

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAIARA CHAVES SILVA

**ANÁLISE DE ASPARTATO PROTEASE (SAP) COMO
FATOR ASSOCIADO À VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE
Candida albicans E *Candida não-albicans***

ALFENAS-MG

2013

NAIARA CHAVES SILVA

**ANÁLISE DE ASPARTATO PROTEASE (SAP) COMO
FATOR ASSOCIADO À VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE
Candida albicans E *Candida não-albicans***

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Prof. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias.

**ALFENAS-MG
2013**

Silva, Naiara Chaves.

Análise de aspartato protease (sap) como fator associado à virulência de linhagens de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*. / Naiara Chaves Silva. - 2013.

102 f. -

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Fatores de Virulência. 2. *Candida albicans*. 3. Aspartil Proteases. 4. Proteólise. 5. Antifúngicos. I. Dias, Amanda Latercia Tranches. II. Título.

CDD: 579

NAIARA CHAVES SILVA

**ANÁLISE DE ASPARTATO PROTEASE (SAP) COMO
FATOR ASSOCIADO À VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE
Candida albicans E *Candida não-albicans***

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.


Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Prof. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias.

Aprovada em:

Prof^a Dr^a Amanda Latercia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof Dr. Ériques Gonçalves da Silva

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: 

Prof^a Dr^a Marília Caixeta Franco Ariosa

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, irmãos, esposo e amigos que sempre me deram forças e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todas as decisões que tomei para que pudesse alcançar meus objetivos, que me deu força e sabedoria para enfrentar a caminhada e possibilitou que eu chegasse até aqui;

Aos meus pais, irmãos, minha família, que mesmo distante, sempre me incentivaram e indicaram o caminho para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje e serei sempre, se Deus quiser;

À minha orientadora Amanda Latercia Tranches Dias, agradecimento especial pela oportunidade, compreensão, incentivo, dedicação, ensinamentos e, sobretudo pela paciência;

A equipe de técnicos e funcionários do laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG, que me ajudaram muito no dia-dia laboratorial;

Aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para o enriquecimento deste trabalho oferecendo seus conhecimentos em pesquisa;

Aos colegas pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais;

A CAPES e a Fapemig pelo fomento;

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Candida spp. se tornaram, nas últimas décadas, importantes agentes causadores de infecções invasivas, responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade. Acredita-se que a aspartato protease secretada (Sap) seja um fator diretamente associado aos processos infecciosos exercendo papel determinante na patogenicidade de *Candida* spp. e que a exposição a concentrações subinibitórias de antifúngicos, pode aumentar a produção de Sap e selecionar isolados resistentes. Analisaram-se isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* oriundos de casos de infecção hospitalar. Avaliou-se o perfil proteico destes isolados por eletroforese SDS-PAGE. Avaliou-se, também, o perfil de sensibilidade dos isolados frente a antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos (fluconazol e anfotericina B) e a antifúngicos mais novos que ainda não fazem parte das rotinas hospitalares (voriconazol e caspofungina). Determinou-se a atividade proteolítica qualitativa e quantitativa de Sap e atividade metabólica de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* cultivados na presença e ausência de concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B. Estabeleceu-se a correlação entre os testes e por fim, avaliou-se a expressão do gene SAP2 em *C. albicans* ATCC 64548 e *C. krusei* ATCC 6258. 100% dos isolados foram sensíveis a anfotericina B, voriconazol e caspofungina e 89,9% a fluconazol. Dois isolados (7,4%) apresentaram sensibilidade dependente da dose e um (3,7%) apresentou resistência ao fluconazol. Na análise qualitativa da atividade proteolítica, 77,7% dos isolados apresentaram atividade. A maioria dos isolados de *C. albicans* (50%) e *Candida* não-*albicans* (32%) apresentou atividade proteolítica moderada. A adição de fluconazol ao cultivo não promoveu alterações significativas na atividade proteolítica dos isolados padrões, enquanto anfotericina B inibiu o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* ATCC 6258. Na análise quantitativa, todos os isolados se apresentaram ativos, sendo que a maior atividade foi observada em *Candida* complexo “*psilosis*” 210 (100%) e a menor em *C. albicans* 257 (2,44%). A maioria dos isolados de *C. albicans* (50%) foi classificada como fracamente proteolítica, enquanto *Candida* não-*albicans* (53%) como moderadamente proteolítica. A presença de antifúngicos no cultivo alterou significativamente o percentual de degradação da maioria dos isolados. A maior diferença de percentual foi observada em *C. lusitanae* 286, que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC₉₀ de anfotericina B aumentou 13,7x em relação à ausência do fármaco. O método quantitativo de determinação da atividade proteolítica apresentou maior sensibilidade. 63% dos isolados de *C. albicans* apresentaram alta atividade metabólica e 68% de *Candida* não-*albicans*, atividade moderada. A maior atividade metabólica foi observada em *C. albicans* 120 (61,72%) e a menor em *C. krusei* ATCC 6258 (2,35%). A atividade metabólica da maioria dos isolados foi significativamente alterada. A maior diferença de percentual foi observada em *Candida* complexo “*psilosis*” 210, que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC₅₀ de fluconazol apresentou redução de 8x na atividade metabólica em relação à ausência do fármaco. Houve expressão de SAP2 apenas em *C. albicans* ATCC 64548, que foi reduzida significativamente na presença de $\frac{1}{4}$ da IC₉₀ de anfotericina B. A atividade de Sap pode ser considerada um fator potencial associado à virulência, uma vez que o isolado que apresentou a maior atividade apresentou sensibilidade antifúngica reduzida.

Palavras-chave: Fatores de virulência, *Candida albicans*, Aspartil proteases, Proteólise, Antifúngicos.

ABSTRACT

Candida spp. has become in recent decades, major causative agents of invasive infections, responsible for high rates of mortality and morbidity. It is believed that the secreted aspartate protease (Sap) is a factor directly associated with infection exerting decisive role in the pathogenicity of *Candida* spp. and that the exposure to subinhibitory concentrations of antifungals may increase the production of Sap and to select resistant isolates. We analyzed isolates of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* from cases of hospital infection. We evaluated the protein profile of the isolates of *Candida* spp. by SDS-PAGE. We evaluated also the susceptibility profile of the isolates against antifungals of use conventional in regimens therapeutics (fluconazole and amphotericin B) and newer antifungals that are not yet part of the hospital routine (voriconazole and caspofungin). It was determined the proteolytic activity qualitative and quantitative of Sap and metabolic activity of isolates of *C. albicans* and *Candida non-albicans* grown in the presence and absence of subinhibitory concentrations of fluconazole and amphotericin B. Was established the correlation between the tests and, finally, the expression of the SAP2 gene in *C. albicans* ATCC 64548 and *C. krusei* ATCC 6258 was evaluated. 100% of the isolates were susceptible to amphotericin B, voriconazole and caspofungin and 89.9% to fluconazole. Two isolates (7.4%) showed susceptibility dose dependent and one (3.7%) showed resistance to fluconazole. In the qualitative analysis of proteolytic activity, 77.7% of the isolates showed activity. The most isolates of *C. albicans* (50%) and *Candida non-albicans* (32%) had moderate proteolytic activity. The addition of fluconazole to culture did not promote significant changes in the proteolytic activity of the isolates patterns, while amphotericin B inhibited the growth of *C. glabrata* ATCC 90030 and *C. krusei* ATCC 6258. In quantitative analysis, all isolates were active, being that the highest activity was observed in *Candida* complex "*psilosis*" 210 (100%) and the lowest in *C. albicans* 257 (2.44%). The most of the *C. albicans* isolates (50%) were classified as weakly proteolytic, while *Candida non-albicans* (53%) as moderately proteolytic. The presence of antifungals in the culture significantly changed the percentage of substrate degradation of the most of isolates. The greatest difference of percentage was observed in *C. lusitaniae* 286, which in the presence of $\frac{1}{4}$ IC₉₀ of amphotericin B increased 13.7x regarding to absence of the drug. The quantitative method of determining the proteolytic activity presented greater sensitivity. 63% of the isolates of *Candida albicans* showed high metabolic activity and 68% of *Candida non-albicans* had moderate activity. The higher metabolic activity was observed in *C. albicans* 120 (61.72%) and lowest in *C. krusei* ATCC 6258 (2.35%). The metabolic activity of the most of the isolates was significantly altered. The major difference of percentages was observed in *Candida* complex "*psilosis*" 210, which in the presence of $\frac{1}{2}$ IC₅₀ of fluconazole showed reduction of 8x in the metabolic activity regarding to absence of the drug. There was expression of SAP2 only in *C. albicans* ATCC 64548, which was significantly reduced in the presence of $\frac{1}{4}$ IC₉₀ of amphotericin B. The Sap activity may be considered a potential factor associated to virulence, once that the isolate that showed the greatest activity showed susceptibility reduced.

Keywords: Virulence factors, *Candida albicans*, Aspartyl proteases, Proteolysis, Antifungals agents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendograma mostrando a relação da família de isoenzimas Sap de *Candida* spp. e as duas yapsinas de *Saccharomyces cerevisiae* que mostram elevada semelhança com Sap9 e Sap10 (ALBRECHT et al., 2006).....25
- Figura 2.** Expressão das diferentes subclasses de Sap por *C. albicans* durante o processo infeccioso (Adaptado de MUNRO, HUBE, 2002).....27
- Figura 3.** Expressão diferencial de genes SAP por diferentes formas morfológicas de *C. albicans*. SAP7 foi silenciada ou apenas fracamente expressa. Adaptado de Hube (1996) citado por Hube et al. (1998).....29
- Figura 4.** Esquema de representação do teste de sensibilidade por difusão em fita “Etest®” e determinação da IC de isolados com 100% de inibição em A e 80% em B. As setas indicam o ponto de intersecção que corresponde à IC.....46
- Figura 5.** Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. CT - Cycle Threshold. A amplificação mostra três fases distintas: (1) linha basal - não há produto suficiente para que a fluorescência seja detectada; (2) fase log - a quantidade de produtos dobra a cada ciclo e (3) fase platô - não há mais aumento no número de produtos (NOVAIS, ALVES, 2004).....54
- Figura 6.** Perfil de degradação proteica dos isolados padrões de *Candida* spp. ATCC obtido por eletroforese SDS-PAGE. Banda aproximada de 43 kDa é sugestiva da presença de Sap. *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019.55
- Figura 7.** Avaliação da sensibilidade de *C. tropicalis* ATCC 750 aos antifúngicos por difusão em fita - “Etest®”. 1 - Anfotericina B; 2 - Fluconazol; 3 - Voriconazol; 4 - Caspofungina.56
- Figura 8.** Diferenciação entre a presença (A) e ausência de halo (B) de degradação no agar proteinase. *C. albicans* ATCC 64548 (proteolítico) e *C. glabrata* ATCC 90030 (não-proteolítico).59

Figura 9. Classificação dos isolados de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> de acordo com a intensidade de atividade proteolítica que apresentaram na avaliação qualitativa.	60
Figura 10. Classificação dos isolados de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> de acordo com a intensidade de atividade proteolítica apresentada na avaliação quantitativa.	63
Figura 11. Classificação dos isolados de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> de acordo com a intensidade de atividade metabólica que apresentaram.	68
Figura 12. Percentual de degradação de substrato dos isolados de <i>Candida</i> spp. na ausência de antifúngicos.	72
Figura 13. Percentual de atividade metabólica dos isolados de <i>Candida</i> spp. na ausência de antifúngicos.	73
Figura 14. Efeito de diferentes condições de exposição sobre a porcentagem de atividade metabólica (♦) e de degradação de substrato (■) dos isolados padrões de <i>Candida</i> spp. (a) <i>C. albicans</i> ATCC 64548; (b) <i>C. glabrata</i> ATCC 90030; (c) <i>C. krusei</i> ATCC 6258; (d) <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019; (e) <i>C. tropicalis</i> ATCC 750.	74
Figura 15. Curva de amplificação do gene SAP2 de <i>Candida</i> spp. As linhas que ultrapassaram o “Threshold” correspondem às curvas de amplificação de <i>C. albicans</i> ATCC 64548.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibidores de proteases e suas principais características..	34
Tabela 2. Concentrações inibitórias (IC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade de <i>Candida</i> spp. frente aos antifúngicos testados, segundo documento M27A3 (CLSI, 2008).	47
Tabela 3. Concentração Inibitória (IC ₈₀ e IC ₁₀₀) do crescimento de <i>Candida</i> spp. determinada por teste de difusão em fita “Etest [®] ” e classificação dos isolados quanto à sensibilidade aos antifúngicos testados.	57
Tabela 4. Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>Candida</i> spp. frente aos antifúngicos testados.	58
Tabela 5. Intensidade de atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com a medida da R _{halo/colônia} .	59
Tabela 6. Análise qualitativa da intensidade de atividade proteolítica dos padrões de <i>Candida</i> spp. na ausência e na presença de concentrações subinibitórias de antifúngicos.	61
Tabela 7. Classificação da intensidade de atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com o percentual de degradação do substrato BSA.	62
Tabela 8. Classificação dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com o percentual de degradação de substrato apresentado na ausência de antifúngicos.	63
Tabela 9. Percentual de degradação de substrato BSA pelos isolados padrões de <i>Candida</i> spp. na ausência e na presença dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B	64
Tabela 10. Análise comparativa dos métodos usados na determinação da atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida</i> spp.	66
Tabela 11. Classificação da intensidade de atividade metabólica dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com o percentual de atividade.	67
Tabela 12. Classificação dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com o percentual de atividade metabólica apresentado na ausência de antifúngicos.	68

Tabela 13. Percentual de atividade metabólica dos isolados padrões de <i>Candida</i> spp. na ausência e na presença de antifúngicos.....	69
Tabela 14. Atividade proteolítica e atividade metabólica de <i>Candida</i> spp.	71
Tabela 15. Relação dos resultados obtidos nos testes quantitativos realizados para os isolados de <i>Candida</i> spp. na ausência de antifúngicos.....	75
Tabela 16. Valores de C_T para <i>Candida albicans</i> ATCC 64548 e <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 na presença e na ausência de antifúngicos.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF-HCl	-	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
BSA	-	Soro albumina bovina
CLSI	-	Clinical and Laboratory Standards Institute
cDNA	-	DNA complementar, sintetizado a partir do RNA
C_T	-	Cycle Threshold
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	-	Ditiotreitol
dNTPs	-	Deoxiribonucleotídeos trifosfato
E-64	-	L-trans-epoxisuccinil leucilamido-4(4-guanidino)butano
ELISA	-	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
FAM	-	Fluoróforo 6-Carboxyfluorescein
g	-	Grama
IC	-	Concentração Inibitória
IgG	-	Imunoglobulina G
kDa	-	Kilodalton
KCl	-	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	-	Hidrogenofosfato de potássio
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
NaCl	-	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄	-	Hidrogenofosfato dissódico
PBS	-	Solução tampão salina fosfato
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PMSF	-	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
Quencher	-	Ligante absorvedor de energia
R_{halo/colônia}	-	Razão entre o diâmetro total do halo e o diâmetro da colônia
RHE	-	Epitélio Humano Reconstituído
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RNA_m	-	RNA mensageiro
RT-PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa
Sap	-	Aspartato protease secretada
SAP	-	Gene codificador da aspartato protease secretada

SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
w/v	-	Relação peso/volume
YCB	-	“Yeast Carbon Base”
YCB-BSA	-	Yeast Carbon Base suplementado com BSA
µg	-	Microgramas
µm	-	Micrômetros
µM	-	Micromolar
µl	-	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Infecções e <i>Candida</i> spp.....	17
2.2 Comensais inofensivos x Patógenos invasivos	20
2.3 Fatores de virulência	20
2.4 Aspartato Proteinase Secretada (Sap) de <i>Candida</i> spp.....	22
2.5 Aspartato protease e os genes relacionados	24
2.6 Antifúngicos e <i>Candida</i> spp.....	31
2.7 Aspartato protease e os inibidores de proteases	33
2.8 Proteases: Identificação e Obtenção.....	35
2.9 Estudo das isoenzimas Saps de <i>Candida</i> spp.	37
2.10 Técnica de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) em tempo real	39
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Local de execução e Amostragem	43
4.2 Indução à produção de Sap	43
4.3 Estudo do perfil proteico de <i>Candida</i> spp. - Pesquisa de aspartato protease secretada (Sap).....	44
4.3.1 Quantificação da proteína total.....	44
4.3.2 Análise do perfil protéico de <i>Candida</i> spp.	44
4.4 Teste de Sensibilidade aos antifúngicos	45
4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória (IC ₈₀ e IC ₁₀₀) dos antifúngicos por difusão em fita (Etest [®]).....	45
4.5 Determinação da atividade proteolítica de Sap	47
4.5.1 Avaliação qualitativa da atividade proteolítica de Sap.....	47
4.5.2 Avaliação quantitativa da atividade proteolítica de Sap.....	48

4.6 Avaliação da atividade metabólica de <i>Candida</i> spp. na presença e na ausência de fluconazol e anfotericina B.	50
4.6.1 Ensaio de Redução do XTT.....	50
4.7 Relação entre os resultados obtidos pelos métodos usados na determinação da atividade proteolítica de <i>Candida</i> spp.	51
4.8 Relação entre atividade proteolítica e atividade metabólica de <i>Candida</i> spp.	52
4.9 Avaliação da expressão de SAP2 nos isolados padrões de <i>Candida</i> spp.....	52
4.9.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	52
4.9.2 PCR quantitativo em tempo real.....	53
4.9.3 Interpretação dos resultados	53
4.10 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Estudo de perfil proteico de <i>Candida</i> spp - Pesquisa de aspartato protease secretada (Sap).....	55
5.2 Avaliação da sensibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	56
5.3 Determinação da atividade proteolítica de Sap	58
5.3.1 Avaliação qualitativa da atividade proteolítica de Sap	58
5.3.2 Avaliação quantitativa da atividade proteolítica de Sap.....	61
5.4 Relação entre os resultados obtidos pelos métodos usados na determinação da atividade proteolítica de <i>Candida</i> spp.	65
5.5 Avaliação da atividade metabólica de <i>Candida</i> spp. na presença e na ausência de fluconazol e anfotericina B.	66
5.6 Relação entre atividade proteolítica e atividade metabólica de <i>Candida</i> spp.	70
5.7 Avaliação da expressão de SAP2 nos isolados padrões de <i>Candida</i> spp.....	76
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	79
7 CONCLUSÃO	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas se tornaram clinicamente importantes na segunda metade do século passado devido aos avanços nas tecnologias médicas. Como resultado, houve um aumento notável na pesquisa básica de fungos patogênicos (ODDS, 2000). Atualmente, essas infecções representam sério risco à saúde, uma vez que aumentaram substancialmente nas últimas décadas e possuem alta prevalência, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (CORNISTEIN et al., 2012).

Candida spp. faz parte da microbiota normal de aproximadamente 50% dos indivíduos e geralmente reside como organismo comensal, entretanto se o equilíbrio é rompido, comensais podem se tornar patogênicos (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE 2003). *Candida albicans* é a espécie de maior interesse clínico, entretanto, paralelamente ao aumento das infecções de origem fúngica, observou-se também um aumento das infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. lusitanae* (TAMURA et al., 2007; CORNISTEIN et al., 2012). Assim como *C. albicans*, elas têm capacidade de desenvolver-se em dispositivos médicos, como cateteres, formar estruturas conhecidas como biofilmes, e persistir no ambiente hospitalar, contribuindo assim para a ocorrência de infecções (ELLIOTT 1988; COX, PERFECT 1993).

Indivíduos imunocomprometidos estão submetidos a diferentes terapias medicamentosas, as quais podem interferir significativamente na promoção e manutenção de infecções (HAZEN et al., 2000; NAVARTHANA et al., 2005). Existem diversos estudos relacionados à epidemiologia e resistência das leveduras aos antifúngicos, porém são raros os relacionados ao potencial de virulência de tais microrganismos e talvez a ausência de informações a esse respeito colabore para o aumento de infecções fúngicas hospitalares (TAMURA et al., 2007).

É de fundamental importância o esclarecimento das condições que possam influenciar a virulência de *Candida* spp. no hospedeiro, já que indivíduos imunocomprometidos são os principais alvos de infecções oportunistas (HAZEN et al., 2000; NAVARTHANA et al., 2005). *Candida* spp. possui vários fatores associados à virulência que garantem sua capacidade de colonizar e causar infecções. Dentre estes fatores, destacam-se as enzimas hidrolíticas lipases, fosfolipases e proteases, sendo que as proteases aspárticas são as principais

envolvidas na patogenicidade (COSTA et al., 2010a). As enzimas proteolíticas favorecem a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro através da degradação de proteínas da matriz extracelular (MORSCHHÄUSER et al., 1997), imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento (KAMINISHI et al., 1995; RÜCHEL, 1986).

Desde 1997, o principal foco das pesquisas a respeito da patogenicidade de *Candida* spp. tem sido a secreção de proteinases aspárticas como fator associado à virulência (WATTS et al., 1998). Grande parte dos estudos a esse respeito sugere a existência de uma relação entre a produção das aspartato proteases secretadas (Saps) e a virulência das linhagens (WHITE, AGABIAN 1995; SCHALLER et al., 2003; KORTING et al., 2003; LERMANN, MORSHHAUSER, 2008), o que faz com que a atividade de Sap se torne um intrigante atributo de virulência (WHITE, AGABIAN, 1995).

Uma família de 10 genes SAP é responsável pela codificação de isoenzimas Sap, que são distribuídas diferentemente entre as espécies do gênero *Candida* spp. (MONOD et al., 1994; FELK et al., 2002). A expressão dos genes é variável e pode ser influenciada por condições ambientais *in vivo* e experimentais *in vitro* (HUBE, NAGLIK, 2001; ORTEGA et al., 2009). Segundo Mores et al. (2009), linhagens secretoras de Sap apresentam maior capacidade de invasão dos tecidos hospedeiros do que linhagens não secretoras. Vários estudos de expressão dos genes SAP sugeriram a existência de uma expressão diferencial dos genes de acordo com o tipo e o local de infecção e papéis específicos durante colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro (HUBE et al., 1997; FELK et al., 2002; KORTING et al., 2003; LERMANN, MORSCHAUSER 2008).

É extremamente necessário estudar os possíveis mecanismos de atuação e inibição das Saps, as condições nas quais elas são estimuladas ou inibidas *in vivo*, para que finalmente, possa ser fornecido um auxílio favorável à pesquisa e desenvolvimento de agentes antifúngicos que interfiram nesse potencial de virulência, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada às infecções (JAIN et al., 2007; RÖRIG et al., 2009).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções e *Candida* spp.

A incidência de infecções hospitalares por fungos aumentou consideravelmente nas últimas décadas acarretando altos índices de morbidade e mortalidade, uma vez que o número de agentes antifúngicos disponíveis é restrito e a resistência a eles cada vez maior (SARDI et al., 2013). Os agentes isolados com maior frequência pertencem ao gênero *Candida* spp. (ST-GERMAIN et al., 2001), que corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar (NETT et al., 2007; SARDI et al., 2013).

As leveduras do gênero *Candida* spp. pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae*. Este gênero compreende as principais leveduras patogênicas, aproximadamente 200 espécies (SIDRIM, ROCHA, 2004). Estes fungos são patógenos oportunistas que vivem de forma comensal na maioria dos indivíduos saudáveis (WHITE, AGABIAN, 1995; MORAGUES et al., 2003). Eles podem ser encontrados frequentemente nas superfícies mucosas, cavidade oral, nasofaríngea, pele, unhas, vagina, assim como no sangue, urina e outros locais do corpo (PITTET, WENZEL, 1995; NUCCI, 2000).

As infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. abrangem desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções difundidas em pacientes neutropênicos. Diversos processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* spp. (ÁLVARES et al., 2007).

A relação entre infecções por *Candida* spp. e ambiente hospitalar ganhou importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças e propiciou o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças terminais, que muitas vezes, morrem de infecções fúngicas e não da doença de base (CHANG et al., 2000; SELITRENNIKOFF, 2001; COLOMBO et al., 2003).

Infecções fúngicas invasivas representam um sério risco à saúde, especialmente no caso de pacientes hospitalizados (YANG, 2003). Muitos fatores de

predisposição às infecções podem ser citados, entre eles, o uso de antibióticos de amplo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar e procedimentos cirúrgicos invasivos, como a utilização de sonda vesical, cateteres venosos e ventilação mecânica (GLOLO, SVIDZINSKI, 2010). Outros fatores, como idade extrema, imunossupressão, insuficiência renal, diabetes, quimioterapia, radioterapia, lesão de mucosas, hemodiálise, cirurgia prévia, corticoterapia, uso de próteses dentais e lentes de contato também possuem certa importância (PAPPAS et al., 2003; MONTES et al., 2009). A primeira defesa do hospedeiro contra infecções microbianas é a imunidade celular, e em casos de imunossupressão, a redução dessa defesa predispõe o indivíduo a uma variedade de infecções fúngicas (YANG, 2003).

Desde 1993, *Candida albicans* era a principal espécie responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade em indivíduos acometidos por infecções fúngicas (MORRISON et al., 1993). Esta é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, mas espécies de *Candida não-albicans* têm aumentado em frequência e muitas vezes são refratárias às terapias convencionais (TAMURA et al., 2007). Cornistein et al. (2012) fez um estudo epidemiológico em pacientes hospitalizados de um centro neurológico e identificou isolados de *Candida não-albicans* em 56,7% dos espécimes clínicos analisados contra 43,3% de *C. albicans*. Um estudo realizado por Chang et al. (2008) detectou a presença de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* em amostras de sangue venoso de pacientes internados. Segundo Pappas et al. (2003) e Colombo et al. (2003) tem-se observado uma proporção aumentada de infecções causadas por *Candida não-albicans*, tais como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*. As razões para essa inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não foram elucidadas.

Cinco espécies de *Candida* spp. causadoras de infecções em humanos eram conhecidas, até 1963: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. guilliermondii* (COLOMBO et al., 2003). Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete espécies causadoras de micoses superficiais ou invasivas e segundo estudo recente determinadas espécies de *Candida não-albicans* chegam a ser responsáveis por 35 a 65% das candidíases (MUIR, WEINBREN, 2010). Segundo Glolo, Svidzinski (2010), as espécies de *Candida não-albicans* mais implicadas em processos infecciosos são: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Candida kefyr*,

Candida norvegensis, *Candida rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *Candida ciferrii*, *Candida haemulonii*, *Candida lypolytica*, *Candida pulcherrima*, *Candida catenulata*, *Candida utilis*, *Candida viswanathii* e *Candida seylanoides*.

Sullivan et al. (1995) realizou detalhada análise genotípica e fenotípica de isolados atípicos de *C. albicans* e à partir de seus resultados propôs o estabelecimento de uma nova espécie, *C. dubliniensis*. Segundo Sullivan et al. (1997), os isolados de *C. dubliniensis* eram identificados, até 1995, como formas incomuns de *C. albicans* por possuírem propriedades fenotípicas muito semelhantes.

Assim como ocorreu com *C. albicans*, isolados identificados como *C. glabrata* devido às semelhanças fenotípicas existentes, foram classificados, posteriormente, como novas espécies (BISHOP et al. 2008). *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis* foram descritas pela primeira vez por Flórez et al. (2005) e Correia et al. (2006), respectivamente. Segundo Correia et al. (2006) e Borman et al. (2006) *C. nivariensis* e *C. bracarensis* podem ser consideradas espécies emergentes quanto à capacidade patogênica. Estudo realizado por Lockhart et al. (2009) verificou aumento de incidência de infecções causadas por *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis* e desenvolvimento de resistência antifúngica, principalmente ao fluconazol.

A espécie *C. parapsilosis* foi isolada e descrita primeiramente por Ashford (1928). Lin et al. (1995) demonstrou a presença de três grupos geneticamente distintos (I, II e III) entre isolados clínicos identificados como *C. parapsilosis* e constatou que tais diferenças seriam mais compatíveis com o delineamento de espécies do que de subgrupos. O estudo de Tavanti et al. (2005) propôs a manutenção do nome *C. parapsilosis* para o grupo I e designou os nomes *Candida orthopsilosis* para o grupo II e *Candida metapsilosis* para o III. Esse estudo concluiu, ainda, que o nível de diferenciação existente entre essas espécies é semelhante ao encontrado entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Um estudo de vigilância epidemiológica realizado por Colombo et al. (2006), que compreendia a avaliação da incidência de infecção hospitalar em 11 centros de saúde no Brasil, encontrou alto índice de candidemia, no qual *Candida* spp. foi o quarto patógeno mais frequentemente isolado, sendo a espécie mais comum *C. albicans* (41%), seguida de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (21%). Estas espécies foram precedidas apenas por estafilococos coagulase-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 Comensais inofensivos x Patógenos invasivos

Para o estabelecimento de uma infecção, patógenos oportunistas devem escapar do sistema imune, sobreviver, dividir-se no organismo do hospedeiro e ser capaz de migrar para outros tecidos (YANG, 2003). Em certas circunstâncias, geralmente associadas à debilidade do sistema imune do hospedeiro, pode haver transição de comensal inofensivo a patógeno invasivo, causando infecções sistêmicas e mucosas (WHITE, AGABIAN, 1995; HUBE, NAGLIK, 2001). Se o sistema imunológico fica comprometido, organismos comensais como *Candida* spp. podem se tornar patogênicos. Determinar como ocorre e como prevenir essa transformação é o principal foco dos estudos em Micologia Médica (BRUCKMANN, et al., 2000).

O estado fisiológico do hospedeiro é o primeiro fator que rege a etiologia da candidíase. Entretanto, pequenas alterações no organismo hospedeiro podem incitar o potencial patogênico de *Candida* spp. e torná-la capaz de promover doenças profundamente debilitantes (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003). Mesmo na forma invasiva, não é interesse do patógeno eliminar o hospedeiro, pois o mesmo fornece a energia necessária à sua sobrevivência (YANG, 2003).

Sabe-se que os microrganismos patogênicos e oportunistas têm desenvolvido mecanismos que os auxiliam nos processos de invasão e infecção (FRADIN et al., 2003). Em comum com outras espécies, *C. albicans*, é capaz de secretar uma proteinase, que parece desempenhar um papel essencial na sua patogenicidade (HOMMA et al., 1992).

Segundo Tamura et al. (2007), as leveduras não agem passivamente durante o estabelecimento de uma infecção invasiva, na verdade, acredita-se que elas participam ativamente no processo fisiopatológico da doença utilizando-se de mecanismos de agressão denominados fatores de virulência.

2.3 Fatores de virulência

Leveduras do gênero *Candida* spp. contam com diversos fatores associados à virulência que garantem sua capacidade de colonizar e provocar infecções. A capacidade de *Candida* spp. de causar infecções depende também de suas

características intrínsecas, de seus fatores ou atributos de virulência, como capacidade de se aderir às células do hospedeiro, promover alterações fenotípicas, convergir entre leveduras e pseudo-hifas, formar biofilmes, produzir substâncias tóxicas às células, como hemolisinas, resistir ao peróxido de hidrogênio e produzir e secretar enzimas hidrolíticas tais como proteases e fosfolipases. Esses fatores podem facilitar a promoção de infecções em hospedeiros suscetíveis e garantir sua permanência colonizando ou invadindo os tecidos do hospedeiro (WHITE, AGABIAN, 1995; SANGLARD et al., 1997; CALDERONI, FONZI, 2001).

Os fatores de virulência de *Candida* spp. podem variar de acordo com a natureza da resposta do hospedeiro, o local e o estágio da infecção (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003). Quando comparado a outros eucariotos, *Candida* spp. possui um genoma de tamanho superior, que fornece recursos suficientes para desenvolver fatores de virulência altamente especializados para promover sobrevivência intracelular em tipos celulares específicos do hospedeiro (HUBE, NAGLIK, 2001).

Candida albicans apresenta um potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de se aderir à parede celular de diferentes tecidos, como mucosas e epitélios, a transição fenotípica com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas proteolíticas como proteinases e fosfolipases (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; BRAGA-SILVA et al., 2009).

Segundo Costa et al. (2010a) a atividade de proteinases e fosfolipases relaciona-se diretamente com a promoção e o estabelecimento de infecções. De acordo com os estudos conduzidos por Noumi et al. (2010), a produção de enzimas hidrolíticas e adesinas por *C. albicans*, isoladas de casos de candidíase oral, apresentaram-se como o maior fator associado à virulência, fato sugerido anteriormente por Neugnot et al. (2002). Shimizu et al. (1996) e Abu-Elteen et al. (2001) apontaram a relevância das aspartato proteases secretadas (Sap), hialuronidases, condroitinases e fosfolipases como fatores de virulência ao relatar que linhagens de *Candida* spp. secretoras de tais enzimas apresentam maior capacidade de invadir tecidos do que as não secretoras.

Em uso de suas propriedades adesivas, leveduras como *C. albicans*, podem formar biofilmes, que se iniciam pela aderência e colonização de superfícies, formam

pequenos agregados por deposição e terminam com o desenvolvimento de uma matriz polimérica complexa. Seu desenvolvimento geralmente ocorre em resposta a uma variedade de condições, tais como, alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (O'TOOLE, DAVEY, 2000; SENEVIRATNE et al., 2008).

Estima-se que a maioria das infecções fúngicas seja causada por leveduras associadas formando biofilmes, a forma mais comum de crescimento microbiano na natureza. Acredita-se também, que a capacidade de formá-los está intimamente relacionada ao grau de virulência do fungo (HAWSER, DOUGLAS, 1994; KUHN et al., 2003; NETT et al., 2007). Considera-se que biofilmes de *Candida* spp. possam estar relacionados a falha terapêutica e consequente aumento na candidemia, uma vez que a presença de uma estrutura extremamente complexa envolvendo as células dificulta a penetração dos antifúngicos utilizados no combate à candidemia. Dessa maneira, biofilmes maduros expostos a antifúngicos, mas não eliminados pelo tratamento, podem se tornar reservatórios de células resistentes a esses agentes. (YANG, 2003).

2.4 Aspartato Proteinase Secretada (Sap) de *Candida* spp.

Proteases extracelulares de fungos saprófitos, tais como *Aspergillus niger* ou *Neurospora crassa*, são secretadas principalmente para fornecer nutrientes para as células, entretanto, fungos patogênicos têm se adaptado e desenvolvido funções especializadas durante infecções (ORTEGA et al., 2009; BRAGA-SILVA et al., 2009).

As três enzimas hidrolíticas extracelulares de maior importância produzidas por *Candida* spp. são fosfolipases, lipases e proteases. Dentre elas, as proteases aspárticas, proteases ativas em pH ácido, têm sido intensamente estudadas como fator associado à virulência e são classificadas com base no seu mecanismo catalítico (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003; ORTEGA et al., 2009). Estudos demonstram que leveduras que apresentam aumento na síntese e atividade de fosfolipases e proteases, principalmente as proteases aspárticas, têm maior potencial patogênico, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (GLOLO, SVIDZINSKI, 2010).

As Saps, potentes indutoras de citocinas inflamatórias, têm atraído atenção de pesquisadores e direcionado o foco das pesquisas a respeito da patogenicidade de *Candida* spp. nos últimos anos (KUHN et al., 2003; GROPP et al., 2009). A Sap foi descrita pela primeira vez por Staib (1965), que a denominou de proteinase ácida de *Candida* (Cap), por possuir um perfil de atividade ótima em faixas de pH ácido e ter sido encontrada primeiramente em *Candida* spp. (STAIB, 1965; REMOLD et al., 1968; RAY, PAYNE, 1990). Ela possui ampla especificidade de substrato, pois pode degradar uma variedade de proteínas humanas, como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, laminina, fibronectina, mucina e quase todas as imunoglobulinas, inclusive a Imunoglobulina A, que é resistente à maioria das proteinases bacterianas. (SANGLARD et al., 1997; RAY, PAYNE, 1990; HUBE, NAGLIK, 2001).

Basicamente, as enzimas Sap efetuam a digestão das proteínas disponíveis, com o objetivo de fornecer nitrogênio para promover a sobrevivência das células fúngicas. Em outras palavras, parecem ter a função de aquisição de nutrientes (SANGLARD et al., 1997; HUBE, NAGLIK, 2001). Entretanto, as Saps podem ter se adaptado para desenvolver outras funções mais direcionadas à virulência, pois elas acabam por degradar proteínas estruturais e do sistema imunológico do hospedeiro (STAIB, 1965; WHITE, AGABIAN, 1995; HUBE, NAGLIK, 2001).

Acredita-se que as Saps podem contribuir para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro através da degradação ou distorção de estruturas da superfície celular e substâncias intercelulares, ou por destruição de células e moléculas do sistema imune para evitar ou resistir ao ataque microbiano (WHITE, AGABIAN, 1995; HAMAL et al., 2004; HORNBAACH et al., 2009). De maneira geral, linhagens secretoras de Sap apresentam maior capacidade de invasão dos tecidos hospedeiros do que linhagens não secretoras (MORES et al., 2009).

As metodologias padronizadas que avaliam a secreção de Sap privilegiam a análise em células planctônicas, mas é muito importante lembrar que as leveduras não vivem de forma isolada no hospedeiro, elas estão sempre agrupadas na forma de biofilmes (MORES et al., 2009), onde produzem e secretam quantidades de Sap superiores às células planctônicas (MENDES et al., 2007; MORES et al., 2009).

Um estudo realizado por Mendes et al. (2007) comparou a atividade proteolítica de Sap produzida por biofilmes e células planctônicas de isolados de *C. albicans* e obteve em seus resultados, níveis de atividade cerca de quatro vezes

mais altos nos biofilmes. Mores et al. (2009) comprovou em seu estudo que células de *C. albicans* secretam maiores quantidades de Sap quando cultivadas na forma de biofilmes e que na presença de doses subinibitórias de fluconazol tendem a aumentar a secreção da enzima. Estudos adicionais são necessários na tentativa de elucidar a relação entre o aumento na secreção de Sap e a diminuição da sensibilidade de biofilmes de *Candida* spp. frente a antifúngicos, principalmente ao fluconazol, como demonstrado por Ramage et al. (2006) e Ferreira et al. (2009).

2.5 Aspartato protease e os genes relacionados

A produção de Sap é codificada por uma família de 10 genes SAP, distribuídos diferentemente entre as espécies do gênero *Candida* spp. (MONOD et al., 1994). A transcrição destes genes gera isoenzimas, denominadas desta forma devido à existência de semelhanças estruturais e conformacionais entre elas (MONOD et al., 1994; FELK et al., 2002; BORELLI, 2008).

Cada gene SAP codifica uma pré-proenzima com cerca de 60-200 aminoácidos a mais que a enzima madura. A pré-proenzima possui um peptídeo sinal N-terminal e resíduos conservados de aspartato e cisteína no sítio ativo, necessários à manutenção da estrutura tridimensional (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003). A enzima madura é obtida após um extenso processamento proteolítico realizado por uma peptidase sinal no retículo endoplasmático e pela enzima Kex2 no complexo de Golgi (HUBE, NAGLIK, 2001; ORTEGA et al., 2009). Após o processamento se completar, os resíduos de asparto no sítio ativo e as sequências de peptídeos comuns para todas as proteinases aspárticas se mantêm conservados (HUBE, NAGLIK, 2001).

As Saps ativadas são empacotadas dentro de vesículas secretoras e transportadas para a membrana celular, onde podem se ligar ao glycosylphosphatidylinositol (GPI), proteína ancoradora da membrana ou da parede celular, como Sap9 e Sap10; ou ser liberada para o espaço extracelular como no caso das outras isoenzimas (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003; ALBRECHT et al., 2006).

Atualmente, sabe-se que *C. albicans* é a única espécie do gênero que possui os dez genes SAP identificados no genoma e tem capacidade de produzir as dez

isoenzimas Sap (HUBE, NAGLIK, 2001; ORTEGA et al., 2009). Os genes são agrupados devido à suas diferenças e/ou semelhanças em seis subgrupos ou subfamílias: SAP1-3, SAP4-6, SAP7, SAP8, SAP9 e SAP10 (MONOD et al., 1998, ORTEGA et al., 2009). Sap1-Sap3 possuem identidade de até 67% e Sap4-Sap6 até 89%. Sap1-Sap3 e Sap4-Sap6 estão intimamente agrupadas. Sap7 tem apenas 20-27% de identidade em relação a outras proteínas e está externamente posicionada. Sap8 é remotamente relacionada a ambos os grupos ou proteínas Sap. Sap9 e Sap10 são agrupadas entre eles (FIGURA 1) (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE 2003; ALBRECHT et al., 2006; ORTEGA et al., 2009). Todos os membros da família de proteínas Sap possuem quatro resíduos de cisteína e dois resíduos de aspartato conservados. A comparação entre as sequências revelou que Sap9 e Sap10 diferem das outras isoenzimas Sap1-Sap8, não apenas pela semelhança entre as sequências, mas também pelos múltiplos locais de N-glicosilação e as prováveis sequências consenso C-terminal típicas para o GPI, uma propriedade estrutural reconhecida de yapsinas (MONOD et al., 1998; EISENHABER et al., 2004; ALBRECHT et al., 2006). Essas proteinases têm uma estrutura semelhante às yapsinas, uma família de cinco proteinases não secretoras e ancoradas por GPI (YPS1-3, YPS6 e YPS7) de *Sacharomyces cerevisiae* envolvidas na integridade da parede celular e interações célula-célula (MONOD et al., 1998; ALBRECHT et al., 2006).

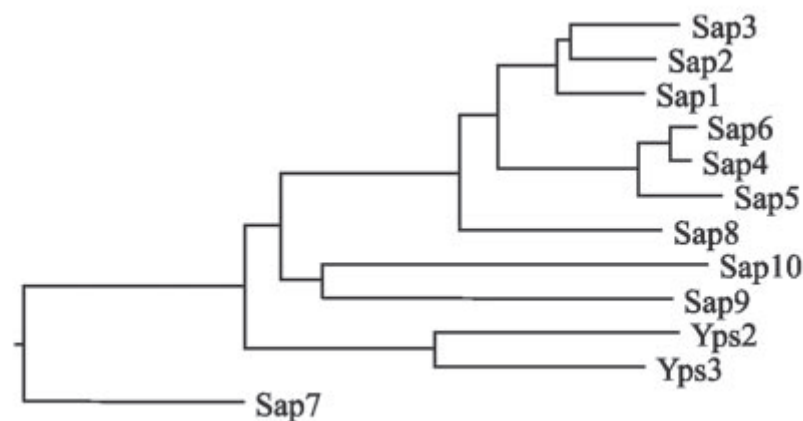


Figura 1. Dendrograma mostrando a relação da família de isoenzimas Sap de *Candida* spp. e as duas yapsinas de *Saccharomyces cerevisiae* que mostram elevada semelhança com Sap9 e Sap10 (ALBRECHT et al., 2006).

No genoma de *C. tropicalis* uma subfamília de quatro genes é responsável pela codificação de Sapt1-Sapt4 e no complexo *C. parapsilosis* os genes SAPP1-SAPP3 são codificadores da subfamília Sapp1-Sapp3 (ZAUGG et al., 2001; ORTEGA et al., 2009). No genoma de *C. dubliniensis* foram encontrados oito genes codificadores de Saps (SAPCD1-SAPCD4 e SAPCD7-SAPCD10), apesar de estudos *in vitro* não identificarem a produção das proteinases correspondentes. A presença dos genes não implica necessariamente na expressão dos mesmos (PICHOVA et al., 2001; ZAUGG et al., 2001; ORTEGA et al., 2009). Genes SAP de *C. albicans* e *C. dubliniensis* ocupam a mesma posição na árvore filogenética devido à sua alta similaridade (> 90%). Estudos relatam uma relação filogenética entre as Saps originadas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (STEHR et al., 2000; ORTEGA et al., 2009). Ortega et al. (2009) construíram uma árvore filogenética da superfamília de genes SAP a partir de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* e observaram a presença de genes SAP em *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*, além dos genes já relatados em outros estudos para as demais espécies. Conforme relatado no trabalho, *C. guilliermondii* possui oito genes SAPGU e *C. lusitaniae* três genes SAPLU. Genes SAP não foram encontrados no genoma de *C. krusei* e *C. kefyr* (ORTEGA et al., 2009) e até hoje nada mais foi relatado a esse respeito. Nenhum gene SAP foi detectado no genoma de *C. glabrata*, entretanto, devido à sua estreita relação filogenética com *S. cerevisiae*, ela possui pelo menos 11 genes YAP, alguns dos quais são expressos em macrófagos (KAUR et al., 2007; ORTEGA et al., 2009).

As proteínas Sap1-10 têm entre 35 e 50 kDa e atuam em pH diferenciado. As isoformas Sap1-6 possuem atividade ótima em faixas de pH distintas: Sap1-3 são mais ativas em faixas de pH mais baixas, entre 2 e 5, enquanto as Sap4-6 são mais ativas em faixas de pH mais altas, de 3 a 7. A temperatura ótima de atividade das proteinases, especialmente Sap1-3 é 45°C, entretanto à 55°C a atividade proteolítica praticamente desaparece. Em contrapartida, Sap3 permanece ainda com 30% da atividade máxima à 55°C, o que sugere que ela seja mais resistente à desnaturação térmica do que todas as outras isoenzimas (SMOLENSKI et al., 1997; NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003; ALBRECHT et al., 2006).

A regulação da expressão da família de genes SAP pode ser controlada ao nível de RNAm ou de proteína. A expressão dos genes é variável e pode ser influenciada por condições ambientais *in vivo* e experimentais *in vitro* (HUBE,

NAGLIK, 2001; ORTEGA et al., 2009). Sap2 é a proteinase mais estudada, porque é secretada em abundância durante experimentos *in vitro* (SANGLARD et al., 1997).

Resultados de White, Agabian (1995) sugerem que o tipo celular controla o padrão de expressão das isoenzimas Sap. Em um hospedeiro infectado é possível encontrar *Candida* spp. nas formas de hifa e levedura. Acredita-se que a formação de hifas seja essencial para a invasividade dos fungos, uma vez que elas auxiliam no escape de macrófagos após fagocitose (PHAN et al., 2000; FELK et al., 2002). Estudos mostraram que SAP1-SAP3 são expressos pela fase leveduriforme, enquanto a expressão dos genes SAP4-SAP6 está associada à formação de hifas (FIGURA 2) (HUBE et al., 1994; HUBE et al., 1998; SCHALLER et al., 1999; FELK et al., 2002). A expressão desses genes e o desenvolvimento de hifas não estão estritamente ligados, mas reguladas pelos mesmos fatores (FELK et al., 2002).

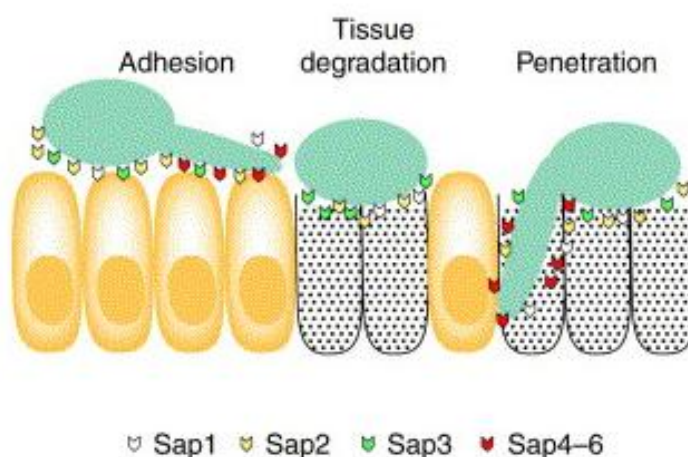


Figura 2. Expressão de diferentes subclasses de Sap por *C. albicans* durante o processo infeccioso (Adaptado de MUNRO, HUBE, 2002).

Os genes SAP estão envolvidos diferentemente no desenvolvimento e manutenção de infecções. Genes SAP1-SAP3 parecem ser essenciais em infecções mucosas e SAP4-SAP6 em sistêmicas (SANGLARD et al., 1997; DE BERNARDIS et al., 1999; LIAN, DA LIU, 2007). As isoenzimas Sap9 e Sap10 parecem ter funções na integridade celular, adesão e separação da célula após brotamento (ALBRECHT et al., 2006). A expressão do gene SAP8 ocorre preferencialmente após 6 a 9 horas de incubação à 27°C em meio suplementado com albumina (ALBRECHT et al., 2006). Em *C. albicans*, transcritos do gene SAP9 podem ser encontrados em fases

posteriores de crescimento, especialmente quando há redução da expressão de SAP8 (LIAN, DA LIU, 2007).

As infecções causadas por *Candida* spp. podem apresentar padrões diferenciados de expressão dos genes SAP de acordo com o tipo e o local de infecção desenvolvida, bem como as condições ambientais de predisposição a infecções (NAGLIK, CHALACOMBE, HUBE, 2003). Em adição, a expressão desses genes não é significativamente diferente entre pacientes infectados e portadores assintomáticos. Em outras palavras, à exceção dos transcritos de SAP1 e SAP3, encontrados apenas em pacientes infectados, as demais isoformas de Sap podem ser expressas tanto em pacientes infectados quanto em portadores assintomáticos (NAGLIK et al., 1999).

Segundo Ortega et al. (2009), o padrão de expressão dos genes SAP pode ser modificado de acordo com as condições de exposição dos isolados e geralmente, condições de estresse fisiológico podem promover aumento da secreção de Sap. Testes de indução da expressão gênica em *C. parapsilosis* permitem observar produção superior de Sapp1 em relação à Sapp2, no uso de proteínas exógenas como única fonte de nitrogênio. Em adição, a Sapp2 produzida tem baixa especificidade de substrato e atividade catalítica significativamente mais baixa do que Sapp1 nas mesmas condições (HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ et al., 2007). Em um trabalho desenvolvido por Gilfillan et al. (1998), isolados de *C. dubliniensis*, submetidos a variações de pH e temperatura, adição de diferentes substâncias ao meio de cultura, foram capazes de formar hifas verdadeiras na maioria das condições testadas, mas falharam na presença de N-acetilglicosamina.

Os primeiros estudos de expressão dos genes SAP encontraram sete genes diferencialmente regulados *in vitro* (FIGURA 3). SAP1 e SAP3 foram regulados durante “mudança fenotípica”. RNAm de SAP2 foi o principal transcrito em fase-log de células leveduriformes cultivadas em meio contendo proteínas, como albumina. SAP4-SAP6 foram expressos durante a transição de leveduras para hifas em pH neutro, enquanto a transcrição de SAP7 foi silenciada sob todas as condições testadas *in vitro*. A expressão de SAP8 foi aumentada a 25°C comparada aos níveis de expressão em temperaturas fisiológicas. Essa expressão diferencial de genes SAP sugere que as isoenzimas podem desempenhar diferentes papéis na invasão do hospedeiro (HUBE et al., 1994; WHITE, AGABIAN, 1995).

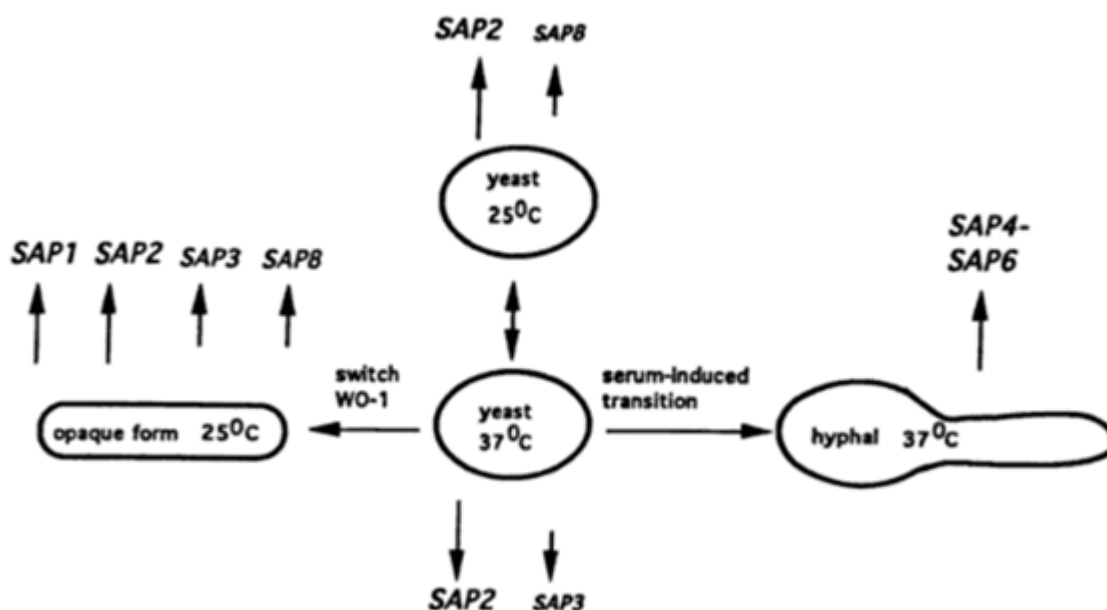


Figura 3. Expressão diferencial de genes SAP por diferentes formas morfológicas de *C. albicans*. SAP7 foi silenciada ou apenas fracamente expressa. Adaptado de Hube (1996 apud HUBE et al., 1998).

A expressão *in vivo* dos genes SAP1-SAP7 de *C. albicans* foi analisada por Lian, Da Liu (2007), em amostras de secreção vaginal de portadoras assintomáticas e mulheres infectadas. SAP2 e SAP4-SAP6 foram os principais genes expressos em ambos os casos. SAP1 e SAP3 foram encontradas em mulheres com quadros de candidíase vulvovaginal, enquanto SAP7 foi encontrada principalmente em portadoras. Schaller et al. (1998) e Schaller et al. (1999) detectaram por RT-PCR a expressão de SAP1-SAP3 e SAP6 em um modelo de infecção vaginal baseado em epitélio humano reconstituído (RHE), mas não de SAP4 e SAP5 e também sugeriu que SAP1-SAP3 são necessárias para manter os níveis de dano tecidual neste modelo.

A expressão de Sap está correlacionada com outros determinantes de virulência na patogenicidade de *C. albicans*. SAP1-SAP3 estão envolvidos na promoção da adesão a células epiteliais bucais. SAP1-SAP3 e SAP8 são todos expressos em um nível mais alto quando *C. albicans* sofre mudança fenotípica a partir do fenótipo W/O (HUBE et al., 1997; KHAN et al., 2010). Mutações em SAP1-SAP3 resultaram em virulência diminuída em ratos modelo (HUBE et al., 1997). SAP4-SAP6 são necessários para sobrevivência e escape de macrófagos, uma vez que um mutante triplo SAP4-SAP6 foi eliminado mais eficientemente após fagocitose

(BORG-VON ZEPELIN et al., 1998). SAP6 parece contribuir principalmente ao dano tecidual do fígado e outros órgãos parenquimais (FELK et al., 2002). Outras pesquisas tem indicado expressão aumentada de genes SAP, especialmente SAP5, SAP6 e SAP9, em células sésseis comparados às células planctônicas (GREEN et al., 2004; NAGLIK et al., 2008).

O papel das Saps durante infecção de RHE foi demonstrado pela redução da extensão do dano tecidual causado pela linhagem tipo selvagem de *C. albicans* SC5314 na presença de inibidores de proteases aspárticas (SCHALLER et al., 1999, 2003). De acordo com Korting et al. (2003), a presença de transcritos de SAP1-SAP3 está relacionada com o aparecimento de lesões epiteliais. Lermann, Morschauer (2008) sugeriram que Sap1-Sap6 não são necessárias para invasão de RHE por *C. albicans*. Esse estudo relata que mutantes que perderam todos os genes SAP1-SAP3 ou SAP4-SAP6 desempenharam a mesma capacidade de invadir e promover dano ao RHE oral e vaginal como sua linhagem selvagem parental.

Estudos, como esses citados acima, apontaram uma expressão diferencial dos genes SAP e papéis específicos durante colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro, no entanto, existem discrepâncias nos resultados obtidos, os quais podem estar relacionados a diferenças na sensibilidade dos métodos usados em vários laboratórios, diferenças intrínsecas, mesmo em modelos de infecção aparentemente semelhantes, e variabilidade entre diferentes linhagens de *C. albicans*.

A emergência desses organismos como patógenos significantes tem importantes implicações para o diagnóstico e gerenciamento, não apenas pelo seu aumento em casos de doenças, mas também porque muitos organismos geralmente são resistentes à terapia antifúngica. A ideia de que existe uma relação entre a resistência a agentes antifúngicos e patogenicidade de *Candida* spp. foi sugerida inicialmente por Becker et al. (1995). A prevalência aumentada de infecções causadas por *Candida* spp. e a seleção de microrganismos resistentes às drogas existentes cria a necessidade de compreender seus mecanismos patogênicos e desenvolver novos agentes antifúngicos (YANG, 2003; BORATE et al., 2011). Fatores de virulência como as isoenzimas Sap podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

2.6 Antifúngicos e *Candida* spp.

O tratamento de infecções fúngicas com antifúngicos objetiva reduzir a intensidade de virulência do patógeno eliminando a infecção (HAZEN et al., 2000; KONTOYIANNIS et al., 2001). Após 10 anos de ausência (1990-1999), novos agentes antifúngicos foram patenteados. Voriconazol (2000), posaconazol (2005), ravuconazol (2007) são do grupo dos azóis, e caspofungina (2002), anidulafungina (2004) e micafungina (2006) do grupo das equinocandinas (KRCMERY, KALAVSKY, 2007). Cada agente antifúngico utiliza um mecanismo diferente para matar ou inibir o crescimento de patógenos fúngicos (PFALLER, 2012).

Os polienos foram o primeiro grupo de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento sistêmico de infecções por leveduras e fungos filamentosos. Eles promovem a formação de poros na membrana que levam à perda do potencial transmembrana e afetam a viabilidade das células fúngicas. Entre os antifúngicos poliênicos, formulações de anfotericina B (convencional, lipossomal e complexo lipídeo) são mais comumente usadas (ARAÚJO, ESPINEL-INGROFF, 2010). Os azóis agem por bloqueio da via de biossíntese de ergosterol, especificamente as enzimas 14- α -lanosterol demetilase em leveduras ou 14- α -esterol demetilase em fungos filamentosos. Estas enzimas do citocromo são codificadas pelos genes ERG11 e CYP51, respectivamente, em leveduras e fungos filamentosos (PEMÁN et al., 2009). As equinocandinas representam uma classe única de agentes antifúngicos que agem pelo bloqueio da atividade da 1,3- β -D-glucano sintase (GS), uma importante enzima para a formação do componente da parede celular 1,3- β -D-glucano. Caspofungina foi o primeiro agente a ser liberado para tratamento de candidemia em pacientes neutropênicos e não neutropênicos (BENNETT, 2006; PAPPAS et al., 2009). Flucitosina é um análogo da pirimidina base que age por inibição da síntese de DNA e RNA, mas raramente é utilizada para o tratamento sistêmico de infecções fúngicas (VERMES et al., 2000). A terbinafina pertence à classe de alilaminas e inibe a atividade da enzima da esqualeno epoxidase, que participa na síntese do ergosterol. Tal como flucitosina, terbinafina é normalmente administrado em combinação com outros agentes antifúngicos no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos (SANGLARD et al., 1997).

Na década de 90, os regimes de tratamento convencional para infecções causadas por *Candida* spp. envolviam o uso de antifúngicos poliênicos, tais como

anfotericina B e nistatina, azóis, tais como fluconazol e itraconazol. Na década seguinte, o voriconazol se tornou parte do grupo (WHITE et al., 1997; GEORGOPAPADAKOU, 2012). Apesar de mais efetiva, a anfotericina B é nefrotóxica, o que impossibilita seu uso em pacientes com doenças renais crônicas. Entretanto, a anfotericina B ainda é a droga de primeira escolha no tratamento de candidíase sistêmica em crianças, como observado por Pappas et al. (2004). Atualmente, a caspofungina tem sido usada no tratamento de infecções por *Candida* spp. resistente aos azóis e por *Aspergillus* spp. (ALBERT EINSTEIN, 2012). Um estudo de caso realizado por Lopes et al. (2012) comprovou o sucesso da utilização de caspofungina no tratamento de candidíase invasiva em neonatos. Eles sugerem que a caspofungina possa ser uma alternativa de tratamento eficaz com menos efeitos adversos do que a anfotericina B.

É fundamental estimular o uso racional dos agentes antifúngicos no ambiente hospitalar visando diminuir a ocorrência de resistência, mas especialmente, promover a terapia mais adequada e com isso elevar a sobrevida destes pacientes (ALBERT EINSTEIN, 2012). Embora os testes de sensibilidade antifúngica sejam frequentemente utilizados para selecionar os antifúngicos de escolha na terapêutica, a função mais importante, atualmente, é a detecção de resistência (PFALLER et al., 2012).

A capacidade de um microrganismo adaptar-se depende das suas características intrínsecas e varia de acordo com as condições de exposição, tais como a presença ou ausência de fármacos que podem estimular a expressão de seus atributos de virulência (GRAYBILL et al., 1998). Um microrganismo é considerado resistente quando é capaz de persistir e desenvolver uma infecção no hospedeiro, mesmo em condições de concentração máxima da droga no sítio de infecção (PERFECT, COX, 1999). A resistência aos antifúngicos pode ser intrínseca (naturalmente presente) ou adquirida (desenvolvida de acordo com influências ambientais, como por exemplo, exposição a fatores externos como radiação) (PONTÓN, QUINDÓS, 2006; PFALLER et al., 2012).

A frequência de infecções fúngicas invasivas e a resistência à terapia antifúngica têm aumentado apesar da introdução de novos agentes antifúngicos. O uso excessivo de antifúngicos, especialmente fluconazol, como tratamento profilático em indivíduos imunodeprimidos promove a exposição de *Candida* spp. por longos períodos a baixas concentrações do antifúngico por via sistêmica, o que pode levar a

seleção de isolados que se adaptaram por possuírem mecanismos de resistência ao fármaco (VAZQUEZ et al., 1993). O aumento da incidência de infecções causadas por *Candida* spp. pode ser resultado de situações como essa (WINGARD et al., 1991, 1993). A exposição repetida ao fármaco pode promover o estabelecimento da resistência *in vitro* ao fluconazol e acredita-se que esse evento possa ocorrer também *in vivo* (BARCHIESI et al., 2000; RUHNKE et al., 2000; SILVA et al., 2011). Assim, concentrações subinibitórias de antifúngicos podem promover aumento do potencial patogênico por estímulo dos fatores de virulência, como a produção e secreção de Sap (JARVIS, 1995; HAZEN et al., 2000; NAVARTHANA et al., 2005). A redução de sensibilidade aos derivados azóis é mais comum entre espécies de *Candida* não-*albicans* (HAJJEEH et al., 2004).

Uma investigação mais detalhada dos mecanismos de patogenicidade de *Candida* spp. e a sua relação com a resistência aos agentes antifúngicos tornou-se indispensável uma vez que houve um aumento do número de isolados resistentes a esses fármacos (WU et al., 2000). Fatores de virulência, como a secreção de Saps, estão atraindo atenção como alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos (PERFECT, 1996), pois é possível que a inibição das Saps através do uso de inibidores seja um alvo terapêutico promissor na criação de novos fármacos.

2.7 Aspartato protease e os inibidores de proteases

Inibidores de protease são enzimas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (LINGARAJU, GOWDA, 2008). As moléculas conhecidas estão divididas em quatro classes de acordo com sua especificidade: inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloprotease (MACEDO et al., 2007), como demonstrado na tabela 1. Diferenças entre estruturas primárias e topologia são observadas entre os inibidores de diferentes famílias (CARLINI, GROSSI DE SÁ 2002). Em geral, a inibição da atividade catalítica é alcançada pela interação entre o inibidor e o sítio catalítico enzimático, fato que os caracteriza como competitivos.

Tabela 1 – Inibidores de proteases e suas principais características.

Inibidor	MM (g/mol)	Tipo, Especificidade e Mecanismo de ação	Solubilidade e Concentração	Referências
AEBSF-HCl	239.5	(I) Serino proteases; Inibe acilação do sítio ativo.	H ₂ O e soluções aquosas; 0.1 – 2 mM	WALSMANN et al., 1972; MARKWARDT et al., 1973
Aprotinina	6511.5	(R) Serino proteases; Liga-se ao sítio ativo formando complexos.	H ₂ O e tampões aquosos; Cultura: 0.01 – 3 µg/ml, Outros: 10 – 250 µg/ml	HEWLETT 1990; GRAY, TSAI 1994
Bestatina-HCl	344.8	(R) Metalopeptidases.	MetOH 5 mg/ml; 1 – 150 mM	UMEZAWA et al., 1976a; UMEZAWA et al., 1976b
E-64	357.4	(I) Cisteíno proteases; Liga-se ao sítio ativo formando complexos.	H ₂ O, DMSO, (H ₂ O:EtOH 1:1); 1 – 10 µM	BARRETT et al., 1982; MONTENEZ et al., 1994
EDTA	372.2	(R) Metalopeptidases.	H ₂ O; 1 – 10 µM	LIZUKA et al., 1993; JANAS et al., 1994
Leupeptina	475.6	(R) Serino e cisteíno proteases.	H ₂ O; 1 – 100 µM	UMEZAWA et al., 1976c; BENISTANT et al., 1994
Pepstatina A	685.9	(R) Aspártico proteases; Modificação química do sítio ativo.	MetOH (1 mg/ml), DMSO; 1 – 10 µM	UMEZAWA et al., 1976c; LAMMERS, JAMIESON 1988
PMSF	174.2	(R) Serino proteases; Promove sulfonilação do resíduo de serina.	Isopropanol, EtOH, MetOH (100 – 200 mM); 0.1 – 1 mM	PROUTY, GOLDBERG 1972; JAMES 1978

A estrutura tridimensional das Saps é semelhante à de outras proteases aspárticas, por esta razão, elas têm alta afinidade pela Pepstatina A, um inibidor da classe das proteases aspárticas. A Pepstatina A é um inibidor não específico, pois é capaz de promover inibição de todas as isoenzimas, em maior ou menor grau, de acordo com a constante de inibição das mesmas (TSANG, WONG, 1987; DAVIES, 1990; BORELLI et al., 2008; DOSTÁL et al., 2009).

As Saps possuem mecanismo catalítico, sítio ativo e estrutura química semelhante às proteases do HIV, o que sugere que os inibidores de proteinase usados contra a AIDS possam interagir com as proteinases de *Candida* spp. Acredita-se que os inibidores sejam capazes de agir sobre as Saps promovendo a redução da adesão às células epiteliais e atenuação das infecções mucosas, que

envolvem Sap1-Sap3 (BORG-VON et al., 1999; BACKMAN et al., 2006). No entanto, os inibidores de proteinase parecem não produzir efeito na prevenção de infecções sistêmicas geralmente desenvolvidas na presença de Sap4-Sap6, sugerindo que não exista interação dos inibidores com as proteinases em questão (KORTING et al., 1999).

Estudos mostraram que pacientes tratados com inibidores de protease anti-HIV tem redução na frequência de candidíase orofaríngea devido à inibição das proteases de *Candida* spp., mesmo persistindo a depressão do sistema imunológico. Backman et al. (2006) avaliou a afinidade de inibidores das proteases do vírus HIV pelas proteinases aspárticas de *Candida* spp. Os resultados mostraram que o fármaco antiviral ritonavir possui a afinidade mais elevada por Sap1 e Sap2, assim como os compostos derivados dele, entretanto, os antivirais também da classe dos inibidores de protease, indinavir, amprenavir, lopinavir e nelfinavir apresentam afinidade significativamente mais baixa, devido a uma menor taxa de associação ao alvo.

2.8 Proteases: Identificação e Obtenção

Em geral, as Saps de *Candida* spp. possuem ampla especificidade de substrato, o que torna possível degradar diversos tipos de proteínas. Entretanto, estudos mostraram que quando purificadas, as Saps têm especificidade reduzida, pois são capazes de utilizar apenas albumina e fibronectina. A enzima tem alta preferência por peptídeos que tenham como aminoácidos Glicina (Glu) e Leucina (Leu), no entanto sofre redução da atividade enzimática na presença de Fenilalanina (Phe) ou Prolina (Pro) e inativação na presença de Arginina (Arg) ou Valina (Val) (NA et al., 1997; HAZEN et al., 2000).

A identificação das proteinases pode ser feita por interação com substratos, não permitindo, no entanto, a diferenciação entre as isoformas enzimáticas. Alternativamente, outra forma de efetuar a identificação é através da utilização de anticorpos específicos, policlonais ou preferencialmente monoclonais, desenvolvidos após estudos em modelos experimentais. Durante uma candidíase disseminada, pacientes secretam anticorpos IgG proteínase específicos a fim de eliminar a infecção. Alguns trabalhos relatam possível especificidade para algumas isoformas

de Sap, no entanto, existem alguns epitopos comuns, principalmente entre as proteinases de um mesmo grupo. Assim, preparações direcionadas contra Sap2 podem ser altamente imunorreativas contra Sap1 e principalmente Sap3 apresentando, respectivamente, 65% e 90% de imunorreatividade (RAY, PAYNE, 1990; SMOLENSKI et al., 1997; MORRISON et al., 2000).

O padrão de produção de isoenzimas depende da linhagem estudada, do tipo celular e de fatores ambientais (SMOLENSKY et al., 1997). Algumas modificações nas condições de cultivo como, suplementação dos meios de cultivo, temperatura e tempo de incubação podem promover expressão diferenciada de proteinases. Através de condições especiais de cultivo é possível estimular a produção de determinadas isoenzimas da família das proteinases.

Através do emprego da cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em fase reversa é possível separar produtos peptídicos gerados por degradação de um substrato teste e analisar o perfil de clivagem enzimático das isoenzimas dentro da família Sap (REMOLD et al., 1968; SMOLENSKY et al., 1997). Um espectrômetro de massas acoplado ao sistema gera uma imagem, que quando interpretada permite observar a existência ou não de especificidade. Enzimas com picos semelhantes devem possuir também sítios de clivagem semelhantes (REMOLD et al., 1968; MORRISON et al., 1993; SMOLENSKI et al., 1997).

As Saps podem ser obtidas a partir do sobrenadante de cultura, mas necessita ser purificada para a remoção de proteínas contaminantes, como as manoproteases (MORRISON et al., 1993; HUBE, NAGLIK, 2001). Segundo SMOLENSKY et al. (1997), a maioria dos estudos de purificação realizados atualmente utiliza pelo menos uma etapa de cromatografia por troca iônica, como proposto por Remold et al. (1968).

Em geral, a purificação é realizada por etapas alternadas de separação cromatográfica em coluna e filtração em membrana, que combinadas fornecem maior nível de pureza (MORRISON et al., 1993; NA et al., 1997).

Não existe metodologia padrão para a purificação das Saps, ou seja, em todos os protocolos disponíveis uma série de etapas é necessária à realização do processo e todas são alvos de alterações que podem ser feitas com o objetivo de melhorar a purificação e aumentar a recuperação da atividade enzimática. A escolha do processo de purificação deve levar em conta os planos direcionados à

proteínase, entre outras palavras, se há necessidade de recuperação da proteínase ativa.

A análise de pureza da enzima purificada pode ser feita por vários métodos, incluindo Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), Imunoblotting e em alguns casos, focalização isoelétrica confirmada por sequenciamento N-terminal (SMOLENSKY et al., 1997).

A obtenção de Sap purificada em larga escala é possível apenas através do uso da tecnologia do DNA recombinante. Estudo recente descreve este tipo de trabalho para Sap2, Sap4-Sap6, Sap8 e Sap9 (RIPEAU et al., 2002). A partir da protease purificada diversos estudos podem ser realizados com o objetivo de compreender melhor os mecanismos que regem sua atividade e possibilitam o desenvolvimento de novas drogas que possam atuar nas mesmas.

2.9 Estudo das isoenzimas Saps de *Candida* spp.

A produção de Sap *in vitro* deve ser estimulada por condições especiais de cultivo. A atividade enzimática de Saps não é detectada em meios de cultivo ricos em nutrientes porque a expressão dos genes SAP é regulada principalmente por escassez de nutrientes (MORRISON et al., 1993; SANGIARD et al., 1997; HUBE, NAGLIK, 2001). Utilizar-se de meios pobres adicionados de proteínas como única fonte de nitrogênio é uma alternativa muito utilizada atualmente para favorecer a produção e secreção das Saps. A albumina bovina é o principal substrato escolhido para os testes, mas pode ser substituída com sucesso por caseína (MORRISON et al., 1993; HUBE, NAGLIK, 2001; WHITE, AGABIAN, 1995).

Acredita-se que a secreção de aspartato protease durante o cultivo é estimulada pela presença de proteínas como única fonte de nitrogênio (BRAGA-SILVA et al. 2009). A protease ativa age sobre o substrato protéico promovendo sua quebra. Assim, durante o cultivo tem-se a secreção enzimática, que faz aumentar o nível de proteína total, mas ao mesmo tempo tem-se a diminuição do nível de proteína total oriundo da quebra da albumina (BRAGA-SILVA et al. 2009).

As metodologias utilizadas para a determinação da atividade proteolítica a partir de sobrenadantes de cultura utilizam, quase sempre, dos mesmos recursos.

Entretanto a determinação pode ser feita de forma qualitativa, que demonstra a atividade ou quantitativa, que avalia seu percentual.

Os ensaios qualitativos geralmente são realizados em placas contendo meios de cultura adicionados de albumina bovina. Após inoculação as placas são incubadas para promover crescimento das colônias e estimular a produção de Saps. A presença de zonas claras (halos) em torno das colônias representa a degradação da albumina e classifica a atividade enzimática como negativa (sem halo visível), positiva ou fortemente positiva, de acordo com tamanho do halo (RAY, PAYNE, 1990; SMOLENSKY et al., 1997; LEE et al., 2009).

A quantificação pode ser realizada através de um ensaio que mede espectrofotometricamente a atividade enzimática da protease através da degradação do substrato. O ensaio foi descrito pela primeira vez em 1980 e é utilizado até hoje. Basicamente faz-se a incubação do sobrenadante da cultura com a albumina e após certo tempo, a reação é interrompida por adição de ácido tricloroacético (CRANDAL, EDWARDS, 1987; MENDES et al., 2007; MORES et al., 2009). O teor de albumina total (sem digestão) e remanescente (após digestão) é calculado principalmente por medida direta da densidade ótica do sobrenadante límpido à A_{280} . O aumento na absorbância, observado pela diferença entre as leituras, reflete a degradação proteolítica (NA et al., 1997; SMOLENSKY et al., 1997). A degradação proteolítica também pode ser determinada pela medida da densidade ótica à A_{660} ou A_{700} com prévia adição de reagente de Folin ao sobrenadante e posterior análise da diferença entre as leituras (RAY, PAYNE, 1990; MENDES et al., 2007). Em ambos os casos, um aumento de 0,1 na densidade ótica corresponde a uma unidade de atividade enzimática (SMOLENSKY et al., 1997; MENDES et al., 2007).

Os ensaios de determinação da atividade proteolítica são realizados, em sua maioria, para detectar indiretamente a presença da proteinase em cultura. Entretanto, alguns trabalhos realizam esses ensaios usando a protease purificada, com o objetivo de avaliar a atividade remanescente após a recuperação da enzima (RAY, PAYNE, 1990).

2.10 Técnica de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) em tempo real

Dentre as metodologias de avaliação da expressão gênica, a PCR Transcrição Reversa (RT-PCR) em tempo real é uma das mais sensíveis e versáteis, pois esta técnica pode ser usada para determinar a presença ou ausência de transcritos, para estimar o nível de expressão e para clonar produtos de cDNA sem a necessidade da construção e seleção de bibliotecas de cDNA (SAMBROOK, 2001; ORSEL et al., 2002). A RT-PCR, em teoria, é capaz de detectar a presença de uma única cópia de uma determinada sequência na amostra de RNAm. Na prática, no entanto, este nível de sensibilidade está fora de alcance principalmente devido à ineficiência da primeira fase da técnica, a conversão do RNA em cDNA (SAMBROOK, 2001).

A descoberta de que a família de genes SAP é diferencialmente expressa em uma variedade de condições ambientais *in vitro* (HUBE et al., 1994; WHITE, AGABIAN, 1995), levou à proposição de que esta expressão diferencial poderia ocorrer também *in vivo* e contribuir para o desenvolvimento de diferentes infecções por *Candida* spp. (NAGLIK et al., 2008). Este conceito, junto à capacidade de *Candida* spp. de habitar um diverso número de nichos no hospedeiro estimulou estudos subsequentes de investigação da expressão dos genes SAP (NAGLIK et al., 2008). Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a detecção e identificação de proteínas codificadas por famílias multigênicas, como a família de isoenzimas Sap, e entre esses métodos a técnica de RT-PCR vem sendo descrita em vários estudos, (FELK et al., 2002; KORTING et al., 2003; NAGLIK et al., 2008). Esses estudos tem sido vitais em demonstrar a expressão dos genes SAP em infecções causadas por *C. albicans*, pois além de serem capazes de detectá-los eles possibilitam analisar os níveis relativos dos genes expressos (NAGLIK et al., 2008).

O procedimento para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi introduzido por Kerry Mullis em 1983 (MULLIS, 1990), para o qual ele ganhou o Prêmio Nobel em 1993. Em 1996, a empresa “Applied Biosystems” tornou a PCR em tempo real comercialmente disponível (HEID et al., 1996) com a introdução do instrumento 7700. A PCR em tempo real é a coleta contínua de sinal fluorescente a partir de uma ou mais reações em cadeia da polimerase ao longo de um intervalo de ciclos. PCR quantitativa em tempo real é a conversão dos sinais fluorescentes de

cada reação em um valor numérico para cada amostra (DORAK, 2007). Ao combinar a reação de transcriptase reversa (RT) com a PCR, foi possível a identificação de um transcrito de RNA específico a partir de um número de cópias muito baixo do material de partida (SAMBROOK, 2001). A RT-PCR é uma ferramenta simples e de grande utilidade para estudos de expressão gênica, possibilitando verificar não só a presença de transcritos como também fornecer dados do nível de expressão relativa do gene. A quantificação relativa ou comparativa é a ferramenta adequada para investigar pequenas mudanças nos níveis de expressão do gene (BUSTIN, 2002).

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA usando a DNA-polimerase, que sintetiza sequências complementares de DNA a partir de um iniciador ou primer, que deve se ligar em um ponto determinado da cadeia de DNA (NOVAIS, ALVES, 2004). A sonda TaqMan[®] é um fragmento de DNA composto por um fluoróforo (emissor de luz) em uma extremidade e um “*quencher*” (absorvedor de luz) na outra, que hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. A sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase e os produtos da reação são detectados pela fluorescência emitida pelo fluoróforo liberado devido à clivagem dos nucleotídeos (NOVAIS, ALVES, 2004). A emissão de fluorescência aumenta de forma exponencial e gera um sinal diretamente relacionado à quantidade de produto da PCR. O resultado da amplificação é uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias (MULLIS, 1990).

A especificidade, ampla faixa dinâmica e facilidade de uso da reação em cadeia da polimerase do tipo transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR) em tempo real tem feito este ser o método de escolha para quantificar RNA (DORAK, 2007). Entretanto, como qualquer medição científica, qRT-PCR sofre de problemas causados por erros (HUGGETT et al., 2005). Conseqüentemente, a normalização dos dados é um componente indispensável no processo de análise do qRT-PCR e é essencial para a correta comparação das medidas entre diferentes amostras.

Um método para quantificação específica de RNAm através de PCR quantitativa foi demonstrado por Wang et al. (1989), usando um RNA sintético, adicionado à amostra, como padrão interno. A qRT-PCR se tornou o método mais preciso e sensível, já descoberto, para a detecção e quantificação de ácidos nucléicos (DORAK, 2007).

Estudos como os desenvolvidos por Felk et al. (2002), Korting et al. (2003), Naglik et al. (2008), entre outros, obtiveram resultados satisfatórios e reprodutíveis no uso da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão dos genes SAP. No uso da mesma técnica, trabalhos como o de Nailis et al. (2010) associaram a expressão dos genes SAP à outros fatores de virulência, como a capacidade de formação de biofilmes. A observação de trabalhos bem sucedidos como estes, permite supor que este seja um caminho promissor nos estudos de expressão dos genes SAP de *Candida* spp.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão dos genes SAPs, a produção de isoenzimas Sap e atividade metabólica de linhagens hospitalares de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* na presença e ausência de concentrações subinibitórias de antifúngicos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a sensibilidade dos isolados de *C. albicans* e *Candida não-albicans* a antifúngicos convencionalmente usados em esquemas terapêuticos (Fluconazol e Anfotericina B) e a antifúngicos que ainda não fazem parte das rotinas hospitalares (voriconazol e caspofungina);

Analisar o perfil proteico de isolados de *Candida* spp. cultivados em meio indutor da produção de Sap.

Determinar e comparar a atividade proteolítica de Sap dos isolados de *Candida* spp. na presença e ausência de concentrações subinibitórias de antifúngicos;

Determinar e comparar a atividade metabólica de *Candida* spp. na presença e ausência de concentrações subinibitórias de antifúngicos

Identificar o gene SAP2, avaliar e comparar sua expressão por PCR em tempo real, em *Candida albicans* ATCC 64548 e *Candida krusei* ATCC 6258 cultivados na presença e ausência de concentrações subinibitórias de antifúngicos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Local de execução e Amostras

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia básica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Foram estudadas 27 amostras de *Candida* spp, sendo cinco padrões “American Type Culture Collection” (ATCC), *C. albicans* ATCC 64548, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. krusei* ATCC 6258 e 22 isolados de *Candida* spp. provenientes de casos de infecção hospitalar fúngica mantidos na Micoteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia básica em Agar Sabouraud Dextrose (Difco) a 4°C.

4.2 Indução à produção de Sap

Primeiramente, fez-se um pré-cultivo dos isolados selecionados em Agar Sabouraud Dextrose (Difco) por 24 horas a 37°C. Para a produção de Sap, preparou-se suspensões em caldo “*Yeast Carbon Base*” suplementado com 0,8% (m/v) de soro albumina bovina (YCB-BSA) diretamente do pré-cultivo com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland. Procedeu-se à incubação das suspensões em tubos de vidro com tampa de rosca por 72 horas a 37°C e 100 rpm. Após esse tempo transferiu-se 1,0 ml de cada cultura para tubos estéreis tipo Eppendorf® de 1,5 ml, os quais foram centrifugados por 5 minutos a 13000g e 4°C. Os sobrenadantes que, supostamente, continham a protease foram transferidos para Eppendorf's® estéreis e armazenados de 2 a 8°C para posterior utilização. O ensaio foi realizado com base nos estudos de Pichová et al. (2001) e Braga-Silva et al. (2009), com algumas modificações.

4.3 Estudo do perfil proteico de *Candida* spp. - Pesquisa de aspartato protease secretada (Sap)

Todas as isoenzimas Sap secretadas para o meio extracelular (Sap1-8) podem ser obtidas diretamente do sobrenadante de cultura não se fazendo necessário o rompimento das células. Assim, neste trabalho, privilegiou-se a análise das Saps secretadas. Fez-se uma análise do perfil de degradação de proteínas dos isolados de *Candida* spp. a partir dos sobrenadantes produzidos pelo cultivo em meio indutor de Sap, YCB-BSA.

4.3.1 Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total pré e pós-cultivo dos isolados de *Candida* spp. foi realizada segundo o método colorimétrico de doseamento proteico de Bradford (BRADFORD, 1976). Utilizou-se para o ensaio uma placa de microtitulação de 96 poços composta de poliestireno. Em cada microensaio adicionou-se 150 µl de água destilada, 10 µl de amostra (sobrenadante obtido por centrifugação da cultura) e 40 µl do Reagente de Bradford. Após 15 minutos, fez-se a medida da densidade óptica produzida a 595 nm no leitor automático de placas Zenyth®. O teste foi realizado em triplicata por amostra.

A estimativa da quantidade de proteína total existente foi feita pela aplicação do valor médio das absorvâncias em uma equação matemática fornecida após confecção da curva de calibração para o reagente de Bradford utilizado.

4.3.2 Análise do perfil proteico de *Candida* spp.

A quantificação de proteínas totais do sobrenadante de cultura dos isolados cultivados em YCB-BSA foi realizada, conforme descrito anteriormente, para a determinação do volume de sobrenadante que corresponderia à massa proteica fixada para a realização da análise eletroforética.

Realizou-se uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE segundo o método de Laemmli (1970) usando gel de poliacrilamida 10%. As amostras foram preparadas pela mistura da solução de proteínas (sobrenadante de

cultura) com tampão de amostra 2X (Tris-HCL 1,5M, SDS 20%, glicerol, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol) proporção 1:1 e aquecidas por 5 minutos a 100°C. Os géis foram carregados com os volumes correspondentes à massa proteica pré-definida. Um marcador padrão de peso molecular, que possui padrão de bandas bem definido, composto pelas proteínas padrões albumina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,4 kDa) foi analisado juntamente com as amostras para possibilitar o efeito comparativo. O meio de cultura YCB-BSA não inoculado foi utilizado como controle negativo.

A eletroforese foi processada inicialmente a 60 V, manteve-se até que as amostras percorressem todo o gel de empilhamento, e posteriormente passou a 90 V até o fim da corrida, no qual o gel foi retirado das placas para revelação.

O gel foi corado com a solução corante azul de coomassie 0,25% (0,25% Coomassie brilliant blue R-250; 45% Metanol; 10% Ácido acético; 45% água destilada) por cerca de 12 horas. Após esse prazo procedeu-se à descoloração por adição de uma mistura de etanol e água na proporção de 1:1. O processo foi repetido diversas vezes por troca do descorante, até que o fundo do gel estivesse nitidamente claro e as bandas ficassem bem marcadas em tons de azul.

A análise dos resultados foi visual, na qual se fez a comparação entre as bandas obtidas a partir das amostras analisadas e o marcador de peso molecular. Como relatado por White, Agabian (1995), bandas próximas de 43 kDa podem corresponder à presença de Sap não purificada.

4.4 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória (IC₈₀ e IC₁₀₀) dos antifúngicos por difusão em fita (Etest®)

Estudou-se o perfil de sensibilidade dos 22 isolados clínicos de *Candida* spp e das cinco linhagens padrão de *Candida* spp. ATCC. Entre elas, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, funcionaram adicionalmente como controle do teste, como recomendado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI).

Os isolados de *Candida* spp. foram testados frente a quatro antifúngicos, para o estabelecimento da Concentração Inibitória (IC). O método comercial de difusão em fita, “Etest[®]” (AB BIODISK, Solna, Suécia) foi executado e interpretado conforme proposto no documento M44-A2 (CLSI, 2009), M27A3 (CLSI, 2008) e critérios do fabricante. As fitas de “Etest[®]” são constituídas de plástico impregnado com determinado antifúngico em gradiente de concentração contínuo e definido. As fitas utilizadas foram Anfotericina B (AP), Voriconazol (VO) e Caspofungina (CS) todas com gradiente variando de 0,002 a 32 µg/ml e Fluconazol (FL) com gradiente de 0,016 a 256 µg/ml.

Os isolados de *Candida* spp. foram previamente cultivados em meio agar Sabouraud-dextrose por 24 horas a 37°C e, a partir desses cultivos preparou-se suspensões em solução salina estéril com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland. Cada inóculo foi semeado com o auxílio de um “swab” sobre a superfície do meio contido em placas de Petri. O meio de cultura utilizado foi agar Mueller Hinton, suplementado com 0,5 µg/ml de azul de metileno. Após 15 minutos, as fitas foram colocadas cuidadosamente sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas por 24-48 horas a 37°C. A interpretação do método “Etest[®]” e a determinação da IC foi feita após incubação das placas-teste por 48 horas, estratégia necessária para avaliar a sensibilidade de isolados apresentaram crescimento inicial lento.

A IC de cada antifúngico foi estabelecida no ponto de intersecção da elipse de inibição do crescimento com a fita inerte impregnada de antifúngico, sendo que para a anfotericina B a determinação da IC foi feita onde houve 100% de inibição, e para os azóis e a caspofungina considerou-se 80% de inibição (FIGURA 4), segundo critérios do fabricante.

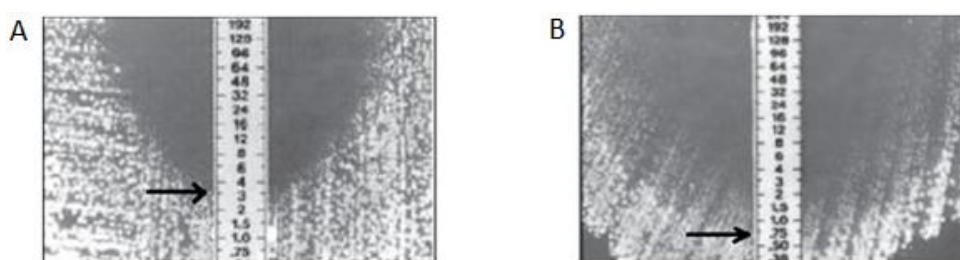


Figura 4. Esquema de representação do teste de sensibilidade por difusão em fita “Etest[®]” e determinação da IC de isolados com 100% de inibição em A e 80% em B. As setas indicam o ponto de intersecção que corresponde à IC.

Não foram estabelecidos pontos de corte para Anfotericina B, mas de acordo com o texto do documento M27-A3 (CLSI 2008), isolados de *Candida* spp. com MIC ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ podem ser considerados suscetíveis. Os perfis de sensibilidade x resistência aos antifúngicos analisados foram interpretados conforme proposto no documento M27 A3 (CLSI, 2008) (TABELA 2). Os isolados foram classificados como sensíveis (S), sensíveis dose dependente (SDD), resistentes (R) e não sensíveis (NS) de acordo com o valor de MIC apresentado.

Tabela 2 - Concentrações inibitórias (IC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade de *Candida* spp. frente aos antifúngicos testados, segundo documento M27A3 (CLSI, 2008).

Drogas Antifúngicas ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	S	SDD	R	NS
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64	-
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4	-
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2	-
Caspofungina	≤ 2	-	-	> 2

(S) Sensível; (SDD) Sensível dose dependente; (R) Resistente; (NS) Não sensível.

4.5 Determinação da atividade proteolítica de Sap

Determinou-se qualitativa e quantitativamente a atividade proteolítica de Sap dos 27 isolados de *Candida* spp.

4.5.1 Avaliação qualitativa da atividade proteolítica de Sap

O ensaio foi realizado como descrito pela primeira vez por Staib (1965), que consiste na determinação da atividade proteolítica de *Candida* spp. através da utilização do meio agar proteinase composto por YCB 1,17%, Agar-agar 1,8%, Protovit[®] 0,25% e soro albumina bovina (BSA) 0,2% como única fonte de substrato.

Os isolados de *Candida* spp. foram previamente cultivados em agar Sabouraud-dextrose por 24 horas a 37°C e, a partir desses repiques preparou-se suspensões em solução salina estéril com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland. De cada inóculo foi dispensado 20 µl de forma pontual sobre a superfície do agar proteinase contido em placas de Petri. Após cerca de 10 minutos, tempo necessário à absorção do inóculo pelo meio de cultura, as placas foram incubadas por 96 horas à 37°C em estufa úmida. Adicionalmente, fez-se a análise da influência dos antifúngicos sobre a atividade proteolítica dos isolados padrões de *Candida* spp. pela adição de soluções de antifúngicos nas concentrações correspondentes a ½ e ¼ da IC₈₀ de fluconazol e IC₁₀₀ de anfotericina B ao meio agar proteinase fundido, de tal forma que sua concentração final no meio fosse compatível com as doses propostas para o teste. A atividade proteolítica dos isolados foi avaliada pela observação de zonas claras (halos de degradação) em torno de cada colônia. Os halos produzidos representam a degradação do substrato BSA pela ação de enzimas proteolíticas, especialmente a aspartato protease, que tem sua atividade potencializada nessa condição. A existência de halo em torno da colônia classifica o isolado como um possuidor de enzimas proteolíticas ativas e a medida da razão entre o diâmetro total do halo formado e o diâmetro da colônia ($R_{\text{halo/colônia}}$) relaciona o teor de atividade. A intensidade de atividade foi estipulada a partir da $R_{\text{halo/colônia}}$. Sinais foram atribuídos à $R_{\text{halo/colônia}}$ com base no proposto por Hamal et al. (2004), assim isolados com $R_{\text{halo/colônia}} = 1,0$ são não proteolíticos (-), $R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,1$ fracamente proteolíticos (+), $1,1 < R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,3$ moderadamente proteolíticos (++) e $R_{\text{halo/colônia}} > 1,3$ altamente proteolíticos (+++).

4.5.2 Avaliação quantitativa da atividade proteolítica de Sap

Muitos grupos de pesquisa trabalham com ensaios de determinação da atividade proteolítica, entretanto, a maioria deles realiza este ensaio conforme proposto por MCDONALD, ODDS (1980), no qual se faz a medida indireta da atividade pela análise do teor de degradação de um substrato, que geralmente é a albumina. Baseado no método de Doumas et al. (1971) empregado na determinação da concentração de albumina em soro humano, que tem como princípio a reação entre albumina e o reativo Verde Bromocresol, propôs-se um

método de determinação indireta da atividade proteolítica das aspartato proteases. Este método é vantajoso no que diz respeito à rapidez, agilidade e análise espectrofotométrica ($\lambda = 630$ nm, região visível). A atividade proteolítica dos isolados foi estimada pelo nível de degradação de substrato (soroalbumina bovina) calculado pela diferença entre a concentração de albumina pré e pós-cultivo. Considerou-se também a degradação natural através da análise de um controle (meio não inoculado).

Os isolados de *Candida* spp. foram cultivados na presença e na ausência de fluconazol e anfotericina B para avaliar o efeito dos antifúngicos sobre a atividade proteolítica de Sap. Primeiramente fez-se um cultivo meio agar proteinase por 48 horas a 37°C, etapa necessária para limitar a disponibilidade de nutrientes e favorecer a produção de Sap. A partir desse cultivo, fez-se suspensões com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland no caldo de cultivo YCB-BSA contido em tubos com tampa de rosca. Propôs-se analisar a influência dos antifúngicos nas concentrações $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da IC_{80} no caso do fluconazol e IC_{100} no caso da anfotericina B para cada isolado. Soluções dos antifúngicos foram incorporadas ao meio inoculado de forma que sua concentração final fosse compatível com as doses propostas para o teste.

Para determinar a concentração inicial de albumina, retirou-se 1,0 ml de cada cultura e esse volume foi transferido para Eppendorf[®]s estéreis. Após centrifugação, fez-se a reação de 5 μ l do sobrenadante de cultura de cada isolado com 1 ml do corante Verde de Bromocresol. Ele age por complexação com a albumina formando um complexo colorido, que após 15 minutos, é quantificado por medição espectrofotométrica a 630 nm.

Incubou-se as culturas por 72 horas a 37°C e 100 rpm. Passado esse tempo, analisou-se os sobrenadantes de cultura pós-centrifugação e a concentração de albumina remanescente pós-cultivo foi determinada pela reação com o corante Verde de Bromocresol. A análise inicial foi feita para, posteriormente, estimar o teor de albumina degradada por ação das proteases, que foi obtido por diferença entre as duas determinações. O percentual de degradação do substrato BSA dos 27 isolados estudados foi obtido por método comparativo, no qual o isolado que apresentou maior concentração de albumina degradada recebeu o percentual máximo (100%) e os demais receberam percentuais menores e comparáveis.

A partir do percentual de degradação definiu-se o percentual de atividade proteolítica, em que o maior percentual de atividade foi estabelecido para os isolados que apresentaram maior teor de albumina degradada. Fez-se a proposição de três faixas de percentual, às quais se atribuiu sinais de positividade que representassem a intensidade de atividade: percentuais menores que 20% compreendem isolados fracamente proteolíticos (+), isolados com percentuais de 20-50% foram considerados moderadamente proteolíticos (++) e para percentuais acima de 50% considerou-se isolados altamente proteolíticos (+++). Analisou-se a intensidade de atividade proteolítica produzida pelos isolados na presença e na ausência dos antifúngicos e efetuou-se a comparação dos resultados por espécie de forma a avaliar sua capacidade proteolítica nas diferentes condições de cultivo.

4.6 Avaliação da atividade metabólica de *Candida* spp. na presença e ausência de fluconazol e anfotericina B

4.6.1 Ensaio de redução do XTT

O ensaio de redução do XTT (2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilaminocarbonil-tetrazolium) proposto por Kuhn et al. (2002) e Ramage et al. (2001) permite avaliar a atividade metabólica de biofilmes formados por leveduras. Propôs-se, então, um ensaio de redução do XTT para avaliar a presença de células planctônicas metabolicamente ativas nos isolados de *Candida* spp. e, posteriormente fazer a comparação do percentual de atividade metabólica dos isolados de *Candida* spp. cultivados em meio de indução à produção de Sap na presença e ausência dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

A solução reagente foi produzida pela mistura de uma solução de XTT 1 mg/ml a uma solução de Menadiona (2-Metilnaftaleno-1,4-diona) 0,4 mM na proporção de 5:1. A solução de XTT foi preparada em solução tampão PBS e a de Menadiona em Acetona PA, ambas esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm.

As culturas de *Candida* spp. cultivadas na ausência e na presença de antifúngicos foram homogeneizadas suavemente, e delas transferiu-se 200 µl para

Eppendorf's® estéreis. Em seguida, adicionou-se 200 µl da mistura XTT-Menadiona e incubou-se a mistura de reação por 2 horas a 37°C e ao abrigo da luz. O ensaio foi feito em duplicata. Passado o tempo de incubação, o XTT inicialmente amarelo citrino foi reduzido a um derivado formazan alaranjado. A mistura de reação foi centrifugada para promover a sedimentação celular e 200 µl do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de poliestireno de 96 poços (Biosystems). Mediu-se a absorbância da cor produzida a 490 nm no leitor automático de microplacas. A intensidade da cor produzida é diretamente relacionada à atividade metabólica das células, pois quanto maior a absorbância maior a atividade.

Foi feita a análise percentual da atividade metabólica dos isolados. Atribuiu-se o valor 100 % para a amostra correspondente ao maior valor de absorbância, a qual foi estabelecida como referência de atividade máxima. Todas as amostras restantes tiveram sua atividade metabólica calculada em relação ao isolado com atividade metabólica considerada máxima. Sinais de positividade foram atribuídos às faixas de percentual da seguinte maneira: percentuais menores que 20% compreendem isolados com baixa atividade metabólica (+), isolados com percentuais de 20-50% com atividade metabólica moderada (++) e para percentuais acima de 50% considerou-se isolados com atividade metabólica alta (+++). Analisou-se, então, a intensidade de atividade metabólica produzida pelos isolados e fez-se a comparação entre os isolados de *Candida* spp.

O efeito dos antifúngicos, em concentrações subinibitórias, sobre a atividade metabólica foi analisado por comparação, na qual se avaliou o aumento ou a diminuição do percentual de atividade.

4.7 Relação entre os resultados obtidos pelos métodos usados na determinação da atividade proteolítica de *Candida* spp.

Fez-se a comparação dos resultados dos testes de atividade proteolítica dos isolados de *Candida* spp. obtidos por metodologia qualitativa e quantitativa com o objetivo de se estabelecer a correlação entre os métodos.

4.8 Relação entre atividade proteolítica e atividade metabólica de *Candida* spp.

Avaliou-se, de forma combinada, os resultados dos testes de atividade proteolítica e metabólica de *Candida* spp. de maneira que fosse possível avaliar a relação entre os testes.

4.9 Avaliação da expressão de SAP2 nos isolados padrões de *Candida* spp.

A expressão do gene SAP2 foi avaliada nos isolados padrões de *Candida albicans* ATCC 64548 e *Candida krusei* ATCC 6258 cultivados na ausência e na presença de concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B.

4.9.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Suspensões celulares dos padrões foram preparadas em tampão PBS 1X (Na_2HPO_4 0,144%; KH_2PO_4 0,024%; NaCl 0,8%; KCl 0,02%), em concentração aproximada de 1×10^7 células/ml, para efeito de padronização do inóculo utilizado. Elas foram incubadas por uma hora com 30 μl de enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) para promover a formação de poros na parede celular e facilitar o rompimento da célula. O RNA total foi extraído através do InviTrap[®] Spin Cell RNA Mini Kit (Invittec). A seguir, as amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de 11 μl do RNA foi adicionado 1 μL de uma mistura contendo os quatro “dNTP’s” na concentração de 10 mM (Invitrogen), 1 μl de “random primers” (primers aleatórios) (Invitrogen). As reações foram levadas ao termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystem) por 5 minutos a 65°C para promover a dissociação das estruturas secundárias. Após, os tubos contendo a mistura de reação foram retirados e colocados no banho de gelo por 20 segundos para evitar anelamentos inadequados. Em seguida, 2 μl DTT (Invitrogen) e 4 μl de tampão (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen) foram adicionados aos demais componentes como cofatores da reação e os tubos foram colocadas novamente no termociclador. Após 20 segundos a 37°C, temperatura necessária para promover o anelamento dos “random primers”,

adicionou-se 1 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase) (Invitrogen), que é a responsável pela transcrição reversa e consequente síntese do cDNA, a partir do RNA inicial. Após 50 minutos a 37°C, um ciclo de 95°C por 5 minutos promove a inativação da enzima e a remoção dos primers. Ao final da reação, os tubos contendo as amostras foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C para posterior utilização em PCR quantitativo em tempo real.

4.9.2 PCR quantitativo em tempo real

Para PCR em tempo real foram utilizadas sondas de hidrólise duplamente marcadas do tipo TaqMan, que possuem o fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e o “quencher” Iowa Black[®] FQ na 3'. A sequência do primer utilizado foi: SAP2 Forward: 5'TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG3', SAP2 Reverse: 5'TGGATCATATGTCCCCTTTTGT3' (NAGLIK et al., 2008) e sonda 5'CACTTATAGTGATCAAAGTGCAGATTTCT. Para cada amostra analisada adicionou-se 3µL de cDNA ao volume composto por 10 µL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 2X (Invitrogen) e 1µL da mistura que contém os iniciadores forward e reverse (18 µM) e a sonda TaqMan (5µM) das amostras. Controles negativos foram adicionados ao conjunto de reações. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 20µL por reação. As amplificações se iniciaram por um ciclo de 50°C por 2 minutos para remover qualquer ligação inadequada e evitar contaminação cruzada. Em seguida, um ciclo se desenvolveu a 95°C por 10 minutos, para promover a desnaturação das cadeias de cDNA e a ativação da Taq polimerase. Na etapa final 40 ciclos foram realizados, sendo cada um de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.9.3 Interpretação dos resultados

Para interpretação dos resultados, a “baseline” (nível de background fluorescente) e o “Threshold” (limiar) para a fluorescência FAM foram programados manualmente. Fez-se a análise das curvas de amplificação gênica e dos valores de C_T (ciclo no qual o valor limiar de fluorescência foi alcançado), como ilustrado na

Figura 5. A determinação do C_T permitiu detectar a presença do DNA alvo e validar a amplificação. Resultados com C_T indeterminado foram considerados válidos e relatados como negativos para a presença do DNA alvo. Resultados com $C_T \leq 35$ foram relatados como positivos para a presença do DNA alvo. Quanto maior for o valor do C_T , menor é o número de cópias do gene amplificado. Fez-se a comparação, em valor absoluto, dos C_T obtidos nas diferentes condições de exposição dos isolados.

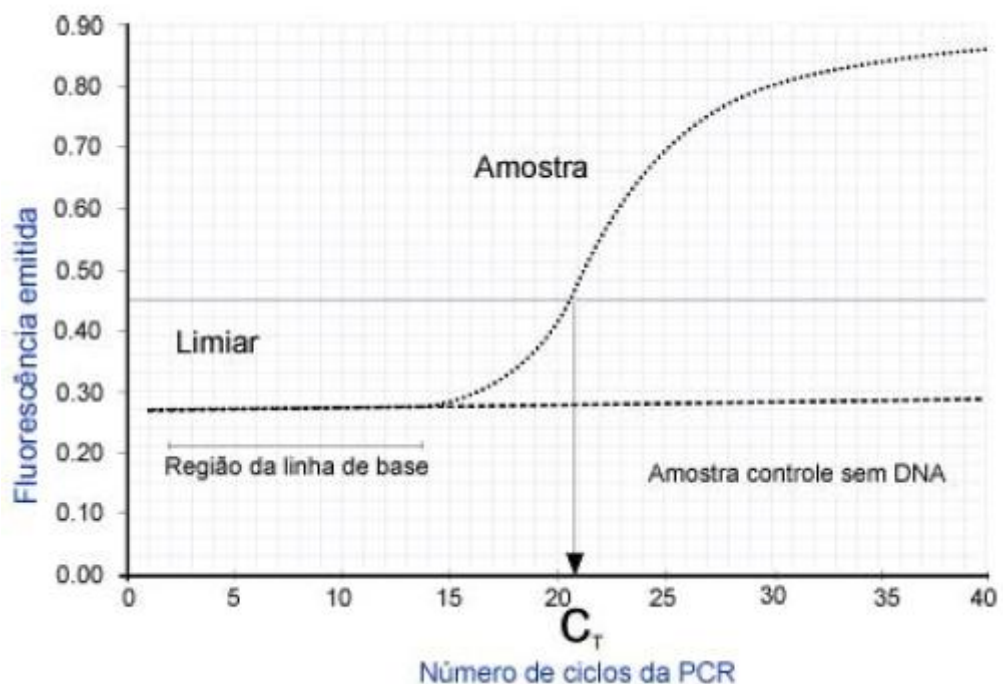


Figura 5. Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T - Cycle Threshold. A amplificação mostra três fases distintas: (1) linha basal - não há produto suficiente para que a fluorescência seja detectada; (2) fase log - a quantidade de produtos dobra a cada ciclo e (3) fase platô - não há mais aumento no número de produtos (NOVAIS, ALVES, 2004).

4.10 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios deste trabalho foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância, uma vez que os dados obtidos não obedecem às pressuposições da ANAVA.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo do perfil proteico de *Candida* spp. - Pesquisa de aspartato protease secretada (Sap)

O perfil proteico dos isolados de *Candida* spp. está representado no gel obtido por eletroforese SDS-PAGE (FIGURA 6). A análise do gel permitiu identificar, em todas as amostras, a presença de uma banda fortemente marcada, compatível com o peso de 66 kDa do marcador, que corresponde à albumina. Essa banda deve corresponder à albumina não degradada presente no meio de cultura. O perfil gerado pelos isolados apresentou uma banda mais clara e mais estreita em torno de 43 kDa, como anteriormente observado por White, Agabian, 1995, que caracterizou tal banda como possível presença de Sap entre outros produtos gerados no cultivo. O perfil proteico foi semelhante em todos os isolados. A visualização da banda permitiu sugerir a presença de Sap entre produtos oriundos da degradação de albumina e outros constituintes do meio de cultura utilizado.

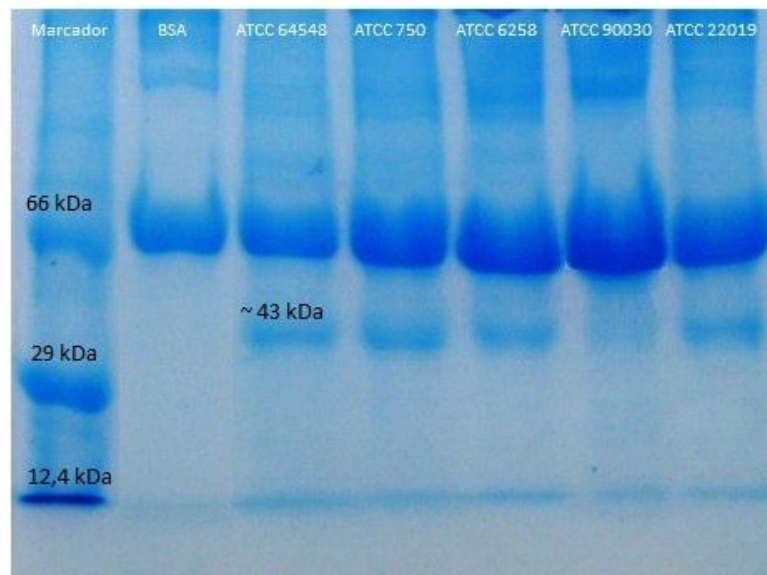


Figura 6. Perfil de degradação proteica dos isolados padrões de *Candida* spp. obtido por eletroforese SDS-PAGE. Banda aproximada de 43 kDa é sugestiva da presença de Sap. *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019.

5.2 Avaliação da sensibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos

A Figura 7 ilustra o crescimento do isolado de *C. tropicalis* ATCC 750, após 48 horas de incubação, perante os quatro antifúngicos testados.

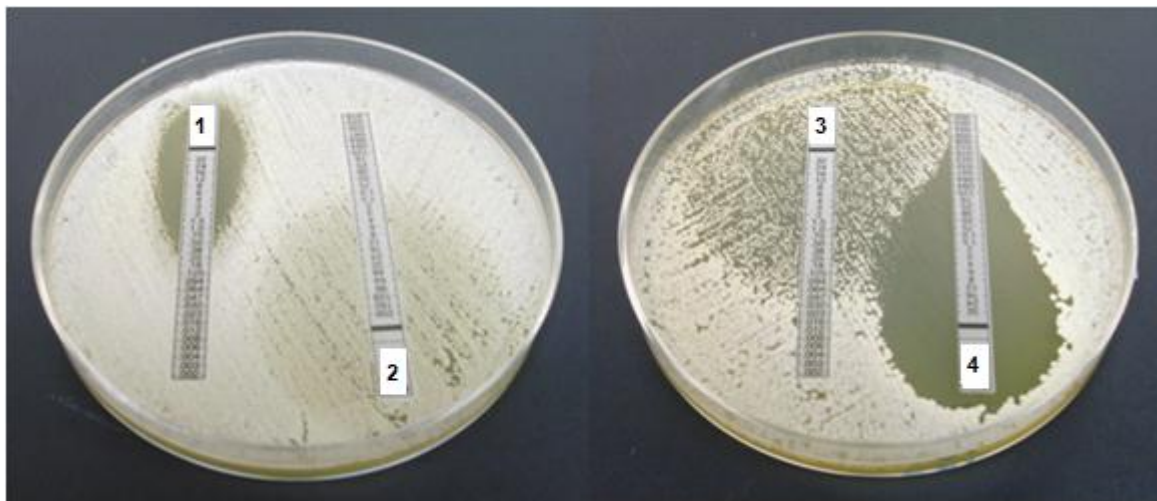


Figura 7. Avaliação da sensibilidade de *C. tropicalis* ATCC 750 aos antifúngicos por difusão em fita - “Etest[®]”. 1 - Anfotericina B; 2 - Fluconazol; 3 - Voriconazol; 4 - Caspofungina.

Os valores de IC₈₀ e IC₁₀₀ para os 27 isolados de *Candida* spp. estão listados na Tabela 3. Baseado nesses valores foi possível classificá-los quanto à sensibilidade e/ou resistência aos antifúngicos. *C. glabrata* ATCC 90030 e *Candida* complexo “*psilosis*” 210 foram classificadas como sensível dose dependente e *C. krusei* ATCC 6258, como resistente.

Tabela 3. Concentração Inibitória (IC₈₀ e IC₁₀₀) do crescimento de *Candida* spp. determinada por teste de difusão em fita “Etest[®]” e classificação dos isolados quanto à sensibilidade aos antifúngicos testados.

Código	Espécie	Origem	FL		VO		AP		CS	
			IC	C	IC	C	IC	C	IC	C
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	Pele humana	3,000	S	0,016	S	0,094	S	0,016	S
31	<i>C. albicans</i>	PC	1,000	S	0,008	S	0,125	S	0,012	S
120	<i>C. albicans</i>	Hemo	1,500	S	0,032	S	0,094	S	0,023	S
121	<i>C. albicans</i>	PC	1,500	S	0,012	S	0,064	S	0,032	S
220	<i>C. albicans</i>	PC	0,500	S	0,008	S	0,064	S	0,032	S
221-V	<i>C. albicans</i>	PC	0,064	S	< 0,002	S	0,047	S	0,023	S
257	<i>C. albicans</i>	PC	0,380	S	0,008	S	0,125	S	0,012	S
289	<i>C. albicans</i>	PC	0,500	S	0,032	S	0,047	S	0,016	S
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	Sangue	32,000	SSD	0,380	S	0,125	S	0,064	S
100	<i>C. guilliermondii</i>	Hemo	0,750	S	0,008	S	0,190	S	0,008	S
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	Bronco	64,000	R	0,025	S	1,000	S	0,064	S
28	<i>C. krusei</i>	Hemo	0,380	S	0,125	S	0,125	S	0,008	S
219	<i>C. lusitaniae</i>	Hemo	6,000	S	0,003	S	0,125	S	0,002	S
286	<i>C. lusitaniae</i>	PC	4,000	S	< 0,002	S	0,094	S	< 0,002	S
288	<i>C. lusitaniae</i>	PC	0,250	S	0,032	S	0,094	S	0,125	S
295	<i>C. lusitaniae</i>	Hemo	0,500	S	0,047	S	0,094	S	0,064	S
389	<i>C. lusitaniae</i>	PC	0,190	S	0,190	S	0,125	S	0,190	S
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	“Sprue”	6,000	S	0,032	S	0,250	S	0,250	S
210	<i>C. parapsilosis</i>	Hemo	12,000	SSD	0,002	S	0,190	S	0,006	S
221-R	<i>C. parapsilosis</i>	PC	0,094	S	0,002	S	0,094	S	0,002	S
280	<i>C. parapsilosis</i>	Hemo	6,000	S	< 0,002	S	0,064	S	< 0,002	S
315	<i>C. parapsilosis</i>	Hemo	0,380	S	0,016	S	0,125	S	0,094	S
392	<i>C. parapsilosis</i>	PC	4,000	S	0,008	S	0,500	S	< 0,002	S
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	Bronco	1,500	S	0,064	S	0,380	S	0,016	S
124	<i>C. tropicalis</i>	PC	2,000	S	0,032	S	0,094	S	0,032	S
397	<i>C. tropicalis</i>	PC	8,000	S	0,047	S	0,500	S	0,023	S
398	<i>C. tropicalis</i>	Hemo	1,000	S	0,047	S	0,125	S	0,012	S

Hemo: hemocultura; PC: Ponta de cateter; Bronco: Broncomicose; Sprue: Doença intestinal; FL: Fluconazol; VO: Voriconazol; AP: Anfotericina B; CS: Caspofungina; IC: Concentração Inibitória (µg/ml); C: Classificação quanto à sensibilidade; S: Sensível; SDD: Sensível dose dependente; R: Resistente; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo “*psilosis*”.

A Tabela 4 relaciona o perfil de sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. agrupados de acordo com a espécie.

Tabela 4. Perfil de sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. frente aos antifúngicos testados.

Espécies (n° de isolados)	Agente antifúngico / Sensibilidade							
	Fluconazol		Voriconazol		Anfotericina B		Caspofungina	
	ns	%	ns	%	ns	%	ns	%
<i>C. albicans</i> (n = 8)	8	100	8	100	8	100	8	100
<i>C. glabrata</i> (n = 1)	0	0	1	100	1	100	1	100
<i>C. guilliermondii</i> (n = 1)	1	100	1	100	1	100	1	100
<i>C. krusei</i> (n = 2)	1	50	2	100	2	100	2	100
<i>C. lusitanae</i> (n = 5)	5	100	5	100	5	100	5	100
<i>C. parapsilosis</i> (n = 6)	5	83,33	6	100	6	100	6	100
<i>C. tropicalis</i> (n = 4)	4	100	4	100	4	100	4	100

ns: número de isolados sensíveis; %: percentual de isolados sensíveis. Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo “*psilosis*”.

De maneira geral, as amostras apresentaram-se sensíveis aos antifúngicos testados, sendo que 100% foram sensíveis ao voriconazol, a anfotericina B e a caspofungina e 89,9% ao fluconazol. Três isolados (11,1%) não se apresentaram sensíveis ao fluconazol, dentre eles, dois (7,4%) são padrões ATCC e apenas um (3,7%) é um isolado clínico. *C. krusei* ATCC 6258 apresentou resistência e *C. glabrata* ATCC 90030 e *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentaram sensibilidade dependente da dose, como pode ser observado na Tabela 4.

5.3 Determinação da atividade proteolítica de Sap

5.3.1 Avaliação qualitativa da atividade proteolítica de Sap

Os halos produzidos devido à degradação do substrato BSA pela ação de enzimas proteolíticas foram medidos e a $R_{\text{halo/colônia}}$ foi calculada. A intensidade de atividade foi obtida por atribuição de sinais de positividade aos valores da $R_{\text{halo/colônia}}$. A Figura 8 mostra a diferença no crescimento de isolados proteolíticos e não-proteolíticos em meio agar proteinase.

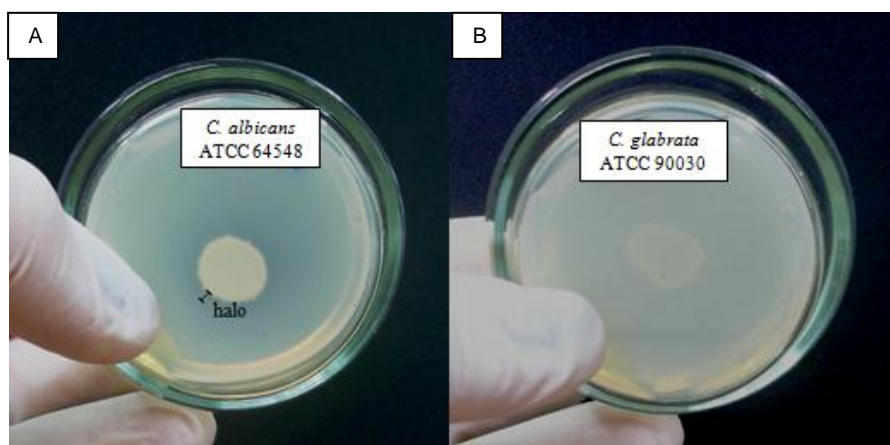


Figura 8. Diferenciação entre a presença (A) e ausência de halo (B) de degradação no agar proteinase. *C. albicans* ATCC 64548 (proteolítico) e *C. glabrata* ATCC 90030 (não-proteolítico).

A Tabela 7 relaciona a $R_{\text{halo/colônia}}$ e a intensidade de atividade dos isolados de *Candida* spp. 77,7% dos isolados apresentaram atividade e *Candida* complexo “*psilosis*” 210 foi o isolado que apresentou a maior $R_{\text{halo/colônia}}$. Todos os isolados de *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae* apresentaram atividade, que variou de moderada a alta. A ausência de atividade proteolítica foi observada principalmente em isolados de *C. tropicalis*, já que apenas um deles (25%) apresentou atividade.

Tabela 5. Intensidade de atividade proteolítica dos isolados de *Candida* spp. de acordo com a medida da $R_{\text{halo/colônia}}$. (continua)

Código	Espécie	$R_{\text{halo/colônia}}$	Intensidade de Atividade
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	1.3	++
31	<i>C. albicans</i>	1.3	++
120	<i>C. albicans</i>	1.4	+++
121	<i>C. albicans</i>	1.4	+++
220	<i>C. albicans</i>	1.1	+
221V	<i>C. albicans</i>	1.3	++
257	<i>C. albicans</i>	1.0	-
289	<i>C. albicans</i>	1.3	++
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	1.0	-
100	<i>C. guilliermondii</i>	1.4	+++
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	1.0	-
28	<i>C. krusei</i>	1.2	++
219	<i>C. lusitaniae</i>	1.4	+++
286	<i>C. lusitaniae</i>	1.4	+++
288	<i>C. lusitaniae</i>	1.1	+
295	<i>C. lusitaniae</i>	1.1	+
389	<i>C. lusitaniae</i>	1.3	++

(conclusão)

Código	Espécie	$R_{\text{halo/colônia}}$	Intensidade de Atividade
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	1.4	+++
210	<i>C. parapsilosis</i>	1.5	+++
221R	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++
280	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++
315	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++
392	<i>C. parapsilosis</i>	1.3	++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-
124	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-
397	<i>C. tropicalis</i>	1.1	+
398	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-

$R_{\text{halo/colônia}} = 1,0$ não proteolíticos (-), $R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,1$ fracamente proteolíticos (+), $1,1 < R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,3$ moderadamente proteolíticos (++) e $R_{\text{halo/colônia}} > 1,3$ altamente proteolíticos (+++); Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo "psilosis".

Dentre os isolados de *C. albicans*, um deles (12%) se apresentou não proteolítico (-), um (13%) fracamente proteolítico (+), dois (25%) altamente proteolíticos (+++), e os demais (50%), moderadamente proteolíticos (++) . Já entre os isolados de *C. não-albicans*, cinco (26%) apresentaram-se altamente proteolíticos (+++), nove (32%) moderadamente proteolíticos (+), três (16%) fracamente proteolíticos e cinco (26%) não apresentaram atividade (-) (figura 9).

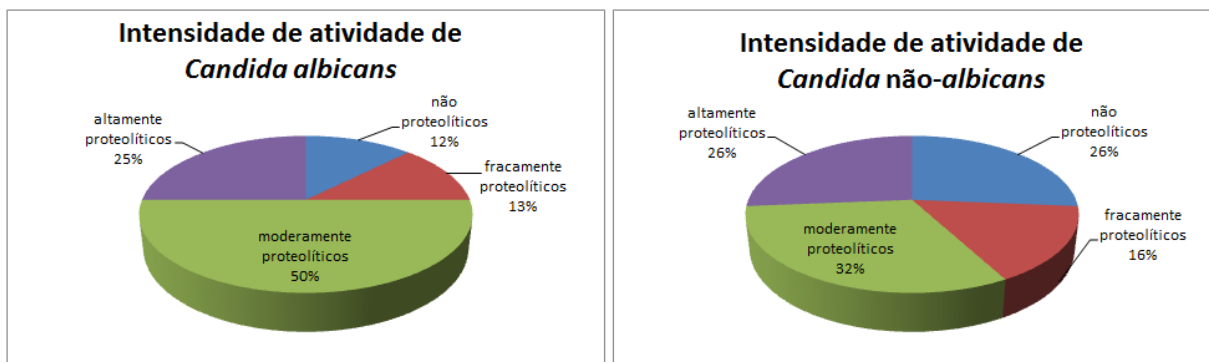


Figura 9. Classificação dos isolados de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* de acordo com a intensidade de atividade proteolítica que apresentaram na avaliação qualitativa.

A adição de fluconazol ao meio agar proteinase não produziu efeito significativo sobre a atividade proteolítica dos isolados padrões ($p > 0,05$), mesmo de *C. parapsilosis*, que apresentou um pequeno aumento de 1,14 vezes em valor absoluto na razão entre o diâmetro do halo e da colônia ($R_{\text{halo/colônia}}$). A anfotericina B

promoveu em *C. albicans* ATCC 64548 redução de 1,08 vezes a $R_{\text{halo/colônia}}$, entretanto, esta não é significativa ($p > 0,05$). As pequenas alterações na $R_{\text{halo/colônia}}$ dos isolados não alteraram a classificação dos mesmos quanto à intensidade de atividade. Em *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 a razão se manteve inalterada independente da concentração de anfotericina B. Os isolados de *C. krusei* ATCC 6258 e *C. glabrata* ATCC 90030, que apresentaram crescimento reduzido na ausência de antifúngico tiveram seu crescimento inibido na presença de anfotericina B (TABELA 6).

Tabela 6. Análise qualitativa da intensidade de atividade proteolítica dos padrões de *Candida* spp. na ausência e na presença de concentrações subinibitórias de antifúngicos.

Código	Espécie	S/ant.		Fluconazol				Anfotericina B			
				½ IC		¼ IC		½ IC		¼ IC	
		$R_{h/c}$	Int.	$R_{h/c}$	Int.	$R_{h/c}$	Int.	$R_{h/c}$	Int.	$R_{h/c}$	Int.
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	1.3	++	1.3	++	1.3	++	1.2	++	1.2	++
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	1.0	-	1.0	-	1.0	-	s/c	0	s/c	0
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	1.0	-	1.0	-	1.0	-	s/c	0	s/c	0
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	1.4	+++	1.4	+++	1.6	+++	1.4	+++	1.4	+++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-

S/ant.: Sem antifúngico; ½ IC: Metade da Concentração Inibitória; $R_{h/c}$: $R_{\text{halo/colônia}}$; Int.: Intensidade de atividade; - $R_{\text{halo/colônia}} = 1,0$ não proteolítico (-); $R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,1$ fracamente proteolíticos (+), $1,1 < R_{\text{halo/colônia}} \leq 1,3$ moderadamente proteolítico (++); $R_{\text{halo/colônia}} > 1,3$ altamente proteolítico (+++); s/c: Não houve crescimento; 0: Ausência de resultado; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo "psilosis".

5.3.2 Avaliação quantitativa da atividade proteolítica de Sap

A Tabela 7 relaciona os percentuais de degradação de BSA dos isolados e a intensidade de atividade proteolítica correspondente a esses percentuais para cada isolado. *Candida* complexo "psilosis" 210 foi o isolado que apresentou o maior percentual de degradação de substrato (100%) e *C. albicans* 257 foi o que apresentou o menor percentual (2,44%). Todos os isolados padrões ATCC de *Candida* spp. apresentaram-se moderadamente proteolíticos (percentual de degradação de substrato entre 20 e 50%).

Tabela 7. Classificação da intensidade de atividade proteolítica dos isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de degradação do substrato BSA.

Código	Espécie	Degradação de BSA (%)	Intensidade de Atividade
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	45,61	++
31	<i>C. albicans</i>	53,66	+++
120	<i>C. albicans</i>	24,39	++
121	<i>C. albicans</i>	21,95	++
220	<i>C. albicans</i>	17,07	+
221V	<i>C. albicans</i>	4,88	+
257	<i>C. albicans</i>	2,44	+
289	<i>C. albicans</i>	7,32	+
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	27,80	++
100	<i>C. guilliermondii</i>	4,88	+
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	40,92	++
28	<i>C. krusei</i>	87,80	+++
219	<i>C. lusitaniae</i>	24,39	++
286	<i>C. lusitaniae</i>	7,32	+
288	<i>C. lusitaniae</i>	70,73	+++
295	<i>C. lusitaniae</i>	48,78	++
389	<i>C. lusitaniae</i>	46,34	++
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	31,19	++
210	<i>C. parapsilosis</i>	100,00	+++
221R	<i>C. parapsilosis</i>	78,05	+++
280	<i>C. parapsilosis</i>	36,59	++
315	<i>C. parapsilosis</i>	7,32	+
392	<i>C. parapsilosis</i>	29,27	++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	20,74	++
124	<i>C. tropicalis</i>	19,51	+
397	<i>C. tropicalis</i>	4,88	+
398	<i>C. tropicalis</i>	26,83	++

+ Fracamente proteolítica; ++ Moderadamente proteolítica; +++ Altamente proteolítica; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo “*psilosis*”.

A Tabela 8 agrupa os isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de degradação do substrato BSA apresentado por eles. A maioria dos isolados (48%) de *Candida* spp. apresentou percentual de degradação de BSA moderado (20-50%), o que os classifica como moderadamente proteolíticos.

Tabela 8. Classificação dos isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de degradação de substrato apresentado na ausência de antifúngicos.

Espécie (n° de isolados)	Degradação de BSA (%)		
	< 20	20-50	> 50
<i>C. albicans</i> (8)	4	3	1
<i>C. glabrata</i> (1)	-	1	-
<i>C. guilliermondii</i> (1)	1	-	-
<i>C. krusei</i> (2)	-	1	1
<i>C. lusitaniae</i> (5)	1	3	1
<i>C. parapsilosis</i> (6)	1	3	2
<i>C. tropicalis</i> (4)	2	2	-
Total	9	13	5

< 20: Percentual de degradação de substrato menor que 20%; 20-50: Percentual de degradação de substrato entre 20 e 50%; > 50: Percentual de degradação de substrato maior que 50%.

A Figura 10 divide os isolados em *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* e os agrupa de acordo com seu percentual de degradação de substrato. Quatro isolados (50%) de *C. albicans* apresentaram-se fracamente proteolíticos, três (37%) moderadamente proteolíticos e um (13%) altamente proteolíticos. Cinco isolados de *Candida* não-*albicans* (26%) apresentaram-se fracamente proteolíticos, dez (53%) moderadamente proteolíticos e apenas quatro (21%) apresentaram-se altamente proteolíticos (TABELA 8 e FIGURA 10).

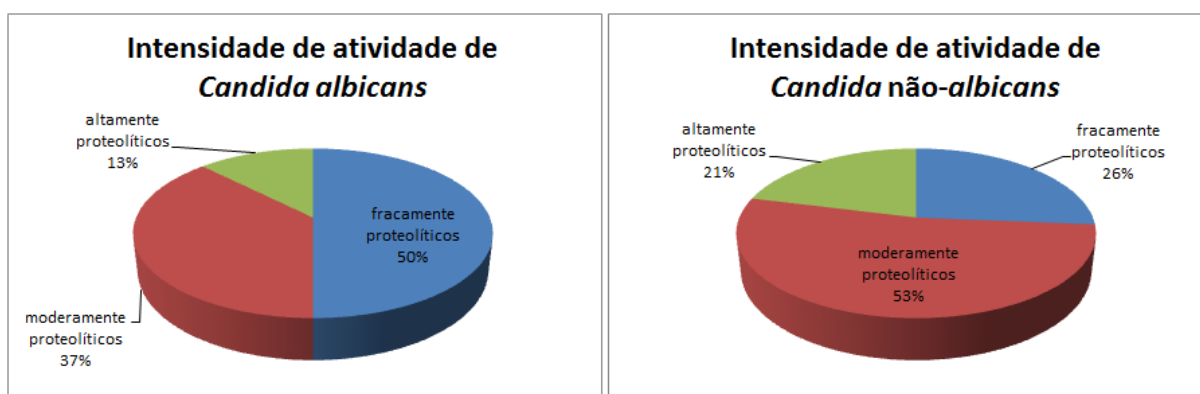


Figura 10. Classificação dos isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* de acordo com a intensidade de atividade proteolítica apresentada na avaliação quantitativa.

A Tabela 9 apresenta o percentual de degradação de substrato na presença e na ausência de fluconazol e anfotericina B. Houve diferença significativa no percentual de degradação de substrato BSA dos isolados, com exceção de *C.*

albicans 220 ($p = 0,0997$), *C. glabrata* ATCC 90030 ($p = 0,1281$), *C. krusei* ATCC 6258 ($p = 0,2457$), *C. krusei* 28 ($p = 0,0529$) e *C. lusitaniae* 288 ($p = 0,4729$). Entretanto, em valores absolutos, os percentuais foram aumentados quando esses isolados foram submetidos a concentrações subinibitórias dos antifúngicos testados. O maior percentual de degradação de substrato foi observado em *C. lusitaniae* 286 na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B e *Candida* complexo "*psilosis*" 210 na ausência de antifúngico. O menor percentual de degradação de substrato (2,44%) foi observado em *C. albicans* 120 e *C. parapsilosis* 392 na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B, *C. albicans* 257 na ausência de antifúngico e *C. guilliermondii* na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol. A maior diferença de percentual foi observada em *C. lusitaniae* 286 ($p = 0,0084$), que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B aumentou o percentual de degradação de substrato em 13,7 vezes relação a sua ausência.

Tabela 9. Percentual de degradação de substrato BSA pelos isolados padrões de *Candida* spp. na ausência e na presença dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. (continua)

Código	Espécie	Degradação de substrato (%)					P-value
		S/ ant.	$\frac{1}{2}$ IC FL	$\frac{1}{4}$ IC FL	$\frac{1}{2}$ IC AP	$\frac{1}{4}$ IC AP	
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	45,61 bc	54,03 ab	93,37 a	19,51 b	57,40 ac	0.0229
31	<i>C. albicans</i>	53,66 a	36,58 ab	4,89 b	51,22 a	31,70 ab	0,0349
120	<i>C. albicans</i>	24,39 ac	9,76 ab	43,90 c	21,95 abc	2,44 b	0,0218
121	<i>C. albicans</i>	21,95 a	82,93 b	73,17 b	31,70 ab	51,22 ab	0,0374
220	<i>C. albicans</i>	17,07 a	29,27 a	46,34 a	31,71 a	24,39 a	0,0997
221-V	<i>C. albicans</i>	4,88 a	21,95 b	7,32 ab	4,88 a	9,76 ab	0,0214
257	<i>C. albicans</i>	2,44 a	4,88 ab	17,07 bc	9,76 ac	19,51 c	0,0149
289	<i>C. albicans</i>	7,32 ab	2,44 a	7,32 ab	9,76 b	9,76 b	0,0348
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	27,80 a	62,77 a	36,54 a	31,17 a	28,26 a	0.1281
100	<i>C. guilliermondii</i>	4,88 ab	19,51 a	2,44 b	4,88 ab	19,51 a	0,0106
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	40,92 a	32,17 a	62,77 a	60,31 a	57,40 a	0.2457
28	<i>C. krusei</i>	87,80 a	70,73 a	68,29 a	80,49 a	4,88 a	0.0529
219	<i>C. lusitaniae</i>	24,39 ab	60,97 a	39,02 ab	82,93 a	17,07 b	0.0206
286	<i>C. lusitaniae</i>	7,32 a	21,95 ac	90,24 bc	53,66 abc	100,00 b	0.0086
288	<i>C. lusitaniae</i>	70,73 a	65,85 a	90,24 a	68,29 a	60,97 a	0.4729
295	<i>C. lusitaniae</i>	48,78 ab	19,51 a	75,61 b	56,10 bc	41,46 ac	0.0322
389	<i>C. lusitaniae</i>	46,34 ab	26,83 a	21,95 a	70,73 b	80,49 b	0.0139

(conclusão)

Código	Espécie	Degradação de substrato (%)					P-value
		S/ ant.	½ IC FL	¼ IC FL	½ IC AP	¼ IC AP	
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	31,19 bc	77,90 a	51,67 ac	31,17 bc	19,51 b	0.0394
210	<i>C. parapsilosis</i>	100 a	56,10 b	56,10 b	63,41 ab	95,12 a	0.0387
221-R	<i>C. parapsilosis</i>	78,05 a	70,73 a	58,54 b	65,85 ab	48,78 b	0.0194
280	<i>C. parapsilosis</i>	36,58 a	36,58 a	29,27 ab	17,07 b	19,51 b	0.0149
315	<i>C. parapsilosis</i>	7,32 ab	39,02 a	31,71 a	7,32 ab	4,88 b	0.0106
392	<i>C. parapsilosis</i>	29,27 abc	24,39 ac	43,90 ab	53,66 b	2,44 c	0.0142
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	20,74 bc	62,38 a	47,30 ac	19,51 b	19,51 b	0.0317
124	<i>C. tropicalis</i>	19,51 a	46,34 b	48,78 b	29,27 ab	34,15 ab	0.0404
397	<i>C. tropicalis</i>	4,88 a	19,51 ac	34,15 ab	58,54 b	36,59 bc	0.0112
398	<i>C. tropicalis</i>	26,83 a	29,27 ac	48,78 bc	56,10 bc	41,46 ac	0.0277

S/ ant.: Sem antifúngico; ½ IC: Metade da Concentração Inibitória; ¼ IC: Um quarto da Concentração Inibitória; FL: Fluconazol; AP: Anfotericina B. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo “*psilosis*”.

5.4 Relação entre os resultados obtidos pelos métodos usados na determinação da atividade proteolítica de *Candida* spp.

A Tabela 10 relaciona os resultados das análises qualitativa e quantitativa da atividade proteolítica dos isolados de *Candida* spp. Todos os isolados que se apresentaram não proteolíticos na análise qualitativa apresentaram percentual de degradação de substrato baixo a moderado, sendo que dentre esses isolados o mais alto percentual foi observado em *C. krusei* ATCC 6258 (40,92%). Alguns isolados apresentaram intensidade de atividade proteolítica diferente nos dois métodos testados. O isolado padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 se apresentou altamente proteolítico na análise qualitativa ($R_{\text{halo/colônia}} = 1,4$), mas com moderado percentual de atividade (31,19%) na análise quantitativa, entretanto, *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentou a maior atividade proteolítica em ambos os métodos.

Tabela 10. Análise comparativa dos métodos usados na determinação da atividade proteolítica dos isolados de *Candida* spp.

Amostra	Espécie	Atividade Proteolítica			
		Método Qualitativo		Método Quantitativo	
		R _{halo/colônia}	Int. de Ativ.	% Deg. BSA	Int. de Ativ.
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	1.3	++	45.61	++
31	<i>C. albicans</i>	1.3	++	53,66	+++
120	<i>C. albicans</i>	1.4	+++	24,39	++
121	<i>C. albicans</i>	1.4	+++	21,95	++
220	<i>C. albicans</i>	1.1	+	17,07	+
221V	<i>C. albicans</i>	1.3	++	4,88	+
257	<i>C. albicans</i>	1.0	-	2,44	+
289	<i>C. albicans</i>	1.3	++	7,32	+
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	1.0	-	27.80	++
100	<i>C. guilliermondii</i>	1.4	+++	4,88	+
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	1.0	-	40.92	++
28	<i>C. krusei</i>	1.2	++	87,80	+++
219	<i>C. lusitaniae</i>	1.4	+++	24,39	++
286	<i>C. lusitaniae</i>	1.4	+++	7,32	+
288	<i>C. lusitaniae</i>	1.1	+	70,73	+++
295	<i>C. lusitaniae</i>	1.1	+	48,78	++
389	<i>C. lusitaniae</i>	1.3	++	46,34	++
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	1.4	+++	31.19	++
210	<i>C. parapsilosis</i>	1.5	+++	100,00	+++
221R	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++	78,05	+++
280	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++	36,59	++
315	<i>C. parapsilosis</i>	1.2	++	7,32	+
392	<i>C. parapsilosis</i>	1.3	++	29,27	++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-	20.74	++
124	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-	19,51	+
397	<i>C. tropicalis</i>	1.1	+	4,88	+
398	<i>C. tropicalis</i>	1.0	-	26,83	++

R_{halo/colônia} = 1,0 não proteolíticos (-), R_{halo/colônia} ≤ 1,1 fracamente proteolíticos (+), 1,1 < R_{halo/colônia} ≤ 1,3 moderadamente proteolíticos (++) e R_{halo/colônia} > 1,3 altamente proteolíticos (+++); Int. de Ativ.: Intensidade de atividade; + Fracamente proteolítica; ++ Moderadamente proteolítica; +++ Altamente proteolítica; % Deg. BSA: Percentual de degradação de BSA; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo "psilosis".

5.5 Avaliação da atividade metabólica de *Candida* spp. na presença e na ausência de fluconazol e anfotericina B.

Os percentuais de atividade metabólica dos isolados de *Candida* spp. e a intensidade de atividade metabólica correspondente a esses percentuais encontram-se relacionados na Tabela 11. Existe diferença significativa entre os percentuais de atividade metabólica dos isolados (p = 0,0001). Os maiores percentuais de atividade

metabólica foram observados em *C. albicans* ATCC 64548 (60,63%), *C. albicans* 120 (73,27), *C. albicans* 121 (61,72%) e *C. albicans* 289 (61,06%) e os menores percentuais em *C. glabrata* ATCC 90030 (3,67%), *C. krusei* ATCC 6258 (2,35%) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (3,78%). Com exceção de *C. albicans* ATCC 64548, os demais isolados padrões ATCC apresentaram baixa atividade metabólica (< 20%).

Tabela 11. Classificação da intensidade de atividade metabólica dos isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de atividade.

Código	Espécie	Atividade metabólica (%)	Intensidade de Atividade
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	60,63	+++
31	<i>C. albicans</i>	28,05	++
120	<i>C. albicans</i>	73,27	+++
121	<i>C. albicans</i>	61,72	+++
220	<i>C. albicans</i>	19,14	+
221V	<i>C. albicans</i>	16,50	+
257	<i>C. albicans</i>	56,11	+++
289	<i>C. albicans</i>	61,06	+++
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	3,67	+
100	<i>C. guilliermondii</i>	20,79	++
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	2,35	+
28	<i>C. krusei</i>	27,72	++
219	<i>C. lusitaniae</i>	39,27	++
286	<i>C. lusitaniae</i>	44,22	++
288	<i>C. lusitaniae</i>	31,68	++
295	<i>C. lusitaniae</i>	27,39	++
389	<i>C. lusitaniae</i>	24,09	++
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	3,78	+
210	<i>C. parapsilosis</i>	39,93	++
221R	<i>C. parapsilosis</i>	9,57	+
280	<i>C. parapsilosis</i>	46,86	++
315	<i>C. parapsilosis</i>	8,25	+
392	<i>C. parapsilosis</i>	27,39	++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	15,11	+
124	<i>C. tropicalis</i>	45,21	++
397	<i>C. tropicalis</i>	31,68	++
398	<i>C. tropicalis</i>	45,21	++

+ baixa atividade metabólica; ++ Moderada atividade metabólica; +++ Alta atividade metabólica; Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo "psilosis".

A Tabela 12 agrupa os isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de atividade metabólica apresentado por eles. A maioria dos isolados (52%) apresentou percentual de atividade metabólica entre 20 e 50%. Nenhum isolado de *Candida* não-*albicans* apresentou atividade metabólica alta (> 50%).

Tabela 12. Classificação dos isolados de *Candida* spp. de acordo com o percentual de atividade metabólica apresentado na ausência de antifúngicos.

Espécie (nº de isolados)	Atividade Metabólica (%)		
	< 20	20-50	> 50
<i>C. albicans</i>	2	1	5
<i>C. glabrata</i>	1	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	1	-
<i>C. krusei</i>	1	1	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	5	-
<i>C. parapsilosis</i>	3	3	-
<i>C. tropicalis</i>	1	3	-
Total	8	14	5

< 20: Percentual de degradação de substrato menor que 20%; 20-50: Percentual de degradação de substrato entre 20 e 50%; > 50: Percentual de degradação de substrato maior que 50%.

A Figura 11 divide os isolados em *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* e os agrupa de acordo com seu percentual de atividade metabólica. Dentre os isolados de *C. albicans*, dois (25%) apresentaram baixa atividade metabólica, um (12%) apresentou atividade metabólica moderada e cinco (63%) alta atividade metabólica. Os isolados de *Candida* não-*albicans* se dividiram entre isolados de atividade metabólica baixa e moderada, sendo que seis (32%) se enquadraram como isolados de baixa atividade e 13 (68%) de moderada atividade.

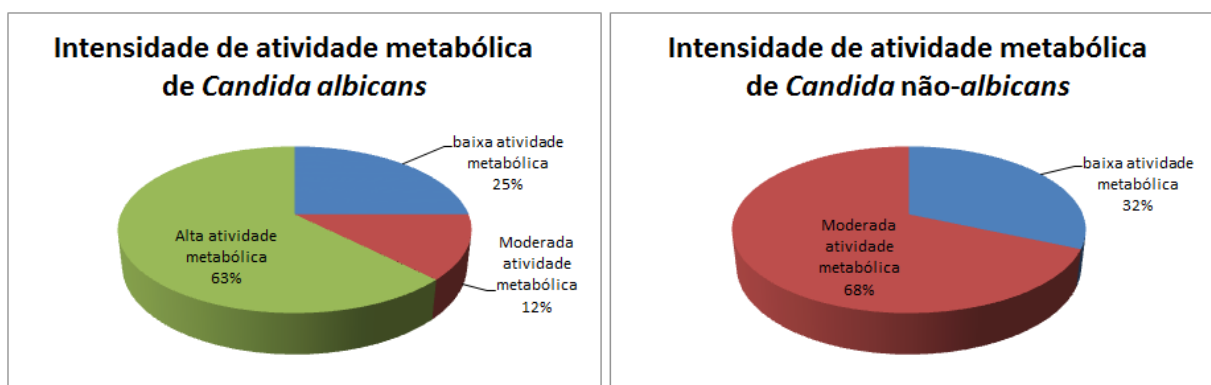


Figura 11. Classificação dos isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* de acordo com a intensidade de atividade metabólica que apresentaram.

A Tabela 13 relaciona o percentual de atividade metabólica dos isolados de *Candida* spp. cultivados nas cinco condições de exposição. Com exceção de *C. albicans* 289 ($p = 0,0630$), *C. krusei* 28 ($p = 0,1093$), *C. lusitaniae* 286 ($p = 0,2197$), *C. lusitaniae* 288 ($p = 0,0548$), *C. parapsilosis* 221-R ($p = 0,1799$) e *C. parapsilosis* 280 ($p = 0,0914$), *C. tropicalis* ATCC 750 ($p = 0,0650$) e *C. tropicalis* 124 ($p = 0,1331$), os demais isolados de *Candida* spp. apresentaram diferença significativa no percentual de atividade metabólica quando expostos à concentrações subinibitórias de antifúngicos ($p < 0,05$). O maior percentual de atividade foi observado em *C. albicans* 121 (100%) na presença de $\frac{1}{2}$ da IC₉₀ de anfotericina B e o menor em *C. krusei* ATCC 6258 (0,07%) na presença de $\frac{1}{4}$ da IC₉₀ de anfotericina B. A maior diferença de percentual foi observada em *Candida* complexo “*psilosis*” 210 ($p = 0,0091$), que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC₅₀ de fluconazol teve seu percentual de atividade metabólica reduzido em 8 vezes em relação a sua ausência.

Tabela 13. Percentual de atividade metabólica dos isolados padrões de *Candida* spp. na ausência e na presença de antifúngicos. (continua)

Código	Espécie	Atividade Metabólica (%)					P-value
		S/ant.	$\frac{1}{2}$ IC FL	$\frac{1}{4}$ IC FL	$\frac{1}{2}$ IC AP	$\frac{1}{4}$ IC AP	
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	60,63 ac	87,46 a	53,84 ac	0,13 b	24,50 bc	0,0163
31	<i>C. albicans</i>	28,05 a	19,14 b	24,42 a	22,44 ab	19,14 b	0,0152
120	<i>C. albicans</i>	73,27 a	67,99 ab	58,09 b	57,10 b	55,78 b	0,0300
121	<i>C. albicans</i>	61,72 a	63,04 ac	73,27 ab	100,00 b	80,53 bc	0,0141
220	<i>C. albicans</i>	19,14 a	21,12 ab	18,48 a	24,10 ab	29,37 b	0,0323
221-V	<i>C. albicans</i>	16,50 ac	10,89 ab	33,33 c	6,27 b	11,88 abc	0,0111
257	<i>C. albicans</i>	56,11 abc	47,85 a	50,17 ab	61,39 bc	98,35 c	0,0111
289	<i>C. albicans</i>	61,06 a	52,80 a	58,75 a	50,50 a	34,65 a	0,0630
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	3,67 ab	3,50 a	14,32 a	0,79 b	1,69 b	0,0131
100	<i>C. guilliermondii</i>	20,79 ac	17,16 a	24,42 abc	54,13 b	26,07 c	0,0295
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	2,35 a	2,84 a	2,42 a	0,13 ab	0,07 b	0,0238
28	<i>C. krusei</i>	27,72 a	38,61 a	27,06 a	33,00 a	34,32 a	0,1093
219	<i>C. lusitaniae</i>	39,27 ac	32,01 a	48,51 c	46,53 ac	57,10 bc	0,0096
286	<i>C. lusitaniae</i>	44,22 a	42,90 a	40,59 a	45,54 a	40,26 a	0,2197
288	<i>C. lusitaniae</i>	31,68 a	37,29 a	25,08 a	25,08 a	23,43 a	0,0548
295	<i>C. lusitaniae</i>	27,39 a	10,89 b	17,49 ab	21,45 ab	15,18 b	0,0127
389	<i>C. lusitaniae</i>	24,09 abc	27,39 ac	36,96 a	17,82 bc	16,17 b	0,0114
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	3,78 ac	23,12 a	4,40 ac	0,22 bc	0,20 b	0,0235

(continua)

Código	Espécie	Atividade Metabólica (%)					P-value
		S/ant.	½ IC FL	¼ IC FL	½ IC AP	¼ IC AP	
210	<i>C. parapsilosis</i>	39,93 a	4,95 b	14,19 bc	28,05 ac	23,76 ab	0,0091
221-R	<i>C. parapsilosis</i>	9,57 a	15,84 a	23,43 a	14,52 a	20,13 a	0,1799
280	<i>C. parapsilosis</i>	46,86 a	30,69 a	32,01 a	30,36 a	28,05 a	0,0914
315	<i>C. parapsilosis</i>	8,25 a	11,22 ac	13,2 ac	19,14 b	16,50 bc	0,0101
392	<i>C. parapsilosis</i>	27,39 a	26,07 ac	21,12 bc	16,83 b	22,44 ab	0,0137
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	15,11 a	15,97 a	6,58 a	0,11 a	5,28 a	0,0650
124	<i>C. tropicalis</i>	45,21 a	42,24 a	39,93 a	45,21 a	49,17 a	0,1331
397	<i>C. tropicalis</i>	31,68 a	57,43 a	14,52 b	21,78 ab	29,04 a	0,0484
398	<i>C. tropicalis</i>	45,21 ab	28,38 a	49,17 b	45,21 ab	45,87 ab	0,0256

S/ant.: Sem antifúngico; ½ IC: Metade da Concentração Inibitória; ¼ IC: Um quarto da Concentração Inibitória; FL: Fluconazol; AP: Anfotericina B. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis.

5.6 Relação entre atividade proteolítica e atividade metabólica de *Candida* spp.

Os dados referentes aos resultados dos testes de atividade proteolítica e atividade metabólica de *Candida* spp. estão demonstrados na tabela 14. O isolado de *C. albicans* 257, que se apresentou não proteolítico na avaliação qualitativa da atividade proteolítica e com o menor percentual de degradação de substrato na avaliação quantitativa, apresentou alto percentual de atividade metabólica (56,11%). O isolado de *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresenta perfil particular, uma vez que apresentou atividade metabólica moderada (39,93%) e a maior atividade proteolítica em valores absolutos, nos dois métodos de análise. *C. krusei* 28 apresentou alto percentual de degradação de substrato (87,80%) e moderado percentual de atividade metabólica (27,72%). Os isolados *C. albicans* ATCC 64548 e *C. albicans* 257 apresentaram alta atividade metabólica (> 50%) e moderada atividade proteolítica (20-50%). O isolado de *C. krusei* ATCC 6258, que apresentou o menor percentual de atividade metabólica (2,35%), apresentou-se não proteolítico na avaliação qualitativa da atividade proteolítica e percentual de degradação de substrato igual a 40,92% na avaliação quantitativa.

Tabela 14. Atividade proteolítica e atividade metabólica de *Candida* spp.

Amostra	Espécie	Atividade Metabólica		Atividade Proteolítica			
		% Ativ.	Int. de Ativ.	Qualitativo		Quantitativo	
				R _{h/c}	Int. de Ativ.	% Deg. BSA	Int. de Ativ.
ATCC 64548	<i>C. albicans</i>	60,63	+++	1.3	++	45.61	++
31	<i>C. albicans</i>	28,05	++	1.3	++	53,66	+++
120	<i>C. albicans</i>	73,27	+++	1.4	+++	24,39	++
121	<i>C. albicans</i>	61,72	+++	1.4	+++	21,95	++
220	<i>C. albicans</i>	19,14	+	1.1	+	17,07	+
221V	<i>C. albicans</i>	16,50	+	1.3	++	4,88	+
257	<i>C. albicans</i>	56,11	+++	1.0	-	2,44	+
289	<i>C. albicans</i>	61,06	+++	1.3	++	7,32	+
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	3,67	+	1.0	-	27.80	++
100	<i>C. guilliermondii</i>	20,79	++	1.4	+++	4,88	+
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	2,35	+	1.0	-	40.92	++
28	<i>C. krusei</i>	27,72	++	1.2	++	87,80	+++
219	<i>C. lusitaniae</i>	39,27	++	1.4	+++	24,39	++
286	<i>C. lusitaniae</i>	44,22	++	1.4	+++	7,32	+
288	<i>C. lusitaniae</i>	31,68	++	1.1	+	70,73	+++
295	<i>C. lusitaniae</i>	27,39	++	1.1	+	48,78	++
389	<i>C. lusitaniae</i>	24,09	++	1.3	++	46,34	++
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	3,78	+	1.4	+++	31.19	++
210	<i>C. parapsilosis</i>	39,93	++	1.5	+++	100,00	+++
221R	<i>C. parapsilosis</i>	9,57	+	1.2	++	78,05	+++
280	<i>C. parapsilosis</i>	46,86	++	1.2	++	36,59	++
315	<i>C. parapsilosis</i>	8,25	+	1.2	++	7,32	+
392	<i>C. parapsilosis</i>	27,39	++	1.3	++	29,27	++
ATCC 750	<i>C. tropicalis</i>	15,11	+	1.0	-	20.74	++
124	<i>C. tropicalis</i>	45,21	++	1.0	-	19,51	+
397	<i>C. tropicalis</i>	31,68	++	1.1	+	4,88	+
398	<i>C. tropicalis</i>	45,21	++	1.0	-	26,83	++

% Ativ.: Porcentagem de atividade; Int. de Ativ.: Intensidade de Atividade; R_{h/c}: R_{halo/colônia}; % Deg. BSA: Porcentagem de degradação de BSA; R_{halo/colônia} = 1,0 não proteolíticos (-), R_{halo/colônia} ≤ 1,1 fracamente proteolíticos (+), 1,1 < R_{halo/colônia} ≤ 1,3 moderadamente proteolíticos (++) e R_{halo/colônia} > 1,3 altamente proteolíticos (+++); + baixa; ++ Moderada; +++ Alta.

A figura 12 exibe os percentuais de degradação de substrato de todos os isolados na ausência de antifúngicos. O maior percentual de degradação de substrato foi observado em *Candida* complexo “*psilosis*” 210.

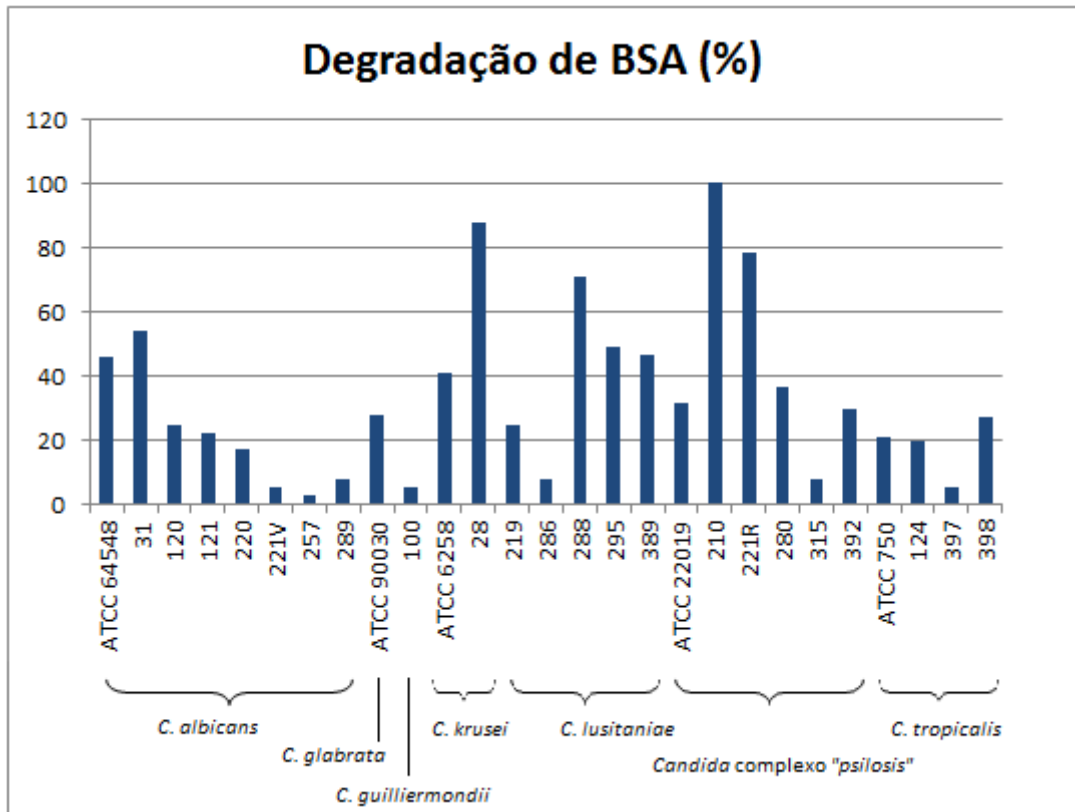


Figura 12. Percentual de degradação de substrato dos isolados de *Candida* spp. na ausência de antifúngicos.

A Figura 13 exibe os percentuais de atividade metabólica na ausência de antifúngicos. Observa-se que os maiores percentuais de atividade foram apresentados por isolados de *C. albicans* e os menores por isolados padrões (*C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019).

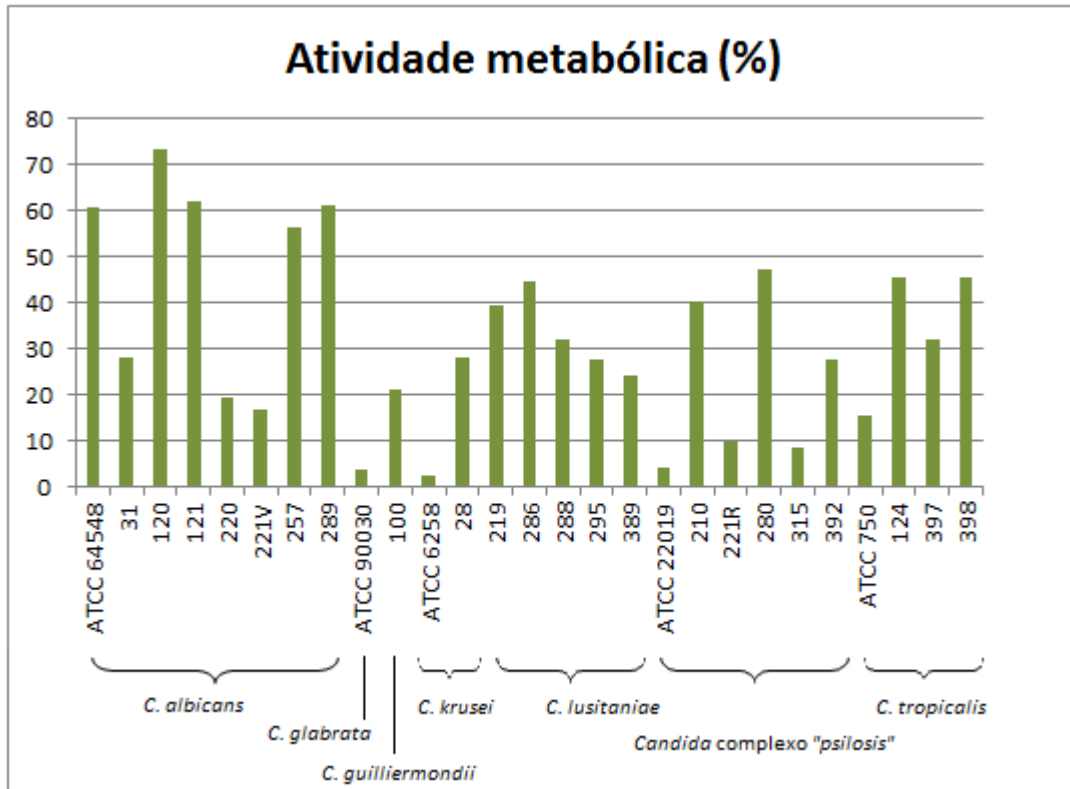


Figura 13. Percentual de atividade metabólica dos isolados de *Candida* spp. na ausência de antifúngicos.

A Figura 14 demonstra de forma ilustrativa a relação entre os percentuais de degradação de substrato e de atividade metabólica dos padrões de *Candida* spp. A presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol no cultivo de *C. albicans* ATCC 64548 promoveu um aumento na percentagem de degradação e substrato enquanto reduziu significativamente a atividade metabólica (FIGURA 1a). Em *C. glabrata* ATCC 90030, a maior percentagem de degradação de substrato foi observada na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol, condição na qual a percentagem de atividade metabólica foi uma das mais baixas. (FIGURA 1b). A percentagem de atividade metabólica de *C. krusei* ATCC 6258 foi mais baixa do que 3% em todas as condições de exposição, enquanto a percentagem de degradação de substrato foi mais alta que 30% (Figura 1c). Em *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750, a mais alta percentagem de degradação de substrato foi observada na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol e ocorreu em condição que apresentou a mais alta percentagem de atividade metabólica (FIGURA 1d) e (FIGURA 1e).

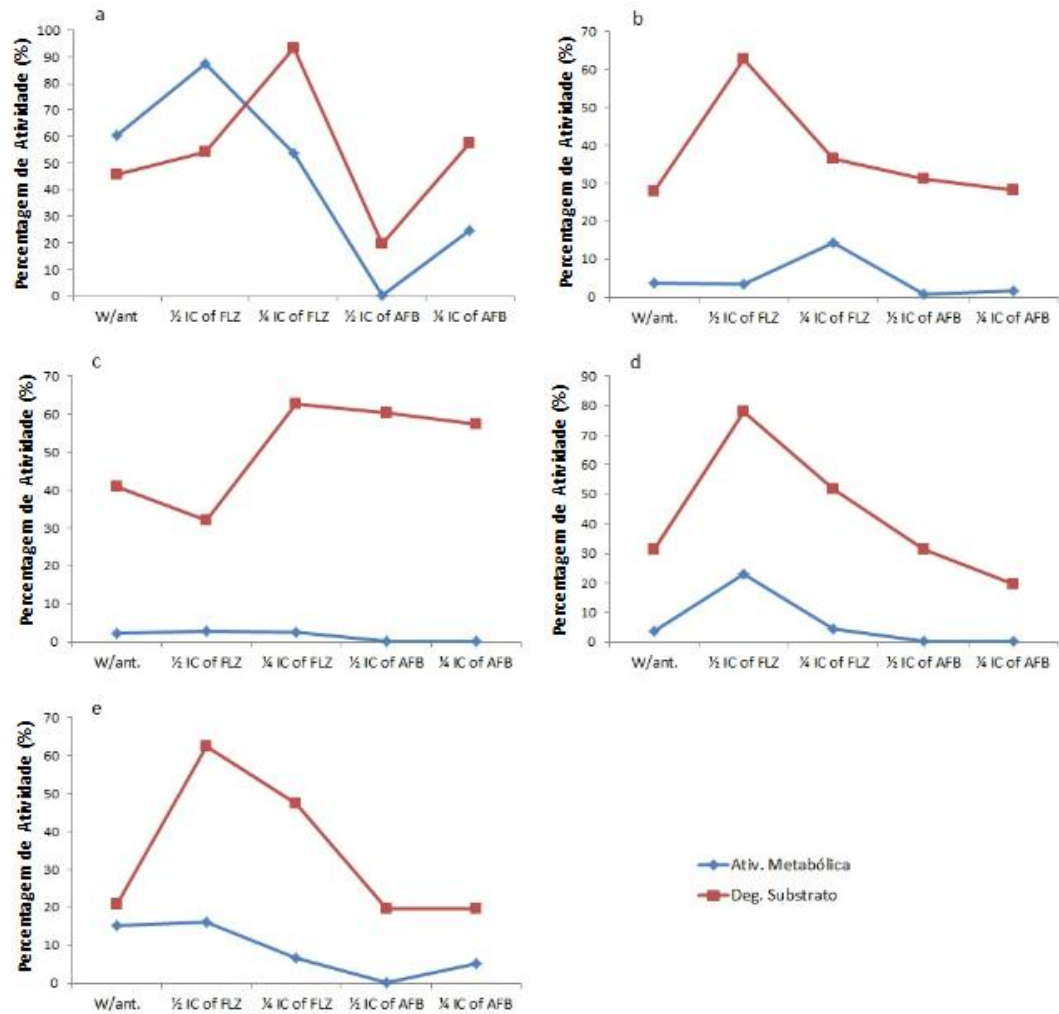


Figura 14. Efeito de diferentes condições de exposição sobre a porcentagem de atividade metabólica (♦) e de degradação de substrato (■) dos isolados padrões de *Candida* spp. (a) *C. albicans* ATCC 64548; (b) *C. glabrata* ATCC 90030; (c) *C. krusei* ATCC 6258; (d) *C. parapsilosis* ATCC 22019; (e) *C. tropicalis* ATCC 750.

A Tabela 15 relaciona todos os resultados obtidos para os isolados de *Candida* spp. cultivados na ausência de antifúngicos. Dentre os isolados que apresentaram sensibilidade reduzida, *C. glabrata* ATCC 90030 apresentou baixa atividade metabólica em todas as condições de exposição e atividade proteolítica < 40% na maioria delas, exceção à presença de 1/2 da IC de fluconazol; já *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentou atividade proteolítica igual a 100,0% na avaliação quantitativa e atividade metabólica igual a 39,93%. *C. krusei* ATCC 6258, que se apresentou resistente ao fluconazol teve redução da atividade proteolítica na presença de 1/2 da IC₅₀ e aumento na presença de 1/4 da IC₅₀, em relação ao

percentual obtido em sua ausência (40,92%), mas a atividade metabólica se manteve baixa (0,07% a 2,84%).

Tabela 15. Relação dos resultados obtidos nos testes quantitativos realizados para os isolados de *Candida* spp. na ausência de antifúngicos.

<i>Candida</i> spp.	Agente antifúngico	C	(continua)					
			Atividade proteolítica (%)			Atividade metabólica (%)		
			S/ant.	½ IC	¼ IC	S/ant.	½ IC	¼ IC
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	Fluconazol	S	45,61	54,03	93,37	60,63	87,46	53,84
	Anfotericina B	S		19,51	57,40		0,13	24,50
<i>C. albicans</i> 31	Fluconazol	S	53,66	36,58	4,89	28,05	19,14	24,42
	Anfotericina B	S		51,22	31,70		22,44	19,14
<i>C. albicans</i> 120	Fluconazol	S	24,39	9,76	43,90	73,27	67,99	58,09
	Anfotericina B	S		21,95	2,44		57,10	55,78
<i>C. albicans</i> 121	Fluconazol	S	21,95	82,93	73,17	61,72	63,04	73,27
	Anfotericina B	S		31,70	51,22		100,00	80,53
<i>C. albicans</i> 220	Fluconazol	S	17,07	29,27	46,34	19,14	21,12	18,48
	Anfotericina B	S		31,71	24,39		24,10	29,37
<i>C. albicans</i> 221-V	Fluconazol	S	4,88	21,95	7,32	16,50	10,89	33,33
	Anfotericina B	S		4,88	9,76		6,27	11,88
<i>C. albicans</i> 257	Fluconazol	S	2,44	4,88	17,07	56,11	47,85	50,17
	Anfotericina B	S		9,76	19,51		61,39	98,35
<i>C. albicans</i> 289	Fluconazol	S	7,32	2,44	7,32	61,06	52,80	58,75
	Anfotericina B	S		9,76	9,76		50,50	34,65
<i>C. glabrata</i> ATCC 9003	Fluconazol	SDD	27,80	62,77	36,54	3,67	3,50	14,32
	Anfotericina B	S		31,17	28,26		0,79	1,69
<i>C. guilliermondii</i> 100	Fluconazole	S	4,88	19,51	2,44	20,79	17,16	24,42
	Anfotericina B	S		4,88	19,51		54,13	26,07
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Fluconazol	R	40,92	32,17	62,77	2,35	2,84	2,42
	Anfotericina B	S		60,31	57,40		0,13	0,07
<i>C. krusei</i> 28	Fluconazol	S	87,80	70,73	68,29	27,72	38,61	27,06
	Anfotericina B	S		80,49	4,88		33,00	34,32
<i>C. lusitaniae</i> 219	Fluconazole	S	24,39	60,97	39,02	39,27	32,01	48,51
	Anfotericina B	S		82,93	17,07		46,53	57,10
<i>C. lusitaniae</i> 286	Fluconazole	S	7,32	21,95	90,24	44,22	42,90	40,59
	Anfotericina B	S		53,66	100,00		45,54	40,26
<i>C. lusitaniae</i> 288	Fluconazole	S	70,73	65,85	90,24	31,68	37,29	25,08
	Anfotericina B	S		68,29	60,97		25,08	23,43

<i>Candida</i> spp.	Agente antifúngico	C	(conclusão)					
			Atividade proteolítica (%)			Atividade metabólica (%)		
			S/ant.	½ IC	¼ IC	S/ant.	½ IC	¼ IC
<i>C. lusitaniae</i> 295	Fluconazole	S	48,78	19,51	75,61	27,39	10,89	17,49
	Anfotericina B	S		56,10	41,46		21,45	15,18
<i>C. lusitaniae</i> 389	Fluconazole	S	46,34	26,83	21,95	24,09	27,39	36,96
	Anfotericina B	S		70,73	80,49		17,82	16,17
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Fluconazole	S	31,19	77,90	51,67	3,78	23,12	4,40
	Anfotericina B	S		31,17	19,51		0,22	0,20
<i>C. parapsilosis</i> 210	Fluconazole	SDD	100,00	56,10	56,10	39,93	4,95	14,19
	Anfotericina B	S		63,41	95,12		28,05	23,76
<i>C. parapsilosis</i> 221-R	Fluconazole	S	78,05	70,73	58,54	9,57	15,84	23,43
	Anfotericina B	S		65,85	48,78		14,52	20,13
<i>C. parapsilosis</i> 280	Fluconazole	S	36,58	36,58	29,27	46,86	30,69	32,01
	Anfotericina B	S		17,07	19,51		30,36	28,05
<i>C. parapsilosis</i> 315	Fluconazole	S	7,32	39,02	31,71	8,25	11,22	13,2
	Anfotericina B	S		7,32	4,88		19,14	16,50
<i>C. parapsilosis</i> 392	Fluconazole	S	29,27	24,39	43,90	27,39	26,07	21,12
	Anfotericina B	S		53,66	2,44		16,83	22,40
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Fluconazole	S	20,74	62,38	47,30	15,11	15,97	6,58
	Anfotericina B	S		19,51	19,51		0,11	5,28
<i>C. tropicalis</i> 124	Fluconazole	S	19,51	46,34	48,78	45,21	42,24	39,93
	Anfotericina B	S		29,27	34,15		45,21	49,17
<i>C. tropicalis</i> 397	Fluconazole	S	4,88	19,51	34,15	31,68	57,43	14,52
	Anfotericina B	S		58,54	36,59		21,78	29,04
<i>C. tropicalis</i> 398	Fluconazole	S	26,83	29,27	78,78	45,21	28,38	49,17
	Anfotericina B	S		56,10	41,46		45,21	45,87

C: Classificação quanto ao perfil de sensibilidade; S/ant.: Ausência de antifúngicos; ½ IC: Metade da concentração inibitória; ¼ IC: Um quarto da concentração subinibitória; S: Sensível; SSD: Sensível dependendo da dose; R: Resistente. Isolados identificados como *C. parapsilosis* pertencem ao complexo “*psilosis*”.

5.7 Avaliação da expressão de SAP2 nos isolados padrões de *Candida* spp.

A expressão do gene SAP2 foi detectada apenas em *C. albicans* ATCC 64548. Apesar da superposição das linhas, cinco curvas de amplificação podem ser observadas para *C. albicans* ATCC 64548, que corresponde às cinco condições de exposição às quais foram submetidas (FIGURA 15). As linhas em tons de verde

representam a expressão de SAP2 na presença de fluconazol e na ausência de antifúngico, enquanto aquelas em tons de azul representam a expressão na presença de anfotericina B.

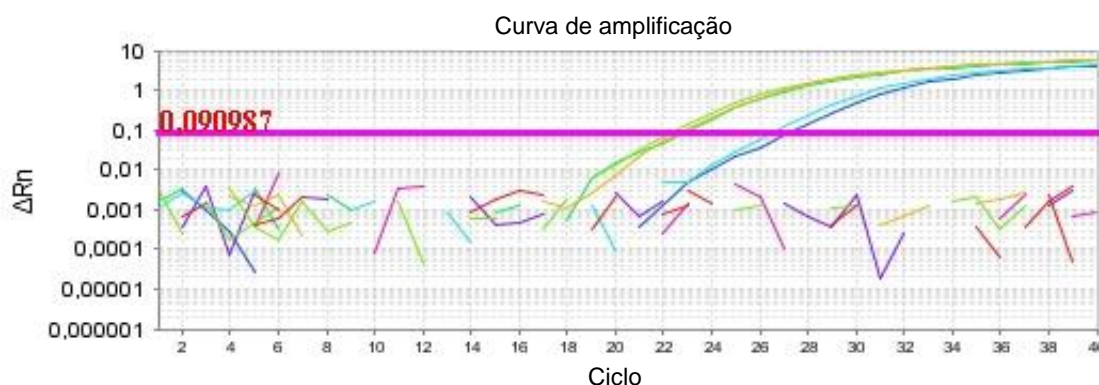


Figura 15. Curva de amplificação do gene SAP2 de *Candida* spp. As linhas que ultrapassaram o “Threshold” correspondem às curvas de amplificação de *C. albicans* ATCC 64548.

A Tabela 16 relaciona os valores de C_T , obtidos por RT-PCR, dos isolados padrões de *Candida* spp. cultivados na ausência de antifúngicos e na presença de fluconazol e anfotericina B.

Tabela 16. Valores de C_T para *Candida albicans* ATCC 64548 e *Candida krusei* ATCC 6258 na presença e na ausência de antifúngicos.

Espécies de <i>Candida</i> spp.	C_T (“Cycle Threshold”)					P-value
	S/ant.	½ IC FL	¼ IC FL	½ IC AP	¼ IC AP	
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	22,8 ac	22,48 c	22,94 abc	26,58 ab	27,35 b	0,0073
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	-

S/ ant.: Sem antifúngico; ½ IC: Metade da Concentração Inibitória; ¼ IC: Um quarto da Concentração Inibitória; FL: Fluconazol; AP: Anfotericina B; Ind.: Indeterminado; Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruscal-Wallis.

O valor do C_T da amostra de *C. albicans* cultivada na presença de ¼ da IC_{90} de anfotericina B foi significativamente maior do que o valor na ausência de antifúngico ($p = 0,0137$) e na presença de ½ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0010$), que significa menor amplificação do gene de interesse, que nesse caso é o gene SAP2. O C_T da amostra cultivada na presença de ½ da IC_{50} de fluconazol foi

significativamente menor do que de *C. albicans* cultivada na presença de anfotericina B. Em valores absolutos, o C_T de *C. albicans* na presença de anfotericina B foi maior do que na presença de fluconazol ou na ausência dos antifúngicos, o que sugere que houve menor expressão do gene pesquisado na presença de anfotericina B (TABELA 16).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A determinação de Sap por eletroforese ainda está limitada à avaliação direta a partir da protease purificada (RAY, PAYNE, 1990; MORRISON et al., 1993; NA et al. 1997) ou indireta pelo uso de anticorpos (RAY, PAYNE, 1990; SMOLENSKI et al., 1997; BRAGA-SILVA et al., 2009). A análise do perfil proteico de *Candida* spp. a partir de sobrenadantes de cultura, apesar de não possibilitar a identificação direta de Sap, possibilita fazer inferência à presença de Sap entre polipeptídeos localizados em banda de tamanho próximo de 43 kDa (BRAGA-SILVA et al., 2009). O método é sensível para quantificação de proteínas totais, pois o Reagente de Bradford reage com todo tipo de proteína, não apresentando qualquer especificidade. Este tipo de eletroforese não avalia proteínas ativas, assim como não determina a quantidade das mesmas, apenas sua presença nas amostras estudadas. O perfil de degradação proteico dos isolados, obtido por SDS-PAGE, evidencia a presença de uma banda com tamanho próximo de 43 kDa (Figura 6), que pode conter a Sap juntamente com produtos de degradação proteica, que poderiam ser excluídos por purificação prévia do sobrenadante, e assim, obter uma banda nítida que correspondesse apenas a Sap, sem peptídeos contaminantes, como realizado por BRAGA-SILVA et al. (2009). Não é possível afirmar que a banda observada é referente a Sap, pois o corante utilizado cora peptídeos e proteínas, mas pode-se supor que ela esteja presente entre estes peptídeos oriundos de degradação.

Com relação ao perfil de sensibilidade, alguns isolados apresentaram crescimento residual dentro da elipse de inibição, fenômeno denominado “trailing” (BRAGA-SILVA et al. 2009), principalmente frente aos azóis dificultando um pouco a determinação da IC. Os isolados analisados se mostraram sensíveis aos antifúngicos Voriconazol, Anfotericina B e Caspofungina, entretanto, frente ao Fluconazol eles não apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade. Todos os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* se mostraram sensíveis aos antifúngicos testados. Detectou-se resistência apenas em *C. krusei* ATCC 6258, no entanto, *C. glabrata* ATCC 90030 e *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentaram sensibilidade reduzida. Isolados de *C. krusei* geralmente apresentam-se resistentes ao fluconazol, pois possuem resistência intrínseca ao fármaco

(PFALLER et al., 2010). LYON et al. (2010) relatou resistência em isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. PFALLER et al. (2010) relatou em seu estudo isolados de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com um perfil de resistência preocupante, pois eles apresentaram resistência aos azóis e a caspofungina. Segundo PFALLER et al. (2012), isolados clínicos de *C. glabrata* têm se apresentado resistentes ao voriconazol e fluconazol, pois possuem genes de resistência à muitos agentes antifúngicos, e podem ainda estabelecer resistência cruzada a outros antifúngicos como a 5-flucitosina e a caspofungina.

Os testes da avaliação qualitativa da atividade proteolítica mostraram atividade na maioria dos isolados, sendo que a maior $R_{\text{halo/colônia}}$ foi observada em um isolado do complexo “*psilosis*” identificado como *Candida* complexo “*psilosis*” 210 (tabela 5). Um estudo de Ray, Payne (1990) determinou a atividade proteolítica de isolados de *Candida* spp. em placa e encontrou maior atividade proteolítica em *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Os resultados do presente trabalho estão em concordância com o trabalho desenvolvido por Hamal et al. (2004) no qual foi detectado, por metodologia qualitativa, atividade proteolítica em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo que a maior atividade proteolítica foi observada em isolados de *C. parapsilosis*. Representantes dos três níveis de intensidade de atividade foram observados entre os isolados de *C. albicans*, fato relatado também por Hamal et al. (2004), que encontrou diferentes níveis de atividade proteolítica em seus isolados de *C. albicans*. Todos os isolados de *Candida* complexo “*psilosis*” apresentaram atividade moderada a alta, enquanto os isolados de *C. tropicalis* apresentaram-se não proteolíticos ou fracamente proteolíticos. Em Hamal et al. (2004) a maioria dos isolados de *C. tropicalis* apresentou atividade proteolítica baixa ou moderada enquanto a minoria dos isolados apresentou alta proteolítica, no entanto, essa minoria foi isolada de fontes de infecção, enquanto a maioria dos isolados de cavidade orofaríngea. Conforme se observa na figura 9, tanto em isolados de *Candida albicans* quanto de *Candida não-albicans*, a maioria dos isolados apresenta intensidade de atividade proteolítica moderada. A percentagem de isolados que apresentaram atividade alta é praticamente a mesma entre *C. albicans* e *Candida não-albicans*, no entanto, a percentagem de isolados de *Candida não-albicans* que apresentaram ausência de atividade é quase o dobro da percentagem de *C. albicans*.

A avaliação qualitativa da atividade proteolítica dos isolados padrões de *Candida* spp. expostos à concentrações subinibitórias de antifúngicos não permitiu detectar diferenças significativas, uma vez que o maior aumento em valor absoluto da $R_{\text{halo/colônia}}$ dos isolados (1,14 vezes) foi observado em *C. parapsilosis* ATCC 22019 na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol. A anfotericina B promoveu inibição do crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* ATCC 6258 em ambas concentrações. Segundo Kaur et al. (2007) e Ortega et al. (2009), genes SAP não haviam sido encontrados nessas espécies e até hoje nada mais se sabe a esse respeito. O meio agar proteinase favorece o crescimento de espécies capazes de expressar Sap por possuir soroalbumina bovina como única fonte de substrato. Talvez a dificuldade de crescimento desses isolados possa ter sido potencializada na presença de anfotericina B, que é fungicida e não na presença de fluconazol, que é fungistático. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avaliasse o efeito de concentrações subinibitórias de antifúngicos sobre a atividade de Sap através da análise qualitativa.

O meio YCB-BSA é capaz de induzir a secreção de Sap e inibir a secreção de outras proteases (WHITE, AGABIAN, 1995). Uma das funções da Sap é fornecer nitrogênio à célula e como a única fonte de nitrogênio existente nesse meio é BSA, a Sap promove a quebra da proteína para liberar nitrogênio. Por esta razão, é possível sugerir que a percentagem de degradação de substrato esteja diretamente relacionada à atividade de Sap. Assim, a alta percentagem de degradação de substrato corresponde à alta atividade proteolítica de Sap. Por se tratar da proposição de uma nova metodologia para determinação quantitativa da atividade proteolítica de Sap, foi necessário realizar diversos testes até que se chegasse às condições finais de experimentação. A concentração de BSA como suplemento no meio de cultura para indução da protease divergia muito entre os trabalhos, 0,2% em WHITE et al. (1993), 0,5% em WU et al. (2000). Assim, escolheu-se 0,8% de forma a atender a sensibilidade do método colorimétrico proposto para nossos ensaios. Da mesma forma, o tempo de cultivo necessário para a secreção das proteases em níveis suficientes para promover atividade detectável foi padronizado em 72 horas após analisar diariamente o percentual de degradação do substrato do meio pelos isolados padrões de *Candida* spp. e correlacionar com suas fases de crescimento.

Através da avaliação quantitativa da atividade proteolítica foi possível detectar atividade em todos os isolados. Como se pode observar na tabela 7, o

comportamento dos isolados analisados quanto à intensidade de atividade foi independente da espécie, pois houve grande variação no percentual de atividade proteolítica de isolados de uma mesma espécie. *C. albicans* 31, por exemplo, apresentou percentual de degradação de substrato 22 vezes maior do que *C. albicans* 257. *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentou o maior percentual de degradação de substrato (100%) e *C. albicans* 257 o menor (2,44%).

A exposição à presença de antifúngicos em concentrações subinibitórias promoveu diferenças significativas no percentual de degradação de substrato da maioria dos isolados, com exceção de *C. albicans* 220 ($p = 0,0997$), *C. glabrata* ATCC 90030 ($p = 0,1281$), *C. krusei* ATCC 6258 ($p = 0,2457$), *C. krusei* 28 ($p = 0,0529$) e *C. lusitaniae* 288 ($p = 0,4729$) (Tabela 9). De acordo com nossos resultados, o cultivo de *C. albicans* ATCC 64548 na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol foi duas vezes maior do que em sua ausência ($p = 0,0446$), enquanto nas demais condições de exposição não houve alteração significativa. A presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B gerou o menor percentual de degradação, o qual foi 4,8 vezes menor do que o gerado na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,001$) e 2,9 vezes menor do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B ($p = 0,0446$). A percentagem de degradação de substrato de *C. glabrata* ATCC 90030 não alterou significativamente nas condições de exposição testadas, mas a maior alteração em valores absolutos foi observada na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol, 2,3 vezes maior que na ausência do mesmo. A maior alteração no percentual de degradação de substrato de *C. krusei* ATCC 6258, em valores absolutos, foi observada entre os cultivos na presença de fluconazol, sendo que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} a percentagem foi duas vezes maior. Em *C. parapsilosis* ATCC 22019, o cultivo na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol apresentou percentual de degradação de substrato 2,5 vezes maior do que na ausência de antifúngico ($p = 0,0446$), 2,5 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B ($p = 0,0319$) e quatro vezes maior do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B ($p = 0,0054$). O percentual de degradação de substrato na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol diferiu significativamente apenas de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B ($p = 0,0497$), com um aumento de 2,6 vezes. Comparado à ausência de agentes antifúngicos, *C. tropicalis* ATCC 750 teve seu percentual de degradação de substrato significativamente aumentado em três vezes quando cultivado na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0446$). O cultivo de *C. tropicalis* ATCC 750 na presença de

fluconazol apresentou percentagem de degradação de substrato de até três vezes maior do que na presença de anfotericina B e essas diferenças foram consideradas significantes.

A maior diferença estatística entre os percentuais de degradação de substrato foi observada em *C. lusitaniae* 286 ($p = 0,0086$), que apresentou percentual inicialmente baixo (7,32%) e quando na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B foi aumentado em até 13,6 vezes (100%). Entretanto, de maneira geral, o cultivo dos isolados na presença de fluconazol apresentou percentual de degradação significativamente maior do que o cultivo na presença de anfotericina B, em ambas as concentrações, como pode ser confirmado pela análise da tabela 9. Segundo FEKETE-FORGACS et al. (2000) e NAVARATHNA et al. (2005), isolados de *Candida* spp. quando expostos a concentrações subinibitórias de antifúngicos podem estimular a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, como as Saps. A análise dos resultados do presente trabalho permite sugerir que a atividade de Sap deve estar relacionada à linhagem e não à espécie, uma vez que o perfil de atividade dos isolados clínicos não é muito semelhante ao perfil dos isolados padrões. Resultados de Costa et al. (2010b) apoiam essa idéia já que em seu trabalho eles obtiveram isolados de *C. albicans* com aumento de atividade de Sap em condições de exposição diferentes, ou seja, um isolado apresentou maior atividade na presença de fluconazol, enquanto outro na sua ausência. As diferenças na atividade de Sap exibida por isolados suscetíveis aos azóis quando expostos a fármacos desta classe permitem sugerir que existem outros fatores desconhecidos que interferem nessa resposta (COSTA et al., 2010b)

Neste trabalho, a avaliação quantitativa permitiu identificar atividade em todos os isolados, mesmo no caso de isolados que apresentam baixo percentual de degradação de substrato. Foi possível observar a dificuldade de detecção de baixo teor de atividade por método qualitativo, já que pequenas alterações não foram detectadas qualitativamente, no entanto, este método é útil para evidenciar espécies altamente proteolíticas, que possuem halos de proteólise claramente visíveis. Com exceção de algumas espécies, que divergiram na intensidade de atividade, houve correlação entre os métodos de análise utilizados na determinação da atividade proteolítica de Sap, entretanto, o método quantitativo é mais sensível, pois isolados classificados como não proteolíticos apresentaram, neste método, percentual de atividade de até 40%. No que se refere à atividade produzida por métodos

diferentes, resultados como o obtido para *C. krusei* (ausência de atividade em um método e moderada atividade no outro) são compatíveis com resultados obtidos por RAY, PAYNE (1990). Segundo Wu et al. (2000) as discrepâncias encontradas nos resultados podem relatar diferenças na sensibilidade das metodologias usadas para medir a atividade proteolítica de Sap.

Acredita-se que o nível de atividade metabólica não esteja relacionado às espécies, já que houve grande variação dentro dos grupos, como exemplo, tem-se os isolados ATCC 64548 e 221-V, ambos *C. albicans*, com atividade igual a 60,63% e 16,50%, respectivamente. Os maiores percentuais de atividade metabólica foram observados em isolados de *C. albicans*, ATCC 64548 (60,63%), 120 (73,27%), 121 (61,72%) e 289 (61,06%) e o menor percentual em *C. krusei* ATCC 6258 (2,35%) (Tabela 11). A maioria dos isolados de *C. albicans* (63%) apresentou alta atividade metabólica, enquanto que entre os isolados de *Candida* não-*albicans* a maioria (68%) apresentou atividade metabólica moderada e nenhum apresentou alta atividade.

Houve diferença significativa no percentual de atividade metabólica dos isolados quando cultivados na presença de fluconazol e anfotericina B, com exceção de *C. albicans* 289 ($p = 0,0630$), *C. krusei* 28 ($p = 0,1093$), *C. lusitaniae* 286 ($p = 0,2197$), *C. lusitaniae* 288 ($p = 0,0548$), *C. parapsilosis* 221-R ($p = 0,1799$) e *C. parapsilosis* 280 ($p = 0,0914$), *C. tropicalis* ATCC 750 ($p = 0,0650$) e *C. tropicalis* 124 ($p = 0,1331$), (Tabela 13). *C. albicans* ATCC 64548 na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B apresentou uma redução de 466 vezes no percentual de atividade metabólica quando comparado à ausência de antifúngicos ($p = 0,0133$). A mais baixa atividade metabólica produzida por esse isolado foi observada na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B, a qual foi até 672 vezes menor do que na presença de fluconazol. Em valores absolutos, a atividade metabólica de *C. albicans* ATCC 64548 aumentou 1,4 vezes na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol e reduziu 1,2 vezes na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} . Em relação à ausência de antifúngicos, *C. glabrata* ATCC 90030 mostrou atividade metabólica 3,9 vezes maior na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol, 4,7 vezes menor na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B e 2,2 vezes menor na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B, no entanto, essas alterações não foram significantes ($p > 0,05$). A atividade metabólica de *C. glabrata* na presença de fluconazol não foi significativamente diferente entre as concentrações testadas ($p = 0,2650$) e o mesmo comportamento foi observado na

presença de anfotericina B ($p = 0,3035$), entretanto houve diferença dignificativa de atividade entre os antifúngicos testados. O percentual de atividade do cultivo na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol foi 4,4 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B e 2,1 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B, enquanto que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol foi 18,2 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B e 8,5 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B. *C. krusei* cultivada na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B apresentou percentual de atividade metabólica significativamente diferente e em torno de 36,6 vezes menor que na ausência de antifúngico ($p = 0,0103$), 40,6 vezes menor que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0089$) e 34,6 vezes menor que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0288$). Em valores absolutos, a atividade metabólica de *C. krusei* na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B foi 18,1 vezes menor do que na ausência do antifúngico, 21,8 vezes menor do que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol, 18,6 vezes menor do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol e 1,9 vezes maior do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B. O cultivo na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B apresentou percentual de atividade metabólica significativamente diferente e 18,9 vezes maior do que o cultivo na ausência de antifúngico ($p = 0,0437$), 115,6 vezes menor do que na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0089$) e 22 vezes menor do que na presença de $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol ($p = 0,0439$). A atividade metabólica de *C. tropicalis* não mudou significativamente nas condições de exposição testadas. O cultivo na presença de $\frac{1}{2}$ da IC_{90} de anfotericina B apresentou a alteração mais expressiva, redução de 145 vezes na atividade metabólica em comparação à sua ausência, mas apesar de grande em valor absoluto, esta redução não foi significativa. O comportamento dos isolados clínicos não foi semelhante ao observado nos isolados padrões o que não possibilita a sugestão de um comportamento por espécie. Assim como na avaliação da atividade proteolítica, o perfil observado deve estar ligado à linhagem estudada e não à espécie.

A análise da tabela 14 permite sugerir que exista uma relação inversa entre a intensidade de atividade proteolítica e metabólica, uma vez que isolados com baixa atividade metabólica apresentaram-se altamente proteolíticos e isolados com alto metabolismo apresentaram-se fracamente proteolíticos, no entanto, esta não deve ser considerada uma regra, pois em alguns casos houve relação direta entre os

percentuais. O ponto que deve ser ressaltado aqui é que isolados com baixo metabolismo e ainda assim, altamente proteolíticos, como *C. krusei* 28, *C. lusitaniae* 288, *Candida* complexo “*psilosis*” 210 e 221-R podem ser potenciais causadores de infecção. O maior problema relacionado a isolados de *C. krusei* é a resistência intrínseca das linhagens dessa espécie (PFALLER et al., 2012). *C. parapsilosis* tem se apresentado como um dos principais agentes causadores de infecções e aumentado muito sua prevalência (CORNISTEIN et al., 2012). Segundo Pichová et al. (2001) isolados de *C. lusitaniae* podem apresentar a mais alta atividade proteolítica específica mesmo com um baixo rendimento no cultivo, o que permite sugerir que níveis mais baixos de secreção de Sap podem ser compensados com mais alta atividade proteolítica por unidade. Este fato confirma a idéia de que as Saps sejam, ainda hoje, o atributo de virulência mais intrigante de *Candida* spp. como sugerido por White, Agabian (1995).

O trabalho realizado por Costa et al. (2010b) relatou que isolados resistentes aos azóis tiveram a atividade de Sap aumentada na presença do mesmo, fato que não ocorreu com isolados suscetíveis. Resultado semelhante foi observado neste trabalho, já que o isolado que apresentou a atividade proteolítica mais intensa foi exatamente o isolado clínico que apresentou sensibilidade reduzida ao fluconazol (*Candida* complexo “*psilosis*” 210), entretanto, *C. glabrata* ATCC 90030 (sensível dose-dependente) e *C. krusei* (resistente), apresentaram baixa atividade proteolítica. *C. glabrata* é considerada um commensal comum em trato gastrointestinal e geniturinário, mas pode tornar-se um patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. Essas espécies podem apresentar resistência inata ou adquirida contra drogas antifúngicas devido a sua capacidade de modificar a biossíntese de ergosterol, funções mitocondriais ou o efluxo de drogas. Essa resistência permite crescimento excessivo dessa espécie em relação a outras espécies suscetíveis e pode contribuir para a emergência recente de infecções causadas *C. glabrata* em populações imunocomprometidas (LI, REDDING, DONGARI-BAGTZOGLU, 2007).

Talvez a ausência de alterações significativas na atividade de Sap na presença de anfotericina B possa ser devido ao perfil de susceptibilidade dos isolados (todos sensíveis), uma vez que pesquisas como a de Kumar et al. (2010) relatam que apenas isolados resistentes a anfotericina B apresentaram aumento da atividade. MORES et al. (2009) estudou a influência do Fluconazol sobre o

crescimento, o metabolismo celular e a produção enzimática de Sap em células planctônicas e em biofilmes. Segundo seus resultados, o Fluconazol exerce influência significativa sobre os aspectos analisados apenas em biofilmes.

Copping et al. (2005) avaliou a influência de azóis, anfotericina B, caspofungina e 5-flucitosina sobre a atividade de Sap em isolados de *C. albicans* e encontrou um aumento de expressão de SAP2 e da atividade do produto do gene SAP2, na maioria dos isolados. No presente trabalho, foi possível observar redução significativa de expressão de SAP2 em *C. albicans* ATCC 64548 cultivada na presença de anfotericina B, em concentrações subinibitórias e ausência de expressão de SAP2 em *C. krusei* em todas as condições, inclusive na ausência de antifúngico (FIGURA 15 e TABELA 16). A ausência de expressão em *C. krusei* também havia sido observada por Ortega et al. (2009).

7 CONCLUSÃO

O perfil eletroforético dos isolados permitiu identificar a presença de albumina remanescente no caldo de cultivo e sugerir a presença de Sap entre outros peptídeos;

Os isolados foram 100% sensíveis a anfotericina B, voriconazol e caspofungina. *C. krusei* ATCC 6258 foi resistente ao fluconazol, enquanto *C. glabrata* ATCC 90030 e *Candida* complexo “*psilosis*” 210 foram sensíveis dose dependente

O método quantitativo de determinação da atividade proteolítica é trabalhoso, mas apresenta maior sensibilidade de que o qualitativo, pois permite identificar e quantificar baixos níveis de atividade proteolítica;

Todos os isolados se mostraram ativos quanto à atividade proteolítica de Sap, quando analisados por avaliação quantitativa.

A maioria dos isolados de *Candida* spp. apresentaram atividade proteolítica moderada (48%) e atividade metabólica moderada (52%).

As atividades proteolítica e metabólica dos isolados foram sutilmente alteradas na presença dos agentes antifúngicos testados, principalmente frente ao Fluconazol, que exerceu influência positiva sobre os percentuais citados. Anfotericina B promoveu redução, e até extinção de atividade proteolítica (método qualitativo) e metabólica dos isolados.

O isolado clínico *Candida* complexo “*psilosis*” 210 apresentou o perfil mais preocupante, pois apesar de ter apresentado baixa atividade metabólica, teve sensibilidade reduzida ao fluconazol e a maior atividade proteolítica dentre os isolados de *Candida* spp. analisados.

A expressão de SAP2 em *C. albicans* ATCC 64548 foi reduzida na presença de $\frac{1}{4}$ da IC₉₀ de anfotericina B, no entanto, em *C. krusei* ATCC 6258 foi ausente em todas as condições.

Ao analisar a proposta do trabalho pode-se concluir que as expectativas vinculadas à realização do mesmo foram alcançadas. Foi possível demonstrar a importância de se compreender o papel da atividade de Sap como um mecanismo envolvido na virulência de *Candida* spp.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ELTEEN, K.H.; ELKARMI, A.Z. HAMAD, M. Characterization of phenotype-based pathogenic determinants de various *Candida albicans* strains in Jordan. **Journal of Infectious Diseases**. v. 54, p. 229-236, 2001.

ALBERT EINSTEIN, SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA. Diretrizes Assistenciais. **Infecções por *Candida* em unidade de terapia intensiva (UTI)**. São Paulo, mai. 2012. Disponível em : http://medicalsuite.einstein.br/diretrizes/terapia_intensiva/fungos_e_protocolo_HIAE.pdf. Acesso em: jun. 2012.

ALBRECHT, A. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 281, n. 2, p. 688-94, 2006.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKY, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

BACKMAN, D., MONOD M., DANIELSON H. Biosensor-Based Screening and Characterization of HIV-1 Inhibitor Interactions with Sap 1, Sap 2, and Sap3 from *Candida albicans*. **Journal of Biomolecular Screening**; v. 11, n. 2, p. 165-175, 2006.

BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D. et al. Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 1578-84, 2000.

BARRETT, A.J. et al. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **The Biochemical Journal**. v. 201, n. 1, p. 189-98, 1982.

BECKER, J.M. et al. Reduced Virulence of *Candida albicans* Mutants Affected in Multidrug Resistance. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4515-8, 1995.

BENISTANT, C.; MOEHREN, G.; GUSTAVSSON, L.; TORRES-MARQUEZ, E.; HOEK, J.B.; RUBIN, R. Leupeptin inhibits phospholipases D and C activation in rat hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1223, n. 1, p. 84-90, 1994.

BISHOP, J.A. et al. *Candida bracarensis* Detected among Isolates of *Candida glabrata* by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization: Susceptibility Data and Documentation of Presumed Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 2, p. 443-446, 2008.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRAGA-SILVA, L.A. et al. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**. v. 42, n. 8, p. 765-770, 2009.
- BORATE, H.B. et al. Novel hybrids of fluconazole and furanones: Design, synthesis and antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**. v. 21, n. 16, p. 4873-8, 2011.
- BORELLI, C. et al. X-ray structures of Sap1 and Sap5: Structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. **Proteins**; v. 72, n. 4, p. 1308-1319, 2008.
- BORG-VON, Z.M. et al. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **Journal of Investigation Dermatology**. v. 113, p. 747-75, 1999.
- BORMAN, A.M. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 933-938.
- BRUCKMANN, A. et al. A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence. **Microbiology**. v. 146, p. 2755-2764, 2000.
- BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 29, n.1, p. 23–39, 2002.
- CALDERONI, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. v. 9, p. 327-35, 2001.
- CARO, L.H. et al. In silico identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccaromyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 13, n. 15, p. 1477-1489, 1997.
- CHANG, H.C. et al. Evaluation of a Capacitance Method for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**; v. 38, n. 3, p. 971-976, 2000.
- CHANG, M.R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 50, n. 5, p. 265-268, 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts**, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27A3 (28). Wayne, PA, USA, 2008.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A.L. et al. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**. v. 41, p. 235-239, 2003.

COLOMBO, A.L. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CORNISTEIN, W. et al. *Candida*: Epidemiology and risk factors for non-*albicans* species. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**. v. 19, n. 12, p. 322-9, 2012.

CORREIA, A. et al. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 313-317, 2006.

COSTA, C.R. et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; v. 52, n. 3, p. 139-143, 2010a.

COSTA, C.R. et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 91-8, 2010b.

COX, G.M.; PERFECT, J.R. Fungal infections. **Currently Opinion Infectious Diseases**. v. 6, p. 422-6, 1993.

DAVIES, D.R. The structure and function of the proteinase. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**. v. 19, p. 189-215, 1990.

DE BERNARDIS, F. et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. **The Journal of Infectious Diseases**; v. 179, n. 1, p. 201-208, 1999.

DORAK, M.T (Ed). **Real-time PCR**. [S.l]: Taylor & Francis e-Library, 2007.

DOSTÁL, J. et al. The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. **Journal of Structural Biology**. v. 167, p. 145-152, 2009.

DOUMAS, B.T.; WATSON W.A.; BIGGS H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**. v. 31, n. 1, p. 87-96, Jan 1971.

EISENHABER, B.; SCHNEIDER, G.; WILDPANER, M.; EISENHABER, F. A sensitive Predictor for Potential GPI Lipid Modification Sites in Fungal Protein Sequences and its Application to Genome-wide Studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Molecular Biology**. v. 337, p. 243-53, 2004.

ELLIOTT, T.S.J. Intravascular-device infections. **Journal of Medical Microbiology**. v. 27, p. 161-7, 1988.

FELK, A. et al. *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the Efg1-Regulated Proteinases Sap4 to Sap6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. **Infection and Immunity**; v. 70, n. 7, p. 3689-3700, 2002.

FERREIRA J. A. G. et al. Biofilm Formation and Effect of Caspofungin on Biofilm Structure of *Candida* Species Bloodstream Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 10, p. 4377-4384, 2009.

FLOREZ J.A. et al. Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a Possible New Opportunistic Fungus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 4107-4111, 2005.

FRADIN, C.; HUBE B. Tissue Infection and site-specific gene expression in *Candida albicans*. **Advances in Applied Microbiology**. v. 53, p. 271-290, 2003.

FREITAS, V.L.T. Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção HIV-*Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença de Chagas. 2009.

GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**. v. 144, p. 829-38, 1998.

GLOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GRAY, E.S.; TSAI, R.W. Characterization of striped bass growth hormone receptors by disulfide-bond reduction and cross-linking studies. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 268, n. 6, p. 428-35, 1994.

GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.; LUTHER, M.F.; REVANKAR, S.G.; PATTERSON, T. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 2938-42, 1998.

GROPP, K. et al. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. **Molecular Immunology**. v. 47, p. 465-475, 2009.

HAJJEH, R. A. et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 1519-1527, 2004.

HAMAL, P.; DOSTÁL, J.; RAČLAVSKÝ, V.; KRYLOVÁ, M.; PICHOVÁ, I. Secreted Aspartate Proteinases, a Virulence Factor of *Candida* spp.: Occurrence among Clinical Isolates. **Folia Microbiologica**. v. 49, n. 4, p. 491-6, 2004.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 3, p. 915-921, mar. 1994.

HAZEN, K.C. et al. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 183, n. 1, p. 89-94, 2000.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. v. 6, p. 986-94, 1996.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; COUCKE, P.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase: open source relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (submitted to **Biotechniques**). 2006.

HEWLETT, G. Apropos aprotinin: a review. **Biotechnology**. v. 8, n. 6, p. 565-6, 1990.

HOMMA, M. et al. Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**. v. 138, p. 627-633, 1992.

HORNBACH, A. et al. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protease Sap9 Modulates the Interaction of *Candida albicans* with Human Neutrophils. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 12, p. 5216-5224, 2009.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infections? **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, p. 1182-1189, 2004.

HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. et al. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. **Biological Chemistry**. v. 390, n. 3, p. 259-268, 2009.

HUBE, B. et al. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. v. 14, n. 1, p. 87-99, 1994.

HUBE, B.; NAGLIK, J.R. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of gene family. **Microbiology**. v. 147, n. 8, p. 1997-2005, 2001.

HUGGETT, J.; DHEDA K.; BUSTIN S.; ZUMLA A. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. **Genes & Immunity**. v. 6, n. 4, p. 279-84, 2005.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAQTZOGLOU, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of Dental Research**. v. 83, p. 204-15, 2007.

JAMES, G. T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. **Analytical Biochemistry**. v. 86, n. 2, p. 574-9, 1978.

JANAS, R.M.; MARKS, D.L.; LARUSSO, N.F. Purification and partial characterization of a heat-resistant, cytosolic neuropeptidase from rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 198, n. 2, p. 574-81, 1994.

JAIN, N. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 6, p. 1697-1703, mar. 2007.

JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**. v. 20, n. 6, p. 1526-1530, 1995.

KAMINISHI, H.; MIHASHI, H.; TAMAKI, T. et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* protease. **Infection and Immunity**. v. 63, n. 3, p. 984-988, Mar., 1995

KAUR, R.; MA, B.; CORMACK, B.P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, n. 18, p. 7628-33, 2007.

KORTING, H.C. et al. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on *in vitro* activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 8, p. 2038-2042, 1999.

KORTING HC, HUBE B, OBERBAUER S et al. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52, p. 623-32, 2003.

KUHN, D.M. et al. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 506-508, 2003.

LAMMERS, G.; JAMIESON, J.C. The role of a cathepsin D-like activity in the release of Gal beta 1-4GlcNAc alpha 2-6sialyltransferase from rat liver Golgi membranes during the acute-phase response. **The Biochemical Journal**. v. 256, n. 2, p. 623-31, 1988.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LERMANN U, MORSHHAUSER J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. **Microbiology**. v. 154, p. 3281-95, 2008.

LIAN, C.H.; DA LIU, W. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. **Mycoses**. v. 50, n. 5, p. 383-390, 2007.

LIN, D. et al. Three Distinct Genotypes within *Candida parapsilosis* from Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, n. 7, p. 1815-1821, jul. 1995.

LINGARAJU, M.H.; GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 850-5, 2008.

LIZUKA, K.; KAWAGUCHI, H.; KITABATAKE, A. Effects of thiol protease inhibitors on fodrin degradation during hypoxia in cultured myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 25, n. 9, p. 1101-9, 1993.

LOCKHART, S.R. et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 4, p. 1216-1217.

LOPES, A. et al. Utilização com sucesso de Caspofungina na candidíase invasiva refractária - No Recém-nascido de Extremo Baixo Peso. **Acta Médica Portuguesa**. v. 23, p. 719-722, 2010.

MACEDO, M.L.R.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Wild. **Phytochemistry**. v. 68, p. 1104-11, 2007.

MARKWARDT, F.; WALSMANN, P.; STURZEBECKER, J.; LANDMANN, H.; WAGNER, G. Synthetic serin protease inhibitors. 1. Inhibition of trypsin, plasmin and thrombin by amidino- and guanidinobenzoic acid esters. **Die Pharmazie**. v. 28, n. 5, p. 356-30, 1973.

MENDES, A. et al. *Candida albicans* biofilms produce more Secreted Aspartyl Protease than the planktonic cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, p. 1813-1815, 2007.

MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**. v. 13, p. 357-68, 1994.

MONOD, M. et al. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic protease family in *Candida albicans*. **Microbiology**. v. 144, n. 10, p. 2731-7, 1998.

MONTENEZ, J.P.; KISHORE, B.K.; MALDAQUE, P.; TULKENS, P.M. Leupeptin and E-64, inhibitors of cysteine proteinases, prevent gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. **Toxicology Letters**. v. 73, n. 3, p. 201-8, 1994.

MONTES, H.M.M. et al. Protein glycosylation in *Candida*. **Future Microbiology**. v. 4, p. 1167-1183, 2009.

MORAGUES, M.D. et al. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C albicans* activities. **Infections and Immunity**. v. 71, n.9, p.5273-5279, sept. 2003.

MORES, A.U. et al. Enhancement of Secretory Aspartyl Protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. **Mycoses**. v. 54, n. 3, p. 195-201, 2009.

MORRISON, C. J. et al. Purification and characterization of the extracellular aspartyl proteinase of *Candida albicans*: removal of extraneous proteins and cell wall manoprotein and evidence for lack of glycosylation. **Journal of General Microbiology**. v. 139, p. 1177-1186, 1993.

MORSCHHÄUSER, J.; VIRKOLA, R.; KORHINEN, T. K. et al. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. **FEMS Microbiology**. v. 153, n. 2, p. 349-55, Aug., 1997.

MUIR, A., WEINBREN, M. J. Potential virulence factors of *Candida* spp. Isolated from clinical and food sources. **Journal of Hospital Infection**. v. 75, p. 236-246, 2010.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique (Paris)**. v. 48, p. 579-82, 1990.

MUNRO, C.A.; HUBE, B. Antifungal therapy at the HAART of viral therapy. **Trends in Microbiology**. v. 10, n. 4, p. 173-77, 2002.

NA, B.K., et al. Purification and Characterization Extracellular Aspartic Proteinase of *Candida albicans*. **The Journal of Microbiology**. v. 35, n. 2, p. 109-116, 1997.

NAGLIK, J.R. et al. *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 5, p. 2482-90, 1999.

NAGLIK, J.R., CHALLACOMBE, S.J, HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NAGLIK, J. R. et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**. v. 154, p. 3266-80, 2008.

NAILIS, H. et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiology**. v. 10, 2010.

NAVARTHANA, D.H. et al. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 1156-1159, 2005.

NETT, J. et al. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

NEUGNOT, V. et al. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. **European Journal Biochemistry**. v. 269, p. 1734-45, 2002.

NOUMI, E. et al. Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. **Mycopathologia**. v. 169, p. 269-278, 2010.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em tempo real. Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 33, p. 10-3, 2004.

NUCCI, M.; MAIOLINO, A. Infecções em transplante de medula óssea. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 278-293, jul./set. 2000.

ODDS, F.C. Pathogenic fungi in the 21st century. **Trends in Microbiology**. v. 8, p. 200-201, 2000.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 36, n.5, p. 255-69, 1998.

ORTEGA, B.P. et al. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 3, p. 505-512, 2009.

O'TOOLE, G.A.; DAVEY, M.E. Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

PAPPAS, P.G. et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**. v. 37, p. 634-643, 2003.

PAPPAS, P.G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, p. 161-189, 2004.

PEMAN, J.; CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antiungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v. 7, p. 453-60, 2009.

PFALLER, M.A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D.J.; ESPINEL-IGROFF, A.; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**. v. 13, p. 180-95, 2010.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**. v. 125, p. S3-S13, 2012.

PHAN, Q.T.; BELANGER, P.H.; FILLER, S.G. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. **Infection and Immunity**. v. 68, n. 6, p. 3485-3490, 2000.

PICHOVA, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **European Journal Biochemistry**. v. 268, n. 9, p. 2669-2677, 2001.

PINHO, R.T., et al. Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of aspartyl proteases. **Experimental Parasitology**. v. 122, p. 128-133, 2009.

PITTET, D.; WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. **Archives of International Medicines**. v. 155, n. 11, p. 1177-84, 1995.

PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Mechanisms of resistance to antifungal therapy. **Medicina clínica**. v. 126, n. 1, p. 56-60, 2006.

PROUTY, W.F.; GOLDBERG, A.L. Effects of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 247, n. 10, p. 3341-52, 1972.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**. v. 6, p. 979-986, 2006.

RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Comparative Production and Rapid Purification of Candida Acid Proteinase from Protein-Supplemented Cultures. **Infection and Immunity**. v. 58, n. 2, p. 508-514, 1990.

REMOLD, H.; FASOLD, H.; STAIB, F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 167, n. 2, p. 399-406, 1968.

RIESELNAN, M.H. ; HAZEN, K.C. ; CUTLER, J.E. Determination of Antifungal MICs by a Rapid Suscetibility Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 1, p. 333-340, 2000.

RIPEAU, J. S. et al. Evidence for Differential Expression of *Candida albicans* Virulence Genes during Oral Infection in Intact and Human Immunodeficiency Virus Type 1–Transgenic Mice. **Brasilian Journal of Infectious Diseases**. v. 185, p. 1094-1102, 2002.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 2, p. 225-227, mar./abr. 2009.

RÜCHEL, R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. **Microbiology Sci.** v. 3, n. 10, p. 316-19, Oct., 1986.

RUHNKE, M.; WESTHAUSEN, A.S.; MORSCHHAUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 46, p. 291-5, 2000.

SAMBROOK, J ; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning** : A laboratory manual. 3. ed. v. 2. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGLARD, D. et al. A Triple Deletion of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of the *Candida albicans* Causes Attenuated Virulence. **Infection and Immunity.** v. 65, n. 9, p. 3539-3546, 1997.

SARDI, J. C. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology.** v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SCHALLER, M.; SCHAFFER, W.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. **Molecular Microbiology.** v. 29, p. 605-15, 1998.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; SCHAFFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.; HUBE, B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Molecular Microbiology.** v. 34, p. 169-80, 1999.

SCHALLER, M.; BEIN, M.; KORTING, H.C et al. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. **Infection and Immunity.** v. 71, p. 3227-34, 2003.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SENEVIRATNE, C.J. et al. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 52, n. 9, p. 3259-3266, 2008.

SHIMIZU, M.T. et al. Studies on hyaluronidase; chondroitin sulfatase; proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses.** v. 39, p. 161-167, 1996.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SMOLENSKI, G. et al. Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. **Microbiology.** v. 143, n. 2, p. 349-356, 1997.

ST-GERMAIN, G. et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 3, p. 949-953, mar. 2001.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabouraudia**. v. 4, n. 3, p. 187-193, 1965.

STEHR, F. et al. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. **Mycoses**. v. 43, n. 2, p. 17-21, 2000.

SULLIVAN et al. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**. v. 147, p. 1507-1521, 1995.

SULLIVAN et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. **Oral Diseases**. v. 3, p. 96-101, 1997.

TAMURA, N.K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 1, p. 91-93, jan./fev., 2007.

TANG, J.; WONG, R.N. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. **Journal of Cellular Biochemistry** . v. 33, p. 53-63, 1987.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 1, p. 284-292, jan. 2005.

UMEZAWA, H.; ISHIZUKA, M.; AOYAQI, T.; TAKEUCHI, T. Enhancement of delayed-type hypersensitivity by bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase. **The Journal of Antibiotics**. v. 29, n. 8, p. 857-9, 1976a.

UMEZAWA, H.; AOYAQI, T.; SUDA, H.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. **The Journal of Antibiotics**. v. 29, n. 1, p. 97-9, 1976b.

UMEZAWA, H. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. **Methods in Enzymology**. v. 45, p. 678-95, 1976c.

VAZQUEZ, J.A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: an Epidemiologic Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n.2, p. 421-426, 1998.

WATTS, H. et al. Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. **Fems Microbiology Letters**. v. 159, n.1, p. 129-135, fev. 1998.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**. v.3, n.7, p. 34.1-34.11, 2002.

WALSMANN, P.; RICHTER M.; MARKWARDT F. Inactivation of trypsin and thrombin by 4-amidinobenzolsulfofluoride and 4-(2-aminoethyl)-benzolsulfofluoride. **Acta Biologica et Medica Germanica**. v. 28, n. 4, p. 577-85, 1972.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases: Isoenzyme Pattern Is Determined by Cell Type, and Levels Are Determined by Environmental Factors. **Journal of Bacteriology**. v. 177, n. 18, p. 5215-5221, 1995.

YANG, Y-L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 36, n. 4, p. 223-228, 2003.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases: Isoenzyme Pattern Is Determined by Cell Type, and Levels Are Determined by Environmental Factors. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 5215-21, 1995.

ZAUGG, C. et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 1, p. 405-412, 2001.