

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool-Stage

Title: Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose e suas relações com proteínas antifúngicas salivares

Creator: Alan Grupioni Lourenço

Affiliation: Universidade de São Paulo (www5.usp.br)

Principal Investigator: Alan Grupioni Lourenço

Data Manager: Alan Grupioni Lourenço

Project Administrator: Alan Grupioni Lourenço

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Funding opportunity number: 57248

Template: Template USP - Mínimo

Project abstract:

Alguns estudos têm verificado maior prevalência de espécies de *Candida* em pacientes com tuberculose (TB). Muito provavelmente, esse aumento na prevalência se deva ao prolongado tratamento com antimicrobianos a que esses pacientes são submetidos. No entanto, não existem estudos que avaliem a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência, quantificação, virulência e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos das espécies de *Candida*. O estudo dessa influência é importante, pois a TB é mais prevalente em pacientes imunodeprimidos, e, portanto, mais susceptíveis às infecções fúngicas. Para o desenvolvimento desse projeto, coletaremos saliva total e enxaguado bucal de 30 pacientes com diagnóstico clínico de TB em dois diferentes momentos: Com menos de 45 dias de tratamento e quando completarem mais de 120 dias de tratamento anti-TB. No enxaguado bucal serão avaliadas em cada ocasião a prevalência, a quantificação, o perfil de sensibilidade ao fluconazol e à anfotericina B, assim como os seguintes fatores de virulência das diferentes espécies de *Candida* isoladas: capacidade de formação de biofilme, produção de proteinases, fosfolipases e capacidade de formação de pseudohifas. Pretendemos com esse estudo, verificar a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência, virulência e resistência aos antifúngicos das *Candida* spp. Na saliva, quantificaremos as concentrações dos antifúngicos salivares, histatina 5 e Lf, e buscaremos associar seus níveis com a maior prevalência e virulência da *Candida*. Como controle, serão incluídos no estudo 30 participantes sem diagnóstico clínico de TB que serão avaliados, uma única vez, com a mesma metodologia.

Start date: 01-31-2019

End date: 01-30-2020

Last modified: 11-26-2020

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Prevalência e virulência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose e suas relações com proteínas antifúngicas salivares - Descrição dos Dados e Metadados produzidos pelo projeto

Ao final do projeto, os seguintes dados de 30 pacientes com TB e 60 pacientes sistemicamente saudáveis serão coletados e disponibilizados em planilhas de excel (.xlsx):

Dados demográficos dos participantes: idade, sexo, raça, tabagismo, consumo de álcool, Exame periodontal simplificado (PSR), Número de dentes cariados, perdidos e obturados), tipos de comorbidades sistêmicas, tipos de tuberculose).

Dados sobre a colonização oral de *Candida* spp: Frequência de isolamento das diferentes espécies de *Candida* spp, Unidades Formadoras de Colônias (logUFC/mL).

Dados sobre a virulência de *Candida* spp: Virulência de cada espécie de *Candida* isolada, destacando-se produção de proteinase ($\mu\text{U/mL}$), proteinase ($\eta\text{g/mL}$), atividade metabólica e formação de biofilme (mDO/min) e capacidade de formação de hifas (cél/s/mL).

Dados sobre as concentrações de proteínas antifúngicas salivares: Níveis salivares de lactoferrina ($\eta\text{g/mL}$) e níveis salivares de Histatina 5 ($\eta\text{g/mL}$)

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

- Pacientes sistemicamente saudáveis: não apresentar envolvimento sistêmico que possa interferir na prevalência e na contagem de *Candida*, como diabetes mellitus, tratamento antineoplásico ou estado de imunossupressão; não ter feito uso de medicação antimicrobiana e anti-inflamatória nos últimos 3 meses; não apresentar envolvimento protéticos extensos, como uso de prótese total ou uso de prótese parcial removível com cobertura palatina.
- Pacientes com tuberculose: além de seguirem os mesmos critérios descritos para os pacientes sistemicamente saudáveis, os pacientes apresentaram TB confirmada por exame de cultura do escarro, teste rápido molecular e/ou baciloscopia.

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

Quantificação de *Candida* spp: A quantificação da *Candida* spp. será realizada no enxaguado bucal. Para tanto, 100 μL de amostra pura do enxaguado e diluições seriadas de 10⁻¹ e 10⁻² serão semeadas em duplicata em placas de

Petri de cultura com Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol e incubadas em estufa de cultura à 37° C por 48 horas. As culturas positivas serão contadas e será obtida a média das duplicatas para a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A UFC será calculada utilizando a seguinte fórmula: $UFC = (\text{colônias encontradas} \times 10n) / \text{quantidade em ml da solução utilizada}$; sendo n o valor absoluto da diluição.

Identificação das espécies de *Candida*: Para a identificação das espécies de *Candida*, 100µL de amostras do enxaguado bucal e de suas diluições serão semeados em placa de Petri contendo CHROMagar *Candida*™, à 37°C por 48 horas. O meio CHROMagar™ identifica de maneira presuntiva as espécies de *Candida* baseadas nas diferentes tonalidades que essas adquirem. Uma colônia de cada cor será expandida em caldo Sabouraud Dextrose e armazenada com 15% de glicerol em freezer -80°C, para posterior confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando a metodologia de Cornet e colaboradores, em 2011.

Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. J Mol Diagn. 2011;13(1):12-22.

Mensuração da Lf salivar: A mensuração da Lf salivar será determinada por ELISA. Inicialmente realizaremos diluições seriadas de Lf (*Lactoferrin from human Milk – Sigma*), em concentração inicial de 5 µg/mL. Adicionar-se-á 100µL de cada concentração de Lf por poço, em duplicata. Amostras salivares serão diluídas dez vezes em PBS e adicionadas à placa de ELISA, em duplicata (100µL por poço). As diferentes concentrações de Lf e as amostras dispensadas sobre a placa serão incubadas durante uma hora em banho-maria à 37°C. Após a incubação e posterior lavagem com PBS realizaremos o bloqueio da placa com ovalbumina a 10%, (*Sigma Albumin from Chicken Egg Whites Grade II*). Empregando-se 200µL por poço, *overnight*, à 4°C. Após o bloqueio adicionaremos o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Lf humana (*Rabbit anti-human lactoferrin - Sigma*) que será incubado durante uma hora, em banho-maria à 37°C. Após lavagens com PBS adicionaremos o anticorpo secundário oriundo de ovelha anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase (*Anti-rabbit IgG Peroxidase antibody produced in goat - Sigma*), que será incubada por 45 minutos, e após nova lavagem com PBS realizaremos a revelação com *o-Phenylenediamine dihydrochloride - OPD* (Sigma), segundo as recomendações do fabricante. Para a leitura empregaremos absorvância de 492nm, em leitor de ELISA (TP Reader ThermoPlate, São Paulo, Brazil).

Dosagem histatina 5 salivar: A determinação dos níveis salivares da histatina 5 serão determinadas através do *Human Histatin 5 ELISA kit* (Cusabio Biotech Co., LTD), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura será realizada a 450 nm em leitor de ELISA (TP Reader ThermoPlate, São Paulo, Brazil).

Avaliação da Produção de Proteinase e Fosfolipase: Inicialmente, o caldo de cultura Sabouraud Dextrose será inoculado com uma concentração de 10⁶cél/mL das diferentes espécies de *Candida* e incubados à 37°C por 24 horas. Após esse período, 1mL de suspensão celular será transferida para microtubos e centrifugados à 6000rpm por 5 minutos. O sobrenadante será utilizado para a análise da produção de protease e o resíduo sólido para a análise da produção da fosfolipase. A quantificação da proteína será realizada através de kit fluorimétrico EnzChek® Protease Assay Kit (Molecular Probe). Em uma placa de 96 poços serão adicionados 100µL do sobrenadante e 100µL da solução caseína BODIPY diluída 20 vezes em tampão de digestão. A placa será incubada à temperatura ambiente por 2 horas em área protegida da luz. A leitura da fluorescência será realizada em fluorímetro, com excitação de 485 nm e emissão em 538 nm. Juntamente será realizada curva padrão para a determinação enzimática.

Para a avaliação da produção de fosfolipase o material sólido obtido por centrifugação será ressuspensionado em tampão de lise (2M TrisHCl, 1 M CaCl₂, pH7,4) e posteriormente levado à agitação por 20 segundos e novamente centrifugado por 5 minutos à 10000rpm. A avaliação da produção de fosfolipase será realizada por meio do kit

fluorimétrico Amplex Red® Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay (Molecular Probe) segundo recomendações do fabricante. Para tanto, 100µL de solução, contendo 2% de Amplex Red (20mM), 1% de Horseradish Peroxidase, 2% de Alkaline Phosphatase, 1% de Choline Oxidase, 0,78% de Lecitina e 93,2% de tampão de digestão, será adicionada à 100µL do lisado em cada poço de placa de 96 poços. A placa será mantida à 37oC em estufa por 3 horas em região protegida de luz. A leitura da fluorescência será realizada em fluorímetro com excitação em 544nm e emissão em 590nm. Os valores obtidos serão comparados com os valores de fluorescência dos controles positivos fornecidos pelo fabricante.

Avaliação da Formação de Hifas: Um volume de 3×10^6 células/mL será transferido para 5mL de meio 199 indutor de hifas (LGC Biotecnologia) acrescido de 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia). Após incubação a 37oC por 3 horas sob agitação de 80rpm será procedido a contagem de leveduras e hifas em câmara de Neubauer, com objetiva de 10x a 40x.

Susceptibilidade aos antifúngicos: Determinaremos a CIM da anfotericina B e do fluconazol através de fitas Etest (Biomeriux), seguindo as recomendações do fabricante.
