



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PROCESSO SELETIVO – MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
EDITAL Nº 4/ 2018 – TURMA 2019/1

CHAVE DE CORREÇÃO

PROVA ESCRITA PARA AFERIR CAPACIDADE DE LEITURA E COMPREENSÃO
DE TRABALHO CIENTÍFICO ESCRITO EM INGLÊS, REALIZADA EM 17/10/2018

As respostas das questões devem ser dadas em PORTUGUÊS e estar estritamente baseadas nos textos.

Com base no texto extraído do artigo “*Candida tolerates and persists*”, disponível nas páginas 2 e 3, responda as questões de número 1 (um) a 5 (cinco).

CANDIDA TOLERATES AND PERSISTS

Nat Rev Microbiol. 2018 Sep;16(9):520-521. doi: 10.1038/s41579-018-0056-6

Persister cells survive antimicrobial drug treatment without being resistant to the drug; instead they develop tolerance. Persisters are intensely studied in bacteria but less so in other microorganisms. Berman and colleagues have now investigated tolerance in the important human fungal pathogen, *Candida albicans*. Resistant cells can overcome antimicrobial drug treatment through specific mechanisms, such as inactivating the drug or pumping it out of the cell. By contrast, persisters arise through phenotypic heterogeneity, that is, a subpopulation of cells that are otherwise identical to their kin can tolerate the drug, for example by slowing growth, which affects growth-dependent drug targets. Tolerance or ‘trailing growth’ has been previously observed in *Candida* spp., but it was unclear how it related to persistence. Berman and colleagues measured the drug resistance and tolerance of 219 clinical *C. albicans* isolates in disk diffusion assays by quantifying the proportion of cells that grew inside the zone of inhibition around the antifungal drug fluconazole; that proportion ranged from 0.1 to 0.85 between isolates. To identify the mechanisms



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

underlying tolerance, the authors measured intracellular drug levels with a fluorescent azole probe. The average level of tolerance of different isolates correlated inversely with intracellular azole levels. However, how the more tolerant cells achieved lower drug concentrations is unclear, as there was no direct relationship between drug uptake or export and the steady-state azole levels. Next, the authors tested whether they could eliminate the tolerant cells with adjuvants, such as inhibitors of the calmodulin, calcineurin and heat shock protein 90 pathway, when combined with fluconazole. The adjuvants had no effect on drug resistance and on low- tolerance isolates but they reduced the tolerance of all tested isolates that had mid to high tolerance levels, with all adjuvants leading to the death of cells inside the inhibition zone. Notably, the adjuvant fluphenazine improved survival of *Galleria mellonellae* larvae that were infected with *C. albicans* and treated with fluconazole. Furthermore, isolates from patients that had persistent candidemia despite fluconazole treatment had higher tolerance than isolates from patients in which one course of fluconazole had cleared the infection. Taken together, these results show that *C. albicans* can form a subpopulation of drug-tolerant cells, which contribute to persistent infection but which might be tackled with adjuvants.

Responda as questões considerando o texto extraído do artigo científico acima:

QUESTÃO 1

Os microrganismos são capazes de desenvolver diversas estratégias de sobrevivência aos antimicrobianos. A resistência é, sem dúvida, a estratégia mais amplamente estudada e divulgada, mas recentemente, a tolerância e a persistência vem ganhando destaque na literatura científica. Baseado nas informações do texto, diferencie persistência e resistência, indicando os mecanismos que levam à sobrevivência das células em cada condição.

As células persistentes sobrevivem ao tratamento antimicrobiano, sem resistência às drogas, mas desenvolvem tolerância. As células resistentes



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

podem superar o tratamento com drogas antimicrobianas através de mecanismos específicos, tais como a inativação da droga ou efluxo (bombeamento) para fora da célula. Por outro lado, as células persistentes podem surgir através de heterogeneidade fenotípica, isto é, uma determinada subpopulação de células pode tolerar a droga, por exemplo, diminuindo o seu crescimento, o que afeta os alvos de drogas dependentes do crescimento celular.

QUESTÃO 2

Existem diversos métodos para se medir a tolerância dos microrganismos aos antimicrobianos. Explique como a tolerância foi medida nos isolados clínicos de *C. albicans* deste estudo.

Berman e colegas mediram a resistência e a tolerância a droga de 219 isolados clínicos de C. albicans em ensaios de difusão de disco, através da quantificando da proporção de células que cresceram dentro da zona de inibição em torno da droga antifúngica Fluconazol. Essa proporção variou de 0,1 a 0,85 entre diferentes isolados.

QUESTÃO 3

Embora o fenômeno da tolerância seja amplamente conhecido em diversos microrganismos, as vias metabólicas envolvidas no processo não o são na mesma medida. O que os autores conseguiram concluir sobre o mecanismo de tolerância ao fluconazol nos isolados clínicos de *C. albicans* e como chegaram a esta conclusão?

Para identificar os mecanismos subjacentes à tolerância, os autores mediram os níveis intracelulares da droga com uma sonda azolo fluorescente. O nível médio de tolerância de diferentes isolados correlacionaram-se inversamente com os níveis intracelulares da sonda azolo. No entanto, como é que as células mais tolerantes alcançaram menor concentração da droga não é clara, pois não havia relação direta entre a captação (uptake) ou a exportação (export) da droga e os níveis de estado estacionário da sonda azolo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

QUESTÃO 4

Explique como foi avaliado o efeito dos adjuvantes sobre a tolerância de *C. albicans* ao fluconazol, bem como os resultados encontrados *in vitro* e *in vivo*.

*Os autores testaram se poderiam eliminar as células tolerantes com adjuvantes, tais como inibidores do calmodulina, calcineurin e proteína de choque térmico 90, quando combinados com terapia antimicrobiana com fluconazol. Os adjuvantes não tiveram efeito na resistência à droga e nos isolados de baixa tolerância, mas reduziram a tolerância de todos os isolados testados que apresentavam níveis de tolerância média-a-alta, salientando que todos os adjuvantes levaram à morte de células dentro da zona de inibição. O adjuvante flufenazina, utilizado *in vivo*, melhorou a sobrevivência de larvas de *Galleria mellonellae* que foram infectadas com *C. albicans* e tratados com Fluconazol.*

QUESTÃO 5

Considerando que as cepas tolerantes ou persistentes representam uma pequena subpopulação microbiana, sua relevância clínica pode ser questionada. Explique como os autores mostraram a relevância deste fenômeno no contexto clínico, destacando a principal conclusão do estudo.

*Os autores verificaram que isolados de pacientes que tinham candidemia persistentes, apesar do tratamento com Fluconazol, tinham maior tolerância do que isolados de pacientes em que um curso de Fluconazol tinha limpado a infecção. Considerados em conjunto, estes resultados mostram que *C. albicans* pode formar uma subpopulação de células tolerantes a drogas, que contribuem para a infecção persistente, mas que pode ser abordada com maior sucesso em terapia antimicrobiana conjugada com adjuvantes.*



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

Com base no texto extraído do artigo “*Assessment of asymptomatic Plasmodium spp. infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil*”, disponível nas páginas 7 e 8, responda as questões de número **6 (seis) a 10 (dez)**.

ASSESSMENT OF ASYMPTOMATIC PLASMODIUM SPP. INFECTION BY DETECTION OF PARASITE DNA IN RESIDENTS OF AN EXTRA-AMAZONIAN REGION OF BRAZIL.

Malar J 2018, 7:113.

Abstract

Background: The hypotheses put forward to explain the malaria transmission cycle in extra-Amazonian Brazil, an area of very low malaria incidence, are based on either a zoonotic scenario involving simian malaria, or a scenario in which symptomatic carriers play an important role. **Objectives:** To determine the incidence of asymptomatic infection by detecting *Plasmodium* spp. DNA and its role in residual malaria transmission in a non-Amazonian region of Brazil. **Methods:** Upon the report of the first malaria case in 2010 in the Atlantic Forest region of the state of Espírito Santo, inhabitants within a 2 km radius were invited to participate in a follow-up study. After providing signed informed consent forms, inhabitants filled out a questionnaire and gave blood samples for PCR, and thick and thin smears. Follow-up visits were performed every 3 months over a 21-month period, when new samples were collected and information was updated. **Results:** Ninety-two individuals were initially included for follow-up. At the first collection, all of them were clearly asymptomatic. One individual was positive for *Plasmodium vivax*, one for *Plasmodium malariae* and one for both *P. vivax* and *P. malariae*, corresponding to a prevalence of 3.4% (2.3% for each species). During follow-up, four new PCR-positive cases (two for each species) were recorded, corresponding to an incidence of 2.5 infections per 100 person-years or 1.25 infections per 100 person-years for each



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

species. A mathematical transmission model was applied, using a low frequency of human carriers and the vector density in the region, and calculated based on previous studies in the same locality whose results were subjected to a linear regression. This analysis suggests that the transmission chain is unlikely to be based solely on human carriers, regardless of whether they are symptomatic or not.

Conclusion: The low incidence of cases and the low frequency of asymptomatic malaria carriers investigated make it unlikely that the transmission chain in the region is based solely on human hosts, as cases are isolated one from another by hundreds of kilometers and frequently by long periods of time, reinforcing instead the hypothesis of zoonotic transmission.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, Asymptomatic carrier, PCR.

Responda as questões considerando o texto extraído do artigo científico acima:

QUESTÃO 6

No contexto da malária extra-Amazônica de incidência muito baixa, quais são as hipóteses estabelecidas para explicar sua cadeia de transmissão?

Um cenário de zoonose envolvendo a malária simiana ou um cenário no qual portadores assintomáticos desempenham um importante papel.

QUESTÃO 7

De que forma o estudo foi estruturado? Quais foram suas etapas?

Diante da notificação do primeiro caso de malária em 2010 na região de floresta Atlântica do estado do Espírito Santo, habitantes dentro de um raio de dois quilômetros foram convidados a participar de um estudo de acompanhamento. Depois de assinarem termos de consentimento livre e esclarecido, os habitantes preencheram um questionário e permitiram a coleta de sangue para PCR, gotas espessas e esfregaços. Visitas de



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

acompanhamento foram realizadas a cada três meses ao longo de 21 meses, quando novas amostras eram coletadas e a informação era atualizada.

QUESTÃO 8

Quantos indivíduos foram acompanhados e quais foram a incidência e a prevalência encontradas?

*Noventa e dois indivíduos foram inicialmente incluídos no acompanhamento. A prevalência encontrada foi de 3,4%, 2,3% para cada uma das duas espécies identificadas (*Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*). Durante o acompanhamento, quatro novos casos foram identificados pela PCR (dois para cada espécie), correspondendo a uma incidência de 2,5 infecções por 100 pessoas-anos ou 1,25 por 100 pessoas-anos para cada espécie.*

QUESTÃO 9

Qual foi o recurso metodológico utilizado para determinar se tais incidências e prevalências seriam suficientes para manter a transmissão da infecção na região?

Um modelo matemático de transmissão usando uma baixa frequência de portadores humanos assintomáticos e a densidade vetorial na região.

QUESTÃO 10

A qual conclusão chegaram os autores?

A baixa incidência de casos e a baixa frequência de portadores de malária assintomática investigados torna improvável que a cadeia de transmissão na região seja baseada apenas em hospedeiros humanos, já que os casos são isolados uns dos outros por centenas de quilômetros e frequentemente por longos períodos de tempo, reforçando, ao invés, a hipótese de uma transmissão de zoonose.