

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Ferramentas quimiométricas aplicadas à micologia: fatores que impactam na
inibição de espécies de *Candida*

ÂNDERSON RAMOS CARVALHO

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ferramentas quimiométricas aplicadas à micologia: fatores que impactam na
inibição de espécies de *Candidas*

Dissertação apresentada por **Ânderson
Ramos Carvalho** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão

PORTO ALEGRE, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.08.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Eduardo Luís Konrath

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. George González Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Anderson Ramos
Ferramentas quimiométricas aplicadas à micologia:
fatores que impactam na inibição de espécies de
Candidas / Anderson Ramos Carvalho. -- 2018.
119 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Marco Flôres Ferrão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. candida. 2. susceptibilidade. 3. temperatura. 4. pH. 5. quimiometria. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Ferrão, Marco Flôres, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica na Faculdade de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES.

Dedico esse trabalho a minha família,
em especial meus pais Flóri e Reiane,
à minha irmã Francieli, fontes de
amparo, carinho e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria e Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão, por possibilitarem a execução desse projeto, apostarem nas minhas ideias e propiciarem meu crescimento intelectual e pessoal. Ao Prof. Dr. George Gonzalez Ortega, por me motivar desde o início das ideias e desenvolver o pesquisador que existe em mim. Aos três professores que sempre me ensinaram a importância de ser crítico e tentar ver sempre por outro ponto de vista, independente da adversidade que fosse apresentada. E, principalmente, por mostrarem que orientar não é apenas cobrar resultados e sim desenvolver o material humano para os desafios que se seguirão;

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada pela parceria, dicas, conselhos e muito café que foi a realização desse Mestrado. Um agradecimento especial às colegas Bruna Batista e Magda Chaves por colaborarem positivamente com ideias ímpares. As grandes e intermináveis discussões e divagações da colega Luana Candice Genz Bazana, que permitiram um olhar sempre crucial na busca por melhorar o trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica, que sempre receberam de braços abertos esse colega que vos dirige a palavra mesmo que bastante distante do campus do Vale.

À Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela assistência e oportunidade;

À CAPES pelo auxílio e oportunidade;

A minha irmã, Franceli, que compreendeu a minha fase, as minhas dificuldades e o que é fazer um trabalho desse porte;

Aos meus pais, Flóri e Rejane, que me apoiaram e acreditaram na minha caminhada para realizar meu sonho.

RESUMO

As infecções ocasionadas pelas espécies do gênero *Candida* acometem anualmente milhares de indivíduos, principalmente, imunocomprometidos sendo considerados patógenos oportunistas, tornando-se um problema de saúde pública. Embora as diversas técnicas microbiológicas de cultura *in vitro* de fungos sejam bem desenvolvidas e padronizadas. Existem muitas variáveis que influenciam o crescimento destes microrganismos. Dessa forma, analisou-se a interferência da temperatura de incubação, adição de glicose e diferentes níveis de pH sobre leveduras do gênero *Candida*. Porquanto essas variáveis, não só influenciam no crescimento das leveduras como também suas mudanças fenotípicas, além disso, interferem na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos podendo modificar diretamente na terapia clínica. Para isso foram realizados testes das contribuições térmicas sobre diferentes espécies de *Candidas* em uma estufa de incubação sob temperatura controlada. A fim de que sejam respondidos quais os impactos acerca de diferentes pontos de incubação na estufa e suas modificações sobre o teste susceptibilidade por microdiluição. Outro panorama avaliado foi a comparação entre *checkerboard* e um desenho fatorial completo com as variáveis pH e glicose. Os resultados obtidos demonstraram significância estatística ($p < 0,01$) quanto à modificação de temperatura, quando diferentes posições são assumidas dentro da mesma estufa pelos termômetros. Assim, foram obtidos CIM díspares nessas mesmas posições registradas pelos termômetros. Outro achado mostra que a redução do pH (4) e adição de glicose (2%) ao meio de crescimento (RPMI 1640) tornam os isolados de *Candida* spp. menos suscetíveis ao fluconazol quando comparado as condições preconizadas pela metodologia padrão (CLSI). Adicionalmente, caracteres fenotípicos que não são levados em consideração no teste de susceptibilidade, parecem ser importantes para o estabelecimento de uma terapia clínica eficaz.

Palavras-chave: *Candida*, pH, temperatura, susceptibilidade, desenho experimental, concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

Chemometric tools applied to mycology: factors that impact the inhibition of *Candida* species

Infections caused by species of the genus *Candida* afflict thousands of individuals, mainly immunocompromised individuals, and are considered opportunistic pathogens, becoming a public health problem. Although the various microbiological techniques of in vitro culture of fungi are well developed and standardized. There are many variables that influence the growth of these microorganisms. In this way, the interference of incubation temperature, glucose addition and different pH levels on yeasts of the genus *Candida* was analyzed. Because these variables not only influence the growth of yeasts but also their phenotypic changes, in addition, they interfere in the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antifungals and can modify directly in the clinical therapy. For this, tests of the thermal contributions on different *Candida* species were carried out in incubator under controlled temperature. In order to answer the impacts on different incubation points in the incubator and their modifications on the microdilution susceptibility test. Another panorama evaluated was the comparison between checkerboard and a complete factorial design with the variables pH and glucose. The results obtained showed statistical significance ($p < 0.01$) for the temperature change, when different positions are assumed inside the same oven by the thermometers. Thus, different MICs were obtained in these same positions recorded by the thermometers. Another finding shows that the reduction of pH (4) and addition of glucose (2%) to the growth medium (RPMI 1640) make the *Candida* spp. less susceptible to fluconazole when compared to the conditions recommended by the standard methodology (CLSI). In addition, phenotypic characters that are not taken into account in the susceptibility test appear to be important for the establishment of effective clinical therapy. Key words: *Candida*, pH, temperature, susceptibility, experimental design, minimal inhibitory concentration.

Keywords: *Candida* spp., pH, temperature, susceptibility, experimental design, minimal inhibitory concentration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) observadas para as diferentes espécies nas posições encontradas colocadas em valores de média e desvios padrões da quadruplicata testada. 58

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) observados através do uso do corante vital resazurina, nas mesmas condições que as da leitura subjetiva... 60

Tabela S1. Resultados do modelo de prateleiras..... 71

Tabela 3. Desenho experimental da susceptibilidade, 2^3 com 3 pontos centrais realizado mostrando os níveis e fatores envolvidos no desenho. 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura filogenética das espécies de <i>Candida</i> , adaptado de MCMANUS; COLEMAN, 2014.	33
Figura 2. Crescimento de <i>C. albicans</i> em meio Ágar Sabouraud, mostrando suas características, isolados esféricos de cor branca a creme.....	34
Figura 3. (I) Desenho de captação dos dados de temperatura, cada número sinaliza a localização de um sensor. Em (II), as letras representam os pontos monitorados na prateleira variou-se a altura dentro da estufa nos 4 diferentes níveis, representados pelas flechas brancas.....	53
Figura 4. Média aritmética e respectivos desvios padrões (n=9) representando a o valor da temperatura medida com a temperatura colocada no painel da estufa.	56
Figura 5. Distribuição da temperatura ao longo da prateleira 2 nos diferentes sensores analisados.....	57
Figura S1. Distribuição de probabilidade das temperaturas de acordo com a sua localização na estufa segundo o modelo de triplicatas.....	72
Figura 6. Desenho esquemático de preparo do ensaio de checkerboard.	83
Figura 7. HCA dos poços da microplaca a partir do fatorial, a cor azul corresponde aos testes pareados (com pH 7), a cor vermelha os testes ímpares (com pH 4) e a cor verde os pontos centrais (com pH 5,5).	90
Figura 8. PCA dos poços da microplaca que do desenho fatorial, a cor azul corresponde aos testes pareados (com pH 7), a cor vermelha os testes ímpares (com pH 4) e a cor verde os pontos centrais (com pH 5,5).	91
Figura 9. PCA dos dados do fatorial sem os pontos centrais subdivididos em cores sendo as células viáveis (rosa) e não viáveis (azul).	92
Figura S2. Delineamento experimental após 24h com a adição de resazurina no tempo zero para os diferentes experimentos (colunas) e espécies (linhas duplicadas). A última coluna representa os controles estéreis sem resazurina.	98

Figura S3. Ensaio de *checkerboard* com corante de resazurina em pH 5,5 para a leitura da concentração inibitória mínima (CIM) de *Candida albicans*. 98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA AO TEMA.....	21
OBJETIVOS.....	27
REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
Artigo1. Qual o impacto do posicionamento de microplacas em uma estufa de incubação sobre a concentração inibitória mínima de antifúngicos?.....	45
Artigo 2. Método de otimização utilizando planejamento fatorial para determinação de concentração inibitória mínima utilizando os fatores pH, glicose e concentrações de fluconazol em espécies de <i>Candida</i> patogênicas e seu comparativo ao ensaio de checkerboard.....	73
DISCUSSÃO GERAL.....	99
CONCLUSÃO GERAL.....	105
PERSPECTIVAS.....	109
REFERÊNCIAS.....	111

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA AO TEMA

As infecções fúngicas tem ganhado papel de destaque, devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, sendo assim suscetíveis a infecções causadas por agentes oportunistas. (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Essas infecções são amplamente relacionadas a altas taxas de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes idosos, transplantados e neonatos (RAMOS-MARTÍNEZ *et al.*, 2017). Apesar de *Candida albicans* ser a espécie mais comumente isolada em candidíases, infecções ocasionadas por espécies emergentes de *Candidas* não-*albicans* (CNA) tem aumentado nas últimas décadas (PFALLER *et al.*, 2010). Este cenário torna-se ainda mais preocupante, pois algumas destas CNA mostram-se menos suscetíveis ou intrinsecamente resistentes aos antifúngicos em uso, não havendo a resposta efetiva esperada ao tratamento farmacológico (DOI *et al.*, 2016). Entre essas espécies emergentes encontramos quase metade dos casos de candidemia (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*). O aumento da notificação de CNA em diferentes infecções por *Candida* está relacionado com o fato de os métodos de identificação mais aprimorados terem uma maior difusão. Entre essas metodologias temos a biologia molecular, MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*) e outros kits de identificação mais acessíveis que possibilitam identificações mais precisas.

Entre as variáveis para o desenvolvimento destes microrganismos temos a temperatura, que se mostra uma condição essencial para o crescimento fúngico (LEMONS-CAROLINO; MADEIRA-LOPES 1984). Diante dessa característica, cresce a importância de uma padronização visando à confiabilidade nos testes que seguem após o isolamento e identificação, como por exemplo, o teste de susceptibilidade que é vital para conhecer a terapia a ser indicada. (BADIEE *et al.*, 2017). Além disso, comportamentos difusos determinados por parcelas térmicas adversas são alvo (JOHNSON *et al.*, 1978). A partir da construção de curvas de crescimento, é possível observar a influência de diferentes temperaturas no desenvolvimento celular em diversas espécies, porém, poucos são os estudos desta influência sobre os testes de susceptibilidade microbiana.

Outro parâmetro importante para o crescimento e diferenciação das leveduras é o pH, que governa as alterações entre as condições dimórficas desses microrganismos. Essa mudança altera sua patogenicidade e perfis de virulência, essenciais ao entendimento do fenótipo dos isolados de relevância clínica, visto que quando colonizando o homem esses microrganismos são expostos aos mais diferentes valores de pH. As cândidas possuem a capacidade de se adaptar às diferentes modificações nos nichos de crescimento, levando assim a comportamentos e respostas diversas frente a esses nichos díspares de infecções (DAVIS, 2009).

A adição de glicose ao meio de cultura mostra um clássico evento de modificação e interação das cândidas, uma vez que a assimilação de carbono modula a sua taxa de crescimento. Já foi demonstrado que a suplementação de glicose no meio de crescimento RPMI tem efeito aditivo, visto que diminui o tempo para leitura e maximiza o crescimento do inóculo (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2001).

Dentro de diversas estratégias de experimentação podemos ter como objetivos a determinação de que variáveis (x) influenciam mais a nossa resposta experimental (y). Sob essa óptica o experimentalista busca estabelecer que níveis das variáveis impactam mais consideravelmente sobre a resposta registrada experimentalmente. Nas várias estratégias de experimentação contamos com: um fator por vez, onde se modifica apenas uma variável, mantendo-se as demais fixadas, contudo essa alternativa não leva em conta as interações entre as variáveis. E para superar a adversidade anterior, se utiliza os desenhos fatoriais que variam conjuntamente, ao invés de separadamente, essa possibilidade cria a alternativa de exploração estatística dos dados obtidos que a outra metodologia não permite (BRERENTON, 2013). Além disso, a utilização de ferramentas quimiométricas, exploratórias principalmente, permite uma redução da dimensionalidade dos dados, permitindo explorar de maneira mais concisa as variáveis apresentadas frente aos resultados registrados.

O presente trabalho se insere em tópicos negligenciados acerca das características de crescimentos de diferentes espécies de *Candida* e sua

susceptibilidade *in vitro*. E como esses fatores modificam as respostas de inibição frente a antifúngicos e que relevâncias clínicas se busca com tais medidas e, além disso, mostra a importância da validação de equipamentos e de meios de cultura a fim de buscar maior reprodutibilidade e resultados mais fidedignos.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Caracterização de variáveis importantes ao crescimento e para a inibição de espécies de *Candida* empregando técnicas quimiométricas.

Objetivos Específicos

- i) Investigar como a temperatura impacta no crescimento fúngico e como esse parâmetro altera a inibição fúngica nos testes de susceptibilidade;
- ii) Mostrar, a partir dos dados obtidos, a importância da validação de estufas de incubação para ensaios de susceptibilidade;
- iii) Qualificar como a utilização de corante vital modifica a capacidade interpretativa da inibição de espécies de *Candida* pelo uso de fluconazol;
- iv) Analisar como alterações de pH e glicose impactam sobre a susceptibilidade de espécies de *Candida*, através do uso de desenhos experimentais quando comparados ao *checkerboard*;
- v) Averiguar a possibilidade da criação de uma ferramenta a partir do uso de desenhos experimentais para ensaios de susceptibilidade;
- vi) Estudo da utilização de imagens aliadas a quimiometria como instrumento de análise de ensaios de inibição de espécies de *Candida* spp.

REFERENCIAL TEÓRICO

Candidas

O número total de organismos eucarióticos no planeta Terra foi recentemente estimado em quase 9 milhões de espécies, com os fungos perfazendo cerca de 7% dessa população (MORA *et al.*, 2011). As *Candidas* pertencentes ao Reino Fungi, divisão Ascomycetos e a classe dos Saccharomycetes, atualmente compreendendo mais de 350 espécies. A classe compreende as leveduras que se reproduzem por brotamento. As espécies dessa classe possuem uma distribuição cosmopolita e estão presentes em uma ampla gama de ambientes, especialmente onde possam obter carboidratos disponíveis (DIEZMANN *et al.*, 2004).

Recentemente, estudos filogenéticos têm alterado os clados de diferentes espécies de *Candida* de acordo com seu brotamento (Figura 1) (MCMANUS; COLEMAN, 2014).

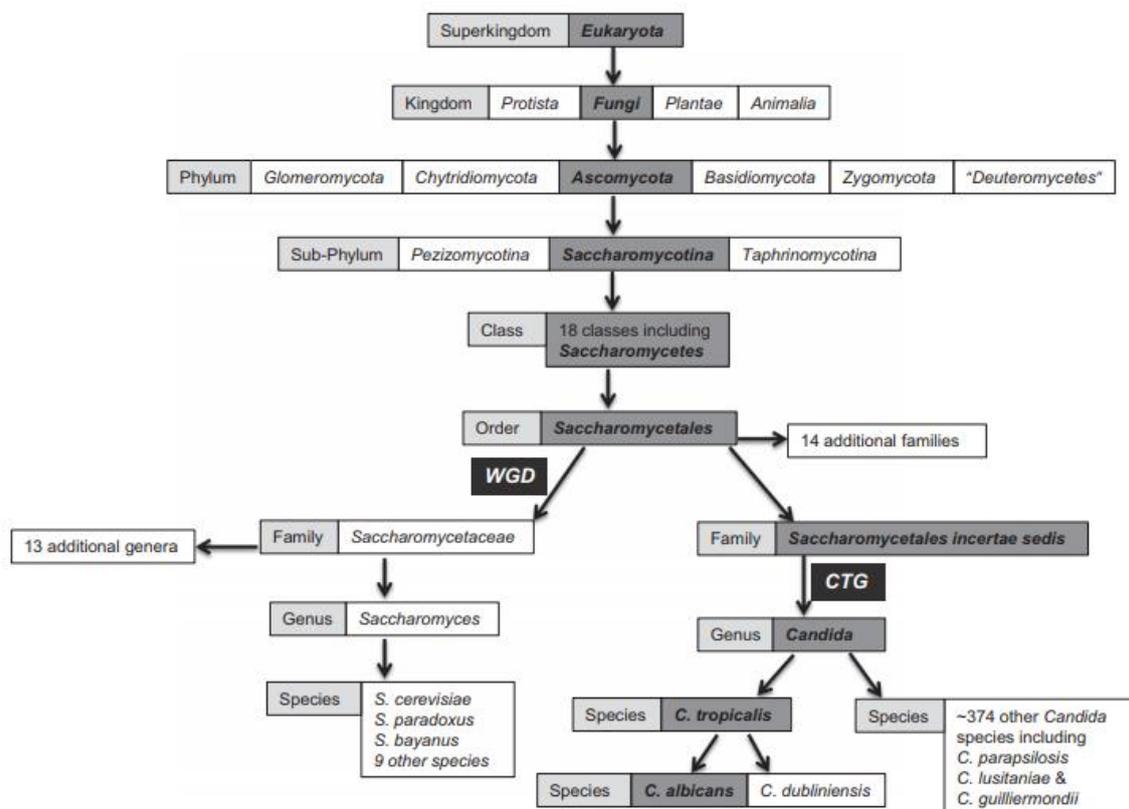


Figura 1. Estrutura filogenética das espécies de *Candidas*. Adaptado de MCMANUS; COLEMAN, 2014. WGD (*Whole Genome Duplication*) e CTG (*CTG Clade*).

O gênero *Candida* é polifilético, albergando espécies distantes no mesmo grupo. Isso causa dificuldades na classificação molecular das mesmas (FITZPATRICK *et al.*, 2006). Nos estudos de crescimentos feitos em laboratório, as colônias leveduriformes se apresentam de forma abundante, circulares, esbranquiçadas (ou de cor creme) e propagam odor característico (Figura 2).

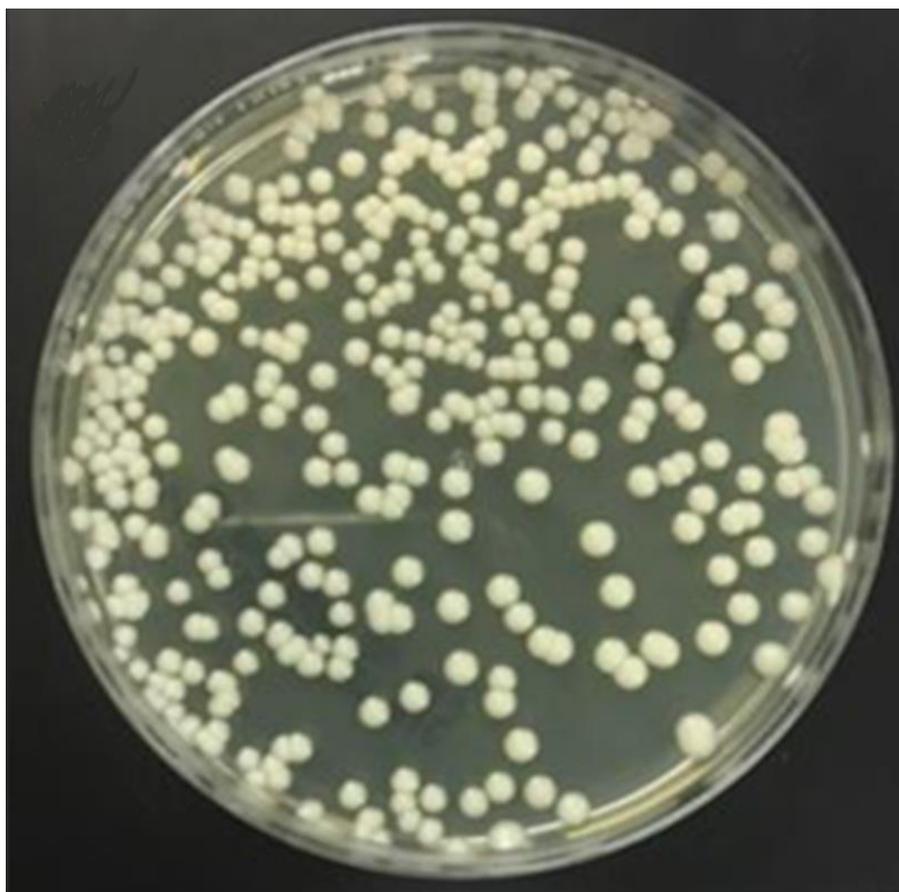


Figura 2. Crescimento de *C. albicans* em meio ágar Sabouraud, mostrando suas características, isolados esféricos de cor branca a creme. Reproduzido de MCMANUS; COLEMAN, 2014. WGD (*Whole Genome Duplication*) e CTG (*CTG Clade*).

As cândidas são constituintes da microbiota humana, principalmente encontrada na pele, mucosas e trato gastrointestinal. É uma levedura diploide e polimórfica que se reproduz de forma assexuada por brotamentos. De maneira geral as cândidas se dividem em *Candida albicans* e *Candida não-albicans* (CNA), esse segundo sendo um grupo ao que são pertencentes, majoritariamente, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. As CNA têm emergido nos últimos anos como um grupo

importante nas infecções sistêmicas mundo afora (CORNET *et al.*, 2011). A emergência das CNA dificulta o êxito das estratégias terapêuticas, uma vez que algumas dessas espécies são intrinsecamente resistentes ou menos suscetíveis aos antifúngicos existentes, em grande parte aos azólicos (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; LOCKHART *et al.*, 2009). São relatadas mais de 50 espécies de *Candida* que podem ser patogênicas aos seres humanos, no entanto, apenas um grupo mais restrito, como a *C. albicans* e as CNA, possuem 90% de todas as comunicações de candidíase invasiva (PAPPAS *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos a *C. glabrata* é a segunda espécie mais prevalente, só perdendo para a *C. albicans*; na sequência aparecem a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (CLEVELAND *et al.*, 2015). Esses organismos são a causa mais comum de infecções vaginais e orais, podendo assumir um papel mais grave quando a situação imunológica do hospedeiro permite, como é o caso de imunossupressão, SIDA e diabetes (MOHAMMADI *et al.*, 2016).

Em casos mais graves, as cândidas podem acometer indivíduos debilitados de forma disseminada, invadindo tecidos e atingindo a corrente sanguínea, ocasionando um quadro de candidemia (FRIDKIN *et al.*, 2006). As candidíases também são um problema em pacientes imunocomprometidos podendo causar candidíase invasiva (LIONAKIS; NETEA, 2013). Essa é fortemente correlacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade (POULAIN, 2013).

Nas infecções mucocutâneas, como é o caso da candidíase vulvovaginal, pode-se observar um crescimento rápido e exponencial deste microrganismo devido a um desequilíbrio ambiental, como a redução do pH (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Presentes em 75% das cavidades orais da população, mostrando a ampla extensão das suas várias espécies (RUHNKE, 2002). Esse é o mesmo percentual estimado para que mulheres acometidas de candidíase vulvovaginal pelo menos uma vez na vida (SOBEL, 2007). Por serem microrganismos comensais facilmente se adaptam a mudanças rápidas nas condições ambientais, mesmo quando há privação de nutrientes (MIRAMÓN; LORENZ, 2017).

O número de estudos na literatura de infecções causadas pelas CNA tem aumentado substancialmente em todas as partes do mundo (MERSEGUEL *et al.*, 2015). Uma dessas causas do aumento da incidência dessas infecções se deve principalmente à grande prevalência de candidíases vaginais. A susceptibilidade frente aos antifúngicos difere entre as espécies patogênicas de *Candida* responsáveis pelas infecções (PAPPAS *et al.*, 2009), variando geograficamente quanto a sua susceptibilidade, também (PAPON *et al.*, 2013). De acordo com essas informações, torna-se notável a necessidade do desenvolvimento de estratégias que visam à otimização do diagnóstico e tratamento destas infecções, para a redução das taxas de morbidade e mortalidade.

Dimorfismo das espécies de Cândida

Cândidas são organismos polimórficos que podem apresentar-se como blastosporos, hifas ou pseudo-hifas, dependendo das condições de cultura (BERMAN; SUDBERY, 2002). Assim, a morfogênese refere-se a uma transição reversível entre células de levedura unicelulares ou blastosporos - que é a morfologia de levedura típica - e um crescimento filamentoso como hifas. Muita dessa morfogênese se deve ao valores dinâmicos de pH encontrados no diferentes sítios do organismo humano. Os valores de pH variam segundo sua localização: o sanguíneo é ligeiramente alcalino (pH 7,4); já o digestivo pode transitar do estomacal (pH 2) ao intestinal (pH 8) e o vaginal (pH 4) (DAVIS, 2009).

Em pH menores que 6, *C. albicans* predominantemente cresce em forma leveduriforme, no entanto, em pH acima de 7, o crescimento de hifas é favorecido. Esse dimorfismo é proposto como mecanismo de patogenicidade. Notadamente as hifas dispõem de mais características de virulência que as demais morfologias, pois, ela detém mais adesão e invasão que as demais formas. Outra característica notável é que as hifas permitem maior resistência ao sistema imunológico, obliterando a fagocitose. Por conseguinte, o conhecimento das características que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das diferentes espécies de cândida é crucial para o melhor entendimento do microrganismo, quer seja para sua caracterização fenotípica

quer seja para avaliar de maneira mais eficiente a sua susceptibilidade frente aos diferentes fármacos (SUDBERY, 2011).

As diferenças de pH causam estresse as *Candidas*, colocando em situações diferentes daquelas ideais, causando anomalias em proteínas sensíveis ao pH e não permitindo que o gradiente eletrônico de prótons aconteça (DAVIS, 2009). Entre as principais proteínas dadas como importantes para a adaptação à mudança de pH duas β -glicosidasas da parede celular: Phr1 e Phr2. A primeira é mais expressa em pH alcalino e neutro; de forma antagônica a Phr2 é mais codificada em pH ácido. Sendo assim, a Phr1 é mais encontrada em infecções sistêmicas e a Phr2 em infecções vaginais (DE BERNARDIS *et al.* 1998).

Outras modificações no ambiente de crescimento como presença de soro, CO₂, e *N*-acetilglucosamina também promovem a formação de hifas (SUDBERY, 2011). Outros mecanismos podem levar ao desenvolvimento de hifas, como o *quórum sensing* que é propiciado por farnesol, tirosol e dodecanol. Contudo, as principais modificações acontecem no número de células, onde um $>10^7$ propicia o desenvolvimento leveduriforme, enquanto que $<10^7$ favorece hifas (MAYER *et al.*, 2013). Achados mais recentes citam que a síntese celular de farnesol é temperatura dependente. Essa substância é responsável pela morfogênese das *Candidas* sendo importante também em várias vias metabólicas e responsável pelo *quórum sense*, onde regula crescimento, metabolismo, virulência e comunicação da comunidade microbiana. Esse efeito é bem entendido para bactérias, mas recente ainda para *Candidas*, *C. albicans* e *C. dubliniensis* as maiores produtoras desse sesquiterpeno. No entanto, CNA também respondem a essa molécula em diferentes meios, entre esses também responde ao mais utilizado que é o RPMI 1640 (WEBER *et al.*, 2010).

Correlações *in vitro* e *in vivo*

A criação de modelos a partir de alguns exemplares de microrganismos facilita a visualização de efeitos e características das quais podemos explorar experimentalmente. A susceptibilidade *in vitro* não prediz uma terapia bem sucedida, no entanto, uma resistência *in vitro* frequentemente predita uma falha

na terapia (REX *et al.*, 1997). Muito disso se deve ao fato que a atividade do fármaco é construída pela concentração inibitória mínima (CIM) e demais fatores, como a resposta imune. Logo, se ocorre sucesso na atividade *in vitro*, não necessariamente ocorrerá garantia de um bom tratamento, pois, ainda existem fatores a serem considerados.

De acordo com ANASSIE *et al.* (1994), que estudou a correlação entre os testes de susceptibilidade *in vitro* com fluconazol e a média da dose efetiva em um modelo murino. Foi encontrada boa correlação entre os achados, no entanto, doses mais altas foram necessárias a fim de prolongar a vida dos ratos. Um dos pontos que a CLSI deixa em aberto é a leitura em 24 ou 48 h, a razão dessa escolha se deve a melhor correlação com resultados de efetividade clínica quando se incuba por 24 h. Esse fato permite informações mais rápidas, no entanto, são necessários mais desenvolvimentos e validações acerca da correspondência entre clínica e testes *in vitro*. Mais testes são necessários em isolados com mais altos CIM, principalmente para CNA.

Modificações de pH e os efeitos sobre susceptibilidade

Diferentes abordagens sobre as alterações de pH sobre as diretrizes da CLSI, ou anteriores ao estabelecimento da mesma, a fim de explicar efeitos espécies específicos ou dependentes de fármacos são realizados com alguma periodicidade.

JOHNSON *et al.*, (1978) encontraram uma correlação entre menores temperaturas de crescimento e um aumento da sensibilidade de *C. albicans* utilizando nistatina e anfotericina B. Similar efeito foi acompanhado para pHs menores, onde obteve-se uma maior susceptibilidade aos mesmos fármacos em pH 3 do que em pH 5 e pH 7.

Trabalhos que sugeriram a modificação de tampões, de faixas de pH na interpretação de CIM são escassos na literatura, um deles é o de GADEA *et al.*, (1997). Nesse trabalho os autores estudaram diferentes tampões (MOPS em dois pH 7,0 e 7,4 e bicarbonato em 7,4), dentro desses meios se fez a determinação do CIM em cinco diferentes antifúngicos. Os autores mostram que o tampão e os pHs alteram os CIM para azólicos e flucitosina. Outro

exemplo é o trabalho de PAI & JONES, (2004), onde fica evidente que o decréscimo do pH modifica a atividade de triazólicos frente a *C. glabrata*, além disso, o perfil de inibição em pH 7 não prediz os resultados as atividades sobre *C. glabrata* em diferentes sítios de infecção como urina e sangue.

Comparativos com outros nichos de infecção também são alvo de publicações, como candidíases vaginais e seu pH diverso (LIU *et al.*, 2011). Nesse estudo comparou-se a atividade de cinco antifúngicos sobre 60 isolados de *C. albicans*. Os autores deixam claro que apesar de o pH 7 ser usado como padrão, esse valor não é o mais eficiente para predizer comportamentos clínicos, mostrando que o pH do meio de teste deve ser corrigido a fim de que o meio de crescimento refletisse a natureza do sítio de infecção por *Candida* spp.

Alternativas não somente para azólicos, mas também para outras classes de antifúngicos, como equinocandinas, têm sido avaliadas (BOIKOV *et al.*, 2017). Em geral as CIM foram maiores quando obtidos em pH 4 do que em pH 7, e foram maiores quando visualizados após 48 h de incubação do que após 24 h. O mesmo foi encontrado no estudo de SPITZER & WIEDERHOLD, (2018), que acharam maiores concentrações de antifúngicos necessários para inibir o mesmo isolado em pH 4, quando comparadas ao pH 7.

Modificações da temperatura e os efeitos sobre susceptibilidade

Anterior às diretrizes da CLSI, muitos artigos buscaram mostrar as variáveis que são importantes para o crescimento e inibição de diferentes microrganismos e agentes antifúngicos. Um dos primeiros relatos na literatura, mostrando que a modificação estrutural de uma levedura dependente de temperatura foi feito por HUNTER & ROSE, (1972). Este mostrou que a alteração da composição lipídica de *Saccharomyces cerevisiae* é dependente de modificações físicas e químicas do ambiente, sendo que esses lipídios podem estar concentrados tanto no citosol como na membrana.

Estudos de crescimento com *Candidas* já demonstravam valores ótimos de crescimento variáveis quando comparando diferentes espécies, *C. glabrata* (27/29 °C a 33/34 °C), *Candida kefyr* (35/36 °C) e *Candida lusitanae*

(34-35 °C) (OLIVEIRA-BAPTISTA & UDEN, 1971). Isso mostra que existem temperaturas específicas para cada espécie, e que cada variedade responde em uma velocidade própria de crescimento para cada temperatura.

A modificação da temperatura em testes de susceptibilidade para outros microrganismos, no caso *Staphylococcus aureus*, vem sendo estudada há bastante tempo. Segundo THORNSBERRY *et al.*, (1973), a temperaturas mais altas (37 °C) as cepas resistentes foram interpretadas como suscetíveis no teste de difusão em ágar, dessa maneira, fica evidente a importância na padronização para a reprodutibilidade dos resultados, pois se garantindo a temperatura de 35 °C os diferentes antibióticos não mostravam discordâncias. No estudo de MACKOWIAK *et al.*, (1982) foram comparadas mais de 3000 CIM, a fim de avaliar a influência da temperatura na susceptibilidade de bactérias. Utilizou-se de 35 a 41,5 °C e como evidência ocorre um aumento progressivo da atividade antimicrobiana em maiores temperaturas. Contudo, no referido trabalho não foi encontrada a razão pela qual ocorre tal fato.

MADEIRA-LOPEZ & CABEÇA-SILVA, (1984) determinaram que as temperaturas nas quais o crescimento exponencial de *Candida tropicalis* se sustenta foram na faixa de 27,9 a 38,6 °C. Quando acima desses valores, ocorre um crescimento em menor massa, característico da taxa de morte associada ao microrganismo. Dessa maneira, a temperatura ótima de crescimento fica em torno de 37 °C, não passando do limite de 38,6 °C.

Relatos na literatura com a modificação da temperatura, inóculo e diferentes meios para dermatófitos já foram realizados NORRIS *et al.*, (1999), descrevem que o tempo de incubação afeta o CIM, e por isso deve ser determinado a fim de se obter as melhores respostas. Contudo, os autores não encontraram diferenças entre para temperaturas de 30 e 35 °C mesmo não utilizando de uma metodologia quantificadora, apenas a análise visual.

COOK *et al.*, (1990) estudaram o efeito da temperatura, tamanho do inóculo, meio de crescimento e a concordância entre as técnicas de macro e microdiluição. Encontraram que a modificação do inóculo e da temperatura, tanto de forma isolada como conjunta, traz alterações importantes ao CIM. Esse fato se repetiu para outras classes de antifúngicos, não somente para

azólicos, mas também para anfotericina B e flucitosina. O trabalho deixa claro a importância da padronização, do conhecimento do método e também sugere que a temperatura a ser utilizada seja a de 35 °C, dada a maior concordância entre as técnicas de micro e macrodiluição. No entanto, ANAISSIE *et al.*, (1991), não encontraram diferenças estatísticas para temperatura, tamanho de inóculo e tempo de leitura. Contudo, as temperaturas utilizadas nesse trabalho foram de 30 e 35 °C, ou seja, um valor diferente do trabalho anterior, que fora de 37 °C. Além disso, eles sugerem que seja feita uma etapa de agitação das placas a fim de se buscar os melhores resultados.

Um dos trabalhos mais completos sobre a influência de temperatura entre as diferentes espécies de *Candida* foi o produzido por ODDS, (1993). Nesse trabalho mostra que maiores temperaturas (comparando 37 com 25 °C) trazem melhores perfis de inibição dos azólicos testados em diferentes espécies de candidas.

Estudos relacionando inóculo, tempo de incubação e temperatura mostraram a necessidade de uma padronização dessas variáveis a fim de se atingir resultados mais fidedignos obtidos (REX *et al.*, 1993). Assim após correlacionar os valores de CIM calculados com as variáveis estudadas, os autores evidenciaram a temperatura como a mais importante dessas, principalmente quando acima de 35 °C.

Entre os poucos trabalhos que utilizaram concentrações sub-inibitórias a diferentes temperaturas destaca-se o de GARCIA *et al.*, (2000) que avaliou essas condições frente a modificações das temperaturas de incubação e manifesta que a eficiência clínica depende dessas temperaturas, a escolha do antifúngico e suas concentrações. Em testes utilizando temperaturas de 25°C e 42°C, diferentes daquelas preconizadas pela CLSI (35°C), foram observadas variações nos valores de CIM de até duas diluições. Olo (35 °C) para uma temperatura menor (25 °C) e uma maior (42 °C) e encontrou modificações na CIM de até duas diluições (AGRAWAL *et al.*, 2007). Contudo, não foi evidenciado o efeito de *trailing end-point*, comum quando se utiliza antifúngico azólico. Esse efeito é visualizado para alguns isolados de *Candida* e é interpretado como resistência, segundo a CLSI, no entanto, em outros métodos

de leitura (espectrofotométrico aliado a agitação, ou com crescimento em pH diferente do preconizado pelas diretrizes da CLSI) os isolados se mostram suscetíveis.

Outras adaptações e os efeitos sobre susceptibilidade

Compreender os diferentes mecanismos de patogenicidade e adaptativos dos microrganismos é essencial para seu entendimento e manutenção. Os diversos fatores que influenciam na sua susceptibilidade e podem levar a resultados díspares quando não levados em conta e ocasionando conclusões errôneas aos testes.

Adaptações metabólicas são importantes também para espécies de *Candida*, visto que isso permite sua colonização em diferentes nichos, e também, pré-requisito para a sobrevivência e desenvolvimento de qualquer microrganismo. Uma das principais modificações metabólicas é a assimilação de nutrientes por fontes diferentes em ambientes dinâmicos (RODAKI *et al.*, 2009).

Outra estrutura de resposta destes mecanismos envolvendo mudanças ambientais é atribuído ao *Heat Shock Proteins* (HSP), que são respostas conservadas de espécimes vivos a condições de estresse. Condições essas que se traduzem em aumento de temperatura, privação de nutrientes e estresse oxidativo (LINDQUIST, 1992). Sob essas condições adversas os microrganismos podem sofrer quebra ou desnaturação de proteínas não específicas, levando à apoptose. Com a finalidade de evitar esse panorama as células produzem HSP. Essas HSP atuam como chaperonas, que são mecanismos eficientes para evitar erros de transmissão da informação genética, logo previnem que aconteçam quebras ou agregação em proteínas inespecíficas, nelas se ligando e dificultando que o processo ocorra (SHAPIRO *et al.*, 2012).

Quimiometria

A quimiometria é uma parte da estatística aplicada a química com a finalidade de extrair a maior quantidade de informações de um conjunto de dados. Os métodos quimiométricos consistem no exame de elevado número de

variáveis de forma a determinar toda a variação existente em uma matriz de estudo. Os propósitos podem ser qualitativos (análise exploratória e reconhecimento de padrões) ou quantitativos (calibração multivariada) (HOPKE, 2003; BRERENTON, 2013).

Entre as metodologias exploratórias se destacam a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA versa basicamente na transformação de coordenadas da matriz de dados originais com o desígnio de representar as variações presentes em muitas variáveis, por um número menor de variáveis. Essa redução é chamada *diminuição de dimensionalidade* por uma representação do conjunto de dados transformados em um novo sistema de eixos. Esses eixos são denominados componentes principais (PCs), são ortogonais entre si, e assim, permitem a visualização da informação contida nos dados em gráficos bidimensionais, tridimensionais ou em mais dimensões, dependendo do total explicável pela informação original (BRO & SMILDE, 2014).

Na PCA a matriz de dados originais é expressa por **X** e é decomposta em duas outras matrizes denominadas **escores (T)** e **pesos (P)**, somadas a essas duas ainda temos a matriz **E**, que é a *matriz de resíduos* como demonstra a Equação 1.

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

Conseqüentemente, os dados originais são agrupados em função das correlações existentes entre suas variáveis, geralmente lineares. Essas correlações geram novos eixos que são denominados *componentes principais* (PC). Cada novo eixo apresenta a maior variância calculada e é ortogonal ao próximo eixo formado. Assim, cada eixo descreve uma variação diferente do seu eixo ortogonal.

Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)

É um método de análise de dados que permite o agrupamento por similaridade, formando grupos (*clusters*) e quando não existe similaridade entre as amostras elas são colocadas separadas uma das outras, segundo distâncias especificadas. Os dados que originam essas análises geralmente são multivariados, mesmo assim os resultados são agrupados em forma de um gráfico particular, chamado dendrograma, que é uma representação bidimensional de todos os parâmetros.

Os dendrogramas são construídos segundo as distâncias entre as amostras. Para que a proximidade ou distância entre dois vetores seja calculada são usados, geralmente, distâncias pré-definidas, como euclidiana, Ward, Mahalanobis, etc. A distância euclidiana é dada segundo a Equação 2.

$$d_{a,b} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (x_a - x_b)^2} \quad (2)$$

onde $d_{a,b}$ é a distância entre os pontos (amostras) a e b no conjunto de dados. Assim, de cada par é obtida uma distância. Posteriormente das aquisições de todas as distâncias são feitos agrupamentos sucessivos, seguindo uma ordem de acordo com a maior ou menor similaridade entre essas distâncias. Para calcular o índice de similaridade é usada a relação descrita na Equação 3.

$$S_{i'i} = 1 - \frac{d_i}{d_{max}} \quad (3)$$

Onde d_i é a distância entre amostras e o d_{max} é a maior distância calculada, dessa forma é obtido o índice de similaridade entre as amostras.

Artigo Científico - Capítulo 1

A íntegra do capítulo 1, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 45 – 71 foram suprimidas por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de artigo original sobre o impacto da modificação da localização de microplacas de 96 poços em uma estufa de cultura de crescimento e sua avaliação com o auxílio de um desenho térmico através da coleta de dados de temperaturas internas da estufa.

Artigo Científico - Capítulo 2

A íntegra do capítulo 2, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas 73 – 97 foram suprimidas por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de artigo original sobre a comparação entre o ensaio de combinação checkerboard e um desenho experimental fatorial 2^3 , esse último foi analisado com o auxílio de ferramentas quimiométricas.

DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação foi desenvolvida com o intuito de determinar a relevância da temperatura sobre a inibição de diferentes espécies de *Candida* mostrando que o conhecimento dos equipamentos utilizados na rotina laboratorial é de extrema importância. Reconhecidamente a literatura apresenta diversos trabalhos mostrando como a temperatura impacta sobre o crescimento das diferentes espécies dentro do gênero *Candida*. No entanto, são raros os estudos que mostram o impacto das contribuições térmicas sobre a susceptibilidade, e os que cobrem o assunto em sua maioria tem um intervalo entre os 25 e 37 °C. Além da temperatura, outra característica modificadora da fenotipia desses microrganismos é o pH. Visto que esse mecanismo permite através da troca do pH a realização do dimorfismo dessas espécies, alternando entre levedura e hifa. Essa troca é uma importante característica da patogenicidade e virulência das *Candidas*. Outro fator que modifica o crescimento é a glicose, que propicia uma fonte de carbono de rápido manejo por esse gênero, propiciando um crescimento aumentado. O teste de susceptibilidade é etapa determinante na escolha da terapia, seja pelo antifúngico ou pela concentração efetiva para o tratamento do paciente acometido pela candidíase. Sendo um ensaio tanto de triagem para o desenho do perfil de inibição de diferentes isolados frente a um fármaco, seja para a prospecção de novos candidatos a fármaco dentro da pesquisa.

O monitoramento da temperatura e o conhecimento das diferentes características térmicas, principalmente de estufas de incubação são essenciais para o crescimento e inibição de microrganismos. Quantificar essas parcelas térmicas e avaliar se posições distintas dentro da estufa propiciam temperaturas diferentes. E, além disso, se essas diferenças podem influenciar um teste de susceptibilidade de forma a se obter CIM diferentes em localizações distintas dentro de um mesmo equipamento. Igualmente, o efeito de *trailing end-point* é evidenciado como atributo de muitos isolados do gênero *Candida*. Contornar esse efeito é alvo de muitos estudos, algumas das diretrizes sugerem a modificação de temperatura, para eliminar o efeito. Visando o estudo concomitante de ambos os efeitos propostos utilizou-se do corante vital resazurina a fim de obter pontos visualizáveis mais claros. Esse efeito é permitido devido a grande troca de cor entre o azul - resazurina (células viáveis) e o rosa - resorufina (células inviáveis). Através do uso desse

corante e do mapeamento da estufa foi possível criar modelo de sensores de temperatura e mostrar que os diferentes pontos amostrados possuem diferença estatística entre si. Além disso, que esses pontos obtiveram resultados também significantes para as CIM ficando claro que a posição na estufa, e assim, sua determinada temperatura contribuem de forma diversa para a inibição de diferentes *Candidas*. Quanto ao uso do corante vital para o estabelecimento da CIM se mostrou eficaz e reprodutível, sendo uma ferramenta viável e de fácil implementação na rotina. Ademais a utilização de resazurina permitiu a eliminação do efeito de *trailing end-point* e assim mais confiabilidade em se decidir o CIM. (Capítulo 1).

As alterações fenotípicas pelas quais os microrganismos respondem com mecanismos bem definidos como a filamentação tornam as leveduras mais patogênicas e invasivas. Como é o caso das candidíases vulvo vaginais (CVV), pois encontram um ambiente diverso com pH diferente dos outros locais de infecção. Isso proporciona as leveduras uma maior virulência possibilitando um aumento na produção de enzimas hidrolíticas e evasão do sistema imune. Logo, compreender como essas modificações de sítios de infecção alteram o microrganismo e como essas alterações impactam sobre a CIM do mesmo é uma dúvida ainda. Para tanto os ensaios de combinação são válidos com a finalidade de possibilitar que três ou mais fatores sejam manipulados pelo experimentador a fim de mimetizar condições de infecção. Dessa maneira, criando um desenho experimental que contemple a situação de uma CVV, onde ocorre menor pH e mais aporte de glicose devido ao sítio de infecção, buscou-se mostrar como esses parâmetros alteram a CIM. E ficou claro que em menores valores de pH (4) ocorre uma menor susceptibilidade das diferentes *Candidas*, onde algumas se adaptam melhor ao antifúngico utilizado (Fluconazol) do que outras. Além disso, apresentou-se uma alternativa para se testar diferentes fármacos ou condições experimentais com a utilização do uso de fatoriais completos. Outro ponto é que a partir do uso dos desenhos se possibilita o uso menor de reagentes, placas e tempo a fim de se praticar testes mais completos e com menor preparo de amostras. Pois o desenho experimental nos permite a maior resposta dentro das variações inseridas no sistema permitindo variações conhecidas dentro da matriz de resultados (Capítulo 2).

Portanto, o presente trabalho abordou questões relevantes acerca das modificações de temperatura, pH e aporte de assimilação de carbono para diferentes espécies patogênicas de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*). Entre essas variações seja de estufa de incubação (Capítulo 1), sejam de condições experimentais (Capítulo 2) mostrou-se a partir dos resultados obtidos que essas alterações sugeridas influenciam nas CIM's. E que para tanto devemos ter padronizações quanto a equipamentos utilizados e novas propostas de diretrizes quanto a susceptibilidade de situações que mimetizem novas condições experimentais.

CONCLUSÃO GERAL

- A localização dos diferentes pontos dentro da estufa é caracterizada por parcelas térmicas diversas;
- Alturas de prateleira também interferem na escolha dos pontos de utilização para ensaios de crescimento e inibição;
- Os testes de susceptibilidade comparativos entre pontos com significativas mudanças de temperatura também se mostraram significativos para as concentrações inibitórias mínimas;
- A utilização do corante vital de resazurina é uma solução rápida e barata para a utilização na rotina laboratorial, pois possibilita a visualização do ponto de concentração inibitória mínima sem o efeito de *trailing end-point*;
- A troca de pH modifica consideravelmente o potencial de inibição, mostrando que mimetizar as condições do local de infecção traz uma nova correlação entre teste *in vitro* e situação clínica;
- A escolha de um desenho experimental possibilita maior resposta química e menor uso de reagentes, tempo e preparo de amostra quando comparado ao checkerboard.

PERSPECTIVAS

- Avaliar condições experimentais não abordadas nesse trabalho como crescimentos em temperatura ambiente (25 °C) e seu impacto frente na susceptibilidade;
- Avaliar outras classes de antifúngicos com mecanismos diversos como as equinocandinas, que tem como alvo a parede celular das leveduras em questão;
- Avaliar a possibilidade de uma metodologia de contagem a fim de caracterizar o padrão de inibição frente a cada condição de alteração de crescimento e inibição a fim de quantificar como a mudança do pH e glicose influenciam na sobrevivência das diferentes *Candidas*;
- Quantificar através de superfícies de resposta como os diferentes fatores afetam e susceptibilidade criando modelos para diferentes classes de antifúngicos e espécies de *Candidas*;
- Classificar através de metodologias supervisionadas quimiométricas comportamentos desconhecidos de amostras clínicas frente a amostras caracterizadas já estudadas.

REFERÊNCIAS

ANAISSIE, E.; PAETZNICK, V.; BODEY, G.P. Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading. **Antimicrob Agents Chemother**, Aug;35(8):1641-6, 1991.

ANAISSIE, E.J.; KARYOTAKIS, N.C.; HACHEM, R.; DIGNANI, M.C.; REX, J.; PAETZNICK, V. Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. **J Infect Dis**, 170:384-389, 1994.

BADIEE, P.; BADALI, H.; DIBA, K.; JAFARIAN, H.; MOHAMMADI, R.; MIRHENDI, H.; NAJAFZADEH, M.J. Multicenter Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of *Candida* Species Isolated from Clinical Samples. **Jundishapur J Microbiol**, December; 10(12):e56117, 2017.

BERMAN, J.; SUDBERY, P.E. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nat Rev Genet**, 3:918-30, 2002.

BOIKOV, D.A.; LOCKE, J.B.; JAMES, K.D.; BARTIZAL, K.; SOBEL, J.D. In vitro activity of the novel echinocandin CD101 at pH 7 and 4 against *Candida* spp. isolates from patients with vulvovaginal candidiasis, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 72, Issue 5, Pages 1355–1358, 2017.

BRERENTON, R.G. The evolution of chemometrics. **Anal. Methods**, 5, 3785-3789, 2013.

BRO, R.; A. K. SMILDE. Principal component analysis. **Analytical Methods** 6(9): 2812-2831, 2014.

CENDEJAS-BUENO, E.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, .J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. **J Clin Microbiol**, 48, 1895–1899, 2010.

CLEVELAND, A.A.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.M.; HOLLICK, R.; STEIN, B.; CHILLER, T.M.; LOCKHART, S.R.; PARK, B.J. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PLoS One**,10(3): e0120452, 2015.

COOK, R.A.; MCINTYRE, K.A.; GALGIANI, J.N. Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro- and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. **Antimicrob Agents Chemother**, Aug;34(8):1542-5, 1990.

CORNET, M.; SENDID, B.; FRADIN, C.; GAILLARDIN, C.; POULAIN, D.; NGUYEN, H-V. Molecular Identification of Closely Related Candida Species Using Two Ribosomal Intergenic Spacer Fingerprinting Methods. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 13(1):12-22, 2011.

CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of Candida spp. **J Clin Microbiol**, Feb;39(2):525-32, 2001.

DAVIS, D.A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Curr Opin Microbiol**, 12:365-70, 2009.

DE BERNARDIS, F.; MÜHLSCHLEGEL, F.A.; CASSONE, A.; FONZI, W.A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of Candida albicans. **Infect Immun**, 66:3317-25, 1998.

DIEZMANN, S.; COX, C.J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Phylogeny and evolution of medical species of Candida and related taxa: a multigenic analysis. **J Clin Microbiol**, 42(12):5624-35, 2004.

FITZPATRICK, D.A.; LOGUE, M.E.; STAJICH, J.E.; BUTLER, G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. **BMC Evol Biol**, Nov 22;6:99, 2006.

FRIDKIN, S.K.; KAUFMAN, D.; EDWARDS, J.R.; SHETTY, S.; HORAN, T. Changing incidence of Candida bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. **An Pediatr**, 117 1680–1687, 2006.

GADEA I, CUENCA M, GEGÚNDEZ MI, ZAPARDIEL J, VALERO ML, SORIANO F. Effect of pH and buffer system on the in-vitro activity of five antifungals against yeasts. **J Antimicrob Chemother**, Apr;39(4):453-9, 1997.

GAREY, K.W.; REGE, M.; PAI, M.P.; MINGO, D.E.; SUDA, K.J.; TURPIN, R.S.; BEARDEN, D.T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin Infect Dis**, Jul 1;43(1):25-31, 2006.

HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365-377, 2003

HUNTER, K.; ROSE, A.H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. **Biochim Biophys Acta**, Apr 18; 260(4):639-53, 1972.

JOHNSON, B.; WHITE, R.J.; WILLIAMSON, G.M. Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenoic antibiotics nystatin and amphotericin B. **J Gen Microbiol**, Feb;104(2):325-33, 1978.

LINDQUIST, S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. **Curr Opin Genet Dev**, 2:748-55, 1992.

LIONAKIS, M.S.; NETEA, M. G. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. **PLoS Pathogens**, 9, e1003079, 2013.

LIU, W.; ZHANG, X.; LIU, Z.; LUO, X. Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, 114: 278-280, 2011.

LOCKHART, S.R.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Identification and Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. **J Clin Microbiol**, 47:242–244, 2009.

MACKOWIAK, P.A.; MARLING-CASON, M.; COHEN, R.L. Effects of temperature on antimicrobial susceptibility of bacteria. **J Infect Dis**, 145(4) : 550-3, 1982.

MADEIRA-LOPES A.; CABEÇA-SILVA C. The dependence on temperature of thermal death, growth and yield of *Candida tropicalis*. **Z Allg Mikrobiol**, 24: 133-135, 1984.

MCMANUS, B.A.; COLEMAN, D.C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infect Genet Evol**, Jan;21: 166-178, 2014.

MENDLING, W.; BRASCH, J: German Society for Gynecology and Obstetrics Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists & German Speaking Mycological Society (2012). Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. **Mycoses** 55 (Suppl. 3), 1–13, 2012.

MERSEGUEL, K.B.; NISHIKAKU, A.S.; RODRIGUES, A.M.; PADOVAN, A.C.; E FERREIRA, R.C.; DE AZEVEDO MELO, A.S.; BRIONES, M.R.; COLOMBO, A.L. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection, **BMC Infect. Dis**, Feb 13;15:57, 2015.

MIRAMÓN, P.; LORENZ, M.C. A feast for *Candida*: metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS Pathog**, 13 e1006144, 2017.

MOHAMMADI, F.; JAVAHERI, M.; NEKOEIAN, S.; DEHGHAN, P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. **Current Medical Mycology**, 2(2):1-7, 2016.

MORA, C.; TITTENSOR, D.P.; ADL, S.; SIMPSON, A.G.B.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biol**, 9:e1001127, 2011.

NORRIS, H.A.; ELEWSKI, B.E.; GHANNOUM, M.A. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. **J Am Acad Dermatol**, Jun;40(6 Pt 2):S9-13, 1999.

ODDS, F.C. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, Apr;37(4):685-91, 1993.

OLIVEIRA-BAPTISTA, A.; VAN UDEN, N. Occurrence of two maximum temperatures for growth in yeasts. **Kurze Originalmitteilungen**, 11, 1, 59-61, 1971.

PAI, M.P.; JONES, A.L. Altered Susceptibility of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates to Triazoles at Clinically Relevant pH Values: Comparison of the NCCLS M27-A2, Sensititre YeastOne, and Etest Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(11): 4441- 4443, 2004.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathog** 9:e1003550, 2013.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J.E.; FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; ZEICHNER, L.O. Clinical practice guidelines for the management candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America, **Clin. Infect. Dis**, 48 503–535, 2009.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R.; CLANCY, C.J.; MARR, K.A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J.A.; WALSH, T.J.; ZAOUTIS, T.E.; SOBEL, J.D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, 15;62(4) :e1-50, 2016.

PFALLER, M,A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997—2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J Clin Microbiol**, 48: 1366-77, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem, **Virulence**, 2, 119–128, 2007.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, Jun; 41(2): 208-217, 2013.

RAMOS-MARTÍNEZ, A.; VICENTE-LÓPEZ, N.; SÁNCHEZ-ROMERO, I.; PADILLA B.; MERINO-AMADOR, P.; GARNACHO-MONTERO, J.; RUIZ-CAMPS, I.; MONTEJO, M.; SALAVERT, M.; MENSA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M; Members of the CANDIPOP Project from GEIH-GEMICOMED (SEIMC) and REIPI. Epidemiology and prognosis of candidaemia in elderly patients. **Mycoses**, Dec;60(12):808-817, 2017.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGIANI, J.N.; BARTLETT, M.S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; LANCASTER, M.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J.; BARRY, A.L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Clin Infect Dis**, Feb;24 (2):235-247, 1997.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G.; POLAK, A.; GALGIANI, J.N. Antifungal susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, Oct;6(4):367-81, 1993.

RODAKI, A.; BOHOVYCH, I.M.; ENJALBERT, B.; YOUNG, T.; ODDS, F.C.; GOW, N.A.; BROWN, A.J. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, 20(22):4845-55, 2009.

RUHNKE, M. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone RA, ed. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC, pp. 307-325., 2002.

SHAPIRO, R.S.; ZAAS, A.K.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; PERFECT, J.R.; COWEN, LE. The Hsp90 Co-Chaperone Sgt1 Governs *Candida albicans* Morphogenesis and Drug Resistance. **PLoS ONE**, 7(9):e44734, 2012.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, 369:1961-71, 2007.

SPITZER, M.; WIEDERHOLD, N.P. Reduced Antifungal Susceptibility of Vulvovaginal *Candida* Species at Normal Vaginal pH Levels: Clinical Implications. **J Low Genit Tract Dis**, Apr;22(2):152-158, 2018.

SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat Rev Microbiol**, 9:737-48, 2011.

THORNSBERRY, C.; CARUTHERS, J.Q.; BAKER, C.N. Effect of temperature on the in vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* to penicillinase-resistant penicillins. **Antimicrob Agents Chemother**, Sep ;4(3): 263-269, 1973.

WEBER, K.; SCHULZ, B.; RUHNKE, M. The quorum-sensing molecule E,E-farnesol--its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. **Yeast**, Sep;27(9):727-39, 2010.