitelial perfurando-a com sua hifa. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade invasiva e o dano celular causado por uma cepa hipervirulenta e uma cepa hipovirulenta, utilizando uma cepa padrão de *C. albicans* (SC5314) como controle. Essas cepas do gênero *Candida* foram cultivadas e co-incubadas com células epiteliais *in vitro*. Em seguida obtemos as taxas de invasão através da microscopia de fluorescência e as taxas de dano celular através da quantificação da enzima lactato desidrogenase. Com isso pudemos avaliar e comparar diferentes cepas em relação a suas capacidades de invadir e lesar a célula do hospedeiro. Assim, a cepa hipervirulenta invadiu mais células epiteliais e, conseqüentemente, causou maior dano as mesmas. Do mesmo modo, a cepa clinicamente hipovirulenta apresentou uma menor capacidade de invasão e menor virulência nesse modelo de infecção. A partir desses resultados, podemos concluir que cepas com maior capacidade de invasão das células do hospedeiro são mais virulentas tanto clinicamente quanto *in vitro*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Invasão. Células epiteliais.

MARUYAMA, Camila Terra. **Evaluation of virulence of *C. albicans* in a in vitro model of lip-deep candidiase.** 2013. 28 f. Completion course of work (Undergraduat dentistry) - State University of Londrina, Londrina. 2013.

ABSTRACT

Candida albicans is a species of commensal fungus normally present in humans. However predisposing conditions may lead to invasion from the epithelial cells to the deeper tissues, causing systemic infection. The invasion of epithelial cells can occur in two ways, induced endocytosis, where epithelial cells that aren't phagocytic, internalizes the fungus, and active penetration, where the fungus attacks the epithelial membrane piercing it with a hyphae . The aim of this study was to investigate the invasiveness and cellular damage caused by two strains, a strain hyper and hypo virulent, using a standard strain of *C. albicans* (SC5314) as control. These strains of *Candida* were cultured and co - incubated with epithelial cells in vitro. Then we obtain the rate of invasion by fluorescence microscopy, and the rate of cell damage by quantifying the enzyme lactate dehydrogenase. With that we evaluate and compare different strains in relation to their capacity to invade and damage the host cell. Thus, the strain hyper virulent invaded more epithelial cells and therefore cause greater damage. Similarly, the strain clinically hypo virulent showed a lower invasiveness and virulence in this model of infection. From these results, we conclude that strains with greater capacity for invasion of host cells are more virulent both clinically and in vitro.

Key words: *Candida albicans*, invasion, epithelial cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Control é a monocamada de células epiteliais incubadas por 8 horas sem infecção. SC5314, Killer e Hipo são monocamadas de células epiteliais incubadas por 8 horas infectadas com as respectivas cepas.....18
- Figura 2 - Ilustrativo da coloração diferencial com fluoróforos da cepa SC5314 de *C. albicans* incubadas durante 2 horas com células HeLa visualizadas na microscopia de fluorescência.....19
- Figura 3 - Taxa de invasão das três diferentes cepas de *C. albicans* em células Hela após 2 horas de incubação.....20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Cultura de células epiteliais.....	13
3.2 Cultura de fungos	13
3.3 Ensaio de dano celular por <i>cândida albicans</i>	14
3.4 Ensaio de invasão celular por <i>cândida albicans</i>	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que exista 1.5 milhões de espécies de fungos e entre elas apenas uma pequena porcentagem é capaz de causar infecção aos humanos. E a *C. albicans* é considerada a espécie patogênica mais importante de seres humanos(WILSON, D. et al., 2009)

Em circunstâncias normais, o fungo dimórfico *Candida albicans* faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis, vivendo como um comensal na superfície da mucosa. No estado comensal, *C. albicans* existe em equilíbrio com a flora microbiana, tecidos epiteliais e defesas imunológicas do hospedeiro. No entanto, a perturbação deste equilíbrio sob condições predisponentes, incluindo tratamento por longo período com antibiótico, defesas e barreiras imunes comprometidas, pode resultar no crescimento descontrolado de *C. albicans* e conduzir à invasão de tecido da mucosa mais profunda ou disseminação para outros órgãos (RUHNKE, M. 2002).

O espectro de doenças causadas por *C. albicans* excede a maioria dos outros organismos comensais pela sua habilidade de sobreviver como um organismo comensal em vários sites anatômicos e por possuir muitos atributos de virulência que contribuem para sua sobrevivência, aptidão e persistência dentro do hospedeiro, bem como fatores específicos associados com a adesão, invasão, dano celular, indução/evasão das respostas do hospedeiro, produção de enzimas extracelulares, especialmente a aspartil proteinase (Saps) e ser capaz de rápidas alterações na expressão gênica em resposta a estímulos ambientais, tais como alterações na disponibilidade de nutrientes, pH, osmolaridade, temperatura ou ataque por células do sistema imune (PITTET, D. et al., 1994), (FRADIN, C. et al., 2003), (PRIGNEAU, O. et al., 2003), (BEJARANO, I. et al., 2003), (BESEN, ES. et al., 2004), (HUBE, B. 2004), (KUMAMOTO, CA. 2008).

O gênero *Candida* afeta principalmente pacientes imunocomprometidos ou criticamente doentes. Está associada a quase 80% dos casos de infecções fúngicas nosocomiais com alta taxa de mortalidade (40% a 60%). *C. albicans* é a principal causa de candidemia e entre as espécies não-*albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* são os agentes mais frequentes e respondem, hoje, por 50% das infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida* (WILSON D. et al., 2009). Além disso, até 90% dos indivíduos HIV

positivos, não tratados, sofrem de infecções orais por *Candida* spp. (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

A observação de que alterações sutis do estado fisiológico do hospedeiro pode causar a mudança de um fungo comensal inofensivo, para um perigoso patógeno, aponta a importância da defesa do hospedeiro em manter *C. albicans* no estado comensal quando condições predisponentes surgem (GRUBB, S. et al., 2008).

Como a transição de um comensal inofensivo para um patógeno agressivo é desencadeada ainda é desconhecido (RUHNKE, M. 2002). Claramente, a adesão às células epiteliais é um evento chave em ambos, comensais e patógenos (HUBE, B. 2004), (TRONCHIN, G. et al., 2008), (CHAFFIN, WL. 2008).

A habilidade de dimorfismo, levedura e hifa, é uma dos tributos mais discutidos e investigados fatores de virulência da *C. albicans*. Ambas as formas morfológicas parecem ser importantes para a virulência e tem função distinta durante os diferentes estágios do desenvolvimento da doença (JACOBSEN, ID. Et al, 2012).

O primeiro passo para a maioria dos patógenos microbianos iniciarem uma infecção, incluindo os que estabeleceram uma relação comensal, é a aderência as superfícies epiteliais para colonizar outros tecidos, além de ser um pré-requisito para sobrevivência e distribuição (JACOBSEN, ID. Et al., 2012).

A adesão requer a interação entre a parede do fungo e a superfície da célula epitelial. Posto que a composição da superfície da *C. albicans* esta continuamente mudando, especialmente durante a transição de levedura para hifa, a natureza precisa da adesão de *C. albicans* às células epiteliais é um complexo processo multi fatorial que provavelmente envolve diversos tipos de adesinas (DALLE, F. et al., 2009).

In vitro *C. albicans* adere às células bucais, vaginais e matrizes de plaquetas de fibrinas. O tubo germinativo, um estágio intermediário entre a forma de levedura e hifa, foi implicada no processo de aderência, pois o tubo germinativo adere em maior número que outras espécies de cândida às células vaginais e a matrizes de plaquetas de fibrinas formadas *in vitro*. Pouco se sabe sobre a estrutura molecular dos receptores de superfície que medeiam a aderência de *C. albicans*. A interação física da *C. albicans* com células epiteliais é um potente estimulador do tubo germinativo e formação de hifa, que promove melhor aderência às células epiteliais que a levedura (NAGLIK, J. et al., 2011).

A formação de hifa permite o íntimo contato entre fungo e célula epitelial, esta interação resulta em uma interação ligante/receptor e reorganização do citoesqueleto da célula e envolvimento da hifa por pseudopodes e captação do fungo. Este tipo de processo invasão conhecido como endocitose induzida é também vista por bactérias como a *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Esta fase inicial da formação de hifa, adesão e endocitose induzida são seguidas pela fase invasiva que é caracterizada por extensa penetração epitelial pela hifa que inclui pressão física pelo avanço da ponta da hifa contra a parede epitelial e produção e secreção de enzimas que auxiliam no processo de invasão que por fim leva ao dano celular (NAGLIK, J. et al., 2011).

A endocitose induzida é um processo no qual a hifa interage com a membrana celular ativando a reorganização do seu citoesqueleto para a formação de estruturas parecidas a pseudopodos que envolvem o fungo. Esse processo de endocitose também ocorre com hifas mortas indicando que é mediada somente pelas células epiteliais. A endocitose induzida ocorre no estágio inicial de interação, usualmente com 4 horas (NAGLIK, J. et al., 2011).

A Penetração ativa, diferente da endocitose induzida, não depende do mecanismo celular de rearranjo do citoesqueleto, ela depende exclusivamente das atribuições e viabilidade do fungo, visto que hifas de *C. albicans* podem invadir células epiteliais mortas, demonstrando que a penetração ativa é um processo mediado pela *C. albicans* (NAGLIK, J. et al., 2011).

2 OBJETIVO

Avaliar as cepas da espécie *C. albicans* (Killer, Hipovirulenta e padrão SC5314) em relação a sua capacidade de lesar a célula do hospedeiro através de um modelo de infecção *in vitro*.

Comparar, entre as três diferentes cepas, a capacidade invasiva e a capacidade de induzir à lesão células epiteliais da linhagem Hela.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células epiteliais do cervical uterino humano

Células epiteliais Hela (número ATCC: HTB-43). As células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino em frascos de cultura de células. A cada dois dias o meio era removido, a monocamada celular no fundo do frasco era lavada com salina tamponada com fosfato (PBS), 5 mL de tripsina era adicionado e o frasco era incubado por 5 minutos a 37°C com 5% de CO₂. Após as células terem se soltado do fundo do frasco (verificação ao microscópio invertido), eram adicionados 10 mL de meio DMEM sem soro. Desta suspensão foi removido 1 mL e misturado com 14 mL de meio DMEM com 10% de soro. Os 15 mL de suspensão foram adicionados a um novo frasco e incubados a 37°C com 5% de CO₂ para formação de uma nova monocamada.

Para realização do ensaio de invasão, 1 mL da suspensão de 15 mL citada acima, para uma concentração final de 5×10^7 células/mL, foi adicionado a cada pocinho de uma placa de 24 poços contendo uma lamínula circular estéril (13 mm de diâmetro) e a placa foi incubada por 16-24 horas a 37°C com 5% de CO₂ para formação de uma monocamada na superfície da lamínula (70% a 90% de confluência).

3.2 Cultura de Fungos

A cepa padrão SC5314 de *C. albicans* foi gentilmente doada pelo Dr. Bernhard Hube (Friedrich Schiller Universität, Alemanha). Estas leveduras foram cultivadas a 30°C em meio YPD (1% extrato de levedura, 1% peptona e 2% dextrose) e mantidas na geladeira em placas contendo meio YPD sólido.

As células fúngicas foram cultivadas em 10 mL de caldo YPD por 16 h a 37°C sob agitação (160 rpm). Após cultivo, as células foram lavadas 3 vezes em PBS, diluídas e contadas em câmara de Neubauer. A suspensão que foi inoculada nas monocamadas de células epiteliais foi preparada através da diluição em PBS

para uma concentração final de 5×10^7 células/mL. O inóculo foi realizado com 20 μ L da suspensão citada anteriormente (10^6 leveduras).

3.3 Ensaio de dano celular por *C. albicans*

Para os ensaios de dano, a linhagem de células humanas HeLa (células epiteliais) foram incubadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino sobre lamínulas tratadas com ácido acético até formarem monocamadas confluentes (80% a 100% de confluência). Após lavagem com tampão fosfato, as monocamadas foram coincubadas com 10^6 blastósporos de *C. albicans* em meio RPMI 1640 sem soro por 8 horas a 37°C com 5% CO₂. Para quantificar o dano causado às células epiteliais, o sobrenadante foi removido e a quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio foi quantificada utilizando o Kit LDH Cytotoxicity Assay (Cayman), seguindo instruções do fabricante. Poços contendo somente células epiteliais e somente células fúngicas foram utilizados como controles. Assim, o dano celular foi estimado em mU/mL de LDH através de uma curva padrão desta enzima (enzima presente no kit).

3.4 Ensaio de invasão celular por *C. albicans*

Para os ensaios de invasão, a linhagem de células humanas HeLa (células epiteliais) foram incubadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino sobre lamínulas tratadas com ácido acético até formarem monocamadas confluentes (80% a 100% de confluência).

Após lavagem com tampão fosfato, as monocamadas foram coincubadas com 10^5 blastósporos de *C. albicans* (10 μ L da suspensão citada acima) em meio RPMI 1640 sem soro por 1 hora a 37°C com 5% CO₂. Posteriormente, as amostras foram lavadas e fixadas para realização de coloração diferencial utilizando dois fluoróforos diferentes. Este método permite a diferenciação, em microscópio de fluorescência, entre as hifas do fungo que estão localizadas no meio externo e as hifas que invadiram a célula hospedeira (meio intracelular) (ALMEIDA *et al.*, 2008). Assim, após serem fixadas, as amostras foram incubadas com 500 μ L de PBS e 2,5

μL de Concanavalina-A conjugada com fluoresceína (Invitrogen, solução de 5 mg/mL em PBS) a temperatura ambiente por 45 minutos. Após lavagem com PBS por 3 vezes, as amostras foram permeabilizadas com 500 μL de Triton X-100 a 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente e incubadas com 495 μL de Tris-HCl (0,1 M, pH 9,0) e 5 μL de Calcofluor (solução de 1 mg/mL em 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0) por 20 minutos em temperatura ambiente.

Após lavagem em PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas com 50% de glicerol. As lamínulas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss) e as hifas que não invadiram, juntamente com as hifas que invadiram as células epiteliais foram contadas para estimar a porcentagem de invasão (ALMEIDA *et al.*, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos, observou-se que a cepa Killer apresentou diferença estatística significativa tanto na concentração de LDH, quanto na porcentagem da taxa de invasão celular. A cepa Hipovirulenta não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de invasão e no de dano celular, porém apresentou-se como a cepa de menor dano e menor nível de LDH, quando comparada com a cepa padrão (SC5314).

A formação de hifa não é necessariamente suficiente para causar dano celular e não é o único fator que contribui com a destruição tecidual, embora esteja relacionado a este fator (NAGLIK, J. et al., 2011). Além disso, a penetração ativa é um mecanismo separado da endocitose induzida e ocorre em um estágio posterior a ela e resulta em invasão entre e através das células epiteliais pelo avanço da ponta da hifa contra a parede epitelial.

É necessário notar que no tecido mucoso de epitélio escamoso estratificado da cavidade bucal e no lúmen vaginal a camada superficial não é proliferativa e se mantém funcionalmente inativa. É improvável que tais células suportem o mecanismo de entrada celular pela endocitose induzida, pois ele requer células epiteliais saudáveis e viáveis. Portanto *in vivo* a penetração ativa provavelmente é o mecanismo principal da invasão da mucosa, seja através de entrada direta ou da penetração inter-epitelial que permite o acesso às camadas submucosas. Assim, embora endocitose induzida e penetração ativa possam ser ditas como mecanismos distintos, *in vivo*, é mais provável que ambos os processos tenham um papel complementar durante a invasão dos tecidos mucosos vaginais e orais (NAGLIK, J. et al., 2011). Embora cada mecanismo tenha uma predominância em tempos diferentes *in vitro*, eles podem ser correlacionados, pois são acometidos pelos mesmos processos, endocitose induzida e penetração ativa.

Estudos mostram que estirpe mutante de *C. albicans* (EED1 deficiente) com adesão e propriedades de endocitose normais é incapaz de causar dano celular. Assim podemos supor que a endocitose é um dos fatores que contribuem com o dano celular, mas é a penetração ativa que é essencial para o dano celular (NAGLIK, J. et al., 2011). Neste trabalho a cepa Killer mostrou-se como a cepa que apresenta maior penetração ativa, podemos assim induzir uma maior capacidade dessa cepa para provocar dano celular.

A patogenicidade da *C. albicans* é regulada por uma rede de fatores de virulência e pela sua interação com a resposta imune do hospedeiro, frequentemente causando infecção superficial invadindo e causando dano às células epiteliais, mas também pode causar infecção sistêmica por penetração da barreira epitelial (NAGLIK, J. et al., 2011), podendo ser considerada a cepa hipovirulenta como a de menor patogenicidade, entre as cepas avaliadas nesse estudo, pois apresentou-se com menor taxa de dano celular, conseqüentemente, menor taxa de invasão.

É de nosso conhecimento que a cepa denominada Killer é uma cepa hipervirulenta proveniente de um paciente com colonização persistente que desenvolveu candidemia ao longo da internação e evoluiu ao óbito (WACHTLER, F. et al., 2012), a partir deste conhecimento prévio, presumiu-se que esta cepa seria mais virulenta, causando mais dano a monocamada e conseqüentemente maior concentração de LDH no sobrenadante removido, hipótese essa compatível com os resultados do nosso estudo.

Os processos de patogenicidade ocorrem em intensidades diferentes entre as cepas, considerando seus fatores individuais. Os três tipos de cepas de *C. albicans* (SC5314, Killer e Hipo) são capazes de causar dano celular às células epiteliais HeLa tanto por endocitose induzida, quanto por penetração ativa. Os patógenos desenvolveram ao longo da sua história evolutiva, estratégias e ferramentas com as quais eles manipulam esse nicho, multiplicam-se, e, muitas vezes, acabam por destruir as células hospedeiras.

Posto que infecções sistêmicas potencialmente fatais podem surgir de brechas da barreira mucosa, é de fundamental importância entender como a *C. albicans* interage com as células epiteliais e como esse fungo fica restrito a superfície da mucosa quando comensal.

O LDH presente no meio das células cultivadas quantifica o dano às células epiteliais. Em nosso estudo os valores de LDH presentes na cultura de células epiteliais da cepa Killer apresentou-se estatisticamente significante das demais cepas (controle, hipovirulenta e padrão SC5314) apresentando com o maior valor de LDH, logo, indicando maior dano às células, com menor valores de LDH para o grupo controle, seguido do grupo das cepas hipovirulentas e das cepas padrão SC5314, conforme podemos ver na figura abaixo (Figura 1 - Controle é a monocamada de células epiteliais incubas por 8 horas sem infecção. SC5314, Killer

e Hipo são monocamadas de células epiteliais incubadas por 8 horas infectadas com as respectivas cepas).

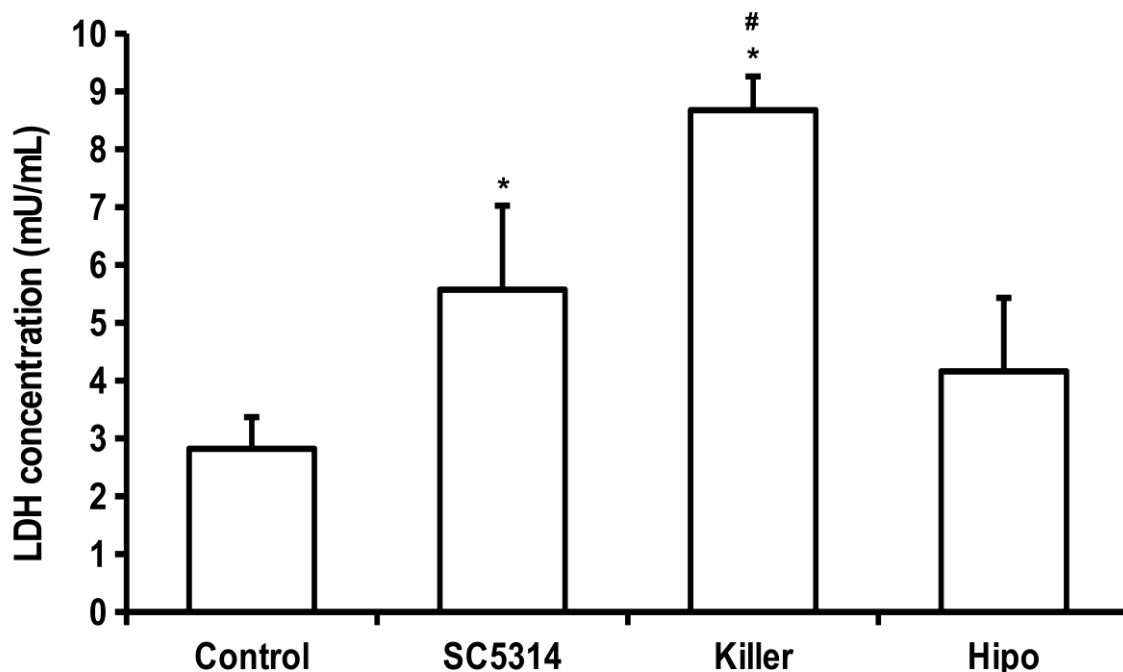


Figura 1 - Controle é a monocamada de células epiteliais incubadas por 8 horas sem infecção. SC5314, Killer e Hipo são monocamadas de células epiteliais incubadas por 8 horas infectadas com as respectivas cepas.

Com o ensaio de invasão, a coloração diferencial utilizando dois fluoróforos diferentes permitiu a diferenciação entre as hifas do fungo que estão localizadas no meio externo e as hifas que invadiram a célula hospedeira (meio intracelular) e, portanto as células fossem visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss) junto com as hifas que não invadiram e as hifas que invadiram e então elas foram contadas para estimar a porcentagem de invasão (CHAVES; SANTOS; COLOMBO, 2012). Para visualizar se a hifa de *Candida* invadiu a célula epitelial, usa-se uma coloração diferencial – concanavalina A-conjugada (Con-A) e calcofluor. A Con-A se liga a açúcares da parede. Como existem manana e glucana em quase toda a espessura da parede, Con-A cora a parede toda. Em relação à célula, tanto a hifa como a levedura ficam coradas de forma uniforme. Por outra parte, o calcofluor se liga à quitina. A quitina, por sua vez, está situada numa camada mais interna da parede de *C. albicans* e, portanto, o calcofluor cora uma parte mais interna da

parede. Com relação à célula, as pontas das hifas ficam pouco ou nada coradas, pois o conteúdo de quitina é muito baixo nesta parte da célula. Podemos observar na figura abaixo que *C. albicans* invade células HeLa, e a metodologia permitiu visualizar tanto as hifas fora (ConA- fluoresceína), como as hifas internalizadas (calcofluor).

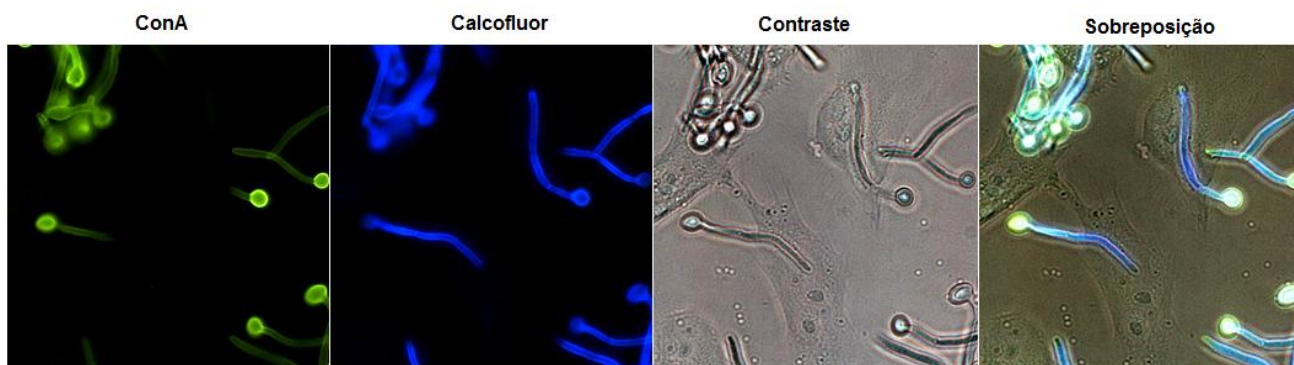


Figura 2 - Ilustrativo da coloração diferencial com fluoróforos da cepa SC5314 de *C. albicans* incubadas durante 2 h com células HeLa visualizadas na microscopia de fluorescência.

A partir da coloração diferencial com fluoróforos foi quantificada a taxa de invasão celular, como nos mostra a figura abaixo (Figura 3 - Taxa de invasão das três diferentes cepas de *C. albicans* em células HeLa após duas horas de incubação.), onde ocorreu predominância de invasão celular pela cepa Killer, e esta invasão apresentou-se estatisticamente significativa entre as demais cepas, com menor taxa de invasão para a cepa hipovirulenta.

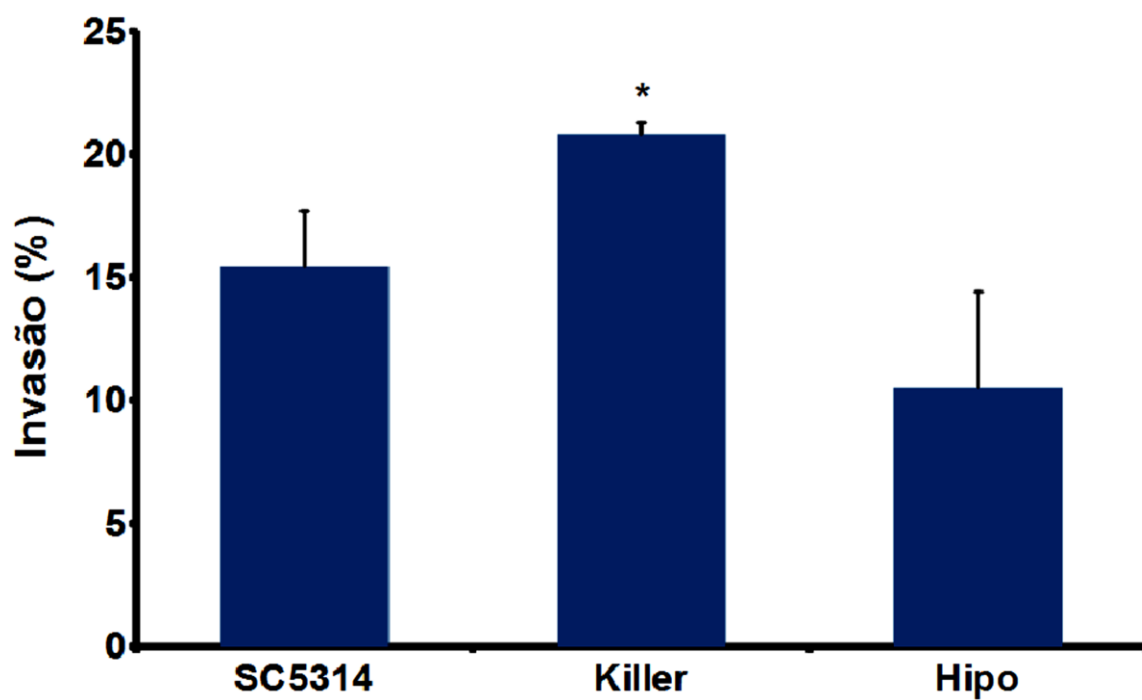


Figura 3 - Taxa de invasão das três diferentes cepas de *C. albicans* em células Hela após duas horas de incubação.

CONCLUSÃO

A partir desses resultados, conseguimos concluir que a cepa com maior capacidade de invasão às células do hospedeiro – a cepa Killer, provocou maior dano as mesmas, demonstrando ser mais virulenta tanto clinicamente quanto *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- _____. ALMEIDA RS, BRUNKE S, ALBRECHT A, THEWES S, LAUE M, EDWARDS JE, ET AL. the hyphal-associated adhesin and invasin als3 of candida albicans mediates iron acquisition from host ferritin. *plos pathog* ; 4:E1000217; PMID:19023418; [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000217](http://dx.doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000217); 2008.
- _____.ALMEIDA RS, WILSON D & HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *fems yeast res* 9: 1000–1012; 2009.
- _____. BENSEN ES, MARTIN SJ, LI M, BERMAN J & DAVIS DA. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol* 54: 1335–1351; 2004.
- _____. BROWN AJ, ODDS FC & GOW NA. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 10: 307-313; 2007.
- _____. CALDERONE RA, FONZI WA: virulence factors in candida albicans. *trends microbial* , 9:327-335 *in press*, Londrina; 2001.
- _____. CALDERONE RA, BRAUN PC. adherence and receptor relationships of *candida albicans*. *microbiol rev* 55: 1–20; 1991.
- _____.CHAFFIN WL.*Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 495–544;2008.
- _____. CHAVES GM, SANTOS FP, COLOMBO AL. The persistence of multifocal colonization by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107(2):198-204; Mar 2012.
- _____.DALLE F, WACHTLER B, CORALIE L, HOLLAND G, BANNERT N, ET AL. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* 12: 248–271; 2009.
- _____.FILLER, S. G., J. N. SWERDLOFF, C. HOBBS, AND P. M. LUCKETT. Penetration and damage of endothelial cell by *Candida Albicans*. *Infect. Immun.* 63:976-983; 1995.
- _____.- FILLER SG, SHEPPARD DC.Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog* 2: e129; 2006.
- _____.FRADIN C, KRETSCHMAR M, NICHTERLEIN T, GAILLARDIN C, D'ENFERT C & HUBE B. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 47: 1523–1543; 2003.
- _____.GRUBB, S. E., C. MURDOCH, P. E. SUDBERY, S. P. SAVILLE, J. L. LOPEZ-RIBOT, AND M. H. THORNHILL. *candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *infect. immun.* 76:4370-4377; 2008.
- _____.HEWLETT JA, SQUIER CA: *candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. *infect immun* 29:252–260; 1980.

_____.HUBE B. From commensal to pathogen: stage- and tissuespecific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 7: 336–341; 2004.

_____.KUMAMOTO CA. Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr Opin Microbiol* 11: 325–330; 2008.

_____.NAGLIK, J., ALBRECHT, A., BADER, O., HUBE, B. *Candida Albicans proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol* 6:915–926; 2004.

_____.NAGLIK J.R., MOYES D.L., WÄCHTLER B., HUBE B. *candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity microbes infect, 13, PP. 963–976; 2011.

_____.PITTET, D., MONOD, M., SUTER, P.M., FRENK, E., AND AUCKENTHALER, R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 220: 751–758; 1994.

_____.PHAN, Q.T., BELANGER, P.H., FILLER, S.G. role of hyphal formation in interactions of *candida albicans* with endothelial cells.*infect. immun.* 68, 3485–3490; 2000.

_____.PRIGNEAU O, PORTA A, POUDDRIER JA, COLONNA-ROMANO S, NOEL T & MARESCA B. Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast* 20: 723–730; 2003.

_____.RUBIN-BEJERANO I, FRASER I, GRISAFI P & FINK GR. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *P Natl Acad Sci USA* 100: 11007–11012; 2003.

_____.RUHNKE, M. Skin and Mucous Membrane Infections. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press. pp. 307-325, 2002.

_____.SANDIN, R. L., ROGERS, A. L., PATTERSON, R. J. & BENEKE, E. S. EVIDENCE FOR MANNOSE-MEDIATED ADHERENCE OF CANDIDA ALBICANS TO HUMAN BUCCAL CELLS IN VITRO. *INFECTION AND IMMUNITY* 35, 79- 85; 1982.

_____.SUNDSTROM P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* 4: 461–469; 2002.

_____.TRONCHIN G, PIHET M, LOPES-BEZERRA LM, BOUCHARA JP. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol* 46: 749–772; 2008.

_____.WACHTLER, B., WILSON, D., HAEDICKE, K., DALLE, F., HUBE B. From attachment to damage: defined genes of *Candida Albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *Plos one* 6, E 17046; 2011.

_____. WACHTLER B., CITIULO F., JABLONOWSKI N., FORSTER S., DALLE F., SCHALLER M., WILSON D., HUBE B. *candida albicans*–epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process *plos one*, 7, P. E36952; 2012.

_____. WILSON D., THEWES S., ZAKIKHANY K., FRADIN C., ALBRECHT A., ALMEIDA R., BRUNKE S., GROSSE K., MARTIN R.,MAYER F.,LEONHARDT I., SCHILD L., SEIDER K., SKIBBE M., SLESIONA S., WAECHTLER B., JACOBSEN L.,HUBE B. Identifying

infection-associated genes of *candida albicans* in the postgenomic era. *fems yeast res*;9(5):688–700; 2009.