



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RITA DE CÁSSIA PONTELLO RAMPAZZO

**“ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE EM *Candida* sp
ISOLADAS DE EXSUDATO VAGINAL”**

Londrina
2005

RITA DE CÁSSIA PONTELLO RAMPAZZO

**“ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE EM *Candida* sp
ISOLADAS DE EXSUDATO VAGINAL”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2005

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, sob a orientação da Prof. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta e contou com o apoio do CNPq, CAPES, Fundação da Araucária e PROPPG/UEL.

Dedico:

Aos meus pais, Emílio e Izilda, por conduzirem nossa família com união, respeito e amor, e as minhas irmãs Camila e Ana Raquel, pelo incentivo, confiança, paciência e amor em toda esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela forma segura com que conduziu a orientação, dedicação, estímulo e apoio permanentes, pelo exemplo de pesquisadora e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Phileo Pinge Filho pela agradável convivência, pelo estímulo nos momentos mais difíceis, pelas oportunas sugestões e colaboração na realização deste trabalho.

À Prof. Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pela disponibilidade e contribuição.

À Prof Dr^a. Rosa Elisa Linhares, à Prof. Dr^a. Tânia Nakamura, ao Prof Dr. Carlos Nozawa e ao Prof. Dr. Celso Nakamura por disponibilizar os seus respectivos laboratórios para realização de parte dos experimentos.

Aos amigos: Angélica Martins, Érika Izumi, Fabrício Benatti, Flávio Lauretti, Fernando Bizerra, Graziela Navarro, Janaína Orlandi, Kelly Ishida, Luciana Furlaneto, Marie Eliza Silva, Nárjara Oliveira, Natália Botelho, Paulo Corrêa, Tatiana Brasil e Viviane Graça, que participaram efetivamente na realização deste trabalho e pelos momentos de convivência no laboratório.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial ao Ediel Clementino pelo apoio.

Aos colegas do curso de mestrado, pela convivência agradável.

A Deus, sem o qual nada seria realizado.

" Tudo neste mundo tem o seu tempo; cada coisa tem a sua ocasião.

Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar;
tempo de matar e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de construir.

Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar; tempo de chorar e tempo de dançar;
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo de
afastar.

Há tempo de procurar e tempo de perder; tempo de economizar e tempo de
desperdiçar; tempo de rasgar e tempo de remendar; tempo de ficar calado e tempo
de falar.

Há tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz." Eclesiastes
3:1-8.

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	07
1 CANDIDA ALBICANS	07
2 FATORES DE VIRULÊNCIA: FOSFOLIPASES E LÍPASES	15
3 PATOGÊNESES DAS INFECÇÕES CAUSADOS POR C- ALBICANS	21
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	21
3.2 CANDIDIASE VULVOVAGINAL	22
3.3 CANDIDIASE VULVOVAGINAL E O SISTEMA IMUNE	23
REFERÊNCIAS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5 RESULTADOS	46
REFERÊNCIAS	57
ANEXO	59
ARTIGO	60

REVISÃO DE LITERATURA

1 *CANDIDA ALBICANS*

C. albicans é um fungo diplóide (JONES e cols., 2004) com genoma nuclear contendo aproximadamente $1,6 \times 10^7$ pb distribuídos em oito cromossomas com tamanho variando entre 1,03 e 4,3 Mb (DE BACKER e cols., 2000).

Esse fungo é polimórfico, isto é apresenta morfologia variada frente a diferentes condições ambientais, tais formas incluem blastoconídios, pseudohifas, hifas verdadeiras e clamidoconídios (MOLERO e cols., 1998).

Os blastoconídios são formas unicelulares ovóides que se dividem assexuadamente por brotamento. Esse processo envolve o crescimento de uma nova célula a partir de um ponto específico na superfície do blastoconídio, usualmente no polo distal da cicatriz de um ciclo reprodutivo anterior. O brotamento também pode ocorrer, com menos frequência, de forma bipolar. Posteriormente ocorre a divisão nuclear e um septo é formado entre as células parental e filha. Na transição levedura-hifa, ocorre inicialmente a formação do tubo germinativo que cresce longitudinalmente através do polo distal. Ocorre a divisão mitótica dentro do tubo e os septos são formados, dando origem às hifas (FIGURA 1).

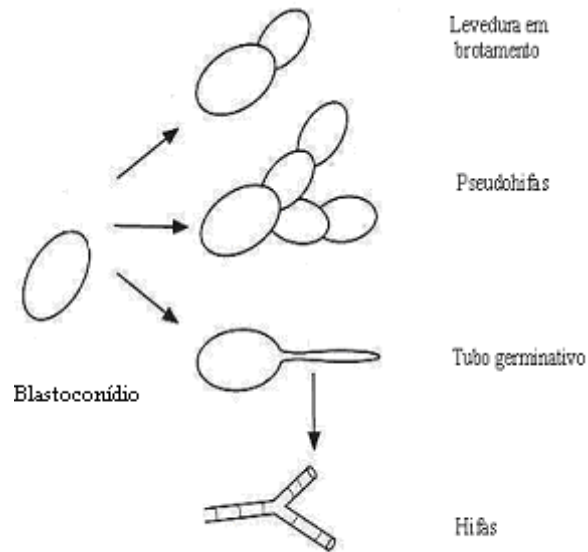


Figura 1: Morfogênese de *C. albicans*. Os blastoconídios são formas unicelulares ovóides que se dividem assexuadamente por brotamento. Esse processo envolve o crescimento de uma nova célula a partir de um ponto específico na superfície da célula mãe. Posteriormente ocorre divisão nuclear e um septo é formado entre as células parental e filha. Na transição levedura-hifa, ocorre inicialmente a formação do tubo germinativo que cresce longitudinalmente através do pólo distal. Ocorre a divisão mitótica dentro do tubo e os septos são formados, dando origem às hifas. As pseudohifas originam-se a partir das novas células filhas que não se separam da célula mãe.

Fonte: Medical Microbiology, 1996. Samuel Baron ed. 4th ed.

A relação entre as formas leveduriformes, pseudohifas e hifas verdadeiras não está bem esclarecida. Algumas evidências sugerem que as pseudohifas são mais similares às formas leveduriformes. Nessas formas, um anel de septina é formado próximo ao “pescoço” entre o tubo germinativo e o blastoconídium e posteriormente ocorre a primeira mitose e formação do septo nesse sítio. Como a célula filha permanece ligada a forma “filamentosa” resultante apresenta constrictões na região do septo que não são encontrados nas hifas (SUDBERY e cols., 2004). Em contraste, nas hifas verdadeiras a primeira mitose e septação ocorrem inteiramente dentro do tubo germinativo, usualmente 10 a 15 μm distante da célula mãe (FIGURA 2).

Apesar das diferenças entre hifas e pseudohifas é sabido que condições ambientes similares induzem a formação das duas formas. Contudo o papel biológico desses fenótipos ainda não está totalmente esclarecido. É possível que pseudohifas sejam um estado de transição entre leveduras e hifas. Ou ainda são estados alternativos induzidos por condições que promovem a infecção e apresentam propriedades biológicas e funções diferentes durante o processo infeccioso (SUDBERY e cols., 2004).

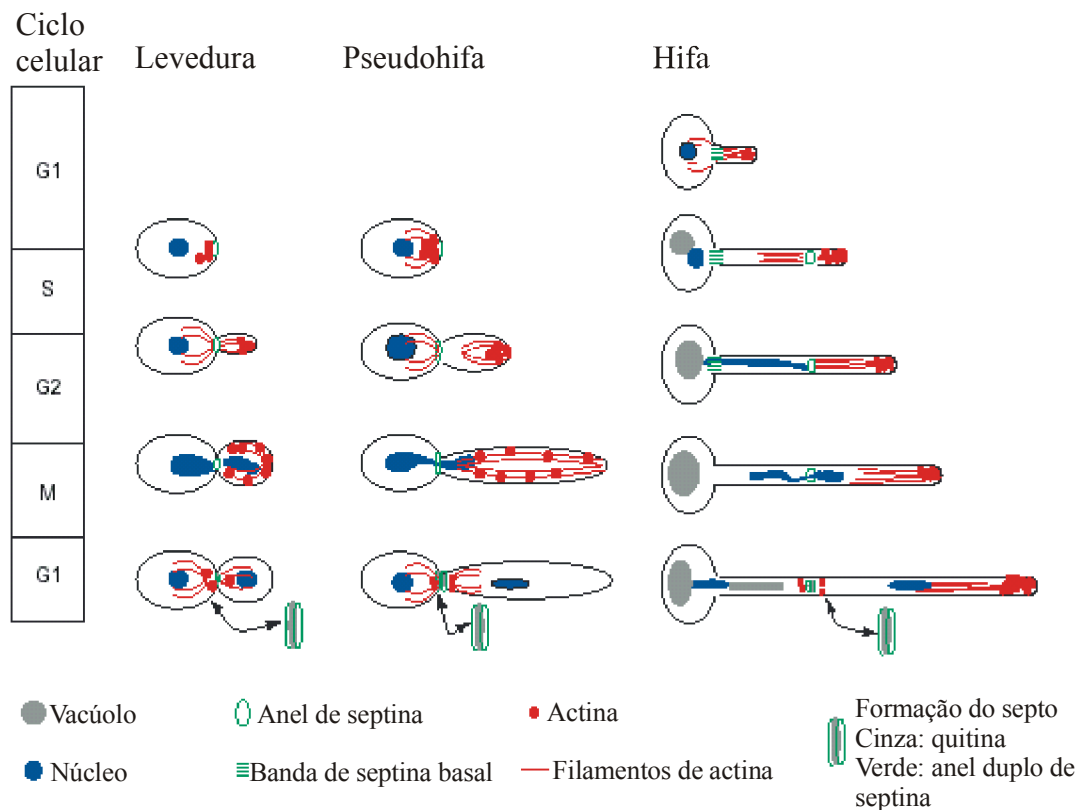


Figura 2: Eventos do ciclo celular das formas leveduriforme e filamentosa.

Ciclo celular de levedura e pseudohifas: A formação do broto ocorre próxima à cicatriz originada do processo anterior ou no polo oposto ao mesmo (bipolar). Inicialmente ocorre uma polarização dos filamentos de actina, que persiste durante todo o ciclo. Um anel de septina é formado na base do brotamento. Após a mitose, o anel de septina separa-se em dois, e um septo primário composto de quitina é formado entre eles. Nos blastoconídios há a separação das células, enquanto nas pseudohifas não ocorre.

Ciclo celular de hifas: O tubo germinativo surge em sítios randômicos na superfície da célula mãe ou de maneira bipolar. A formação do tubo ocorre antes de iniciar o ciclo celular que é caracterizado pela duplicação do fuso mitótico e síntese de DNA. O primeiro

septo é formado no interior do tubo germinativo e na sua base encontra-se uma banda de septina. A divisão nuclear ocorre na região entre o broto e a célula mãe nos blastoconídios e pseudohifas. Nas hifas, o núcleo migra e se divide no tubo germinativo.

Fonte: Sudbery, 2004.

Os clamidoconídios são estruturas de resistência, a semelhança dos esporos bacterianos, formados pela diferenciação das hifas em condições adversas. *In vitro*, os clamidoconídios podem ser formados após incubação do fungo em meio contendo fonte de carbono natural e Tween 80. Apresentam parede espessa, citoplasma concentrado e podem localizar-se no meio ou no final das hifas (FIGURA 3).



Figura 3: Os clamidoconídios são estruturas arredondadas que se formam a partir da diferenciação das hifas.

Fonte: www.uky.edu

C. albicans é comumente encontrado como comensal no trato digestivo e genital de indivíduos saudáveis podendo, inclusive, atingir altas densidades celulares sem sintomas de doença (SOLL, 2002). Entretanto, pode ser responsável por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal (CVV) e orofaríngea (COF), até infecções sistêmicas principalmente quando fatores de risco estão presentes nos hospedeiros humanos. Esses fatores geralmente incluem: uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, uso de esteróides ou outras

substâncias imunossupressoras, *diabetes mellitus*, AIDS e funções fagocitárias alteradas (WEIG e cols., 1998). Com frequência, o tipo de infecção por *Candida* sp está relacionado com uma debilidade específica nas defesas do hospedeiro. Assim, a infecção de mucosa geralmente está associada com a debilidade da imunidade mediada por célula T, enquanto a infecção sistêmica é comum em pacientes neutropênicos (GREENFIELD, 1992).

Essas infecções são usualmente tratadas com drogas antifúngicas, como fluconazol e anfotericina B. Entretanto, relatos de isolados resistentes ao fluconazol surgiram rapidamente na literatura. Resistência aos agentes antimicrobianos pode ser considerada como uma manifestação complexa de fatores envolvendo hospedeiro e patógeno. Do ponto de vista clínico, resistência pode ser definida como persistência ou progressão da infecção mesmo em curso de terapia antimicrobiana. Fatores como, sensibilidade do patógeno ao antimicrobiano, estado geral do indivíduo, farmacocinética e interações da substância utilizada, bem como capacidade de produção de biofilme pelo agente etiológico, podem influenciar no tratamento da infecção (COWEN e cols., 2002).

A identificação por métodos convencionais é trabalhosa e requer longo período de tempo. Estes métodos são baseados na micromorfologia das colônias, assimilação de açúcares e testes de fermentação (KURTZMAN & FELL, 1998). A formação de tubo germinativo em presença de soro *in vitro* e a produção de clamidoconídios são utilizados em laboratório clínico como critérios preliminares para diferenciar *C. albicans* de espécies não-*albicans*.

A identificação molecular de *Candida* sp baseia-se na detecção de seqüências espécie-específicas através de várias metodologias (Tabela 1). A maioria das técnicas emprega a reação de amplificação em cadeia pela polimerase isoladamente ou associada à outra (ERJAVEC & VERWEIJ, 2002).

Tabela 1: Técnicas empregadas para identificação molecular de *Candida* sp

Técnica	Descrição	Referência
PCR em tempo real	Detecção de ITS2 (seqüência espaçadora) dos genes rDNA de amostras cultivadas <i>in vitro</i> .	Park e cols., 2000
	Detecção do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene rDNA (LSU rDNA) de amostras ressuspensas em água.	Brinkman e cols., 2003
	Detecção da seqüência de rDNA 18 S de amostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue de pacientes.	White e cols., 2003.
	Detecção de ITS 2 entre a os genes 5.8 S e 28 S de amostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue.	Maaroufi e cols., 2003
	Detecção da seqüência de rDNA de isolados vaginais entre os genes 5.8 S e 28 S	Trama e cols., 2005
Multiplex PCR	Amplificação de seqüência complementar ao gene <i>CHS1</i> (quitina sintetase) de amostras isoladas de tartaruga e cultivadas <i>in vitro</i> .	Milde e cols 2000
	Amplificação de ITS1 e ITS2 de amostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue de pacientes.	Chang e cols., 2001

PCR cont	RFLP: amplificação de seqüências complementares a ITS1 e ITS4 seguida de digestão enzimática com as endonucleases de restrição <i>Hae</i> III, <i>Dde</i> I e <i>Bfa</i> I. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> .	Williams e cols., 1995
	RFLP: amplificação de uma região do gene <i>LIA1</i> (lanosterol 14- α demetilase) seguida da digestão enzimática com <i>Hinc</i> II, <i>Nsi</i> I e <i>Sau</i> 3A. As amostras são provenientes de cultura <i>in vitro</i> e de diferentes sítios anatômicos.	Morace e cols., 1997
	Amplificação de seqüências complementares a região 18 S do rDNA seguida de hibridação com seqüências espécie-específicas a partir de amostras cultivadas <i>in vitro</i> .	Loeffler e cols., 2000
	Amplificação de seqüências complementares a região 28 S do rDNA seguida de análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) a partir de amostras cultivadas <i>in vitro</i> .	Hui e cols., 2000
	Semi-nested PCR: amplificação de seqüências complementares a extremidade 3' do rDNA 5.8 S e 5' do rDNA 28 S. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> e sangue de pacientes.	Ahmad e cols., 2002
	AFLP: amplificação de fragmentos de DNA ligados previamente a adaptadores e análise em gel de agarose. Amostras	Borst e cols., 2003

	obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> .	
	RAPD: amplificação utilizando oligonucleotídeos randômicos a partir de cultura <i>in vitro</i> .	Bautista-Muñoz e cols., 2003
	PCR-EIA: amplificação de fragmento correspondente região entre ITS3 e ITS4 seguida de ensaio imunoenzimático, utilizando os amplicons como “antígeno”.	Coignard e cols., 2004
NASBA: <i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>	Amplificação em cadeia pela polimerase a partir de RNA (reação de RT, RNase H, T7 RNA polimerase a 41 °C acopladas) correspondente a região 18 S do rDNA. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> e sangue de pacientes.	Widjoatmodjo e cols., 1999 Loeffler e cols., 2003
Sequenciamento	Análise de seqüência de fragmento complementar a região 18S do rDNA	Gharizadeh e cols., 2004

2 FATORES DE VIRULÊNCIA: FOSFOLIPASES E LIPASES

Microrganismos oportunistas podem manter uma relação comensal e patogênica com seu hospedeiro. Para o estabelecimento da infecção, sinais específicos presentes no hospedeiro são reconhecidos pelo microrganismo e estes podem estar ausentes durante o estado comensal. Em resposta a essas diferenças, o microrganismo pode expressar genes que codificam os fatores de virulência somente durante a infecção. Além disso, esses genes podem ser diferencialmente expressos dependendo da fase e do tipo de processo infeccioso (HUBE, 2004).

C. albicans é um bom exemplo de microrganismo que mantém essa relação com o seu hospedeiro. Entretanto, até o momento pouco é conhecido sobre os fatores humanos requeridos durante a transição do estado comensal para o estado patogênico desse fungo. Várias evidências sugerem que o fungo “sente” as mudanças ambientais e em resposta, rapidamente modifica seu perfil de expressão gênica.

De Bernardis e cols., (1998) mostraram que o pH do hospedeiro pode alterar o padrão de expressão gênica e a virulência de *C. albicans*. Esse fungo apresenta dois genes, *PHR1* e *PHR2*, que codificam proteínas de parede celular e cuja expressão é controlada pelo pH neutro ou alcalino e ácido, respectivamente (SAPORITO-IRWIN e cols., 1995; MÜHLSCHLEGEL & FONZI, 1997). A deleção desses genes produz mutantes (*PHR1*⁻ e *PHR2*⁻) incapazes de crescer em pHs nos quais os genes são expressos. Mutantes *PHR1*⁻ apresentam virulência reduzida em infecção sistêmica em camundongos BalbC, enquanto mutantes *PHR2*⁻ não desenvolveram quadros de vaginite em ratos (De BERNARDIS e cols., 1998).

Durante a candidíase sistêmica o microrganismo deve transitar do trato gastrintestinal para a corrente sangüínea. O mecanismo molecular envolvido nesse processo ainda é obscuro, mas Pendrak e cols., (2004) sugerem que a hemoglobina é uma molécula do hospedeiro importante para o estabelecimento da infecção sistêmica. O crescimento em meio quimicamente definido elimina a capacidade de adesão de *C. albicans*. Entretanto, a adição de hemoglobina ao meio restaura a propriedade de ligação e adesão do fungo a várias proteínas do hospedeiro e induz a expressão de vários genes. A função da maioria desses genes no processo de adaptação de *C. albicans* no hospedeiro ainda é desconhecida. Contudo, o gene *CaHMX1*, que codifica a enzima hemeoxigenase, somente é expresso quando a hemoglobina está presente no ambiente. A presença dessa enzima permite que o microrganismo utilize a hemoglobina para adquirir ferro como nutriente. Além disso, moléculas como α -biliverdina

(proteção contra processos oxidativos dos fagócitos) e monóxido de carbono (potente anti-inflamatório) podem ser produzidas na corrente sanguínea protegendo o patógeno das defesas do hospedeiro

Embora a maioria das infecções por *Candida* sp ocorra em resposta a alterações fisiológicas que afetam, principalmente, os sistemas de defesa do hospedeiro (FERNANDES & MACHADO, 1996; WEIG e cols., 1998), o microrganismo expressa vários fatores de virulência que contribuem para a patogênese da infecção. Entre esses fatores encontram-se adesão às células e tecidos dos hospedeiros, secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases), alteração fenotípica da morfologia celular e da colônia (*switching* fenotípico) e dimorfismo (CALDERONE & FONZI, 2001).

As enzimas hidrolíticas estão envolvidas em processos nutricionais e metabólicos. Durante o estado patogênico sua principal função parece estar relacionada com a degradação e invasão das células e tecidos do hospedeiro. Os danos teciduais e celulares nos sítios onde se encontram os organismos são características de muitas infecções causadas por fungos. Entre os fatores que contribuem para esse processo estão as proteases, fosfolipases e lipases (van BURIK & MAGEE, 2001).

No nosso trabalho analisamos a atividade de fosfolipase em amostras de exsudato vaginal, dessa forma limitaremos a discutir somente sobre esse fator de virulência.

O termo fosfolipase refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade para hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos. A nomenclatura das fosfolipases baseia-se no tipo de ligação éster que é quebrada. Dessa forma, fosfolipase A1 (PLA1) e fosfolipase A2 (PLA2) hidrolisam as ligações éster nas posições 1 e 2 da molécula de glicerol, respectivamente. Ácidos graxos livres e 1-acil-lisofosfolipídeo ou 2-acil-lisofosfolipídeo são produtos da atividade de PLA1 e PLA2, respectivamente. Fosfolipase C (PLC) hidrolisa a ligação fosfodiéster do fosfolipídeo, produzindo 1,2-diacilglicerol. A segunda ligação fosfodiéster é quebrada pela fosfolipase D (PLD) e o produto originado é o ácido fosfatídico. A fosfolipase B (PLB) apresenta dois tipos de atividade: hidrolase e lisofosfolipase-transacilase. A atividade de hidrolase permite a clivagem de ligações éster de fosfolipídeos (PLB) e lisofosfolipídeos (lisofosfolipase), enquanto a transacilase catalisa a formação de fosfolipídeos a partir da transferência de ácidos graxos livres para o lisofosfolipídeo (FIGURA 4) (GHANNOUM, 2000).

O primeiro relato da presença de fosfolipases em *C. albicans* foi publicado por Werner (1966) e atualmente todos os tipos de enzima descritos anteriormente já foram identificados em

C. albicans (NIEWERTH & KORTING, 2001). A atividade de fosfolipase pode ser detectada *in vitro* (PRICE e cols., 1982; SAMARANAYAKE e cols., 1984) e baseia-se na formação de halo de degradação do substrato, geralmente gema do ovo ou lecitina, em presença da enzima secretada pelo fungo. Entretanto, como a gema do ovo contém substrato para fosfolipase e lipase, essas metodologias são inespecíficas e são utilizadas para avaliação inicial da produção das enzimas pelas amostras de *C. albicans*. A confirmação da atividade de fosfolipase depende de outras técnicas, tais como ensaios colorimétricos (MIRBOD e cols., 1995).

Alguns genes que codificam para fosfolipase já foram clonados e caracterizados: *CaPLB1* (LEIDICH e cols., 1998; HOOVER e cols., 1998), *CaPLB2* (SUGIYAMA e cols., 1999), e *CaPLD* (KANOHO e cols., 1998). Dessa forma, estudos de deleção dos mesmos podem contribuir para o conhecimento do papel biológico de fosfolipase no ciclo evolutivo de *C. albicans*.

Poucos estudos em relação a função das fosfolipases na patogenicidade de *C. albicans* foram realizados até o momento. Barrett-Bee e cols., (1985) analisaram a atividade de fosfolipase A e lisofosfolipase em sobrenadantes de cultura e extratos de blastoconídios de *C. albicans*. Uma correlação entre isolados do fungo com maior atividade dessas enzimas e maior capacidade de adesão nas células epiteliais bucais e maior taxa de mortalidade dos animais pôde ser observada. Esses resultados sugerem a participação dessas enzimas na patogênese do parasita.

Alguns autores observaram atividade de protease e fosfolipase em isolados clínicos de *C. albicans* provenientes de mucosa oral de pacientes com câncer (OLIVEIRA e cols., 1998); candidemia (SUGITA e cols., 2004); mucosa oral e vaginal de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (RIBEIRO e cols., 2004).

Ibrahim e cols., (1995) utilizaram isolados clínicos de *C. albicans* provenientes do sangue de pacientes com candidíase disseminada e isolados de cavidade oral de indivíduos saudáveis (comensais) para relacionar a atividade de fosfolipases com essa função. Os resultados mostram que: os isolados de sangue apresentaram maior atividade de fosfolipase extracelular; isolados com maior atividade enzimática invadem a mucosa do local infectado e são disseminados via hematogênica para outros órgãos e ainda causam maior mortalidade de camundongos.

Outros dados que reforçam a participação das fosfolipases na virulência de *C. albicans* vêm de estudos realizados com mutantes deficientes de atividade de fosfolipase B1 (PLB1⁻). Leidich e cols., (1998) infectaram camundongos Balb/c com células leveduriformes de cepas

parentais e mutantes *PLB1⁻* via intravenosa. Todos os animais infectados com a cepa parental morreram após nove dias, enquanto cerca de 60% dos animais infectados com o mutante sobreviveram até o 15º dia pós infecção. Esses resultados indicam que a deleção do gene *CaPLB1* reduz drasticamente a capacidade de invasão do fungo nas células hospedeiras. Entretanto, o produto da expressão desse gene não é essencial para os processos de crescimento, germinação e aderência do fungo.

A atividade de fosfolipase D foi detectada em *C. albicans* pela primeira vez por McLain & Dolan, (1997). Sua expressão é induzida pelo crescimento em meio contendo galactose e acetato, mas é inibida por glicerol. A atividade da enzima é estimulada durante a transição levedura-forma filamentosa e é induzida em temperaturas elevadas e pela presença de soro ou N-acetilglucosamina. Esses resultados mostram que a fosfolipase D pode ser um importante regulador do dimorfismo nesse fungo.

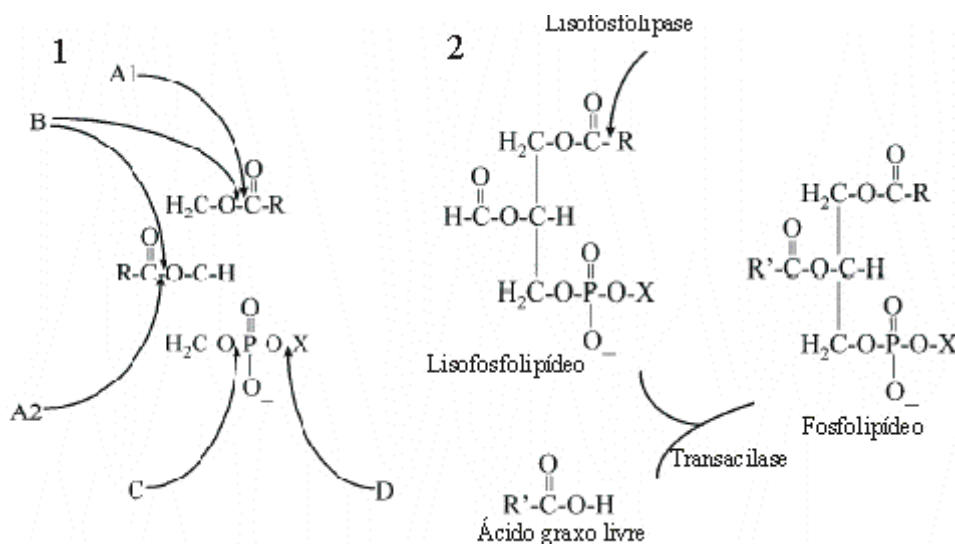


Figura 4 Atividade de fosfolipases.

1. Sítios de ação de fosfolipases.

A1: Fosfolipase A1 (PLA1)

A2: Fosfolipase A2 (PLA2)

B: Fosfolipase B (PLB)

C: Fosfolipase C (PLC)

D: Fosfolipase D (PLD)

2. Atividades de fosfolipase B:

Hidrolase: libera ácido graxo livre de fosfolípidos (fosfolipase B) e lisofosfolípidos (Lisofosfolipase).

Transacilase: produz fosfolípido a partir da transferência de ácido graxo livre ao lisofosfolípido.

Fonte: Modificado de Ghannoum, 2000.

E finalmente, Hänel e cols. (1995) testaram a hipótese de que as fosfolipases podem ser alvo para substâncias antimicrobianas em modelo murino de infecção por *C. albicans*, uma vez que são fatores importantes para o processo de invasão. Dessa forma, os camundongos foram tratados com beta-bloqueadores disponíveis comercialmente (ex. propranolol), análogos estruturais dos mesmos e antifúngicos; alguns compostos beta-bloqueadores apresentaram atividade, enquanto outros foram ativos quando aliados ao fluconazol. No caso dos antifúngicos usados rotineiramente, anfotericina B e fluconazol inibem a atividade das fosfolipases, independente da taxa de crescimento do fungo, já no caso de nistatina a inibição foi verificada apenas quando o fungo apresentava baixa taxa de crescimento, cetoconazol e fenticomazol não inibiram significativamente a atividade de fosfolipase do fungo.

Esterases e lipases catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis, embora vários representantes dessas classes atuem sobre mono e diacilgliceróis (FIGURA 5). A diferença principal entre essas enzimas reside na habilidade em hidrolisar substratos solúveis. As lipases hidrolisam ligações éster na interface entre a fase insolúvel e a fase aquosa. Já as esterases atuam sobre substratos solúveis (ANTHONSEN e cols., 1995).

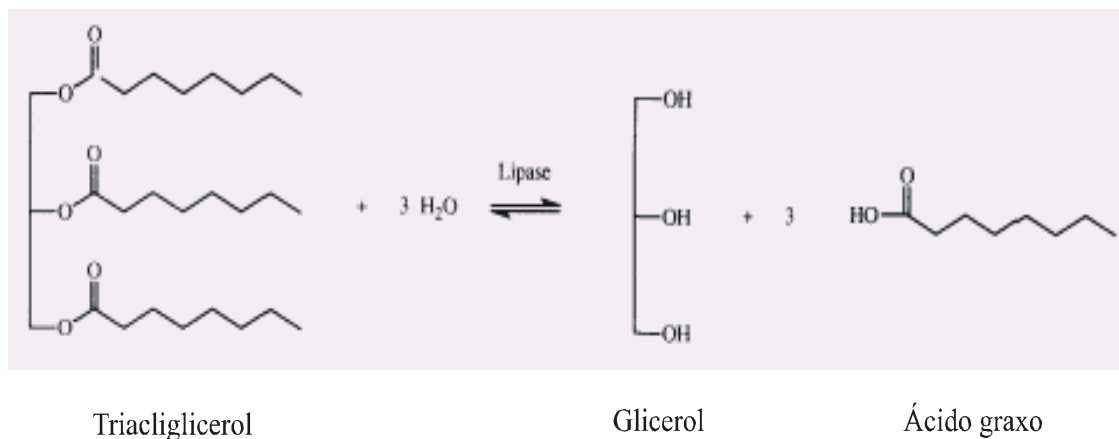


Figura 5: Hidrólise ou síntese de triacilglicerol catalisada por lipase.

Fonte: Jaeger e cols., 1994.

Em vários microrganismos, as lipases são importantes nos processos de adesão (GRIBBON e cols., 1993), interação com o sistema imune inibindo a atividade fagocítica dos leucócitos e a quimiotaxia de monócitos *in vitro* (JAEGER e cols., 1994). Além disso, participam do metabolismo, fornecendo fonte de carbono e energia para os microrganismos patogênicos durante a infecção (GÖTTLICH e cols., 1995).

As atividades de lipase e esterase já foram observadas em *C. albicans*. As lipases pertencem a uma família gênica com pelo menos dez genes (*LIP1 – LIP10*). A expressão dos produtos desses genes foi obtida em vários meios de culturas contendo lipídeos como única fonte de carbono (FU e cols, 1997; HUBE e cols, 2000), sugerindo a participação dessas enzimas na nutrição e metabolismo do fungo. Além disso, Hube e cols., (2000) mostraram que alguns genes *LIP* são constitutivamente expressos, enquanto outros são induzidos de acordo com as condições ambientais. Esse padrão de expressão também pode ser observado *in vivo*, utilizando modelo animal de candidíase sistêmica e saliva de pacientes com candidíase oral e, ainda, *in vitro* após infecção de cultura de células epiteliais humanas da cavidade oral. A expressão diferencial de lipases estava relacionada com o estágio e não com a localização da infecção (STEHR e cols., 2004).

3 PATOGÊNESE DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR *C. ALBICANS*

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A incidência de infecções causadas por *Candida* sp tem aumentado nas últimas décadas, particularmente entre pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Embora *C. albicans* seja a mais frequentemente isolada de amostras clínicas, as espécies não-*albicans* estão significativamente emergindo, entre elas *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HAYNES, 2001). A razão para o aumento de casos de candidíase causada por espécies não-*albicans* ainda é obscura. Contudo, a menor sensibilidade dessas espécies aos agentes antifúngicos de uso clínico parece ser parcialmente responsável por esse quadro. Devido à diferença de susceptibilidade a drogas terapêuticas, como derivados azólicos e anfotericina B, entre as diversas espécies de *Candida*, a identificação do agente é importante para o planejamento terapêutico e estudos epidemiológicos.

As infecções causadas por *C. albicans* podem ser divididas em duas classes principais: infecção superficial e sistêmica. A candidíase superficial (mucosa e cutânea) resulta quando há um desequilíbrio nas condições locais e ocorre um aumento no número de células fúngicas, causando danos ou invasão do epitélio local. As infecções de mucosa são mais frequentes na cavidade oral (orofaringe - “sapinho” e esôfago – esofagite) e vaginal.

A candidíase de mucosas caracterizada pela presença de placas pseudomembranosas (colônias visíveis do fungo) pontuais ou confluentes, eritema (colônias não visíveis). Ainda podem ocorrer queilite angular (fissuras no “canto” da boca), e na vagina, prurido e corrimento (van BURIK & MAGEE, 2001).

As infecções sistêmicas caracterizam-se pela multiplicação/disseminação hematogênica do fungo e comprometimento de órgãos. Os sinais e sintomas mais frequentes da candidemia são inespecíficos e incluem febre alta e queda acentuada da pressão arterial (choque). O índice de mortalidade é bastante alto (40 a 60%) e geralmente está associado ao diagnóstico tardio e comprometimento do estado geral do paciente (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

3.2 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais frequentes na prática diária em ginecologia, representando cerca de 25% dos casos de infecções cérvico-vaginais (FERNANDES & MACHADO, 1996).

Estima-se que uma porcentagem significativa (75%) de mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal em sua vida sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingem o caráter recorrente (CVVR: candidíase vulvovaginal recorrente), ou seja, três ou mais episódios anuais de vaginite por *Candida* (FIDEL & SOBEL, 1996). Novas infecções podem ocorrer logo após o término da terapia (SOBEL, 1988; MERCURE e cols.,1993; VASQUEZ e cols, 1994).

Vários estudos mostram que a maioria dos casos de CVV (80 a 90%) é ocasionada por *C. albicans*, entretanto um aumento na frequência de isolamento de espécies não-albicans, particularmente *C. glabrata* tem sido reportado.(SOBEL e cols, 1998; RIBEIRO e cols; 2000; BAUTERS e cols, 2002; CONSOLARO e cols, 2004).

CVV ocorre com menor frequência durante os períodos pré-menarca e pós menopausa. Barousse e cols (2004) mostraram que a taxa de colonização vaginal em adolescentes (20%) por *C. albicans* é similar à encontrada em adultos (BAUTERS e cols, 2002). Entretanto a incidência de CVV é baixa, mesmo em presença de alta densidade celular.

Vários fatores exógenos podem estar associados a CVV em mulheres adultas. Entre eles incluem fatores hormonais associados à gravidez, fase lútea do ciclo menstrual, uso de contraceptivos contendo altas doses de estrógeno, e reposição hormonal e não hormonais como o uso de antibióticos e *diabetes mellitus* não controlada. (SOBEL e cols., 1998; FERRER.,2000).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento da CVVR ainda não são totalmente conhecidos. Duas teorias tentam explicar a presença dos casos recorrentes: reinfecção ou recidiva (FIDEL & SOBEL, 1996). Na reinfecção, o microrganismo pode ser reintroduzido na vagina durante o ato sexual (HOROWITZ e cols., 1987) ou ainda a partir de outro local que esteja colonizado, como a região ano-retal (MERCURE e cols., 1993). As recidivas podem ser decorrentes da persistência de *C. albicans* na vagina, mesmo após o tratamento.

3.3 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E O SISTEMA IMUNE

O delicado balanço entre o hospedeiro e o fungo comensal pode tornar-se uma relação de parasitismo, resultando em desenvolvimento de infecção. A natureza e a magnitude do comprometimento imunológico do hospedeiro influenciam na manifestação e severidade da infecção (ODDS, 1988).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a candidíase vaginal ainda não são completamente conhecidos a despeito dos numerosos trabalhos disponíveis na literatura. A imunidade celular do tipo Th1 (CANTORNA e cols., 1991; COLE e cols, 1992; BISTONI e cols.; 1993; DOMER e cols, 1993; CENCI e cols.,1995) parece ser importante na proteção do hospedeiro contra a infecção de mucosa. Ao nível de vagina humana, os mecanismos protetores ainda não foram completamente elucidados. Provavelmente, ocorre uma cooperação entre os sistemas imune humoral, mediado por células e defesa inata que ainda são desconhecidos.

Vários autores sugerem que a proteção contra CVV seja mediada por uma imunidade local específica (FIDEL & SOBEL, 1996; De BERNARDIS e cols., 2000; FIDEL, 2002; 2004). Contudo nenhum fator específico ainda foi identificado.

Os resultados em relação ao papel da imunidade mediada por células e por anticorpos na proteção contra CVV são controversos (VÁSQUEZ-TORRES & BALISH, 1997; FIDEL, 2004). Estudos clínicos (FONG e cols., 1992) e com modelos animais (WOSNIAK e cols., 2002) sugerem que os anticorpos não são importantes para a proteção anti-Candida. Entretanto, outros estudos mostram que anticorpos (IgM e IgG3) específicos contra mananas de parede celular do fungo (LÓPEZ-RIBOT e cols., 2004) e anticorpos (IgA) contra aspartil protease (HAN e cols., 1998) conferem proteção contra CVV. Além disso, a imunização intranasal ou intravaginal de ratos com esses antígenos conferem alto grau de proteção contra infecção vaginal por *C. albicans* (De BERNARDIS e cols., 2002). O efeito protetor dos anticorpos pode estar associado à inibição da adesão e formação de tubo germinativo, opsonização, neutralização dos fatores de virulência e atividade candidacida direta (CASADEVALL, 1995).

No nosso trabalho tentamos avaliar o papel da defesa inata como mecanismo protetor contra CVV. Dessa forma passaremos a discutir sobre esse tema e ainda mais especificamente sobre macrófagos.

A adesão de *C. albicans* às células epiteliais é uma etapa importante para o desenvolvimento da infecção vaginal (FERRER, 2000). Vários autores mostraram que células epiteliais da vagina de camundongo (STEELE e cols., 1999a; NOMANBHOY e cols, 2002), macacos (STEELE e cols., 1999b) e mulheres (BAROUSSE, e cols., 2001) pode inibir o crescimento de *C. albicans in vitro*. Esses resultados sugerem que as células epiteliais representam um mecanismo de defesa inata localizado ao nível de vagina.

As células fagocíticas do sistema imune inato apresentam atividade antimicrobiana e funções imunomodulatórias sendo importantes como primeira linha de defesa contra agentes infecciosos (VASQUEZ-TORRES & BALISH, 1997).

Em indivíduos saudáveis as células fagocíticas do sistema imunológico, macrófagos (EVRON, 1980), monócitos (SCHUIT, 1979; MARODI e cols., 1991) e neutrófilos (SCHUIT,1979) impedem a infecção por *C. albicans* por produzirem importantes compostos, tais como os inibidores de crescimento e os citotóxicos, além de proteínas com atividade antifúngica (PETERSON & CALDERONE, 1978) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (VASQUEZ-TORRES & BALISH, 1997).

Macrófagos provenientes de vários sítios anatômicos de diferentes mamíferos têm habilidade para fagocitar *C. albicans* (VASQUEZ-TORRES & BALISH, 1997). A diferenciação celular da forma leveduriforme para filamentosa (dimorfismo) desse fungo é um evento importante para evasão da atividade antimicrobiana intracelular dos macrófagos (BLASI e cols., 1995). Além da atividade fagocítica, vários produtos são secretados pelos macrófagos em resposta a estímulos particulados ou solúveis de origem animal ou microbiana. Dessa forma essas células podem influenciar em quase todos os aspectos da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (NATHAN, 1987).

A atividade anti *Candida* dos macrófagos parece envolver mecanismos dependentes de radicais gerados a partir do metabolismo do oxigênio: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e intermediários reativos contendo nitrogênio, tais como o óxido nítrico (VASQUEZ-TORRES & BALISH, 1997). Por sua vez, vários intermediários reativos são gerados a partir do óxido nítrico: ânion nitrito (NO_2^-), ânion nitrato (NO_3^-), peroxinitrito ($ONOO^-$). Essas moléculas reagem com grupamentos tiol (SH), lipídeos e DNA das células interferindo com o metabolismo normal das mesmas (NATHAN, 1987; MacMICKING e cols., 1997).

O óxido nítrico (NO: nitric oxide) é uma pequena molécula inorgânica, solúvel em água e lipídeos, altamente volátil gerada a partir de vários processos na natureza e diferentes tipos de células. Nos mamíferos, essa molécula participa da homeostase e do sistema de defesa (NATHAN, 1992).

A biossíntese de NO é catalisada por uma óxido nítrico sintase (NOS) utilizando como substrato L-arginina (Figura 6) (YVENGAR e cols., 1987, MacMICKING e cols., 1997). Atualmente, três isoformas dessa enzima podem ser encontradas nas células dos mamíferos: duas isoformas constitutivas dependentes de cálcio que são encontradas principalmente nas células endoteliais (ecNOS: endothelial constitutive NOS) e neuronais (ncNOS: neuron constitutive NOS); a terceira isoforma é indutível e independente de cálcio (iNOS: calcium-independent NOS) presentes em uma série de células, inclusive em macrófagos (MacMICKING e cols., 1997).

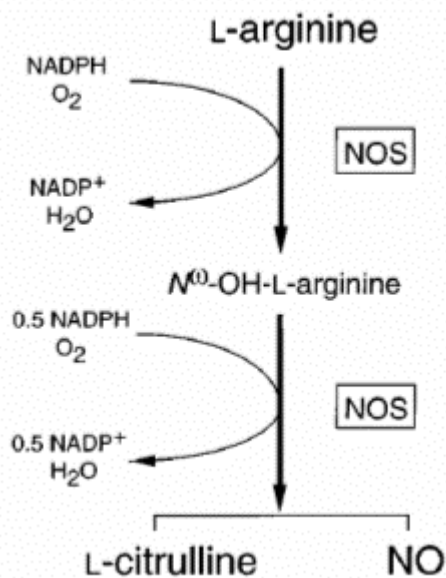


Figura 6: Biossíntese de NO em células de mamíferos. Duas reações sequenciais são catalisadas pela enzima NO sintase (NOS).

Fonte: MacMICKING e cols., 1997

O papel de NO na proteção contra processos infecciosos de origem microbiana pode também ser sustentada pela observação de que muitos inibidores de iNOS, enzima que catalisa a sua produção, exacerbam a infecção de vários patógenos (vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos) em modelos animais (MacMICKING e cols., 1997).

Como mencionado anteriormente, vários estímulos solúveis ou particulados (agonistas), tais como produtos microbianos e citocinas, sinergicamente ou isoladamente, induzem a expressão de iNOS (NATHAN & XIE, 1994). Entre as citocinas, o IFN γ é um potente indutor e eficaz mesmo quando utilizado exclusivamente (NATHAN, 1992). Outra molécula ativadora de macrófagos bastante utilizada é o LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano (STUEHR & MARLETTA, 1985; NATHAN, 1992; NATHAN & XIE, 1994; CHINEN e cols., 1999). LPS participa da ativação de múltiplas cascatas de sinalização intracelular que resultam na liberação de moléculas imunoregulatórias tais como NO e prostaglandinas (SZABO, 1998).

Embora *C. albicans* seja susceptível a atividade antimicrobiana do NO (VAZQUEZ-TORRES e cols., 1994; REMENTERIA e cols., 1995; ELAHI e cols., 2001), esse microrganismo é capaz de evadir do efeito tóxico dessa molécula (CHINEN e cols., 1999). Em outros microrganismos, a proteção contra o efeito deletério envolve a conversão do NO em nitrato catalisada por flavohemoglobina, uma NO dioxigenase (HAUSLADEN e cols., 1998; GARDNER e cols., 1998; WU e cols., 2003) e a presença dessa enzima têm sido reportada em bactérias e leveduras (STAAB e cols., 2003; CRAMM e cols., 1994, ZHU & RIGGS, 1992). Recentemente, Ullmann e cols. (2004) caracterizaram o gene *CaYHB1* que codifica uma flavohemoglobina importante no mecanismo de detoxificação do NO.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, S.A.; KHAN, U.Z. (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. J. Clin. Microbiol., 40: 2483-2489.
- ANTHONSEN, H.W.; BAPTISTA, A.; DRABLOS, F.; MARTEL, P.; PETERSEN, S.B.; SEBASTIAO, M.; VAZ, L. (1995). Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. Biotechnol. Annu. Rev. 1: 315-371.
- BARON, SAMUEL. (1996). Medical Microbiology. 4 th. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- BAROUSSE, M. M.; STEELE, C.; DUNLAP, K.; ESPINOSA, T; BOIKOV, D.; SOBEL, J. D. ; FIDEL Jr, P. L. (2001). Growth inhibition of *Candida albicans* by human epithelial cells. J. Infect. Dis., 184(11): 1489-1483.
- BAROUSSE, M. M.; VAN DER POL, B. J.; FORTENBERRY, D.; ORR, D.; FIDEL JR, P. R. (2004). Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. Sex. Transm. Infect., 80: 48-53.
- BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G.; RYLEY, J.F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeast. J. Gen. Microbiol., 131: 1217-1221.
- BAUTERS, T. G. M.; DHONT, M. A.; TEMMERMAN, M. I. L. (2002). Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazol in women. Am. J. Obstet. Gynecol., 187(3): 569-564.
- BAUTISTA-MUNOZ C., BOLDO M.X., VILLA-TANACA L., HERNANDEZ-RODRÍGUEZ C (2003). Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. J. Clin. Microbiol., 41(1): 1414–420.
- BISTONI F, CENCI E, MENCACCI A, SCHAFFOLLA E, MPSCI P, PUC CETTI P, ROMANI L.(1993) Mucosal and systemic T helper cell function after intragastric colonization of adult mice with *Candida albicans*. J. Infect. Dis., 168: 1449-1457.
- BLASI, E.; PITZURRA, L.; PULITI, M.; CHIMIANTI, A. R.; MAZZOLLA, R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F.(1995). Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. Infect. Immun., 63(5): 1806-1809.

- BORST A., THEELEN B., REINDERS E., BOEKHOUT T., FLUIT C. A., SAVELKOUL M. H. P (2003). Use of Amplified Fragment Length Polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., Including *C. dubliniensis*. J. Clin. Microbiol. 41 (4): 1357–1362.
- BRINKMAN E. N., HAUGLAND R A., WYMER L.J., BYAPPANAHALLI M., WHITMAN L. R., VESPER J S.(2003). Evaluation of a rapid, quantitative Real-Time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. Appl Environ Microbiol., 69 (93): 1775–1782.
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol., 9(7): 327-335.
- CANTORNA, M; BALISH E.(1991). Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis . Infect Immun., 59: 2447-2455.
- CASADEVALL, A. (1995). Antibody immunity and invasive fungal infections. Infect. Immun., 63(11): 4211-4218.
- CENCI, E.; MENCACCIA.; SPACCAPELLO R.; TONNETTI L.; MOSCI P.; ENSSLE, K. H.; PUCETTI P.; ROMANI, L.; BISTONI, F.(1995). T helper cell type 1(Th1) and Th2 like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. J. Infect. Dis., 171 1279-1288.
- CHANG C. H., LEAW N. S.M HUANG H. A., WU L.T., CHANG C. T. (2001). Rapid Identification of Yeasts in Positive Blood Cultures by a multiplex PCR Method. J. Clin. Microbiol., 39 (10): 3466-3471.
- CHINEN, T.; QURESHI, M. H.; KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. (1999). *Candida albicans* suppresses nitric oxide (NO) production by interferon γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS)- stimulated murine peritoneal macrophages. Clin. Exp. Immunol., 115: 491-497.
- COIGNARD C., HURST F.S., BENJAMIN E. L., BRANDT E.M., WARNOCK W. D., MORRISON J. C. (2004). resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. J. Clin. Microbiol., 42 (2):858-861.
- COLE, G. T.; SAHA, K.; SESHAN K. R.; LYNN, K. T.; FRANCO M.; WONG P. K.(1992) Retrovirus-induced immunodeficiency in mice exacerbates gastrointestinal candidiasis. Infect. Immun., 60:4168-4178.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 36(5): 599-607.

- CONSOLARO, M. E. L.; ALBERTONI, T. A.; YOSHIDA, C. S.; MAZUCHELI, J.; PERALTA, R. M. SVIDZINSKI, T. I. E. (2004). Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev Iberoam. Micol., 21: 202-205
- COWEN, L.E.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M.S.; THOMAS, D.Y.; TESSIER, D.C.; KOHN, L.M. (2002). Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 99(14): 9284-9289.
- CRAMM, R.; SIDDIQUI, R. A.; FRIEDRICH, B. (1994). Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemoprotein of *Aucaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem., 269: 7349-7354.
- DE BACKER, M.D.; MAGEE, P.T.; PLA, J. (2000). Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. Ann. Rev. Microbiol., 54: 463-498.
- DE BERNARDIS, F.; BOCCANERA; ADRIANI, D.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A. (2002). Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. Infec. Immun., 70(5): 2725-2729.
- DE BERNARDIS, F.; MÜHLSCHLEGEL, F.A.; CASSONE A.; FONZI, W.A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun., 66: 3317-3325.
- DE BERNARDIS, F.; SANTONI, G.; BOCCANERA, M.; SPREGHINI, E.; ADRIANI, D.; MORELLI, L.; CASSONE, A. (2000). Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. Infect. Immun.; 68(6): 3297-3304.
- DOMER J E, LEHER, R, I. Introduction to *Candida*: systematic candidiasis. In Murphy J W, Friedman H, Bendinelli, M. Eds. Fungal infection and imune response. New York : Plenum Press, 1993: 49-116.
- ELAHI, S.; PANG, G.; ASHMAN, R. B.; CANCY, R. (2001). Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. Immunol., 104: 447-454.
- ERJAVEC, Z.; VERWEIJ, P.E. (2002). Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. Drug Res. Updates, 5: 3-10.
- EVRON, R. 1980. In vitro phagocytosis of *Candida albicans* by peritoneal mouse macrophages. Infect. Immun. , 28 963-971.
- FERNANDES, C.E.; MACHADO, R.B. (1996). Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. Rev. Bras. Medicina – GO, 7:100-104.

- FERRER, J.(2000). Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. Intern. J. of Gynecol Obstet., 71: S21-S27.
- FIDEL Jr, P. L. (2002). The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. Int. Rev. Immunol., 21(6): 515-548.
- FIDEL Jr, P. L. (2004). History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. Trends Microbiol., 12(5): 220-227.
- FIDEL Jr, P.L; SOBEL, J.D. (1996). Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin. Microbiol. Rev., 9 (3): 335-348.
- FONG, I. W.; McCLEARY, P.; READ, S. (1992). Cellular immunity of patients with recurrent or refractory vulvovaginal moniliasis. Am. J. Obstet. Gynecol., 166(3): 887-890.
- FU, Y.; IBRAHIM, A.S.; FONZI, W.; ZHOU, X.; RAMOS, C.F.; GHANNOUM, M. (1997). Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. Microbiol., 143: 331-340.
- GARDNER, P. R., CONSTANTINO, G, SALZMAN, A. L. (1998). Constitutive and adaptative inducible detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. J. Biol. Chem., 273: 26528-26533.
- GHANNOUM, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev., 13(1): 122-143.
- GHARIZADEH B, NORBERG E, LOFFLER J, JALAL S, TOLLEMAR J, EINSELE H, KLINGSPOR L, NYREN P. (2004). Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. Mycoses, 47:29-33.
- GÖTTLICH, E.; DE HOOG, G.S.; YOSHIDA, S.; TAKEO, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. (1995). Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. Mycosis, 38: 489-494.
- GREENFIELD, R.A. (1992). Host-defense system interactions with *Candida*. J. Med. Vet. Mycol., 30: 89-104.
- GRIBBON, E.M.; CUNLIFFE, W.J.; HOLLAND, K.T. (1993). Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids *in vitro*. J. Gen. Microbiol., 139: 1745-1751.
- HAN, W.; MORRISSON, R. P.; CUTLER, J. E. (1998). A vaccine and monoclonal antibodies that enhances mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. Infec. Immun., 66(12): 5771-5776.

- HÄNEL, H.; KIRSCH, R.; SCHIMIDTS, H. L.; KOTTMANN, H. (1995). New systematically active antimycotics from the beta-blocker category. Mycoses, 38: 251-264.
- HAUSLADEN, A.; GOW, A. J.; STAMLER, J. S. (1998). Nitrosative stress, A.; Gow, A. J.; Stamler, J. S. (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 10378-10383.
- HAYNES, K. (2001). Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol., 9(12): 591-596.
- HOOVER, C.I.; JANTAPOUR, M.J.; NEWPORT, G. AGABIAN, N.; FISHER, S.J. (1998). Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) gene. FEMS Microbiol. Let., 167: 163-169.
- HOROWITZ, B. J.; EDELSTEIN, S. W., LIPPMAN, L. (1987). Sexual transmission of *Candida*. Obstet. Gynecol., 69: 883-886 .
- HUBE, B. (2004). From comensal to pathogen: stage- and tissue specific gene expression of *Candida albicans*. Cur. Opin. Microbiol., 7: 336-341.
- HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSEZ, M.; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHÄFER, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Arch. Microbiol., 174: 362-374.
- HUI M., IP M, CHAN. K.S P., LING C M., CHENG A F.B. (2000). Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. Diag. Microbiol. Infec. Dis., 38: 95–99.
- IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANNO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS Jr, J.E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect. Immun., 63(5): 1193-1198.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRAB, B.W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. (1994). Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev., 15: 29-63.
- JONES, T.; FEDERSPIEL, N.A.; CHIBANA, H.; DUNGAN, J.; KALMAN, S.; MAGEE, B.B.; NEWPORT, G.; THORSTENSON, Y.R.; AGABIAN, N.; MAGEE, P.T.; DAVIS, R.W.; SCHERER, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(19): 7329-7334.
- KANO, H.; NAKASHIMA, S.; ZHAO, Y.; SUGIYAMA, Y.; KITAJIMA, Y.; NOZAWA, Y. (1998). Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus *Candida albicans*. Bioch. Bioph. Acta, 1398: 359-364.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. ed. (1998). In: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

- LEIDICH, S.D.; IBRAHIM, A.S.; FU, Y.; KOUL, A.; JESSUP, C.; VITULLO, J.; FONZI, W.; MIRBOD, F.; NAKASHIMA, S.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. (1998). Cloning and disruption of a *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J. Biol. Chem., 273(40): 26078-26086.
- LOEFFLER J., DORN C., HEBART H., COX P., MAGGA S. (2003). Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. Diag. Microbiol. Infect. Dis., 45: 217–220.
- LOEFFLER J., HEBARTA H, MAGGA S., SCHMIDTA D., KLINGSPORB L. (2000). Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. Diag. Microbiol Infect. Dis., 38: 207–212.
- LÓPEZ-RIBOT, J.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTÍNEZ, J. P. (2004). Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 41: 187-196.
- MAAROUFI Y., HEYMANS C., DE BRUYNE J-M., DUCHATEAU V, RODRIGUEZ-VILLALOBOS H., AOUN M., CROKAERT F. (2003). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. J. Clin. Microbiol, 41(7): 3293–3298.
- MacMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. Annu. Rev. Immunol., 15: 323-350.
- MARODI, L. ; KORCHACK, H. M.; JOHNSTON Jr, R. B. (1991). Mechanisms of host defences against *Candida* species . Phagocytosis by monocytes and monocyte- derived macrophages. J. Immunol., 146: 2783-2789.
- McLAIN, N. ; DOLAN, J.W. (1997). Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. Microbiol., 143: 3521-3526.
- MERCURE, S; POIRIER, S.; LEMAY, G.; AUGER, P.; MONTPLAISIR, S.; DE REPENTIGNY. (1993). Application of biotyping and DNA typing of *Candida albicans* to the epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis., 168:502-507.
- MILDE K.; KOSTKAA V.; KALETAA E.F.; WILLEMS H.; C. JAGER C. (2000). Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). Vet. Microbiol., 76: 395-402.
- MIRBOD, F.; BANNO, Y.; GHANNOUM, M.A.; IBRAHIM, A.S.; NAKASHIMA, S., KITAJIMA, Y.; COLE, G.T.; NOZAWA, Y. (1995). Purification and characterization of

- lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta, 1257: 181-188.
- MOLERO, G., DíEZ-OREJAS, R., NAVARRO-GARCÍA, F., MONTEOLIVA, L., PLA, J., GIL, C., SÁNCHEZ-PÉREZ, M., NOMBELA, C. (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. Int. Microbiol., 1:95–106.
- MORACE G.; SANGUINETTI M.; POSTERAPO B.; LO CASCIO G.; FADDA G. (1997). Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-Restriction Enzyme Analysis. J. Clin. Microbiol. 35: 667–672.
- MÜHLSCHLEGEL, F.A.; FONZI, W.A. (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. Mol. Cell Biol., 17: 5960-5967.
- NATHAN, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. The FASEB J., 6: 3051-3064.
- NATHAN, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest., 79(2): 319-326.
- NATHAN, C.; XIE, Q. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric-oxide. J. Biol. Chem., 269(19): 13725-13728.
- NIEWERTH, M.; KORTING H.C. (2001). Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses, 44: 361-367.
- NOMANBHOY, F.; STEELE, C.; YANO, J.; FIDEL Jr, P. L. (2002). Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. Infect. Immun., 70(12): 7081-7088.
- ODDS FC. (1988). *Candida* and Candidosis. London: Bailliere Tindall.
- OLIVEIRA, E. E.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J.; ATTUX, C.; CRUUVINEL, B.; RODRIGES-SILVA, M. R. (1998). Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas de mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev. Soc. Méd. Trop., 31(6): 523-527.
- PARK S., WOMG M., MARRAS A.E. S., CROSS W.E., KIEHN E.T., CHATURVEDI V., TYAGI S., PERLIN S.D. (2000). Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species- specific molecular beacon. J. Clin. Microbiol., 38(8): 2829-2836.
- PENDRAK, M.L.; YAN, S.S.; ROBERTS, D.D. (2004). Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. Arch. Biochem. Bioph., 426: 148-156.

- PETERSON, E. M.; CALDERONE R. A. (1978). Inhibition of specific amino acid uptake in *Candida albicans* by lysosomal extracts from rabbit alveolar macrophages. Infect. Immun., 21:506-513.
- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia, 20: 14-20.
- REMENTERIA, A.; GARCIA-TOBALINA, R.; SEVILLA, M. J. (1995). Nitric oxide-dependent killing of *Candida albicans* by murine peritoneal cells during an experimental infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 11: 157-162.
- RIBEIRO, M. A.; DIETZE, R.; PAULA, C. R.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. (2000). Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. Mycopathologia: 151: 5-10.
- RIBEIRO, M. A.; MIRANDA, A. E.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. (2004). Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. Mycopathologia, 157:255-261.
- SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MACFARLANE, T.W. (1984). Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. Sabouraudia, 22:7-14.
- SAPORITO-IRWIN, S.M.; BIRSE, C.E.; SYPHERD, P.S.; FONZI, W.A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. Mol. Cell Biol., 15: 601-613.
- SCHUIT, K. E. (1979). Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. Infect. Immun., 24: 932-938.
- SOBEL, J. D. (1988) Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 544: 547-557.
- SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. G.; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D.; SUMMERS, P. R. (1998). Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am. J. Obstet. Gynecol., 178: 203-211.
- SOLL, D.R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica, 81:101-110.
- STAAB, J. F.; SUNDSTROM, P. (2003). URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. Trends Microbiol., 11: 69-73.
- STEELE, C. H.; OZENCI, H.; LUO, W.; SCOTT, M. FIDEL Jr. (1999a). Growth inhibition of *Candida albicans* by vaginal cells from naive mice. J. Med. Mycol., 37: 251-260.
- STEELE, C. M.; RATTEREE, FIDEL Jr, P. L. (1999b). Differential susceptibility to experimental vaginal candidiasis in macaques. J. Infect. Dis., 180: 802-810.

- STEHR, F.; FELK, A.; GÁCSEK, A.; KRETSCHMAR, M.; MÄHNB, B.; NEUBER, K.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patients samples. FEMS Yeast Res., 4: 401-408.
- STHUER, D. J.; MARLETTA, M. A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* LPS. Med. Sci., 82: 7738-7742.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol., 12(7): 317-324.
- SUGITA, T.; TAKEO, K.; OHKUSU, M.; VIRTUDAZO, E.; TAKASHIMA, E. A.; OHSHIMA, F.; HARADA, S.; YANAKA, C.; NISHIKAWA, A.; MAJOROS, L.; SIPI CZKI, M. (2004). Fluconazole-resistance pathogens *Candida in scopua e Candida norvegensis*: DNA sequence diversity of rRNA intergenic spacer region , antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. Microbiol. Immunol., 48(10): 761-766.
- SUGIYAMA, Y.; NAKASHIMA, S.; MIRBOD, F.; KANO H, H. KITAJIMA, Y.; GHANNOUM, M.A.; NOZAWA, Y. (1999). Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*. Med. Mycol., 37(1): 61-67.
- SZABO, C. (1998). Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. Ann. N. Y. Acad. Sci., 851: 422-425.
- TRAMA, J. P.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E. (2005). Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real time PCR and pyrosequencing. Mol. Cel. Probes, 19:145-152.
- ULLMANN, B. D.; MYERS, W.; CHIRANAND, W.; LAZZELL, A. L.; ZHAO, Q.; VEGA, L. A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; GARDNER, P. R.; GUSTIN, M. C. (2004). Inducible defense against oxide nitric in *Candida albicans*. Eucaryotic Cell, 3 (3): 715-723.
- VAN BURIK, J-A. H.; MAGEE, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. Ann. Rev. Microbiol., 55: 743-772.
- VASQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; DEMITRIOU, R.; VAISHAMPAYAN, J.; LYNCH, M.; ZERVOS, M. (1994) Kariotyping of *Candida albicans* isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis., 170: 1566-1569.
- VÁSQUEZ-TORRES, A.; BALISH , E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. ,61: 170-192.

- VASQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; BALISH, E. (1994). Candidacidal activity of macrophages from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice. *J. Infect. Dis.*, 170: 180-188.
- WEIG, M.; GROB, U.; MÜHLSCHLEGEL, F. (1998). Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends Microbiol.*, 6(12): 468-470.
- WHITE L. P., SHETTY A., BARNES A.R., (2003). Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J. Med. Microbiol.*, 52: 229-238.
- WIDJOJOATMODJO M.N., BORST A., SCHUKKINK R.A., BOX A.T., TACKEN N.M., GEMEN B., VERHOEF J., TOP B., FLUIT A.C.(1999). Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection medically important *Candida* species. *J. Microbiol. Meth.*, 3 (1-2): 81-90.
- WILLIAMS W. D., WILSON J. M., LEWIS A. O. M., POTIS C. A.J.(1995). Identification of *Candida* Species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of Intergenic Spacer regions of Ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (9): 2476-2479.
- WU, G.; WAINWRIGHT, L. M.; POOLE, R. K. (2003). Microbial globins. *Adv. Microbi. Physiol.*, 47: 255-310.
- YVENGAR, R.; STHUER, D. J.; MARLETTA, A. (1987). Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N- nitrosamines: Precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6369-6373.
- ZHU, H.; RIGGS, A. F. (1992). Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5015-5019.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS VAGINAIS

As amostras de *Candida* foram obtidos da parede vaginal de pacientes da região Sul do Brasil e foram processadas pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC, da Universidade Estadual de Maringá .

As amostras foram coletadas com auxílio de zaragatoas estéreis, da parede vaginal, e logo após foram cultivadas em meio CHROMágar *Candida*® (Probac do Brasil) a 25°C por 5 dias. Depois de isoladas, cada colônia foi transferida para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud e, cultivadas por 30°C por 24 horas para análises posteriores. As amostras de referência utilizadas foram: *C. albicans*, (ATCC 10231); *C. parapsilosis*, (ATCC 22019); *C. tropicalis*, (ATCC 28707), fornecidas pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ RJ).

As amostras de leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud a 4 °C, com repiques mensais.

4.2 MEIOS DE CULTURA

Sabouraud dextrose

Componente.....	g/L
Peptona	10,0
Glicose	40,0
Extrato de levedura.....	2,5

Quando necessário, cerca de 15 g de ágar foi acrescentado ao meio líquido.

Meio agar fubá

Componentes	g/L
Fubá de milho	40,0
Ágar bacteriológico	40,0
Twen 80	12 mL

Meio mínimo (PONTECORVO e cols., 1953)

Componentes	g/L
NaNO ₃	6,0
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄	0,01
ZnSO ₄	0,01
Glicose	10,0
Ágar	15,0

4.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

4.3.1 Meio CHROMágar Candida

As amostras de levedura foram inoculadas em meio CHROMágar Candida em placas de Petri e incubadas a 37°C por 24 a 48 h para diferenciar as leveduras pela cor e morfologia (HORVATH e cols., 2003).

4.3.2 Formação de tubo germinativo (Efeito Reynolds – Braude)

As amostras de leveduras foram cultivadas em meio Sabouraud caldo durante 3 horas. Cerca de 10⁵ foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 0,2 mL de soro humano. Os tubos testes foram incubados a 37°C por até 3 horas, e as leituras foram realizadas a cada hora, para observar a formação de tubo germinativo (efeito Reynolds-Braude).

4.3.3 Formação de clamidoconídios

Para avaliar a produção de clamidoconídios, utilizamos a técnica descrita em Kreger Van-Rij (1984). Assim, foram realizados microcultivos em lâmina contendo ágar fubá acrescido de Tween 80. As amostras foram incubadas a 25°C, por até 96 horas, e as leituras efetuadas diariamente.

4.3.4 Teste de utilização de carboidratos

Inicialmente foram preparados soluções estoques (10%), em água destilada, dos açúcares a serem testados. Para os testes de assimilação de açúcares, as amostras foram inoculadas no meio YNB (DIFCO) através da técnica de “Pour Plate”. Dessa forma, uma suspensão de células foi realizada em 2,0 mL de água estéril e misturada ao meio resfriado sem adição de glicose. A mistura foi transferida para placas de Petri e mantida a temperatura ambiente até a solidificação do meio. Cerca de 10 µL (concentração 1%) de cada carboidrato foi aplicado sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas a 30° C por 24 a 48 horas para observação do crescimento.

Para os testes de fermentação, cerca de 10^3 células foram inoculadas em 2,0 mL de meio mínimo líquido contendo uma fonte de carbono a ser testada. Os tubos foram incubados a 30° C por até 15 dias para observação da produção de gás.

Os açúcares testados foram: Inulina, Ramnose, Glicose, Sacarose, Lactose, D-galactose, Rafinose, Inositol, D-xilose, Celobiose, Trealose, Dulcitolose, Maltose, Melibiose. O padrão de utilização de carboidratos foi avaliado de acordo com Sidrim & Rocha (2004).

4.3.5 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

Alíquotas de cada amostra, com cerca de 10^5 células foram acrescentadas a tubos com 1 mL de caldo Sabouraud. As culturas foram incubadas a 37°C e 42°C por 96 h. O crescimento celular foi avaliado visualmente com intervalos de 24h. Um resultado de teste negativo foi definido como a falta de qualquer crescimento visual dentro do tubo após 96 h de incubação.

4.36 Avaliação do crescimento em presença de NaCl 6,5%

Alíquotas de cada amostra, com cerca de 10^5 células foram acrescentadas a tubos com 1 mL de caldo Sabouraud suplementado com 6.5% de cloreto de sódio (Sab+ NaCl). As culturas foram incubadas a 37°C por 96 h. Culturas controle em caldo Sabouraud foram preparados e incubados sob as mesmas condições para assegurar a viabilidade de todos os organismos testados. O crescimento celular foi avaliado visualmente com intervalos de 24h. Um resultado de teste negativo foi definido como a falta de qualquer crescimento visual dentro do tubo após 96 h de incubação.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método descrito em Ausubel e cols, (1999) com algumas modificações. Os isolados clínicos foram cultivados em 3 mL de meio Sabouraud líquido a 37°C sob agitação por 24 horas. As células foram centrifugadas a 13.000 rpm e lavadas com 1,5 mL de água destilada esterilizada. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de tampão de lise TENTS (10mM Tris HCl pH 8,0 contendo 2% v/v Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl e 1 mM EDTA) e 2 pérolas de vidro (2 mm). Em seguida foram adicionados 400 µl de fenol saturado e a suspensão foi homogeneizada em vórtex por 3 minutos. A fase aquosa foi removida após centrifugação da mistura a 13.000 rpm por 5 minutos e transferida para novo tubo e desproteinizada com fenol-clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1,v/v). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto por 2 horas, lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuscitado com 50 µL de água deionizada estéril. O DNA foi tratado com 1µL RNase A (1 mg/mL) a 37°C por 1 hora e as concentrações foram estimadas por eletroforese em gel de agarose como descrito por Sambrook & Russel (2001).

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase

A identificação molecular das leveduras através de PCR foi realizada como descrito por Ahmad e cols, (2002) e Milde e cols, (2000).

4.4.2.1 Semineded PCR (snPCR - Ahmad *et al*, 2002)

Para a identificação dos isolados de *Candida* sp foram utilizados os seguintes iniciadores: oligonucleotídeo direto universal, CTSF, oligonucleotídeo reverso CTSR, capazes de amplificar o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8 S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28 S e a região espaçadora interna. Para realização do segundo ciclo de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos espécie-específicos que derivam da região ITS2 de *C.albicans* (CADET), *C.parapsilosis* (CPDET), *C.tropicalis* (CTDET) e *C.glabrata* (CGDET), (Tabela 1).

4.4.2.2 Amplificação do gene *CHS 1* (quitina sintetase) (*chs 1* – PCR)

Durante a realização da técnica de semi-nested PCR, as amostras identificadas presuntivamente como *C. glabrata* produziram resultados duvidosos. Para confirmar os resultados, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma seqüência do gene que codifica quitina sintetase, denominados GLAB 1 e GLAB2 (Tabela 1) descrito por Milde e cols., (2000).

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase.

Oligonucleotídeo	Seqüência 5' → 3'
CTSF	TCGCATCGAT GAAGAACGCAGC
CTSR	TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC
CADET	ATTGCTTGCGGCGGTAACGTCC
CPDET	TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC
CGDET	TAGGTTTTACCAAC TCGGTGTT
CTDET	ATTTTGCTAGTGGCC
GLAB 1	GTGCAGATATGTCGCTATTACCTTTGG
GLAB 2	CGACTGGTTGACGATAATCAGAGGAGATGGG

4.4.2.3 Amplificação do DNA

A reação de amplificação de DNA foi realizada em tubos de 0,2 mL, com volume total de 20 μ L contendo 1X tampão para PCR (200 mM Tris HCl pH 8,4, 500 mM KCl, MgCl 2 mM), 1 U Taq DNA polimerase, 5 pmol dos iniciadores, 1 μ L do DNA extraído da cultura (cerca de 10 ng), 0,1 mM desoxirribonucleotídeos trifosfatos.

No primeiro ciclo de amplificação do snPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais CTSF e CTSR nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, hibridação a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 min e finalmente um ciclo a 72°C por 10 min.

Após o primeiro ciclo de amplificação 1 μ L do produto diluído 1:40V/V (cerca de 10 ng) foi utilizado como substrato para o segundo ciclo de amplificação utilizando a combinação do iniciador reverso universal (CTSR) e um oligonucleotídeo espécie-específico. A reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Para CHS-1-PCR foram utilizadas as seguintes condições: 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos.

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3). O gel, em diferentes concentrações (0,8 a 2,5%) foi preparado em TBE. As amostras e um padrão de peso molecular (100 pb Ladder - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA 1X (Ficoll 400 2,5%; Azul de bromofenol 0,025%; Xileno cianol FF 0,025%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 100V) com amperagem constante.

As moléculas de DNA foram visualizadas após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) por 30 minutos e observação em comprimento de onda ultravioleta (260 nm).

4.5 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

4.5.1 Determinação da atividade de protease em placa

As amostras foram previamente incubadas por 24 horas sob agitação constante (160 rpm) em meio de indução (meio mínimo suplementado com 0,6% de caseína de leite e ampicilina 100 µg/mL), após o período de incubação o número de células foi avaliado através de contagem direta utilizando-se uma câmara hemocitométrica (Improved Neubauer Chamber).

Foram transferidos 10 µL (aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células) das culturas em meio de indução para as placas de Petri contendo meio mínimo pH 4,0 suplementado com caseína de leite na concentração final de 0,6%. O inóculo foi realizado em orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro perfurados no ágar (inóculo de “ponto”).

Para a observação do crescimento celular e atividade proteolítica extracelular, as placas foram incubadas a 37°C por um tempo máximo de 72 horas, sendo verificadas a cada 24 horas. As amostras que apresentaram um halo de degradação ao redor da colônia, após o período incubado foram consideradas positivas para produção de proteases.

A atividade proteolítica foi estimada pela razão entre o diâmetro da zona de degradação ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (PZ), como descrito em Ruchel e cols., (1982).

4.5.2 Determinação da atividade de fosfolipase em placa

As amostras foram incubadas por 24 horas sob agitação contante (200 rpm) em meio Sabouraud adicionado de 100 µg/mL de ampicilina, após o período de incubação o número de células foi avaliado através de contagem direta utilizando-se uma câmara hemocitométrica (Improved Neubauer Chamber).

Foram transferidos 5 µL (aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células) das culturas em meio Sabouraud para as placas de Petri contendo meio mínimo pH 4,5 suplementado com emulsão de gema de ovo na concentração final de 4%, NaCl 20g/L e $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1g/L. O inóculo foi realizado na superfície do ágar.

Para a observação do crescimento celular e atividade de fosfolipase extracelular, as placas foram incubadas a 37°C por 96 horas, sendo verificadas a cada 24 horas por 10 dias. As amostras que apresentaram um halo de precipitação ao redor da colônia, após o período de incubação foram consideradas positivas para atividade de fosfolipase.

A atividade de fosfolipase foi estimada pela razão entre o diâmetro da zona de precipitação ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (PZ), como descrito em Samaranayake e cols., (1984).

4.6 DETECÇÃO DO GENE FOSFOLIPASE B (*PLB1*)

Reação em cadeia da polimerase

A detecção do gene *PLB1* foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos que flanqueiam a primeira metade do gene (751 pb) como descrito por Mukherjee e cols., (2003).(Tabela 2)

As condições de amplificação usadas foram desnaturação inicial a 95°C por 2 min seguida de 33 ciclos a 94°C para a desnaturação por 1 min, 50°C para extensão por 1min e 72°C para extensão por 3 min, e finalmente extensão por 10 min a 72°C.

Tabela 2: Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase para o gene *PLB1*.

Oligonucleotídeo	Seqüência 5' → 3'
PLBF	ATGATTTTGCATCATTG
PLBR	AGTATCTGGAGCTCTACC

4.7 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *C. ALBICANS*

As amostras foram cultivadas por 24 horas sob agitação constante (200 rpm) em 3 mL de Sabouraud, após o período de incubação o número de células foi avaliado através de contagem direta utilizando-se uma câmara hemocitométrica (Improved Neubauer Chamber). Foram inoculadas 10^4 leveduras em 10 mL de caldo Sabouraud. As contagens foram realizadas a cada 2 horas por um período de 12 horas e após 24h do inóculo inicial.

5 RESULTADOS

Tabela 3: Compilação dos critérios utilizados para identificação das leveduras isoladas de secreção vaginal

Isolado	Testes avaliados						
	snPCR	CHROmagar	Utilização de carboidratos	Temperatura 42° C	Clamidosporo	Teste NaCl	Tubo germinativo
7D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
29D	<i>C.albicans</i>	ND	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
41D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
43 D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
49D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
50D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
67D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
73D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
74D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	-	+	+	+
78D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
86D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
88D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
90D	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
10013	<i>C.albicans</i>	ND	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
10029	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
10039	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
10041	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
10057	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
10069	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
10073	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 1	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 2	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
Mg 3	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 4	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 5	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 6	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 7	<i>C.albicans</i>	ND	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
Mg11	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+

Continuação Tabela 3

Testes avaliados							
Isolado	snPCR	CHROmagar	Utilização de carboidratos	Temperatura 42° C	Clamidosporo	Teste NaCl	Tubo germinativo
Mg13	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg14	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
Mg15	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	-	+	+
Mg16	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg21	<i>C.albicans</i>	ND	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 22	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
Mg 25	<i>C.albicans</i>	ND	<i>C.albicans</i>	+	-	+	-
Mg 26	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	+	+	+	-
98D	<i>C.glabrata</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	ND	+	ND	-
53 MC	<i>C.glabrata</i>	ND	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
71 MC	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
82 MC	* ND	ND	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
95 MC	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
97 MC	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
107 MC	ND	ND	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
108 MC	<i>C.glabrata</i>	ND	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
154 MC	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	ND	-	ND	-
32D	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>	ND	-	ND	-
112 MC	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>	ND	-	ND	-
48 MC	<i>C.parapsilosis</i>	ND	<i>C.parapsilosis</i>	ND	-	ND	-
103 MC	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.parapsilosis</i>	ND	-	ND	-
31 D	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-
57 D	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-
72D	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-
79 D	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-

Continuação Tabela 3

Isolado	Testes avaliados						
	snPCR	CHROMagar	Utilização de carboidratos	Temperatura 42° C	Clamidosporo	Teste NaCl	Tubo germinativo
Mg 9	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-
Mg 12	ND	ND	<i>C.guilhermondii</i>	ND	-	ND	-
80 D	ND	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.lusitanae</i>	ND	-	ND	-
45 D	ND	ND	<i>C.lusitanae</i>	ND	-	ND	-

ND : Não Determinado. Foi realizado sn-PCR e *CHS*-1-PCR e em ambos os resultados foram negativos.

- CHROMagar Candida é um meio seletivo diferencial utilizado em laboratório de rotina para identificação presuntiva de espécies de leveduras do gênero Candida. O crescimento desses microrganismos pode ser visualizado como: colônias de *C. albicans* são lisas e verde-claras; *C.krusei* crescem formando colônias grandes, rugosas e de coloração rosa; colônias azuis apresentando um halo de pigmentação púrpura ao seu redor são características de *C. tropicalis*; *C.glabrata* formam colônias pequenas, lisas e rosas (HORVATH e cols., 2003).
- A formação do tubo germinativo juntamente com a produção de clamidoconídios são testes preliminares para diferenciação de *C. albicans* de isolados não-*albicans*. As amostras presuntivamente identificadas como *C. albicans* nos testes fenotípicos foram submetidas a dois testes complementares para diferenciação de *C. dubliniensis*. O teste de tolerância ao caldo Sabouraud acrescido com 6.5% de cloreto de sódio é um teste tradicional e útil em microbiologia para a identificação de diferentes microrganismos. Alves e cols., (2002) desenvolveram um teste discriminatório baseado na habilidade de crescimento da *C.dubliniensis* em caldo Sabouraud acrescido com 6.5% de cloreto de sódio. Outro teste discriminatório é baseado na habilidade que a *C.albicans* apresenta para crescer 42°C ou 45°C enquanto o *C.dubliniensis* não cresce bem a esta temperatura (GALES e cols, 1999).



Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g/mL}$. PCR. M: marcador de peso molecular λ *Hind* III. PCR.B: branco. Primeiro ciclo de amplificação do snPCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais CTSF e CTSR.

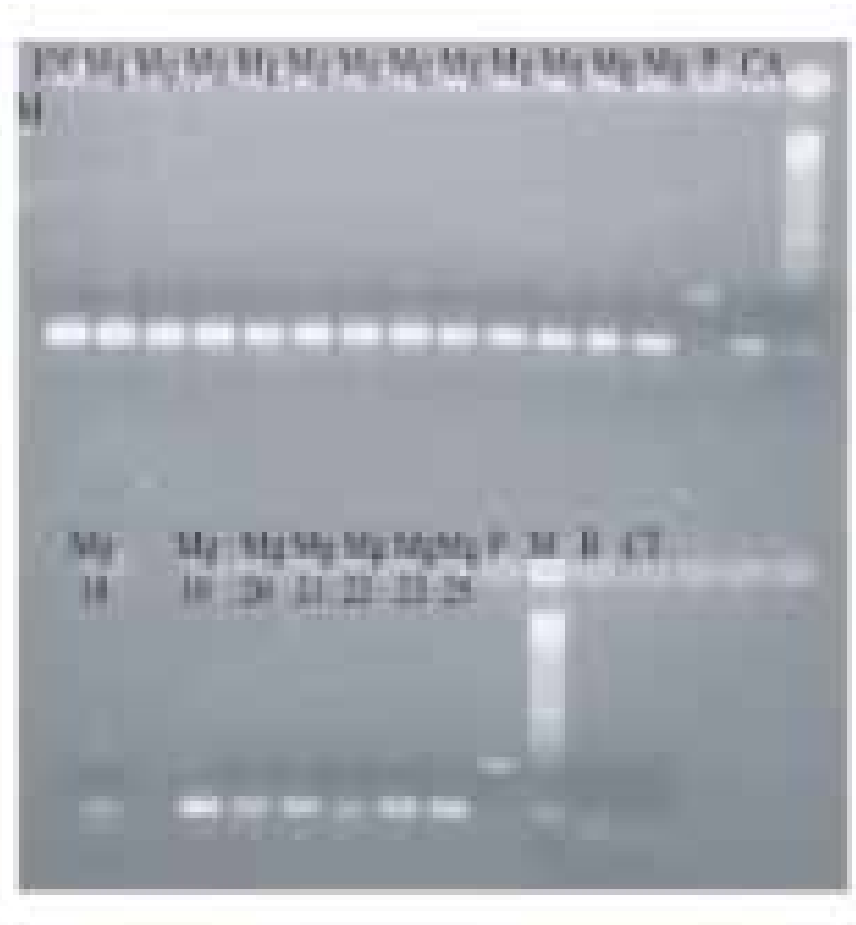


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. PCR. M: marcador de peso molecular 100 pb. P: produto do primeiro PCR. B: branco. C e D: segundo ciclo de amplificação utilizando os iniciadores CTSR e CADET. E: segundo ciclo de amplificação utilizando os iniciadores CTSR e CTDET. F: segundo ciclo de amplificação utilizando os iniciadores CTSR e CGDET. Seta amarela: produto do primeiro PCR.

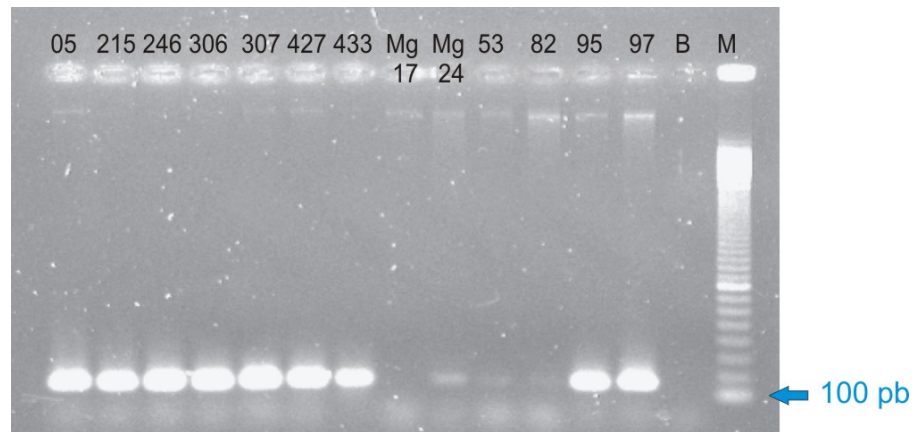


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. PCR. M: marcador de peso molecular 100 pb. B: branco. Produto de amplificação do (*chs 1* – PCR) utilizando os oligonucleotídeos GLAB 1 e GLAB 2.

- As Figuras 1, 2 e 3 correspondem aos produtos de amplificação obtidos a partir da PCR para identificação molecular das amostras de *Candida*. 1 e 2 correspondem à técnica de semi-nested PCR (AHMAD e cols., 2002) e 3 a amplificação do gene *CHS1* (MILDE e cols, 2000).
- O método de semi-nested PCR empregado nesse estudo baseia-se na amplificação em cadeia pela polimerase (seminested PCR) das regiões dos genes que codificam para RNA ribossomal. Os oligonucleotídeos iniciadores universais amplificam a extremidade 3' do RNAr 5.8 S até a extremidade 5' do RNAr 28 S, incluindo a região espaçadora ITS2, gerando fragmentos de aproximadamente 350 a 410 pb para o gênero *Candida*. Os iniciadores espécie-específicos amplificam seqüências nucleotídicas únicas presentes na região ITS2.
- O gene *CHS1* é espécie-específico, permitindo dessa maneira identificar leveduras do gênero *Candida*.
- As técnicas fenotípicas e genotípicas mostraram 100% de concordância dos resultados para as espécies analisadas.

Tabela 4: Atividade proteolítica e de fosfolipase das leveduras isoladas de exsudato vaginal.

Enzimas hidrolíticas		
Isolado	Atividade de protease (PZ)	Atividade de fosfolipase (PZ)
7D	2,9	1,2
29D	3,4	1,3
41D	3,2	1,4
43 D	1,8	1,0
49D	3,6	1,3
50D	3,5	1,2
67D	1,9	1,1
73D	1,9	1,3
74D	3,7	1,4
78D	4,1	1,0
86D	3,0	1,2
88D	2,7	1,2
90D	5,2	1,4
10013	2,9	1,1
10029	4,0	1,2
10039	5,0	1,4
10041	1,9	1,1
10057	4,5	1,3
10069	5,0	1,3
10073	3,9	1,3
Mg 1	2,6	1,2
Mg 2	4,9	1,3
Mg 3	4,2	1,2
Mg 4	3,5	1,3
Mg 5	4,5	1,1
Mg 6	5,0	1,4
Mg 7	3,4	1,3
Mg11	3,7	1,2
Mg13	3,0	1,1
Mg14	3,0	1,2
Mg15	4,3	1,3
Mg16	3,4	1,2
Mg21	4,9	1,4
Mg 22	2,9	1,1
Mg 25	4,2	1,3
Mg 26	4,5	1,4
98D	3,9	1,3
53 MC	1,7	1,0
71 MC	1,7	1,0
82 MC	4,7	1,0
95 MC	4,7	1,0
97 MC	1,0	1,0
107 MC	3,1	1,0
108 MC	2,9	1,0

Continuação Tabela 4

Enzimas hidrolíticas		
Isolado	Atividade de protease (PZ)	Atividade de fosfolipase (PZ)
154 MC	3,1	1,0
32D	1,9	1,2
112 MC	2,1	1,5
48 MC	5,4	1,0
103 MC	1,7	1,0
31 D	2,5	1,0
57 D	2,3	1,0
72D	2,7	1,0
79 D	2,5	1,0
Mg 9	4,3	1,3
Mg 12	4,9	1,0
80 D	2,5	1,0
45 D	3,7	1,0

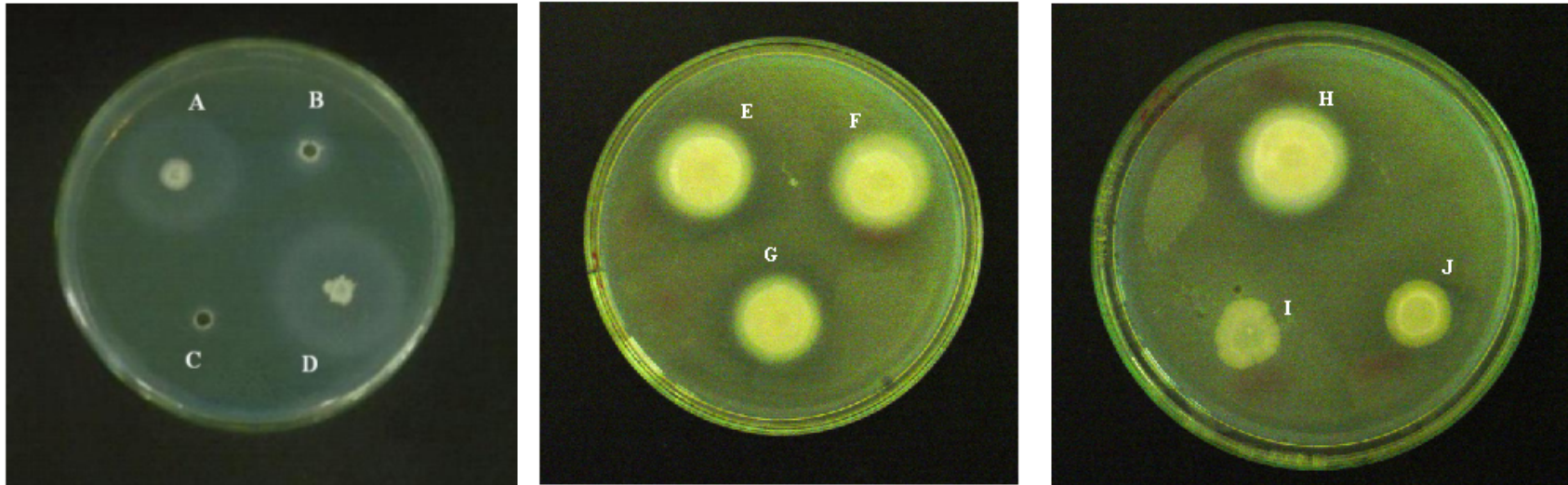


Figura 4: Atividade proteolítica e de fosfolipase em placa de amostras clínicas de *C. albicans*. A, B, e D – atividade proteolítica detectada, C – atividade proteolítica não detectada, E, F, G, H – atividade de fosfolipase detectada, I e J - atividade de fosfolipase não detectada.

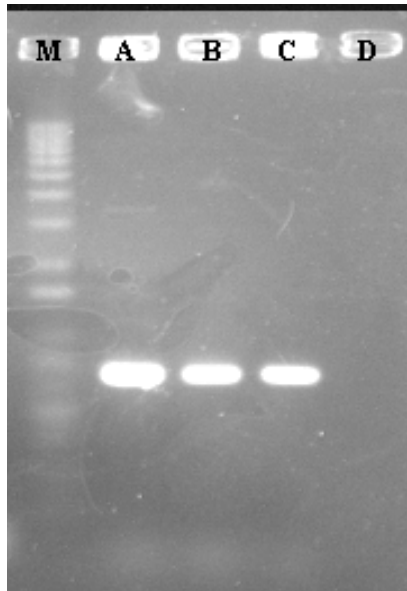


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus. A (MG6), B (78D), C (ATCC 10231): Produto de amplificação do gene da fosfolipase B (*PLB 1* – PCR) utilizando os oligonucleotídeos PLBF e PLBR D: branco. Os oligonucleotídeos do gene *PLB 1* são específicos de *C. albicans*.

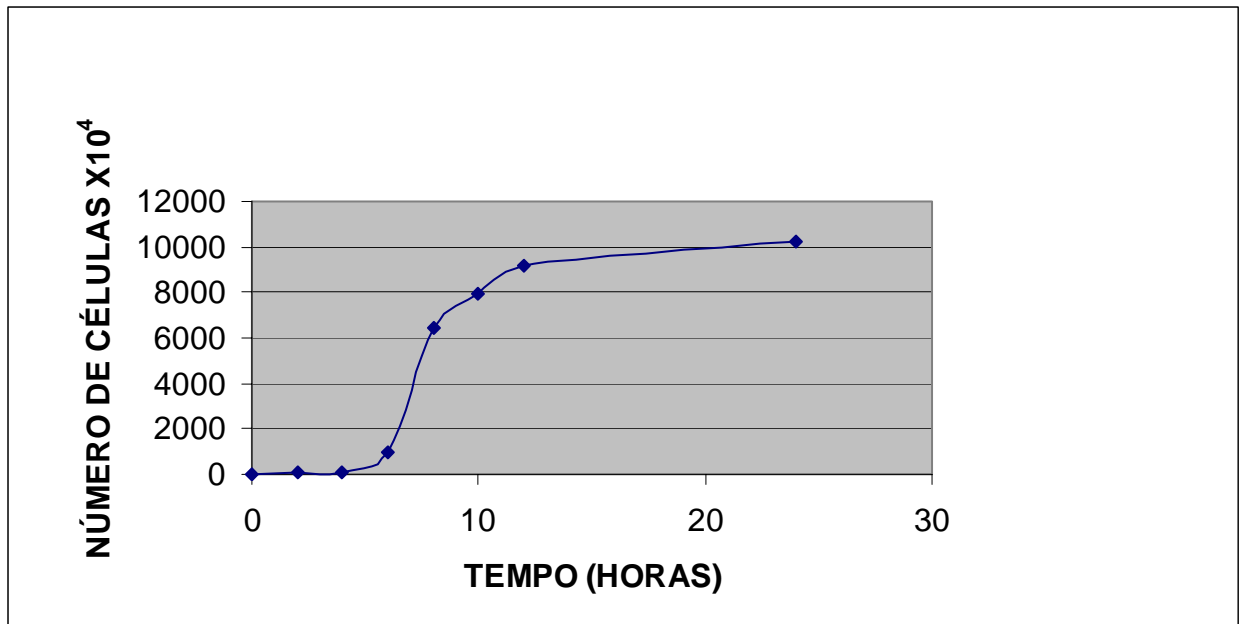


Figura 6: Cinética de Crescimento da amostra MG 06.

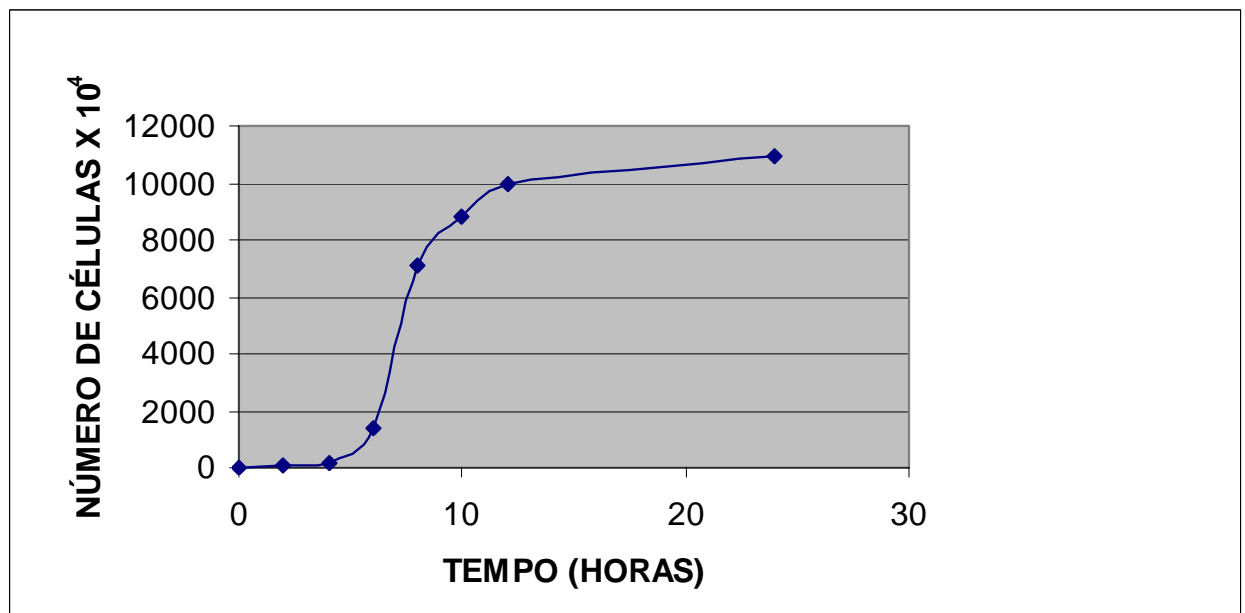


Figura 7: Cinética de Crescimento da amostra 78 D.

- As amostras MG 06 e 78 D apresentaram perfil de crescimento semelhante, atingindo a fase log aproximadamente entre 8-14 horas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, S.A.; KHAN, U.Z. (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. J. Clin. Microbiol., 40: 2483-2489.
- ALVES H. S., MILAN E. P., LAET SANTANA L.O.O.P., SANTURIO J. M., COLOMBO L. A (2002). Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. Diag. Microbiol and Infect. Dis. 43: 85–86.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (1999). Short protocols in molecular biology (4th ed.). New York: John Wiley and Sons.
- GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; HOUSTON, A. K.; JOLY, S., SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C., SOLL, D. R. (1999). Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and VitekYBC systems. J. Clin. Microbiol., 37(12), 3804–3808.
- HORVATH L. L.; HOSPENTHAL D. R.; MURRAY C. K.; DOOLEY D. P. (2003). Direct Isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic Medium CHROMagar Candida. J. Clin. Microbiol, 41: 2629–2632 .
- KREGER VAN RIJ, N.J.W. (1984). The Yeast: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, 1082.
- MILDE K.; KOSTKAA V.; KALETAA E.F.; WILLEMS H.; C. JAGER C. (2000). Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). Vet. Microbiol., 76: 395-402.
- MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. (2003). Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental conditions. Microbiol., 149: 261-267.

PONTECORVO G., ROPER J.A., HEMMONS L.M., McDONALD K.D., BUFTON, W.F.C.

(1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv.Genet., 5:141-238.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M.(1982) A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia: 20:233-244.

SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MACFARLANE, T.W. (1984). Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. Sabouraudia,22:7-14.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3th Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.

ANEXO

ARTIGO**Extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* from vaginal isolate is not requisite in the suppression of LPS-induced nitric oxide production in J774 cells**

Rita de Cássia Pontello Rampazzo ^a, Phileno Pinge Filho ^b, Érika Izumi ^a, Fernando César Bizerra ^a, Luciana Furlaneto ^c, Luiz Vicente Rizzo ^{d,e,f}, Márcia Cristina Furlaneto ^a, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski ^g and Sueli Fumie Yamada-Ogatta ^{a,*}.

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina,

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Pr, Brasil

^c Departamento de Farmácia, Universidade Norte do Paraná, Londrina – Pr, Brasil

^d Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil

^e Fundação Zerbini, São Paulo – SP, Brasil

^f Divisão de Alergia e Imunologia Clínica, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil

^g Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Pr, Brasil

* Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788.

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

Abstract

Candida albicans is a major opportunistic fungal pathogen in human and animals, and macrophages are important for the defence against disseminated candidiasis. Although phospholipases have been considered a putative virulence factor of *Candida albicans*, very little is known about the role of these enzymes in candidal vaginitis. We investigated the participation of phospholipases in the release of nitric oxide by J774 macrophages stimulated with LPS previously incubate in the presence or absence of two vaginal isolates of *C. albicans* from symptomatic (MG6) and asymptomatic (78D) women. Phospholipase activity in egg-yolk agar was detected to MG6 isolate only, albeit in both isolates a 750 bp fragment corresponding 5' half PLB 1gene was detected in both isolates. Our results suggest that *C. albicans* suppresses NO production in the absent of phospholipase, and this could allow to *C. albicans* evades the host defense systems to resist macrophage fungicidal activity.

Keywords: *Candida albicans*; phospholipase; vulvovaginal candidiasis; macrophages; nitric oxide

Extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* from vaginal isolate is not requisite in the suppression of LPS-induced nitric oxide production in J774 cells

1. Introduction

Candida albicans and related species are endogenous commensals of the gastrointestinal and reproductive tracts in healthy individuals. However as opportunistic pathogens, they can cause diseases ranging from mucosal candidiasis to life threatening disseminated infections, mainly, in immunocompromised hosts [1]. Different traits of *C. albicans* have been considered putative factors of virulence and infection development: adherence to host tissues, yeast-hyphal reversible transition (morphogenesis) and phenotypic switching [2]. In addition, these microorganism secretes proteinases [3] and phospholipases [4] that contribute to fungal pathogenicity.

The hydrolytic activity of phospholipases yields fatty acid and lysophospholipids from membrane phospholipids leading to cell lysis and host damage [4]. Indeed, several evidences correlate phospholipases and virulence of the fungi [5-8] and other microorganisms [9].

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common problem in women of childbearing age and it is estimated that 75% of all women will experience, at least, an episode in their lifetime. In addition, approximately 5% of cases will develop a recurrent VVC, which is defined by three or more episodes during a year [10].

Local *Candida*-specific immunity has been considered important for protection against vaginal candidiasis [11-13], however, the specific immunoprotective factor has not been identified. The roles of cell-mediated and humoral immunity against VVC are uncertain [13,14]. Several studies have been focused on innate immunity in controlling the response to *Candida* infection. Accordingly, vaginal epithelial cells from mice [15, 16], macaques [17] and human [18] can inhibit the growth of *C. albicans in vitro*.

Macrophages are phagocytic cells of the innate immune system and play an important role as a primary line of host defense against microbial infections [19]. These cells, from diferent mammalian species and anatomical sites, have the ability to ingest *C.*

albicans however only the yeast forms are killed intracellularly [20]. Additionally, several macrophage secretory products are generated in response of microbial attack [21].

Nitric oxide (NO), which is synthesized from L-arginine by an inducible and calcium-independent NO synthase [22,23], is one important effector of macrophage antimicrobial activity against various pathogens [24,25]. Although *C. albicans* are susceptible to killing by NO [26,27], these organisms are also able to evade from deleterious effect of this reactive molecule [28,29] and *CaYHB1*, a NO-scavenging flavohemoglobin gene, plays an important role in this process [30].

Although several exogenous factors predispose to acute VVC, including pregnancy, high-dose oral estrogen contraception, hormone replacement therapy, as well as antibiotic usage and uncontrolled *diabetes mellitus* [10], the underlying innate or acquired immune defects associated with disease are uncertain. Recently, based in an intravaginal live *Candida* challenge carried out in healthy adult women, it has been suggested that symptomatic VVC is associated an aggressive innate response mediated by PMNs [31].

The function of macrophages during vaginal candidiasis remains unknown [13], then, the purpose of this study was to investigate the ability of vaginal isolates of *C. albicans* to stimulate J774 cells, a murine macrophage cell line, and the relationship between phospholipase activity and NO production.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The reagents used in this study were obtained from following companies. Sigma Chemical Co (St Louis, USA): chloramphenicol, lipopolisacharide (LPS - O111;B4) from *Escherichia coli*, Tween 80, nystatin, L-glutamine, palmitoyl carnitine, agarose, all components of Griess reagent, ethidium bromide. Invitrogen-Gibco (Grand Island, N.Y, USA): *Taq* DNA polimerase, dNTPs, sodium bicarbonate, oligonucleotide primers, boric acid, EDTA, Tris base. Pfizer Central Research, United Kingdom: fluconazole.

2.2. Organisms and species identification

Candida albicans MG6 and 78D were isolated from vagina of two sexually active reproductive age and healthy women. None of them had a history of *diabetes mellitus* or other

endocrinopathies. During the specimen collection, both are not in use of antibiotics and immunosuppressive medication. MG6 strain was isolated from a symptomatic patient with VVC (presenting vaginal discharge, vulvovaginal itching and dysuria in a single occurrence in the past of one year) whereas 78D strain was isolated from an asymptomatic woman. Samples of secretions from the vagina were obtained by scraping the vaginal walls with a sterile cotton swab and inoculated on Sabouraud agar medium (Difco, New Jersey, USA) supplemented with $50\mu\text{g mL}^{-1}$ of chloramphenicol. The cultures were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24-96 hours under aerobic conditions. Both isolates were also cultured on CHROMagar Candida® medium (Probac, São Paulo, Brasil) for differential growth analysis. The identity of each isolated yeast was confirmed by standard mycological methodology ([32,33] such as, germ-test tube, production of chlamydoconidia on cornmeal agar with 0.5 % Tween 80 and sugar assimilation and fermentation. In addition, two PCR-based method for species identification was performed using specific primers directed against 3' end of 5.8S and 5' end of 28S rDNA region, as described by [34] and *chs1* (chitin synthetase 1 gene) as decribed by [35]. Genomic DNA extraction was performed according to Jain and colleagues [36].

2.3. ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING

The minimum inhibitory concentrations of fluconazole and nystatin for all isolates were determined by broth microdilution assays for yeasts according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A standard [37](NCCLS, 1997). Quality control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) was included in each experiment. Two wells of each plate served as growth and sterile controls.

2.4. Determination of extracellular phospholipase activity by egg yolk agar

Both isolates were tested for their ability to grow and produce a clear zone of hydrolysis in minimal medium agar (MM) [38] supplemented with 4% egg yolk, $350\text{ }\mu\text{M}$ NaCl, $6.5\text{ }\mu\text{M}$ CaCl_2 , pH 4.5. Previously, one egg yolk was mixed in sterile distilled water (w/v) and centrifuged at 500 g for 10 minutes, after the supernatant was added in sterilized MM at determined concentration. A $10\text{ }\mu\text{l}$ suspension of 10^6 yeast cells were inoculated on the surface of the medium and the cultures were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 96 h, after which the diameter of the precipitation zone around the colony was determined. Each isolate was tested in replicates of three and the experiment was carried out on three different occasions.

2.5. PCR AMPLIFICATION OF THE *PLB1*-SPECIFIC REGION

Genomic DNA isolated from *C. albicans* cells was used to PCR amplification with oligonucleotide primers directed against a 751 bp region representing the 5' half of the *PBL1* gene. The oligonucleotide primers used were 5' ATGATTTTGCATCATTTG 3' (forward) and 5' AGTATCTGGAGCTCTACC 3' (reverse), as described previously [39]. The PCR products amplification were analysed on 1.2 % agarose gels stained with ethidium bromide.

2.6. Treatment of *Candida albicans* with palmitoyl carnitine (phospholipase inhibitor)

C. albicans isolates were cultivated at 30 °C on Sabouraud broth for 18 h. After growth, 1×10^8 yeast cells were incubated for 2 h at 37 °C in absence and presence of the 25, 50 and 100 µM palmitoyl carnitine. Following, yeast cells were harvested by centrifugation 8000 g for 15 min and washed in sterile 10 mM phosphate buffer pH 7.2.

2.7. Macrophage cultures

The murine macrophage cell line J774 G8 [40] was cultured in RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab São Paulo, Br.), 2 mM L-glutamine, 36 mM sodium bicarbonate and 5% CO₂ at 37 °C. At confluence non-adherent cells were removed and adherent cells were harvested by gentle scraping with a rubber policeman, washed three times and cells counted. The cells were inoculated into 96-well culture plate (Linbro, ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio) at a density of 2×10^5 cells/well and incubated for 18 h. The medium was removed and replaced with fresh culture medium in absence of fetal bovine serum and *Candida albicans* cells were inoculated at one yeast to macrophage ratio of 1:32. The plate was incubated for 2 h at 37 °C, after which 0.1 µM/well LPS were added. Following growth for 24 h at 37 °C in 5% CO₂, culture supernatants were collected and assayed for NO.

2.7. Nitric oxide assay

Nitric oxide production was indirectly determined by measuring nitrite (NO₂⁻) accumulating in the cultures using the method according to Stuehr and Nathan [41]. Briefly, 50 µL of supernatant were mixed with an equal volume of Griess reagent (0.5% sulphanilamide and 0.05% N-1-naphthylethelene-diamide hydrochloride in 2.5% phosphoric

acid) and incubated at room temperature for 10 minutes. The absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (Multiskan EX, LabSystems, Minnesota USA). The concentration of nitrite was estimated by a standard curve prepared with sodium nitrite.

2.8. Statistical analysis

All values in the figures and text are expressed as mean \pm s.d. of n observations. A one way analysis of variance (ANOVA) followed, if appropriated, by a Bonferroni's test for multiple comparisons was used to compared means between the groups. A P value less than 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

Candida albicans is the most prevalent fungal species isolated from vaginal samples of symptomatic and asymptomatic women in childbearing age [10, 42-44]. Vaginal candidiasis is rare before menarche and after menopause [10] and low incidence of disease in presence of high levels of asymptomatic vaginal colonisation has been showed in adolescent [45]. Probably, there is a strong resistance to vaginal infections in these populations but what protective mechanism is involved remains unclear.

In this study, we investigate the participation of phospholipases in the release of nitric oxide by macrophages stimulated with LPS previously incubate in the presence or absence of two vaginal isolates of *C. albicans*. Accordingly, we first evaluated a total of 57 women (14 – 66 years old) without any previous underlying disease associated with immunodeficiency, including AIDS attending at gynecology healthy service. Green colonies on CHROMagar growth were further identified on basis of their morphological and biochemical properties and 36 isolates (63,1%) were identified as *C. albicans*. These isolates were confirmed with two PCR-based method using specific primers directed against ITS2 region of rDNA and *chs1*. In addition, we screening the ability of the isolates to grow and secrete hydrolytic enzymes such as proteinases and phospholipases (data not shown). Then we choose MG6 and 78D isolates based on their differential phospholipase activity and patient source. We investigated the susceptibility of both isolates to fluconazole and nystatin, which is recommended for treatment of VVC [46]. The minimal inhibition concentration (MIC) of nystatin was $4\mu\text{g ml}^{-1}$ for both isolates. Curiously, both isolates were resistant to fluconazole (MIC $> 64\mu\text{g ml}^{-1}$). In general, vaginal isolates of *Candida albicans* are susceptible to fluconazole [42,47] but resistant isolates had been showed also in asymptomatic colonised women [43,44].

Phospholipase activity of *C. albicans* can be detected in agar plate method using different substrates [6,48,49]. We used a fungal minimal medium [38] supplemented with egg-yolk for assaying phospholipase activity. The activity was determined by visual measuring the clear zone of precipitation around the colony without any revelation step. Additionally, as MM is a chemically defined medium it is possible to analyse the real role of specific substrate into enzymatic activity. Differential phospholipase activity was achieved in both isolates. Whereas MG6 isolate was able to hydrolase egg-yolk substrate, none degradation zone around the colony were visualized. The Table 1 resumes *C. albicans* characteristics investigated.

Phospholipases are a heterogeneous group of proteins, which contribute for many biological events including phospholipid turnover, and signal transduction in eukariotics cells. All types of phospholipase (A, B, C and D) have been reported in *C. albicans* [4] but only phospholipase B, which have hydrolase and lysophospholipase–transacylase activities, has been detected extracellularly [7,50]. The hydrolytic activity of phospholipases yields many metabolic intermediates. These products can act as second messengers or can further metabolized as precursors in the production of specific proinflammatory lipid mediators such as prostaglandins and leukotrienes [4, 51]. According, phospholipase activity of *C. albicans* MG6 can be associated with the host inflammatory response in addition to causing direct tissue damage, supporting the role of phospholipase as *C. albicans* virulence factor.

The comensalism and infection development transition is determined by the balance between microbial ability to damage host tissue at opposite host resistance mechanisms. Then, expression of virulence factors of these organisms should occur during infection only [52]. Supporting this, differential expression of *C. albicans* phospholipase B under several environmental and physiological conditions was showed by Mukherjee and colegues [39]. So, we carried out a polimerase chain reaction using oligonucleotide primers targeting the *PLBI* gene from genomic DNA. In both isolates we detected a correpondent fragment (Fig. 1) but more investigations are need to indicate differential gene expression during comensal and pathogenic conditions.

The relationship between nitric oxide and macrophages functions has been well documented. Expression of iNOS macrophages is modulated by cytokines and microbial products [23].

Studies with mice showed higher production of NO by activated peritoneal macrophage cells from *C. albicans* infected than controls animals [26,27] supporting an NO-dependent antimicrobial activity of macrophages. In our case, no significant increased

of NO production was observed by non-activated macrophages coincubated with vaginal isolates of *C. albicans*.

Since the activation of macrophages is critical for stimulation of candidacidal activity, we use LPS as inducer because of its ability to trigger various host cells, including mononuclear phagocytes [53]. Again, similar production of nitrite was observed for MG6 isolate compared to cells cultured with medium only ($11.7 \pm 0.01 \mu\text{M}$ of nitrite (NO_2^-) vs $7.3 \pm 0.01 \mu\text{M}$ nitrite (NO_2^-); $p < 0,001$, Figure 2). Surprisingly, when J774 cells (2×10^5 cells/well) were infected with 78D isolate (6,250 cells/ml, 1:32) suppressed the production of NO by LPS-stimulated cells. After 24 h, the supernatant of uninfected control cells contained $13,7 \pm 0.02 \mu\text{M}$ of NO_2^- whereas the concentration of NO_2^- in supernatant of 78D-infected culture cells was $7,3 \pm 0,01 \mu\text{M}$, which corresponds to a suppression of ~50%. This suppression was dose-dependent (data not shown).

The reduction of macrophage NO production by *C. albicans* 78D did not seem to be due to cytolytic effect on the cells, because the number of viable macrophages, estimated by trypan blue exclusion method, was not significantly different 24 h after initiation of the cultures with or without *C. albicans* from vaginal isolates (data not shown).

The suppression of activated macrophages NO production by *C. albicans* have been reported [28,29] and these process was mediated by soluble molecules derived from live pathogen [28] and hyphal formation of *C. albicans* and direct interaction with host cells was required for maximum inhibition of NO production by peritoneal macrophages [29].

In order to analyse the role of phospholipase on these process, we incubated *C. albicans* with the inhibitor palmitoyl carnitine in different concentrations. In this case, an important discovery of our study was that the *C. albicans* MG6 isolate (positive to phospholipase activity, Table 1) when treated with palmitoyl carnitine was also capable to reduce NO production by activated macrophages, suggesting that *C. albicans* NO suppression occur in the absent of phospholipase, a virulence factor of *C. albicans* (Figure 3). By the other hand, when phospholipase activity is present, intermediate lipid metabolites, such as phosphatidic acid can induce the production of NO by activated macrophages as showed by Lim and colleagues [53]. So, a balance between suppression and production of NO can be occurring for MG6 isolate coincubated with activated macrophages.

In view of our results we hypothesize a picture around vaginal isolate of *C. albicans*. In some way, during comensalism the microorganism suppresses the host production of NO as observed for 78D isolate which is from an asymptomatic colonised woman. Then the virulence factor gene, such as phospholipase is expressed during the infection and

contributes to the inflammatory process associated with symptomatic vulvovaginal candidiasis by generating proinflammatory mediators and nitric oxide. The pathogen can be using the host protective mechanism to promote an aggressive innate response like proposed by Fidel and colleagues [31]. In their study, it was observed a heavy vaginal cellular infiltrate, mainly of PMNs, during symptomatic VVC. Whereas those women asymptotically colonized, no evidence of an inflammatory response was detected. According to them, *Candida*-vaginal epithelial cells interactions can release signals that modulate the inflammatory leucocytic response associated with clinical symptoms.

The results of the present study corroborate the observations of other researches [6] demonstrating that extracellular phospholipases contribute to *C. albicans* virulence. In addition, this is the first evaluation, albeit *in vitro*, of NO-macrophages response to vaginal isolates of this yeast. We showed that vaginal isolates can decrease NO production by LPS-activated macrophages and this could allow to *C. albicans* evades the host defense systems to resist macrophage fungicidal activity. Further studies are important to understand the biological significance of this activity and an investigation about this is currently under way in our laboratory.

Acknowledgement

We thank Dr. Celso Vataru Nakamura from Departamento de Análises Clínicas of Universidade Estadual de Maringá (PR, Brasil) for donating J774G8 macrophage cell line. We also thank to Dr Albert Leyva for reading this manuscript.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

References

- [1] Soll, D.R. (2002) *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* 81, 101-110.
- [2] Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327-335.
- [3] Hube, B. and Naglik, J. (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147, 1997-2005.

- [4] Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 122-143.
- [5] Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G. and Ryley, J.F. (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeast. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1217-1221.
- [6] Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards Jr, J.E., Nozawa, Y. and Ghannoum, M.A. (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63, 1193-1198.
- [7] Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Ghannoum, M.A. (1998) Cloning and disruption of a *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273, 26078-26086.
- [8] Mukherjee, P.K., Seshan, K.R., Leidich, S.D., Chandra, J., Cole, G.T., and Ghannoum, M.A. (2001) Reintroduction of the *PBL1* gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology* 147, 2585-2597.
- [9] Schmiel, D.H. and Miller, V.L. (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection* 1, 1103-1112.
- [10] Sobel, J.D., Faro, S., Force, R.W., Foxman, B., Ledger, W.J., Nyirjesy, P.R., Reed, B.D. and Summers, P.R. (1998) Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178, 203-211.
- [11] De Bernardis, F., Santoni, G., Boccanera, M., Spreghini, E., Adriani, D., Morelli, L. and Cassone, A. (2000) Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 68, 3297-3304.
- [12] Fidel Jr, P.L. (2002) The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. *Int. Rev. Immunol.* 21, 515-548.

- [13] Fidel Jr, P.L. (2004) History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol.* 12, 220-227.
- [14] López-Ribot, J.; Casanova, M.; Murgui, A. and Martínez, J. P. (2004) Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 187-196.
- [15] Steele, C. H.; Ozenci, H.; Luo, W.; Scott, M. Fidel Jr, P. L. (1999) Growth inhibition of *Candida albicans* by vaginal cells from naive mice. *J. Med. Mycol.* 37, 251-260.
- [16] Nomanbhoy, F.; Steele, C.; Yano, J.; Fidel Jr, P. L. (2002) Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. *Infect. Immun.* 70(12), 7081-7088.
- [17] Steele, C. M.; Ratteree, Fidel Jr, P. L. (1999) Differential susceptibility to experimental vaginal candidiasis in macaques. *J. Infect. Dis.*, 180: 802-810.
- [18] Barousse, M. M.; Steele, C.; Dunlap, K.; Espinosa, T; Boikov, D.; Sobel, J. D. and Fidel Jr, P. L. (2001) Growth inhibition of *Candida albicans* by human epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 184(11) 1489-1483.
- [19] Lorenz, M. C .and Fink, G. R. (2002) Life and death in a macrophage: role of a glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell.* 1(5), 657-662.
- [20] Vásquez-Torres, A. and Balish , E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 170-192.
- [21] Nathan, C. F. (1987) Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79(2), 319-326.
- [22] Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB J.* 6 3051-3064.
- [23] MacMicking, J., Xie, Q. And Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.
- [24] Nathan, C. F. and Hibbs Jr, J. D. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3(1), 65-70.

- [25] Liew, F. Y.; Xu, D. and Chan, W. L. (1999) Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol. Lett.* 65(1-2), 101-104
- [26] Rementeria, A.; Garcia-Tobalina, R. and Sevilla, M. J. (1995) Nitric oxide-dependent killing of *Candida albicans* by murine peritoneal cells during an experimental infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 11,157-162.
- [27] Elahi, S., Pang, G., Ashman, R.B. and Clancy, R. (2001). Nitric oxide-enhanced to oral candidiasis. *Immunology.* 104, 447-454.
- [28] Chinen, T.; Qureshi, M. H.; Koguchi, Y. and Kawakami, K. (1999) *Candida albicans* supresses nitric oxide (NO) production by interferon γ (IFN γ) and lipopolysaccharide (LPS)- stimulated murine peritoneal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 491-497.
- [29] Schroppel, K.; Kryk, M.; Herrmann, M.; Leberer, E.; Rollinghoff, M. and Bogdan, C. (2001) Suppression of type 2 NO-synthase activity in macrophages by *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290(8), 659-668.
- [30] Ullmann, B. D.; Myers, W.; Chiranand, W.; Lazzell, A. L.; Zhao, Q.; Vega, L. A.; Lopez-Ribot, J. L.; Gardner, P. R. and Gustin, M. C. (2004) Inducible defense against oxide nitric in *Candida albicans*. *Eucaryotic Cell* 3 (3), 715-723.
- [31] Fidel Jr, P.L., Barousse, M., Espinosa, T., Ficarra, M., Sturtevant, J., Martin, D.H., Quayle, A.L. and Dunlap, K. (2004) An intravaginal live *Candida albicans* challenge in humans leads to new hyphoteses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infec. Immun.* 72, 2939-2946.
- [32] Larone, D.H. Medically important fungi. A guide to identification. Washington, AMS Press, 1995.
- [33] Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. *The Yeast. A taxonomic study*, 4^a ed., Amsterdam: Elsevier, 1998.

- [34] Ahmad, S.; Khan, Z.; Mustafa, S.A. and Khan, U.Z. (2002) Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2483-2489.
- [35] Milde K.; Kostkaa V.; Kaletaa E.F.; Willems H. C. and Jager C. (2000) Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). *Vet. Microbiol.* 76, 395-402.
- [36] Jain, P., Khan, Z.K., Bhattacharya, E. And Ranade, S.A. (2001) Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and – sensitive strains of *Candida albicans*. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* 41, 113-119.
- [37] National Committee For Clinical Laboratory Standards (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast. Approved standard M27-A. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- [38] Pontecorvo G.; Roper J.A.; Hemmons L.M.; McDonald K.D. and Bufton, W.F.C. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv.Genet.*, 5:141-238.
- [39] Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M. and Ghannoum, M.A. (2003) Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology.* 149, 261-267.
- [40] Tiunan, T.S., Ueda-Nakamura, T., Cortez, D.A.G., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W. and Nakamura, C.V. (2005) Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 176-183.
- [41] Sthuer, D. J. and Nathan, C. F. (1989) A macrophage product for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169, 1543-1555.
- [42] Ribeiro, M. A.; Dietze, R.; Paula, C. R.; Da Matta, D. A and Colombo, A. L. (2000) Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia* 151, 5-10.

- [43] Mathema, B.; Cross, E.; Dun, E.; Park, S.; Bedell J.; Slade B.; Willians, M.; Chaturvedi, L. and Perlin, D. S. (2001) Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-counter azole antifungals. *Clin. Infect. Dis.* 33(5), E23-E27.
- [44] Bauters, T. G. M.; Dhont, M. A. and Temmerman, M. I. L. (2002) Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazol in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187(3), 569-564.
- [45] Barousse, M. M.; Van Der Pol, B. J.; Fortenberry, D.; Orr, D. and Fidel Jr, P. R. (2004) Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sex. Transm. Infect.* 80: 48-53.
- [46] Sobel, J.D. (1999) Limitations of antifungal agents in the treatment of *Candida* vaginitis: future challenges. *Drug Resistance Updates* 2, 148-152.
- [47] Sobel, J.D., Zervos, M., Reed, B.D., Hooton, T., Soper, D., Nyirjesy, P., Heine, M.W., Willems, J. and Panzer, H. (2003) Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. *Antimicrobial Agents Chemother.* 47, 34-38.
- [48] Price, M.F.; Wilkinson, I.D. and Gentry, L.O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20, 14-20.
- [49] Samaranayake, L.P.; Raeside, J.M. and Macfarlane, T.W. (1984) Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia* 22, 7-14.
- [50] Mirbod, F.; Banno, Y.; Ghannoum, M.A.; Ibrahim, A.S.; Nakashima, S., Kitajima, Y.; Cole, G.T. and Nozawa, Y. (1995) Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1257, 181-188.

- [51] Noverr, M.C., Toews, G.B. and Huffnagle, G.B. (2002). Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect. Immun.* 70, 400-402.
- [52] Hube, B. (2004) From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Cur. Opin. Microbiol.* 7, 336-341.
- [53] Morrison, D.C. and Ryan, J.L. (1987) Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38, 417-432.
- [54] Lim, H.K., Choi, Y.A., Park, W., Lee, T., Ryu, S.H., Kim, S.Y., Kim, J.R., Kim, J.H. and Baek, S.H. (2003) Phosphatidic acid regulates systemic inflammatory responses by modulating the akt-mammalian target of rapamycin-p70 S6 kinase 1 pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 45117-45127.

Strain	Patient source	CHROMagar Candida® (colony)	Phospholipase activity	Protease activity	Fluconazole MIC ^b (µg mL ⁻¹)	Nystatin MIC ^b (µg mL ⁻¹)
MG6	syntomatic	green	positive	positive	≥ 64	4
78D	asyntomatic	green	negative ^a	positive	≥ 64	4

Table 1: Characteristics of vaginal isolates of *C. albicans*.

^a Negative: none clear zone of degradation around colony by activity in the egg yolk agar.

^b MIC: MINIMAL INHIBITION CONCENTRATION IN THE ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING.

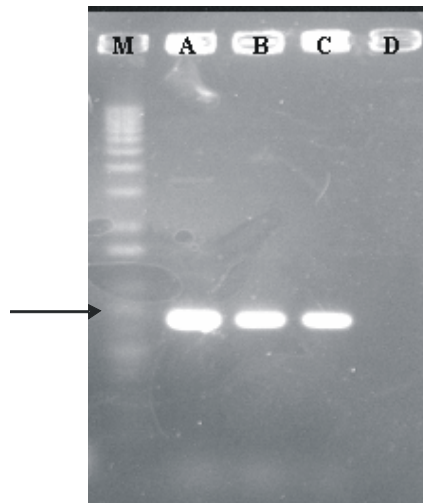


Figure 1- PCR amplification of genomic DNA with oligonucleotide primers against phospholipase B1 gene of *C. albicans*. Lanes: M, molecular weight, A, B, C, *C. albicans* isolates MG6, 78D, ATCC 10231, respectively. The arrow indicates 800 bp fragment.

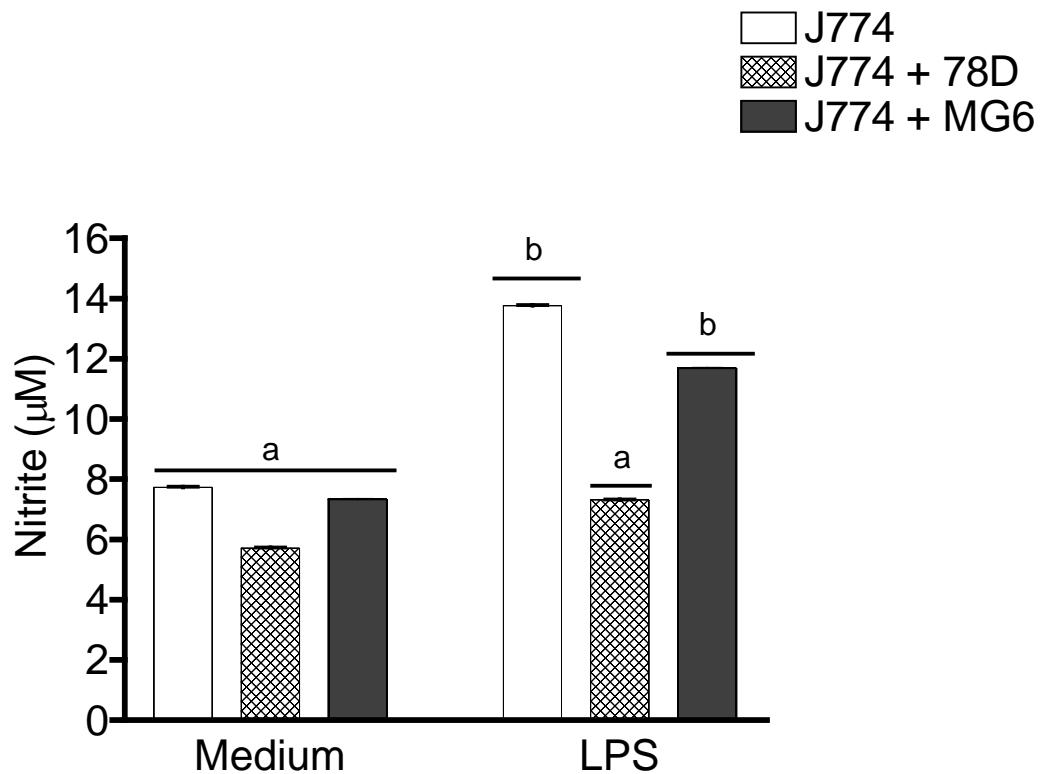


Figure 2- Inhibition of LPS-induced NO production (nitrite) by vaginal clinical isolates of *Candida albicans* with negative extracellular phospholipase activity. J774G8 cells (2×10^5 cells/well) were precultured with CA 78D (negative to extracellular phospholipase activity) or CA MG6 (positive to extracellular phospholipase activity), (6,250 cells; 1:32), for 2 h. After was added LPS (0,1µg/ml) and the cultures were maintained for 24 h in 5% CO₂ incubator, followed by measurement of nitrite in the culture supernatants. Each bar indicates the mean \pm s.d. of triplicate cultures. The experiments were repeated two times with similar results. Results were analysed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple compararisons test. Means not sharing a letter differ, * $P < 0.001$.

CA, *Candida albicans*.

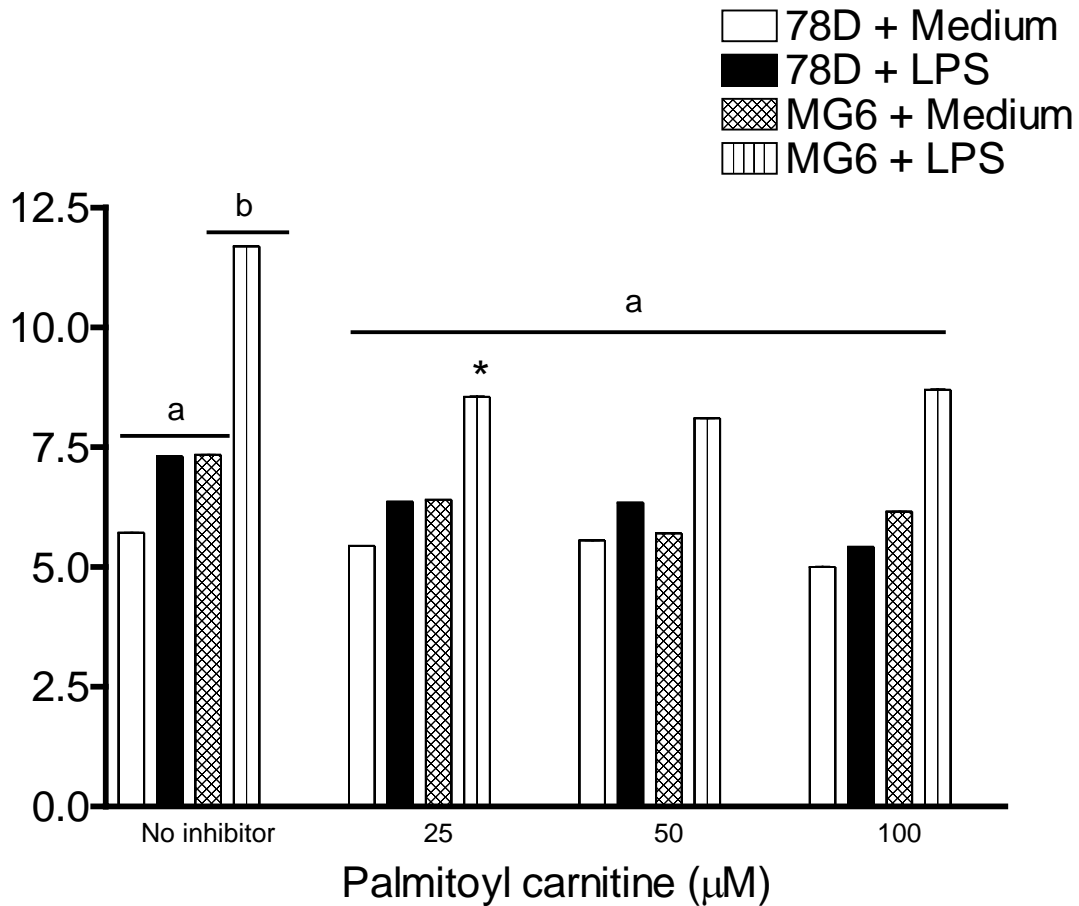


Figure 3 – Effects of palmitoyl carnitine on NO production (nitrite) by vaginal clinical isolates of *Candida albicans* with positive and negative extracellular phospholipase activity. CA 78D (negative to extracellular phospholipase activity) or CA MG6 (positive to extracellular phospholipase activity), were treated or not with palmitoyl carnitine, a phospholipase inhibitor for 2 h prior infection of the J774G8 cells and addition of LPS (0,1μg/ml) in the cultures. The cells cultures were maintained for 24 h in 5% CO₂ incubator, followed by measurement of nitrite in the culture supernatants. Each bar indicates the mean ± s.d. of triplicate cultures. Results were analysed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. Means not sharing a letter differ, * $P < 0.001$. CA, *Candida albicans*.