

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração: Biociências

Cristina Rauen Ribas, BVMedSci, MSc

**Aumento na virulência de *Candida albicans* por
esteroides androgênicos anabolizantes**



Curitiba
2014

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração: Biociências

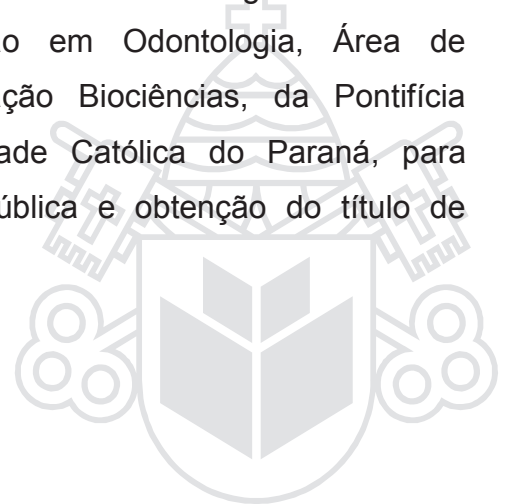
Aumento na virulência de *Candida albicans* por esteroides androgênicos anabolizantes

Increase in *Candida albicans* virulence by androgenic anabolic steroids

Doutoranda: Cristina Rauen Ribas, BVMedSci, MSc

Orientador: Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, BPharm, MSc, PhD

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para defesa pública e obtenção do título de Doutor.



Curitiba
2014

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

R482a Ribas, Cristina Rauen
2014 Aumento na virulência de *Candida albicans* por esteroides androgênicos anabolizantes = Increase in *Candida albicans* virulence by androgenic anabolic steroids / Cristina Rauen Ribas ; orientador; Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. – 2014.
vi, 35 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2014.
Bibliografia: f. 19-26

1. Virulência (Microbiologia). 2. *Candida albicans*. 3. Biofilme. 4. Esteroides anabolizantes. 5. Odontologia. I. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. IV. Título: Increase in *Candida albicans* virulence by androgenic anabolic steroids.

CDD 20. ed. – 617.6

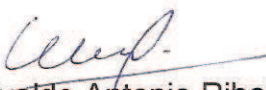
TERMO DE APROVAÇÃO


CRISTINA RAUEN RIBAS


AUMENTO NA VIRULÊNCIA DE CANDIDA ALBICANS POR ESTEROIDES ANDROGÊNICOS ANABOLIZANTES


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.

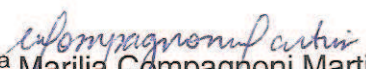
Orientador (a):


Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof^a Dr^a Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof^a Dr^a Ana Maria Trindade Grégio
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR


Prof^a Dr^a Marília Compagnoni Martins
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 04 de abril de 2014.

PERSISTA, RESISTA, MAS, NUNCA..., NUNCA..., DESISTA!

Persista, acreditando em seus Sonhos,
Resista, seguindo-os e sendo fiel a eles,
Mas, nunca, nunca..., deixe-os para trás!
E, Nunca..., Nunca..., Desista de alcançá-los!

POIS, SE DESISTIR,

Estará desistindo de viver!

Estará desistindo de sonhar!

Estará desistindo de SI MESMO!

(Cristina Rauen Ribas)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar-me, abençoar-me, guiar-me e ajudar-me a concluir mais uma etapa da vida e a realizar mais um sonho.

Ao meu marido, Luiz Guilherme por todo amor, incentivo, apoio e paciência.

Aos meus pais, Antonio e Maria Regina, e a minha irmã Beatriz por todo amor, incentivo, compreensão e dedicação.

Ao meu orientador, professor, doutor, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, pela competência, sabedoria, dedicação e amizade.

Aos colegas de doutorado, e a Meire por toda ajuda e colaboração.

A todos os professores que de certa forma incentivaram e contribuíram para a conclusão desse trabalho e para minha formação acadêmica.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão desse trabalho.

Ao meu cachorro, Flash por toda paciência e companheirismo.

Muito Obrigada!

Resumo

A candidose bucal é mencionada como um efeito secundário do abuso de esteroides androgênicos anabolizantes (EAA). Contudo, a interação entre EAA e *Candida albicans* ainda é desconhecida. O objetivo deste estudo foi avaliar se fatores de virulência como formação de biofilme e secreção de proteases são incrementados quando o fungo se encontra em presença de esteroides anabolizantes. Três cepas de *Candida albicans* (ATCC®90028™, SC5314 e 15A2) foram desafiadas a formar biofilme dinâmico em presença de EAA em concentrações fisiológica (6,5 ng.mL⁻¹, para testosterona) ou equivalente-fisiológica (6,5 ng.mL⁻¹, para nandrolona, oximetolona e boldenona), bem como em concentrações suprafisiológicas (65 ng.mL⁻¹ e 650 ng.mL⁻¹), comumente encontradas em fisiculturistas. Os biofilmes tiveram suas biomassas estimadas e a secreção de proteases foi medida. Diferenças entre os tratamentos foram acessadas por comparações múltiplas de Games-Howell. De forma geral, os EAA aumentaram concomitantemente as biomassas e a atividade proteolítica, com características de dose-dependência. Logo, os fatores de virulência avaliados foram incrementados. A associação desses dois fatores pode ser considerada como um efeito colateral danoso, pois aumenta a destruição local dos tecidos e a persistência do fungo.

Palavras-Chave: *Candida albicans*. Biofilmes. Anabolizantes.

Abstract

Oral candidose is mentioned as a secondary effects of androgenic anabolic steroid (AAS) abuse. However, the interaction between AAS and *Candida albicans* is still unknown. The aim of this study was to evaluate whether virulence factors such as biofilm formation and secretion of proteases are increased when the fungus is in the presence of anabolic steroids. Three *Candida albicans* strains (ATCC®90028™, SC5314, and 15A2) were challenged to form dynamic biofilms in presence of AAS in physiological (6.5 ng.mL⁻¹, for testosterone) or equivalent-physiological concentrations (6.5 ng.mL⁻¹, for nandrolone, oxymetholone, and boldenone), as well as in supraphysiological concentrations (65 ng.mL⁻¹ and 650 ng.mL⁻¹), commonly found in bodybuilders. Biofilms had their biomasses and proteases' secretion measured. Differences between treatments were assessed by Games-Howell multiple comparisons test. In a general way, AAS concomitantly increased biomasses and proteolytic activities, with characteristics of dose-dependency. Thus, the virulence factors evaluated were increased. The combination of these two factors can be considered as a deleterious side-effect because it increases the local tissue destruction and fungal persistence.

Key-words: *Candida albicans*. Biofilms. Anabolics Agents.

ÍNDICE

Resumo	v
Abstract	vi
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL & MÉTODOS	12
2.1 Cepas de <i>C. albicans</i>	12
2.2 Compostos esteroides	13
2.3 Adaptação celular	13
2.4 Formação de biofilmes aeróbios em fluxo dinâmico	14
2.5 Quantificações dos fatores de virulência solúveis	14
2.5.1 Proteases	14
2.6 Estimativa da biomassa	15
2.7 Estatística	15
3 RESULTADOS	16
4 DISCUSSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biorreator para Biofilmes sobre Papel (PEBR).....	27
Figura 2.	Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de <i>C. albicans</i> sob influência de testosterona.....	28
Figura 3.	Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de <i>C. albicans</i> sob influência de nandrolona.....	29
Figura 4.	Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de <i>C. albicans</i> sob influência de oximetolona.....	30
Figura 5.	Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de <i>C. albicans</i> sob influência de boldenona.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Cepas de <i>C. albicans</i> empregadas no estudo.....	32
Tabela 2.	AAS empregados no estudo.....	33
Tabela 3.	Relações de ordem para estimativa de biomassa de biofilmes dinâmicos de <i>C. albicans</i> crescidas sob influência de AAS.....	34
Tabela 4.	Relações de ordem para atividade proteásica de biofilmes dinâmicos de <i>C. albicans</i> crescidas sob influência de AAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

EAA	Esteroides androgênicos anabolizantes
DMSO	Dimetilsulfóxido
STM	Meio teste para esteroides
YNB	Yeast Nitrogen Base
BSA	Albumina bovina
MTT	3(4,5 dimetiltiazol – 2- YI) – 2,5 – difeniltetrazolium bromide

1 1 INTRODUÇÃO

2 Os esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) são fármacos amplamente
3 usados de forma ilícita para ganho de massa muscular, aumento de força e redução
4 de gordura corporal. Esses fatores levariam a “melhora” da imagem, com aumento
5 da auto-confiança (1; 2; 3).

6 O abuso entre adultos jovens se mostra maior entre homens. Foi relatado que
7 6% dos homens e 1,4% das mulheres frequentadores de academias de ginástica no
8 Reino Unido faziam uso de EAA (4). Contudo, o abuso entre adolescentes é mais
9 preocupante. Um levantamento conduzido pelo *Youth Risk Behavior Surveillance*
10 *System* mostrou que 3,3% (2,9-3,8%) dos estudantes secundaristas norte-
11 americanos usam/usaram EAA sem prescrição médica (5).

12 No Brasil, o abuso dos EAA apresenta nuances particulares. A admissão de
13 consumo varia de 6,5 a 19% entre os frequentadores de academias de ginástica (6;
14 7; 8; 9), sendo que, entre educadores físicos, tal admissão de consumo sobe para
15 25,57% (10). Ainda, o baixo poder aquisitivo dos fisiculturistas oriundos de bairros
16 populares (11) e de classe média (12) leva ao consumo de esteroides de uso
17 veterinário, muitas vezes contrabandeados de países vizinhos. Tais produtos são
18 mais baratos e pretensiosamente levariam a resultados precoces, se utilizados em
19 concentrações suprafisiológicas.

20 Estudos mostram que a maioria dos usuários relata efeitos colaterais quando
21 do abuso de EAA (13; 14; 15; 16; 17). A candidose bucal é mencionada como um
22 efeito secundário desse abuso (18; 19). A despeito da redução de
23 imunocompetência, a interação entre EAA e *Candida albicans* ainda é desconhecida
24 (20; 21; 22).

1 Fungos apresentam proteínas de ligação à esteroides androgênicos (23; 24;
2 25) e à progesterona ou estradiol (26; 27; 28). Uma vez ligadas, essas moléculas
3 podem promover biotransformações (29), bem como, alterações morfológicas (30) e
4 de virulência (31).

5 É sabido que *Candida albicans* apresenta receptores para esteroides (32; 33)
6 e existem indícios de que tais substâncias modulam sua virulência (30; 32; 34).
7 Enquanto a maioria dos estudos publicados se concentra em estrógenos e
8 correlatos, informações sobre interações entre o fungo e os EAA praticamente
9 inexistem, embora *C. albicans* seja capaz de converter testosterona *de novo* a partir
10 de metabólitos androstenediona e androstenediol encontrados em urina infectada de
11 esportistas (29).

12 A possibilidade de modulação de virulência fúngica por EAA permanece
13 desconhecida. É necessário avaliar se fatores como formação de biofilme, secreção
14 de enzimas histolíticas (proteases, esterases, fosfolipases) e hemolisinas,
15 resistência aos antifúngicos e capacidade de penetração, dentre outros, também são
16 incrementados quando o fungo se encontra em presença de esteroides
17 anabolizantes.

18 O objetivo deste estudo foi avaliar se fatores de virulência como formação de
19 biofilme e secreção de proteases são incrementados quando o fungo se encontra
20 em presença de esteroides anabolizantes.

21

22 **2 MATERIAL & MÉTODOS**

23 **2.1 Cepas de *C. albicans***

24 As cepas empregadas no estudo, bem como suas origens são apresentadas
25 na tabela 1.

1 **2.2 Compostos esteroides**

2 Os EAA empregados neste estudo (tabela 2) foram escolhidos dentre outros,
3 com base na informação existente de que são moléculas muito utilizadas sem
4 prescrição médica (1), principalmente por praticantes de musculação.

5 Soluções-estoque contendo os EAA na concentração de $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram
6 preparadas em DMSO. As concentrações de trabalho utilizadas foram $6,5 \text{ ng.mL}^{-1}$
7 (valor baseado na média aritmética dos valores fisiológicos de testosterona, 35; 36),
8 65 ng.mL^{-1} e 650 ng.mL^{-1} (valores baseados nos níveis de testosterona
9 suprafisiológica encontrados em praticantes de musculação, 37). Não foram
10 consideradas oscilações circadianas. Quando se tratava de testosterona, as
11 concentrações foram denominadas fisiológica ou suprafisiológica ($1\times[\text{fisiol}]$,
12 $10\times[\text{fisiol}]$, ou $100\times[\text{fisiol}]$); quando se tratava dos outros EAA, as concentrações
13 foram denominadas equivalente-fisiológica ou equivalente-suprafisiológica
14 ($1\times[\text{eq.fisiol}]$, $10\times[\text{eq.fisiol}]$, ou $100\times[\text{eq.fisiol}]$).

15 As soluções-estoque de EAA foram diluídas em *Steroid Testing Medium*
16 (STM) composta de YNB (BD Co.), com albumina bovina 0,2% (BSA, Sigma-Aldrich
17 Co.), glucose 2% e Protovit[®]Plus 0,25% (Bayer GmbH). A glucose era diluída em
18 água deionizada e esterilizada em autoclave. YNB, BSA e Protovit[®]Plus eram
19 filtrados em membrana $0,22 \mu\text{m}$ e, então, misturados à solução de glucose. O meio
20 assim preparado foi mantido a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e normóxia (N_2 80%+ O_2 20%), por 24 h, para
21 verificar contaminações. Como controle-negativo foi empregado STM sem adição de
22 esteroides.

23 **2.3 Adaptação celular**

24 As cepas foram crescidas em STM (controle) ou em STM+EAA (grupos
25 experimentais) e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h em normóxia. As células foram

1 colhidas por centrifugação ($5000 \times g$) e lavadas com H₂O deionizada estéril, três
2 vezes. Então, foram resuspendidas em H₂O deionizada estéril até *ca.* 3×10^7
3 células.mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 1,0), e utilizadas imediatamente.

4 **2.4 Formação de biofilmes aeróbios em fluxo dinâmico**

5 Um disco de papel-filtro de 80 mm foi esterilizado em autoclave e seco em
6 estufa. Sobre ele foram dispensados 30 discos estéreis de papel para antibiograma
7 de 0,5 mm (Cefar Diagnóstica Ltda), de forma a cobrir sua periferia, mas sem
8 sobreposição desses discos. Nesses discos de antibiograma foram
9 dispensados 10 µL de suspensões aeróbias padronizadas crescidas em presença de
10 EAA ou controle.

11 Esse conjunto foi inserido em Biorreator para Biofilmes sobre Papel (PEBR,
12 Figura 1) e receberam fluxo contínuo de STM (controle) ou STM+EAA (grupos
13 experimentais), na vazão *ca.* 100 µL.min⁻¹. Os discos foram incubados a 37 °C, por
14 72h.

15 **2.5 Quantificações dos fatores de virulência solúveis**

16 **2.5.1 Proteases**

17 Após o término das incubações, os sistemas foram desmontados e 12 discos
18 contendo biofilmes foram removidos e inseridos verticalmente em microtubos de 1,5
19 mL. Os microtubos foram preenchidos com 800 µL de solução contendo BSA 0,2
20 mg.mL⁻¹, tampão citrato de sódio 10 mM e ácido cítrico 10 mM (pH 5,0), e foram
21 incubados a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Decorrido o tempo de digestão, alíquotas de
22 100µL de sobrenadantes foram combinadas com volumes de 100 µL de solução de
23 Coomassie (Coomassie brilliant blue G-250 0,025%, etanol 11,75%, ácido fosfórico
24 21,25%) em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços. Após 5 min, as

1 densidades ópticas das misturas foram determinadas em 540 nm. Como controles,
2 foram utilizadas repetições de solução de Coomassie com água deionizada (*blank*) e
3 repetições da solução BSA/citrato com solução de Coomassie (*basal concentration*).

4 Uma unidade enzimática foi arbitrariamente determinada como sendo a
5 quantidade de enzima capaz de promover a digestão de um micrograma de BSA,
6 por mililitro, por minuto. Unidades de atividade proteolítica pela absorbância da
7 redução de MTT (abaixo) foram tomadas como atividade proteolítica específica.

8 **2.6 Estimativa da biomassa**

9 Após o término da incubação, com os sistemas desmontados, outros 12
10 discos foram removidos e inseridos verticalmente em microplaca fundo U de 96
11 poços. Os poços foram preenchidos com 100 μL de MTT 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a cada poço-
12 teste, assim como aos poços-controle, que continham discos estéreis sem biofilme
13 (38). As placas foram incubadas no escuro, a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Após a
14 incubação, o MTT não reativo foi drenado por aspiração e 200 μL de álcool
15 isopropílico foram acrescentados. Passados 5 min, 100 μL do sobrenadante foram
16 transferidos para microplacas de fundo chato de 96 poços e as alterações de cor
17 foram medidas em 540 nm.

18 **2.7 Estatística**

19 Todos os testes acima descritos foram conduzidos com 30 repetições. Os
20 dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição e submetidos aos
21 testes estatísticos apropriados. As diferenças foram acessadas após análise por
22 ANOVA, seguida de comparações múltiplas de Games-Howell, com intervalo de
23 confiança de 95% e $p < 0,05$. Foi empregado o pacote estatístico SPSS 20.0 (IBM
24 Co.).

25

1 3 RESULTADOS

2 Os resultados obtidos a partir das leituras permitiram a construção de
3 diagramas cartesianos que situam as diferentes possibilidades em uma dispersão de
4 biomassa vs atividade proteolítica. A distribuição espacial das médias dos
5 tratamentos permitiu obter consensos para estimativa de biomassa do biofilme e
6 para atividade proteolítica.

7 Esses consensos foram estabelecidos com base na relação de ordem
8 crescente de valores para cada cepa e para a média da somatória de todas as
9 cepas ($\bar{\Sigma}$), para cada fármaco estudado. Assim, a partir das relações de ordem
10 definidas pelas leituras, foi determinado o consenso geral, onde cada coluna foi
11 avaliada quanto ao tratamento com maior número de repetições, seguida de
12 diferenças ou similaridades, também com maior número de repetições e, assim
13 sucessivamente até o término dos tratamentos para todos os fármacos testados. No
14 caso de empate de colunas em relação ao tratamento ou às diferenças ou
15 similaridades, a próxima coluna era utilizada como critério de desempate, levando
16 em conta sempre o maior número de repetições presentes na coluna e aplicando o
17 princípio de parcimônia quanto à quantidade e ordem dos tratamentos nas
18 respectivas colunas (Tabela 3 e 4).

19 Foi observado que concentrações mais elevadas de testosterona promovem
20 incrementos na atividade proteolítica das diferentes cepas, o que reflete na média
21 geral (Figura 2). Os consensos permitiram observar que, em termos de biomassa, a
22 concentração 100×[fisiol] foi inferior a 10×[fisiol] (Tabela 3) e que, para atividade
23 proteásica esse quadro se revertia (Tabela 4).

24 De modo geral, os diferentes tratamentos com nandrolona incrementaram a
25 atividade proteásica de forma dose-dependente (Figura 3). Os consensos obtidos

1 foram ctrl < 1×[eq.fisiol] < 100×[eq.fisiol] < 10×[eq.fisiol], para biomassa e ctrl <
2 1×[eq.fisiol] ≤ 10×[eq.fisiol] < 100×[eq.fisiol], para atividade proteásica.

3 A oximetolona também induziu aumentos significativos na atividade
4 proteásica; contudo, diferente dos EAA anteriores, houve uma tendência à redução
5 das biomassas dos biofilmes, principalmente na concentração 100×[eq.fisiol] (Figura
6 4). No entanto, essa redução na biomassa, não refletiu em reduções nos valores de
7 atividade proteásica específica, que, pelo contrário, tenderam a ser aumentados. A
8 oximetolona tendeu a promover maior incremento da secreção de proteases em
9 concentrações 1×[eq.fisiol] e 100×[eq.fisiol]; diferente dos EAA anteriores. A
10 redução na biomassa levou a obtenção de um consenso de relação de ordem
11 100×[eq.fisiol] < 1×[eq.fisiol] < 10×[eq.fisiol] < ctrl. Quanto à atividade proteásica, a
12 relação de ordem foi ctrl < 10×[eq.fisiol] < 1×[eq.fisiol] < 100×[eq.fisiol].

13 A boldenona promoveu aumentos proporcionais de biomassa e atividade
14 proteásica no controle e nos tratamentos 1×[eq.fisiol] e 10×[eq.fisiol] (Figura 5).
15 Entretanto, na concentração 100×[eq.fisiol] apresentou um grande incremento na
16 secreção de proteases. Os consensos apresentaram relação ordem dose-
17 dependente para estimativa de biomassa e para atividade proteolítica de maneira
18 muito mais pronunciada que para os demais EAA.

19 Para obter uma visão geral acerca da influência dos EAA na virulência
20 mediada pelos fatores aqui analisados, foram extraídos seus respectivos consensos
21 (Tabelas 3 e 4, Consensos Gerais). A biomassa geral mostrou uma relação de
22 ordem ctrl < 1×[eq.fisiol] < 100×[eq.fisiol] < 10×[eq.fisiol]. A relação de ordem para
23 atividade proteásica geral foi ctrl ≤ 1×[eq.fisiol] < 10×[eq.fisiol] < 100×[eq.fisiol].

24

25 4 DISCUSSÃO

1 Este estudo não prospectou vias de transdução de sinal, tampouco genes
2 envolvidos no aumento de virulência. Contudo, o mesmo é pioneiro na investigação
3 de possibilidade de incremento de fatores de virulência em *C. albicans* induzido por
4 EAA, tão empregados ilicitamente. Este estudo verificou que os fatores de virulência
5 como formação de biomassa e secreção de proteases são incrementados quando *C.*
6 *albicans* se encontra na presença de anabolizantes.

7 Como regra geral, os EAA aumentaram a biomassa dos biofilmes para todas
8 as concentrações testadas. Nesse contexto, (18) obtiveram que praticantes de
9 fisiculturismo usuários de EAA apresentaram maior carga fúngica subgengival que
10 não usuários, independentemente da competência imune dos indivíduos dos dois
11 grupos. Ainda, a manutenção da viabilidade de *C. albicans* exposta aos esteroides
12 androgênicos é mantida mesmo em doses muito superiores àquelas utilizadas neste
13 estudo (39).

14 A oximetolona, no entanto, reduziu a biomassa dos biofilmes. Hipotetizamos
15 que características relacionadas à estrutura molecular da oximetolona possam estar
16 envolvidas na diversidade de resultados encontrada.

17 Os aumentos na formação de biofilmes de *C. albicans* verificados no presente
18 estudo são preocupantes, pois é sabido que esses secretam, proporcionalmente,
19 mais proteases que células planctônicas livres não provenientes de biofilme (40) e
20 que o potencial de agressividade do fungo em biofilme é uma característica que
21 passa a ser mantida mesmo após a dissociação de suas células para a fase
22 planctônica (41; 42; 43; 44).

23 Os consensos obtidos revelaram a existência de uma tendência dose-
24 dependente na expressão da virulência associada à secreção de proteases. A

1 agressividade de *C. albicans* mediada por essas enzimas é bem conhecida (45; 46;
2 47; 48; 49; 50), principalmente no desenvolvimento de infecções ativas (51; 52).

3 O mecanismo pelo qual os EAA promovem elevações na secreção de
4 proteases permanece incerto. Provavelmente, de forma semelhante ao que ocorre
5 com progesterona (34), o estresse causado pela exposição a concentrações supra-
6 fisiológicas leva à co-expressão de genes controlados por fatores de transcrição
7 como *EFG1*, *CPH1*, *TUP1* ou outros.

8 Em suma, os EAA aumentaram concomitantemente as biomassas e a
9 atividade proteolítica, com características de dose-dependência. A associação
10 desses dois fatores pode ser considerada preocupante ou até mesmo um efeito
11 colateral danoso nos usuários, pois aumenta a possibilidade de destruição local (53)
12 e a persistência do fungo (54; 48) nos tecidos infectados.

13

14 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 15 1. Cohen J, Collins R, Darkes J, Gwartney D. A league of their own: demographics,
16 motivations and patterns of use of 1,955 male adult non-medical anabolic steroid
17 users in the United States. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007; 4:12.
- 18 2. Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG Jr. Issues for DSM-V:
19 clarifying the diagnostic criteria for anabolic-androgenic steroid dependence. *Am*
20 *J Psychiatry.* 2009; 166(6):642-5.
- 21 3. Kanayama G, Hudson JI, Pope HG Jr. Illicit anabolic-androgenic steroid use.
22 *Horm Behav.* 2010; 58(1):111-21.
- 23 4. Korkia P, Stimson GV. Indications of prevalence, practice and effects of anabolic
24 steroid use in Great Britain. *Int J Sports Med.* 1997; 18(7):557-62.

- 1 5. Eaton DK, Kann L, Kinchen S, Shanklin S, Ross J, Hawkins J, Harris WA, Lowry
2 R, McManus T, Chyen D, Lim C, Whittle L, Brener ND, Wechsler H, Centers for
3 Disease Control and Prevention. (2010). Youth risk behavior surveillance - United
4 States, 2009. *MMWR Surveill Summ.* 2010; 59(5):1-142.
- 5 6. Araujo LR, Andreolo J, Silva MS. Utilização de suplemento alimentar e
6 anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. *Rev*
7 *Bras Ciênc Mov.* 2002; 10(3):13-18.
- 8 7. Franco-Silva LSM, Moreau RLM. Uso de esteroides anabólicos androgênicos por
9 praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev*
10 *Bras Cienc Farm.* 2003; 39(3):327-333.
- 11 8. Frizon F, Macedo SMD, Yonamine M. Uso de esteroides andrógenos anabólicos
12 por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo
13 Fundo/RS. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2005; 26(3): 227-232.
- 14 9. Silva PRP, Machado Jr LC, Figueiredo VC, Cioffi AP, Prestes MC, Czepielewski
15 MA. Prevalence of the use of anabolic agents among strength training
16 apprentices in Porto Alegre, RS. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(1):104-
17 110.
- 18 10. Palma A, Assis M. Uso de esteroides anabólico-androgênicos e aceleradores
19 metabólicos entre professores de educação física que atuam em academias de
20 ginástica. *Rev Bras Cienc Esporte.* 2005; 27(1):75-92.
- 21 11. Iriart JAB, Matos de Andrade T. Musculação, uso de esteroides anabolizantes e
22 percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador,
23 Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2002; 18(5):1379-1387.

- 1 12. Iriart JAB, Chaves JC, Ghignone de Orleans R. Culto ao corpo e uso de
2 anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cad Saúde Pública*. 2009;
3 25(4):773-782.
- 4 13. Parkinson AB, Evans NA. Anabolic Androgenic steroids: a survey of 500 users.
5 *Med. Sci. Sports Exerc*. 2006; 38(4):644-51.
- 6 14. Nogueira FRS, Souza AA, Brito AF. Prevalência do uso e efeitos de recursos
7 ergogênicos por praticantes de musculação nas academias brasileiras: uma
8 revisão sistematizada. *Rev. Bras. Ativ. Fis. e Saúde*. 2013; 18(1):16-30.
- 9 15. Shimada Y, Yoritaka A, Tanaka Y, Miyamoto N, Ueno Y, Hattori N, Takao U.
10 Cerebral infarction in a young man using high-dose anabolic steroids. *J. Stroke*.
11 *Cerebrovasc. Dis*. 2012; 21(8):906.e9-11.
- 12 16. Lima AP, Cardoso FB. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da
13 utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. *Rev Bras Ciên Saúde -*
14 *RBCS*. 2011; 9(29):39-46.
- 15 17. Vanberg P, Atar D. Androgenic anabolic steroid abuse and the cardiovascular
16 system. *Handb. Exp. Pharmacol*. 2010; (195):411-57.
- 17 18. Brusca MI, Verdugo F, Amighini C, Albaina O, Moraques MD. Anabolic steroids
18 affect human periodontal health and microbiota. *Clin. Oral Investig*. 2013 nov 13.
19 PMID: 24221579.
- 20 19. Rich JD, Dickinson BP, Feller A, Pugatch D, Mylonakis E. The infectious
21 complications of anabolic-androgenic steroid injection. *Int. J. Sports Med*. 1999;
22 20:563-6.
- 23 20. Bauer A, Rataj F, Zierau O, Anielski P, Grobe J, Parr MK, Vollmer G, Thieme D.
24 Characterization of identity, metabolism and androgenic activity of 17-

- 1 hydroxyandrosta-3, 5-diene by GC-MS and a yeast transactivation system. *Arch*
2 *Toxicol.* 2012; 86(12):1873-84.
- 3 21. Khan NT, Bibi M, Yousuf S, Qureshi IH, Rahman AU, Al-Majid AM, Mesaik MA,
4 Khalid AS, Sattar SA, Wahab AT, Choudhary MI. Synthesis of some potent
5 immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of
6 anabolic steroid oxymetholone. *Chem Cent J.* 2012;6:153-11.
- 7 22. Wolf S, Diel P, Parr MK, Rataj F, Schänzer W, Vollmer G, Zierau O. Long-term
8 detection of methyltestosterone (ab-) use by a yeast transactivation system. *Arch*
9 *Toxicol.* 2011; 85(4):285-92.
- 10 23. Zakelj-Mavric M, Kastelic-Suhadolc T, Plemenitas A, Rizner TL, Belic I. Steroid
11 hormone signalling system and fungi. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol*
12 *Biol.* 1995;112(4):637-42.
- 13 24. Kastelic-Suhadolc T, Plemenitas A, Zigon D. Isolation and identification of
14 testosterone and androstenedione in the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Steroids.*
15 1994; 59(6):357-61.
- 16 25. Kastelic-Suhadolc T, Lenasi H. Androgen binding proteins in *Cochliobolus*
17 *lunatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993; 108(1):121-5.
- 18 26. Das M, Datta A. Steroid binding protein(s) in yeasts. *Biochem* 1985; 11:171–176.
- 19 27. Madani, ND, Malloy PJ, Rodriguez-Pombo P, Krishnan AV, Feldman D. *Candida*
20 *albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is
21 inhibited by estradiol. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:922–926.
- 22 28. Malloy PJ, Zhao X, Madani ND, Feldman D. Cloning and expression of the gene
23 from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein.
24 *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:1902–1906.

- 1 29. Kicman AT, Fallon JK, Cowan DA, Walker C, Easmon S, Mackintosh D. *Candida*
2 *albicans* in urine can produce testosterone: impact on the
3 testosterone/epitestosterone sports drug test. *Clin Chem.* 2002; 48(10):1799-
4 801.
- 5 30. White S, Larsen B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen.
6 *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53:744-9.
- 7 31. McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, Smith JM, Ory JJ.
8 The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*
9 infections. *Plos One.* 2013; 8(5):e63632.
- 10 32. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. Cellular and molecular biology of *Candida*
11 *albicans* estrogen response. *Eukaryot Cell.* 2006; 5(1):180-91.
- 12 33. Chelikani V, Rawson FJ, Downard AJ, Gooneratne R, Kunze G, Pasco N,
13 Baronian KH. Electrochemical detection of oestrogen binding protein interaction
14 with oestrogen in *Candida albicans* cell lysate. *Biosens Bioelectron.* 2011;
15 26:3737-41.
- 16 34. Banerjee D, Martin N, Nandi S, Shukla S, Dominguez A, Mukhopadhyay G,
17 Prasad R. A genome-wide steroid response study of the major human fungal
18 pathogen *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2007; 164:1–17.
- 19 35. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the male reproductive tract. In: Larson PR,
20 Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, eds. *William's textbook of*
21 *endocrinology.* 10th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2002; 709–770.
- 22 36. Bradley DA. Male reproductive endocrinology and related disorders. In: Porter
23 RS, Kaplan JL (Eds.). *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy.* 19th ed.
24 Railway, NJ: Merck Research Laboratories. 2011; 684-4.

- 1 37. Hassan NA, Salem MF, Sayed MA. Doping and effects of anabolic androgenic
2 steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic
3 assessment in strength athletes. *Hum Exp Toxicol*. 2009; 28(5):273-83.
- 4 38. Gobor T, Corol G, Ferreira LE, Rymovicz AU, Rosa RT, Campelo PM, Rosa EA.
5 Proposal of protocols using D-glutamine to optimize the 2,3-bis(2-methoxy-4-
6 nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT)
7 assay for indirect estimation of microbial loads in biofilms of medical importance.
8 *J Microbiol Methods*. 2011; 84(2):299-306.
- 9 39. Brasch J. In vitro susceptibility of *Pityrosporum ovale* (*Malassezia furfur*) to
10 human androgenic steroids. *Mycopathologia*. 1993; 123(2):99-104.
- 11 40. Mendes A, Mores AU, Carvalho AP, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA.
12 *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl proteases than the
13 planktonic cells. *Biol. Pharm. Bull*. 2007; 30(9):1813-5.
- 14 41. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A model Organism for
15 studying fungal pathogens. *ISRN Microbiol*. 2012; 2012:538694.
- 16 42. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr. Opin.*
17 *Microbiol*. 2011; 14(4):380-5.
- 18 43. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida*
19 *albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ*
20 *Microbiol*. 2002; 68:5459-63.
- 21 44. Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans*
22 biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998; 42(8):1900-
23 1905.

- 1 45. Santos ALS, Braga-Silva LA. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs
2 against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem*.
3 2013; 13: 155-162.
- 4 46. Pietrella D, Rachini A, Pandey N, Schild L, Netea M, Bistoni F, Hube B,
5 Vecchiarelli A. The Inflammatory response induced by aspartic proteases of
6 *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun*. 2010;
7 78(11):4754-62.
- 8 47. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence
9 factors of *C. albicans*. *Mycoses*. 2005; 48(6):365-77.
- 10 48. Naglik, J. R., S. J. Challacombe, and B. Hube. *Candida albicans* secreted
11 aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*
12 2003; 67(3):400–428.
- 13 49. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown AJ, Gow
14 NA. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2,
15 and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun*. 1997;
16 65(9):3529-38.
- 17 50. Staib, F. Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol.*
18 *Mycol. Appl*. 1969; 37(4): 345-8.
- 19 51. Santos, A.L.S. Aspartic proteases of human pathogenic fungi are prospective
20 targets for the generation of novel and effective antifungal inhibitors. *Curr. Enz.*
21 *Inhib.*, 2011; 7:96-118.
- 22 52. Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted
23 proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol*. 2002; 292(5-6):405-19.
- 24 53. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal
25 tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation,

- 1 mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect. Immun.*
2 2007; 75(5):2126-35.
- 3 54. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ.
4 *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural
5 antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 2013;
6 62(1):10-24.
- 7 55. Thien ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of
8 *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and
9 anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(8):761-7.
- 10 56. Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, José da Silva W, Yau JY,
11 Samaranayake LP. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some
12 virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008; 10:1277-81.

Figuras

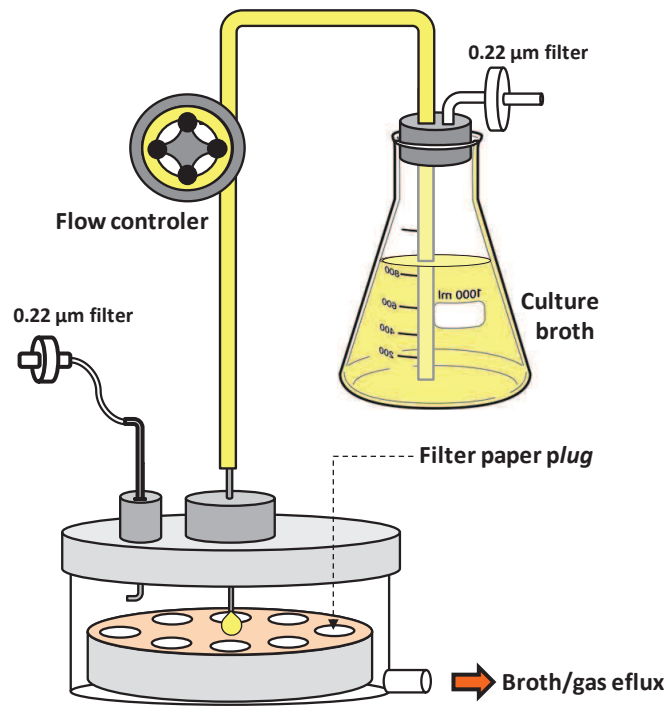


Figura 1. Biorreactor para Biofilmes sobre Papel (PEBR).

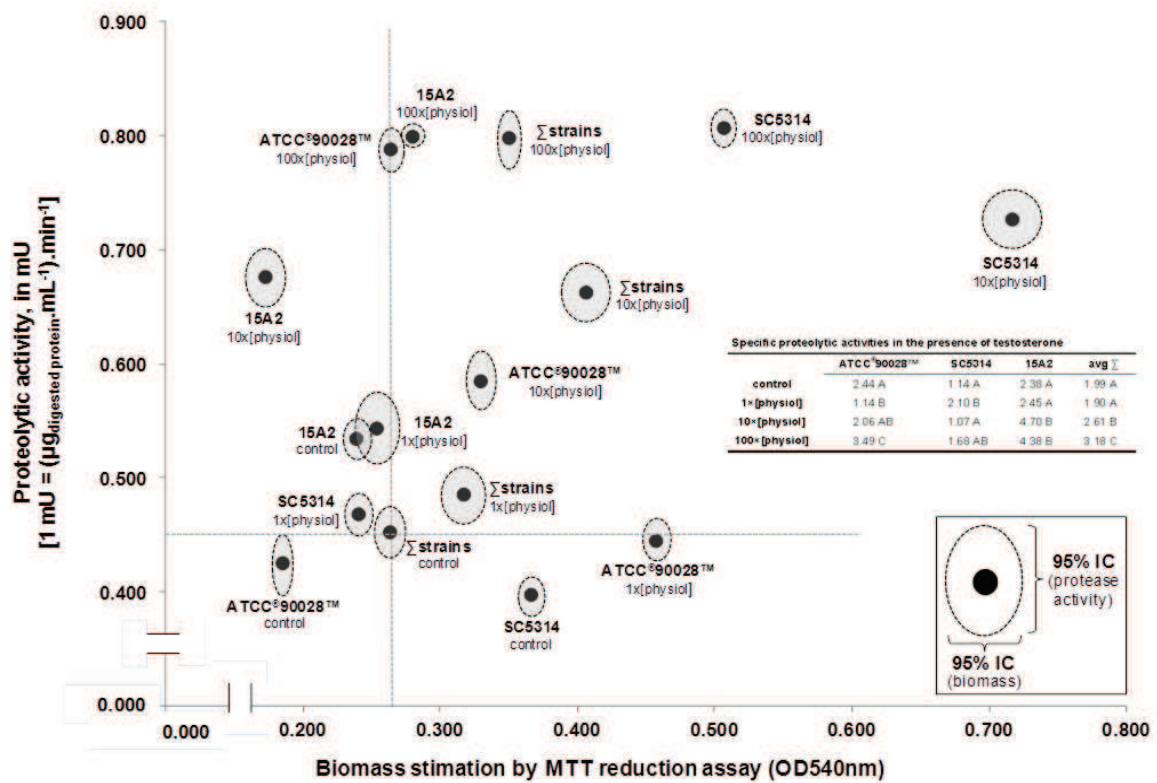


Figura 2. Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de *C. albicans* sob influência de testosterona.

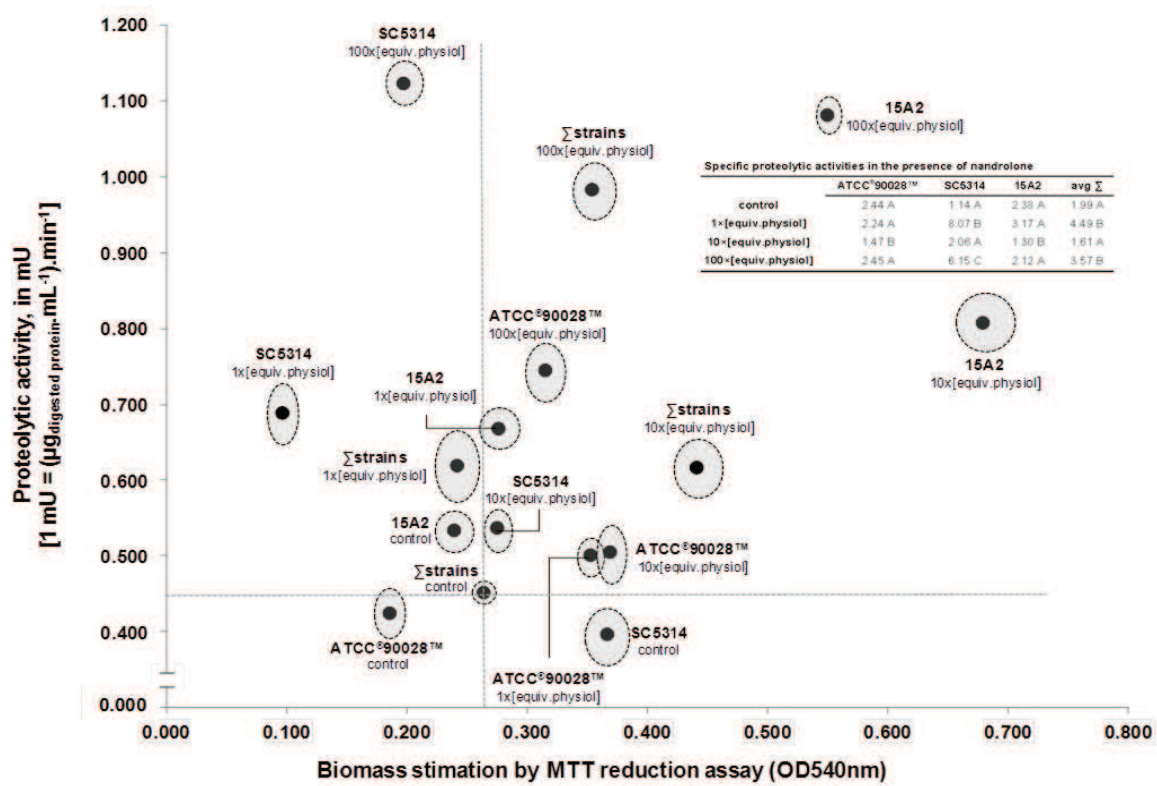


Figura 3. Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de *C. albicans* sob influência de nandrolona.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

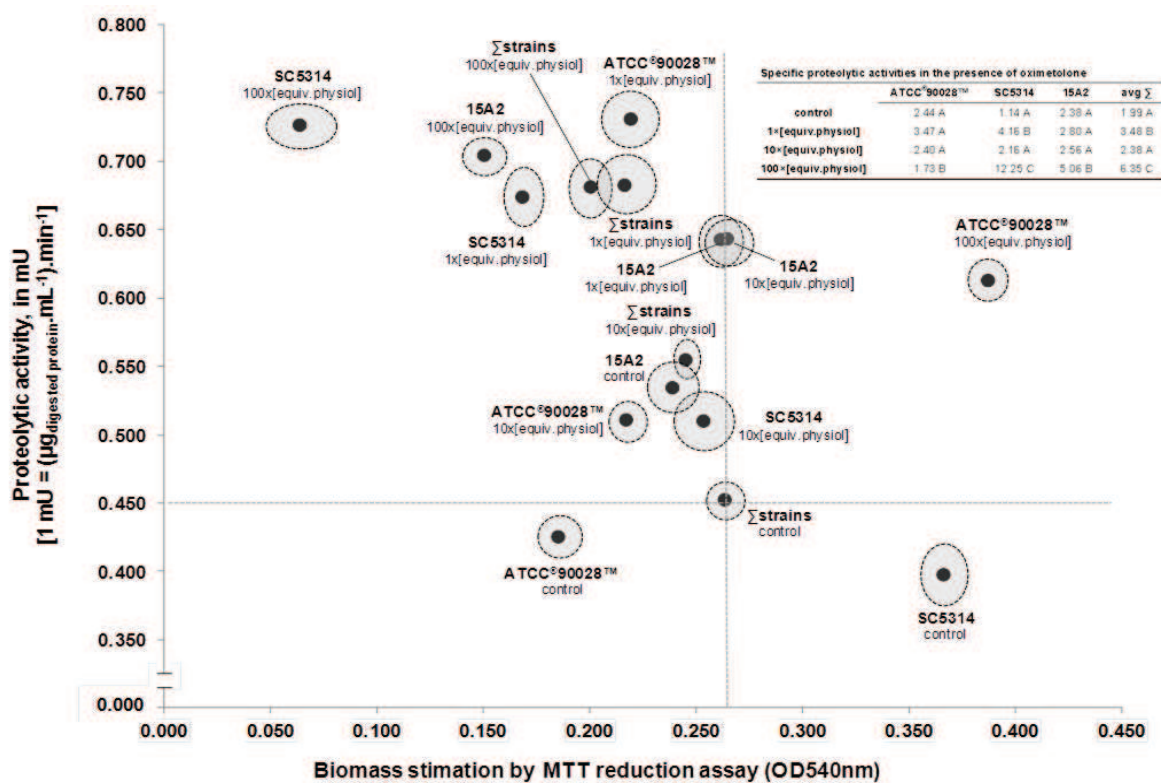


Figura 4. Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de *C. albicans* sob influência de oximetolona.

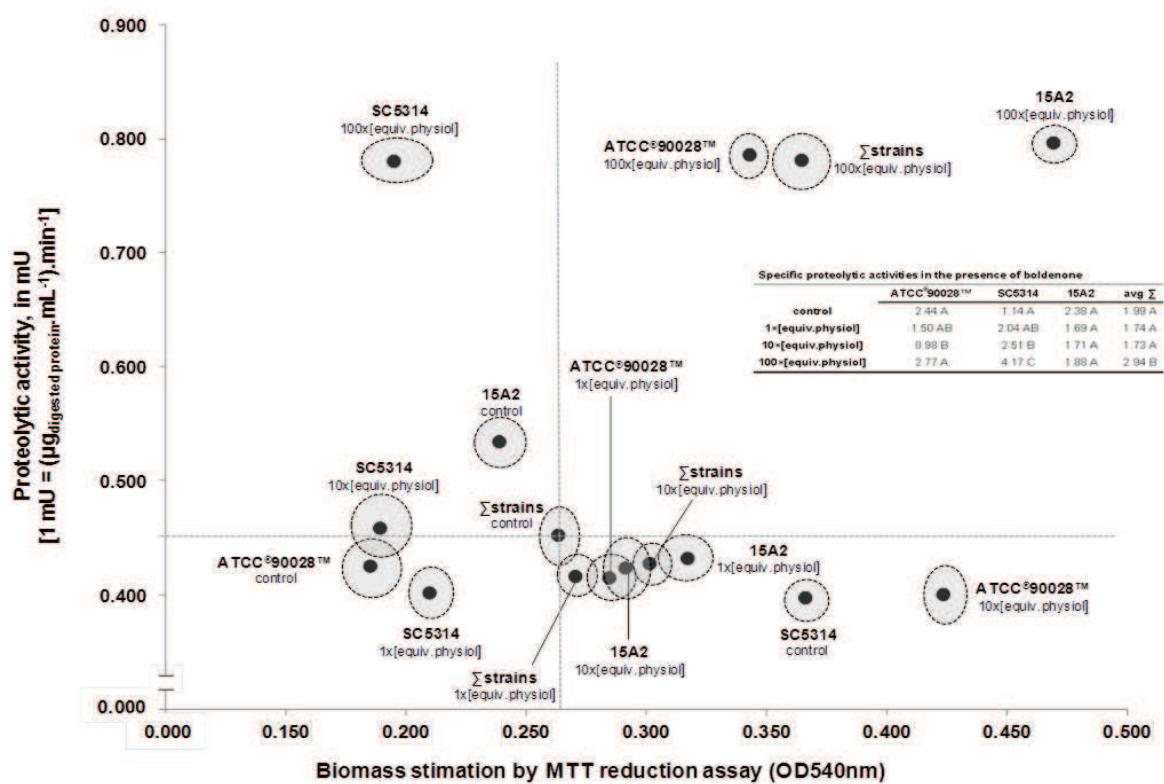


Figura 5. Diagrama cartesiano da dispersão de biomassa vs atividade proteolítica de *C. albicans* sob influência de boldenona.

Tabelas

Tabela 1. Cepas de *C. albicans* empregadas no estudo

Cepas	Origem	Citação
ATCC® 90028™ SC5314	<ul style="list-style-type: none">• Cepas referência	55
15A2	<ul style="list-style-type: none">• Bolsa periodontal com profundidade ≥ 3,00 mm	56

Tabela 2. AAS empregados no estudo (1)

Grupo experimental	Princípio Ativo	Número CAS	Nome comercial	Fabricante	
AAS#1	Multiésteres de testosterona	• Propionato de testosterona	57-85-2	Durateston®	Merck & Co, Inc
		• Fenilpropionato de testosterona	1255-49-8		
		• Isocaproato de testosterona	15262-86-9		
		• Caproato de testosterona	5721-91-5		
AAS#2	Decanoato de nandrolona	360-70-3	Deca-Durabolin®	Merck & Co, Inc	
AAS#3	Oximetolona	434-07-1	Hemogenin®	Sanofi-Aventis Farm. Ltda	
AAS#4	Undecilenato de boldenona	846-48-0	Equipoise®	Pfizer Ltda	

Tabela 3. Relações de ordem para estimativa de biomassa de biofilmes dinâmicos de *C. albicans* crescidos sob influência de AAS.

AAS	Cepa	Relação de ordem						
Testosterona	ATCC®90028™	Ctrl	<	100×[physiol]	<	10×[physiol]	<	1×[physiol]
	SC5314	1×[physiol]	<	Ctrl	<	100×[physiol]	<	10×[physiol]
	15A2	10×[physiol]	<	Ctrl	=	1×[physiol]	<	100×[physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	<	1×[physiol]	<	100×[physiol]	<	10×[physiol]
	*Consenso 1	Ctrl	<	1×[physiol]	<	100×[physiol]	<	10×[physiol]
Nandrolona	ATCC®90028™	Ctrl	<	100×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]
	SC5314	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	Ctrl
	15A2	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	1×[equiv.physiol]	=	Ctrl	<	100×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]
	*Consenso 2	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]
Oximetolona	ATCC®90028™	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	SC5314	100×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	Ctrl
	15A2	100×[equiv.physiol]	<	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	100×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	Ctrl
	Consenso 3	100×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	Ctrl
Boldenona	ATCC®90028™	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]
	SC5314	10×[equiv.physiol]	=	100×[equiv.physiol]	=	1×[equiv.physiol]	<	Ctrl
	15A2	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	=	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	Consenso 4	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
*Consenso Geral		Ctrl	<	1×[physiol/equiv]	<	100×[physiol/equiv]	<	10×[physiol/equiv]

As diferenças foram obtidas após análise por comparações múltiplas de Games-Howell, com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$. (*) demonstra a similaridade entre os consensos de AAS diferentes e o consenso geral.

Tabela 4. Relações de ordem para atividade proteásica de biofilmes dinâmicos de *C. albicans* crescidos sob influência de AAS.

AAS	Cepa	Relação de ordem						
Testosterona	ATCC®90028™	Ctrl	=	1×[physiol]	<	10×[physiol]	<	100×[physiol]
	SC5314	Ctrl	<	1×[physiol]	<	10×[physiol]	<	100×[physiol]
	15A2	Ctrl	=	1×[physiol]	<	10×[physiol]	<	100×[physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	=	1×[physiol]	<	10×[physiol]	<	100×[physiol]
	*Consenso 1	Ctrl	=	1×[physiol]	<	10×[physiol]	<	100×[physiol]
Nandrolona	ATCC®90028™	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	SC5314	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	15A2	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	Consenso 2	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	≤	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
Oximetolona	ATCC®90028™	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]
	SC5314	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	15A2	Ctrl	<	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	=	100×[equiv.physiol]
	Consenso 3	Ctrl	<	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
Boldenona	ATCC®90028™	Ctrl	=	10×[equiv.physiol]	<	1×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	SC5314	Ctrl	=	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	15A2	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	Ctrl	<	100×[equiv.physiol]
	$\bar{\Sigma}$	Ctrl	=	1×[equiv.physiol]	=	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
	*Consenso 4	Ctrl	=	1×[equiv.physiol]	<	10×[equiv.physiol]	<	100×[equiv.physiol]
Consenso Geral		Ctrl	≤	1×[physiol/equiv]	<	10×[physiol/equiv]	<	100×[physiol/equiv]

As diferenças foram obtidas após análise por comparações múltiplas de Games-Howell, com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$. (*) demonstra a similaridade entre os consensos de AAS diferentes.