

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAIARA CHAVES SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *Candida albicans* FRENTE A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS E ANTIRETROVIRAIS**

ALFENAS-MG

2017

NAIARA CHAVES SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *Candida albicans* FRENTE A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS E ANTIRETROVIRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias.

ALFENAS-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Naiara Chaves

Expressão gênica de *Candida albicans* frente a diferentes concentrações de antifúngicos e antiretrovirais. / Naiara Chaves Silva. - 2017.
122 f. -

Orientador: Amanda Latercia Tranches Dias.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. *Candida albicans*. 2. Expressão Gênica. 3. Antifúngicos. 4. Inibidores de Proteases. 5. Ergosterol. 6. Citometria de Fluxo. I. Dias, Amanda Latercia Tranches. II. Título.

CDD: 615.1

NAIARA CHAVES SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *Candida albicans* FRENTE A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS E ANTIRETROVIRAIS**

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: ____/____/____

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias

Instituição: UNIFAL-MG

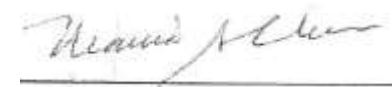
Assinatura:



Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura:



Profa. Dra. Ana Beatriz Alkimim Teixeira Loyola

Instituição: UNIVAS

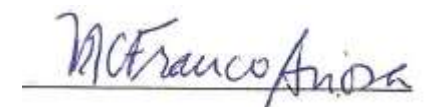
Assinatura:



Profa. Dra. Marília Caixeta Franco Ariosa

Instituição: UNIFAL-MG

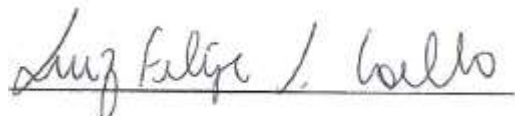
Assinatura:



Profa. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais Gilberto e Heloisa, meus irmãos Taiana e Rafael e meu esposo Markus Vinícius, pela confiança e amor incondicional, e em especial à minha avó Elza (*in memoriam*), pelo seu exemplo de amor e perseverança.

AGRADECIMENTOS

À 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 os obstáculos e me guiou nessa caminhada para chegar até aqui;

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

Aos meus pais Gilberto Eustáquio Moura Silva e Heloisa Carolina do Carmo Chaves Silva, a quem devo tudo o que sou, agradeço pelo amor, apoio incondicional e confiança, porque mesmo distante sempre me incentivaram e acreditaram que eu era capaz e aos meus irmãos Taiana Chaves Moura e Rafael Moura da Silva, pelo amor, inspiração apoio e compreensão em momentos difíceis;

Ao meu amado esposo Markus Vinícius Esteves Guarda, toda a gratidão do mundo por ser meu companheiro e ter se mantido presente em todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho, fossem bons ou ruins. Muito obrigada por ter me ajudado caminhar pra frente após as decepções, com muito amor, carinho e compreensão;

Às minhas colaboradoras, Ma. Josidel Conceição Oliver e Ma. Camila Miranda Pernambuco, pela amizade sincera, pelo apoio em todas as situações e missões, pela motivação e compreensão e, especialmente, pela grande ajuda na condução dos trabalhos e análises laboratoriais;

À turma dos laboratórios de Microbiologia e Imunologia e Biologia molecular de microrganismos da UNIFAL-MG, colaboradores diretos ou indiretos, professores, técnicos e funcionários que me ajudaram muito no dia-dia laboratorial e tornaram este trabalho possível;

Aos pesquisadores Dr. Fabio Antônio Colombo e Dra. Daniela Cristina Macedo Vieira pela constante ajuda na realização deste trabalho, pela imensa disposição em ajudar, pelas sugestões, amizade, excelentes conversas e momentos de descontração, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida e por todo o apoio que me deram.

À Faculdade de Ciências e Tecnologias de Campos Gerais - Facica, especialmente aos meus colegas de trabalho e alunos do curso de Farmácia, que sempre me ofereceram uma palavra de ânimo, especialmente nos momentos em que mais necessitei, agradeço pelo amor, carinho e reconhecimento;

Aos professores do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que colaboraram direta ou indiretamente para o enriquecimento deste trabalho de pesquisa oferecendo seus conhecimentos em áreas afins;

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e à Profa. Dra. Marília Caixeta Franco Ariosa pelos ensinamentos e sugestões e por participarem da banca de defesa desta tese, juntamente com as Profas. Dras. Márcia de Souza Carvalho Melhem e Ana Beatriz Alkmin Teixeira Loyola às quais também agradeço imensamente a disponibilidade.

À Profa. Dra. Marisa Ionta e ao Me. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva pela imensa disponibilidade na realização das análises por citometria de fluxo;

À Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan por ter nos fornecido, gentilmente, uma passagem da linhagem de *C. albicans* SC5314, além da disponibilidade, atenção e conhecimentos técnico-científicos transmitidos, os quais foram de grande valia para a realização deste estudo;

Ao laboratório Cristália[®] por ter nos cedido, gentilmente, o fármaco saquinavir para a utilização no presente trabalho;

Aos meus amigos e demais familiares por compreenderem minha ausência em diversas situações;

À CAPES, CNPQ e a FAPEMIG pelo fomento necessário para a realização do trabalho;

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Importantes atributos associados à virulência podem ser observados em *Candida* spp., tais como a expressão de genes *SAP*, os quais são responsáveis por regular a secreção de aspartato proteases (Sapp). Sabe-se que a exposição de *Candida* spp. a certas substâncias pode alterar o padrão de secreção de enzimas hidrolíticas tais como as Sapp. Essas proteases apresentam estrutura química e sítio ativo semelhante às proteases do vírus HIV, o que sugere que inibidores de proteases usados no tratamento da AIDS possam interagir com as proteases de *Candida* spp. e influenciar a síntese das proteases. O isolado padrão de *C. albicans* SC5314 e dois isolados de *C. albicans* provenientes de casos de infecção hospitalar, classificados como sensíveis ao fluconazol e anfotericina B no teste de sensibilidade, foram cultivados por 24 horas, 37°C, 180 rpm em caldo “Yeast Carbon Base” (YCB) suplementado com soroalbumina bovina (BSA) em diferentes condições de exposição, como a presença de fluconazol e anfotericina B em concentrações inibitórias e subinibitórias e saquinavir e pepstatina A em concentrações efetivas e subefetivas. Avaliou-se a expressão relativa dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* nos isolados submetidos a esses cultivos usando *ACT1* como gene normalizador e os resultados foram analisados pelo método do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) usando a amostra não tratada como controle. A expressão de *SAP* nos isolados de *C. albicans* foi maior na presença de concentrações inibitórias/efetivas dos antifúngicos e inibidores de proteases, sendo que, em número absolutos, a expressão desses genes foi ainda maior para os inibidores de proteases. *C. albicans* SC5314 foi o isolado de maior expressão de *SAP* e *SAP7* foi o gene mais expresso nos isolados, em números absolutos. A fim de investigar a influência das substâncias ativas fez-se avaliação dos cultivos por citometria de fluxo e quantificação de ergosterol. A avaliação por citometria de fluxo não demonstrou grandes alterações de complexidade celular ou desvio de fluorescência indicativo de maior atividade de morte e a quantificação do ergosterol foi significativamente reduzida em relação ao controle apenas na presença de concentração inibitória de fluconazol. Tais resultados sugerem que não deva existir relação direta entre a influência dos antifúngicos e inibidores de proteases sobre a expressão de *SAP* e os padrões celulares avaliados, entretanto, uma vez que os fatores associados à virulência são correlacionados, tais situações podem influenciar positivamente a expressão dos genes no sentido de promover reposição das proteases a fim de garantir sua patogenicidade.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Expressão gênica. Antifúngicos. Inibidores de proteases. Ergosterol. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Important attributes associated to virulence may be observed in *Candida* spp., such as the expression of *SAP* genes which are responsible for regulating the secretion of aspartate proteases (Sapp). It is known that exposure of *Candida* spp. to certain substances may alter the secretion pattern of hydrolytic enzymes, such as Sapp. These proteases have a chemical structure and active site similar to HIV virus proteases, suggesting that protease inhibitors used in the treatment of AIDS may interact with the proteases of *Candida* spp. and influence the synthesis of proteases. The standard isolate of *C. albicans* SC5314 and two isolates of *C. albicans* from hospital infection cases classified as sensitive to fluconazole and amphotericin B in the sensitivity test were cultured for 24 hours, 37°C, 180 rpm in Yeast Carbon Base (YCB) supplemented with bovine serum albumin (BSA) under different exposure conditions, such as the presence of fluconazole and amphotericin B in inhibitory and subinhibitory concentrations and saquinavir and pepstatin A in effective and sub-effective concentrations. The expression of the *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* and *SAP9* genes in the isolates submitted to these cultures was evaluated using *ACT1* as the normalizing gene and results were analyzed by the comparative C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) method using the untreated sample as a control. *SAP* expression in *C. albicans* isolates was higher in the presence of inhibitory/effective concentrations of antifungal and protease inhibitors, and in absolute numbers the expression of these genes was even greater for protease inhibitors. *C. albicans* SC5314 was the highest expression isolate of *SAP* e *SAP7* was the most expressed gene in the isolates, in absolute numbers. In order to investigate the influence of the active substances cultures were evaluated by flow cytometric and ergosterol quantification. Flow cytometric assessment did not demonstrate large changes in cell complexity or fluorescence drift indicative of increased death activity, and ergosterol quantification was significantly reduced. The evaluation of the samples by flow cytometry didn't show pronounced changes in cell complexity or fluorescence drift indicative of increased death activity in relation to the control only in the presence of fluconazole inhibitory concentration. These results suggest that there shouldn't be direct relationship between the influence of antifungal and protease inhibitors on the expression of *SAP* and the assessed cellular patterns, however, since factors associated with virulence are correlated, such situations can positively influence the expression of genes in the sense of promoting protease replacement in order to ensure its pathogenicity.

Keywords: *Candida albicans*. Antifungal agents. Protease inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dendrograma mostrando a relação da família de isoenzimas Sapp de *Candida albicans* e as duas yapsinas de *Saccharomyces cerevisiae* que mostraram elevada similaridade com Sap9p e Sap10p..... 24
- Figura 2 - Expressão de diferentes subclasses de Sapp por *C. albicans* durante o processo infeccioso. 27
- Figura 3 - Estrutura química de uma molécula de ergosterol (YUAN et al., 2006)..... 41
- Figura 4 – Esquema representativo da montagem do teste de sensibilidade dos isolados de *C. albicans* aos agentes antifúngicos fluconazol e anfotericina B com distribuição das diferentes diluições dos antifúngicos em microplacas de poliestireno de 96 poços contendo 1×10^5 UFC/mL dos isolados. ... 47
- Figura 5 - Configuração das nove amostras propostas para estudo dos isolados de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121, *C. albicans* 257. 52
- Figura 6 - Contagem celular. (A): Câmara de Neubauer; (B): Quadrantes para contagem; (C): Células de *C. albicans* observadas por microscopia óptica com azul de tripan 0,2%, células mortas (coradas em azul)..... 61
- Figura 7 - Perfis espectrais de esteróis representativos de isolados de *C. albicans* determinados por espectrofotometria na luz ultra-violeta (UV) entre 240 nm e 300 nm. Isolados sensíveis ao fluconazol (A), sensíveis dependendo da dose (B) e resistentes ao fluconazol (C). Teor de ergosterol a partir de cultivo sem adição de fluconazol (Curva A), com adição de 1 µg/mL (Curva B), 4 µg/mL (Curva C), 16 µg/mL (Curva D) ou 64 µg/mL (Curva E)..... 63
- Figura 8 - Curvas Dose-Resposta (A) e percentual de crescimento relativo (%) (B) de Saquinavir e Pepstatina A, ambos obtidos por avaliação espectrofotométrica do efeito dos inibidores de proteases sobre o crescimento de *C. albicans* SC5314 após 24 h de incubação a 37°C, 180 rpm. Gráficos elaborados pelo Graph Pad® Prism. 68
- Figura 9 - Análise do RNA total de *C. albicans* SC5314 por eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, (2) Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, (3) Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, (4) Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, (5) Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, (6) Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, (7) Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, (8) Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, (9) Controle, cultivo na ausência de substâncias ativas, M: marcador de peso molecular. 71
- Figura 10 - Curva de amplificação dos genes *ACT1*, *SAP2*, *SAP4* e *SAP7* de *C. albicans* SC5314. As linhas que ultrapassaram o “Threshold” correspondem às curvas de amplificação de cada condição.. 73
- Figura 11 - Avaliação da expressão relativa dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 na presença e ausência de fluconazol, anfotericina B, saquinavir e pepstatina A em concentrações inibitórias e subinibitórias/efetivas dos mesmos, conforme especificado na figura..... 74
- Figura 12 - Contagem celular. Amostra controle de *C. albicans* SC5314 (sem adição de substâncias), observadas por microscopia óptica com azul de tripan 0,2%, células mortas (coradas em azul). 81
- Figura 13 - Análise citométrica de *C. albicans* SC5314, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus

fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 83

Figura 14 - Análise citométrica de *C. albicans* 121, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 84

Figura 15 - Análise citométrica de *C. albicans* 257, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 85

Figura 16 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* SC5314 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 86

Figura 17 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* 121 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 87

Figura 18 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* 257 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias..... 88

Figura 20 - Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol apresentado pelo isolado de *C. albicans* 121 em nove condições de exposição relativas à presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de em condições inibitórias/subinibitórias e efetivas/subefetivas, conforme discriminado na figura. Curvas elaboradas no Graph Pad Prism® 90

Figura 21 - Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol apresentado pelo isolado de *C. albicans* 257 em nove condições de exposição relativas à presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de em condições inibitórias/subinibitórias e efetivas/subefetivas, conforme discriminado na figura. Curvas elaboradas no Graph Pad Prism® 91

Figura 22 - Percentual de ergosterol no sedimento obtido de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 nas nove condições de exposição propostas, conforme discriminado na figura. Os dados foram apresentados como média + desvio padrão..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das famílias de genes <i>SAP</i> em <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>	25
Tabela 2 - Inibidores de proteases e suas principais características.....	36
Tabela 3 - Concentrações inibitórias mínimas (MIC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade x resistência de <i>Candida albicans</i> frente aos antifúngicos, segundo o documento EDef 7.3.1 (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017).	48
Tabela 4 - Sequências de <i>primers</i> e sondas para os genes <i>SAP2</i> , <i>SAP4</i> , <i>SAP7</i> , <i>SAP9</i> e <i>ACT1</i> para análise de expressão por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).....	58
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (MIC ₅₀ e MIC ₉₀) do crescimento e classificação dos isolados de <i>Candida albicans</i> quanto à sensibilidade aos antifúngicos, determinada por microdiluição em caldo conforme documento E Def 7.3.1 (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF-HCl	-	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina sérica bovina
c-DNA	-	DNA complementar, sintetizado a partir do RNA
C_T	-	<i>Cycle Threshold</i>
DEPC	-	Dietilpirocarbonato
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	-	Ditiotreitol
dNTPs	-	Deoxiribonucleotídeos trifosfato
E-64	-	L-trans-epoxisuccinil leucilamido-4(4-guanidino)butano
FAM	-	Fluoróforo 6-Carboxifluoresceína
IC	-	<i>Inhibitory Concentration</i> - Concentração Inibitória
KCl	-	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	-	Hidrogenofosfato de potássio
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
qPCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	-	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
Sapp	-	<i>Secreted aspartyl proteinase</i> - Aspartato protease secretada (proteína)
SAP	-	<i>Secreted aspartyl proteinase</i> - Gene codificador da síntese de Sapp
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
YCB	-	“ <i>Yeast Carbon Base</i> ” – Caldo base para leveduras
YCB-BSA	-	Caldo base para leveduras suplementado com albumina sérica bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	<i>Candida</i> spp. e Infecções oportunistas	16
2.2	Fatores associados à virulência de <i>Candida</i> spp.	21
2.3	“Secreted aspartyl proteinase” (Sapp) de <i>Candida</i> spp.	22
2.4	Antifúngicos e Secreção de Sapp	29
2.5	Inibidores de proteases, proteases do vírus HIV-1 e Sapp.....	34
2.6	Métodos de avaliação da influência de substâncias ativas.....	38
2.6.1	<i>Citometria de fluxo</i>	39
2.6.2	<i>Ergosterol e suas funções como constituinte essencial em leveduras</i>	40
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo Geral	44
3.2	Objetivos específicos.....	44
4	METODOLOGIA	45
4.1	Local de execução e seleção de amostras.....	45
4.2	Teste de sensibilidade dos isolados de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos.....	45
4.2.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC ₅₀ e MIC ₉₀)	47
4.3	Indução à produção de Sapp.....	48
4.3.1	Indução à produção de Sapp na presença de antifúngicos.....	49
4.3.2	Indução à produção de Sapp na presença de inibidores de proteases – condições determinadas em dependência da realização de ensaios prévios	50
4.4	Configuração de amostras para o estudo proposto.....	51
4.5	Extração de RNA total	53
4.6	Avaliação da qualidade e rendimento do RNA extraído	54
4.6.1	<i>Quantificação de RNA</i>	54
4.6.2	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	55
4.7	Tratamento do RNA.....	55
4.8	Reação de Transcrição reversa para a síntese de cDNA	56
4.9	Avaliação da expressão de <i>SAP</i> nos isolados de <i>Candida albicans</i> eleitos no estudo	57
4.9.1	<i>Padronização das condições de realização da Reação em cadeia da polimerase quantitativa para os genes pesquisados</i>	57

4.9.2	Quantificação dos genes por Reação em cadeia da polimerase quantitativa	58
4.9.3	Análise e interpretação dos resultados da qPCR	59
4.10	Avaliação do padrão de alteração celular nos isolados de <i>Candida albicans</i> mantidos sob influência dos antifúngicos e inibidores de proteases	60
4.10.1	Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán	61
4.10.2	Citometria de fluxo	61
4.10.3	Determinação do teor de ergosterol presente em cada amostra após exposição aos agentes antifúngicos e inibidores de proteases	62
4.11	Análise estatística	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Teste de sensibilidade aos antifúngicos – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC ₅₀ e MIC ₉₀) dos antifúngicos	65
5.2	Indução à produção de Sapp na presença e na ausência de antifúngicos e inibidores de proteases	66
5.3	Extração de RNA total	70
5.4	Tratamento do RNA total e síntese de cDNA	71
5.5	Avaliação da expressão de <i>SAP</i> nos isolados de <i>Candida albicans</i> eleitos no estudo	72
5.5.1	PCR quantitativo	72
5.5.2	Análise e interpretação dos resultados da qPCR	73
5.6	Avaliação do padrão de alteração celular nos isolados de <i>Candida albicans</i> mantidos sob influência dos antifúngicos e inibidores de proteases	80
5.6.1	Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán	80
5.6.2	Citometria de fluxo	81
5.6.3	Determinação do teor de ergosterol	89
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A evolução científica possibilitou avanços na medicina, como melhoria nos procedimentos usados nas unidades de terapia intensiva (UTI), intervenções e transplante de órgãos, implementação de novas estratégias para o tratamento da AIDS, etc., no entanto, esse avanço trouxe como consequência um aumento no número de infecções oportunistas, principalmente infecções causadas por fungos (YAPAR, 2014). O aumento das infecções fúngicas, com alta prevalência nas últimas décadas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (CORNISTEIN et al., 2013), gerou mudanças nas políticas de saúde em todo o mundo, a fim de encontrar mecanismos para controlar as infecções, uma vez que apresentam alta morbidade e mortalidade e têm impacto direto nos custos de assistência à saúde (COLOMBO et al., 2006; YAPAR, 2014).

Os agentes fúngicos isolados com maior frequência pertencem ao gênero *Candida* spp., que ocupam o quarto lugar entre os microrganismos mais frequentemente isolados em sepsis hospitalar (KUMAR et al., 2015a) e *Candida albicans*, com alta prevalência em candidemias, é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas (YAPAR, 2014). A prevalência aumentada de infecções causadas por *Candida* spp. e a seleção de microrganismos resistentes aos fármacos existentes cria a necessidade de compreender seus mecanismos patogênicos e, paralelamente, desenvolver novos agentes antifúngicos (BORATE et al., 2011; YANG, 2003).

Grande parte dos estudos a respeito da patogenicidade de *Candida* spp. sugere a existência de uma estreita relação entre a produção das “Secreted Aspartyl proteases” (Sapp) e a virulência das linhagens (KORTING et al., 2003; LERMANN; MORSCHHÄUSER, 2008; SCHALLER et al., 2003; WHITE; AGABIAN, 1995), pois segundo pesquisadores citados, linhagens secretoras de Sapp geralmente apresentam maior capacidade de invasão dos tecidos hospedeiros do que linhagens não secretoras de tais proteases (MORES et al., 2011).

A produção de Sapp em *Candida* spp., codificada pelos genes *SAP*, é variável e pode ser influenciada por condições ambientais *in vivo* e experimentais *in vitro* (HUBE; NAGLIK, 2001; PARRA-ORTEGA et al., 2009). Acredita-se que concentrações subinibitórias de antifúngicos podem promover aumento do potencial patogênico por estímulo de fatores de virulência, como a produção e secreção de Sapp (HAZEN et al., 2000; JARVIS, 1995; NAVARATHNA et al., 2005). Segundo estudo, há redução na frequência de candidíase

orofaríngeal em pacientes tratados com inibidores de protease anti-HIV, o que sugere que inibidores de proteases do vírus HIV possam agir direta ou indiretamente sobre a expressão dos genes *SAP* e influenciar a secreção das proteases, uma vez que as Sapp possuem estrutura química e sítio ativo semelhante às proteases do vírus HIV (BACKMAN; MONOD; DANIELSON, 2006).

Tais informações fazem com que a Sapp seja considerada um importante atributo de virulência (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003a; WHITE; AGABIAN, 1995) e tenha direcionado o interesse desse trabalho de tese, que teve por objetivo avaliar a expressão dos genes *SAP* e alterações relacionadas à integridade celular em linhagens de *C. albicans* submetidas ao cultivo na presença e ausência de antifúngicos e inibidores de proteases em concentrações inibitórias/efetivas e subinibitórias/subefetivas.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam pesquisas anteriores e apontam perspectivas para estudos futuros, pois evidenciaram a capacidade que *C. albicans* tem de se adaptar a situações adversas como a presença de antifúngicos e inibidores de proteases e ainda assim manter sua complexidade celular e capacidade proliferativa. Os resultados dessa pesquisa confirmam que as isoenzimas Sapp e sua relação com a capacidade invasiva podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, e deste modo, fornecem dados para pesquisas subsequentes nesse sentido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Comunidades hospitalares em todo o mundo vêm relatando o aumento significativo das infecções fúngicas invasivas, destacando-se aquelas causadas pelo gênero *Candida* spp. (AGARWAL et al., 2017; CAGGIANO et al., 2015; MARRA et al., 2011; NUCCI et al., 2013; PFALLER; DIEKEMA, 2007; SARDI et al., 2013a). As infecções por *Candida* spp. têm aumentado não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença causada por elas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (NUCCI et al., 2013; PAPPAS et al., 2004). Essas infecções podem ser de difícil diagnóstico e estar associadas a altas taxas de mortalidade (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003).

2.1 *Candida* spp. e Infecções oportunistas

A emergência de leveduras do gênero *Candida* spp. como patógenos significantes tem implicações importantes para o diagnóstico e gerenciamento das infecções fúngicas invasivas. O aumento de incidência dessas infecções pode estar associado ao número restrito de agentes antifúngicos disponíveis e à resistência de alguns isolados a esses agentes (SARDI et al., 2013b). A relação entre infecções causadas por *Candida* spp. e o ambiente hospitalar ganhou importância a partir da década de 80, interligada ao avanço da tecnologia científica médica, a melhor compreensão dos mecanismos desencadeadores de doenças e os mecanismos que oferecem sobrevida aumentada de pacientes com doenças terminais, que geralmente morrem de infecções fúngicas e não da doença de base (CHANG et al., 2000; COLOMBO et al., 2003; YAPAR, 2014).

Infecções fúngicas invasivas representam um sério risco à saúde, especialmente no caso de pacientes hospitalizados (YANG, 2003), pois apesar dos avanços recentes, as taxas de mortalidade associadas às candidemias (infecções sistêmicas) permanecem altas, entre 12 e 60% (STORTI et al., 2012). O aparecimento de novas espécies patogênicas de *Candida* e a resistência aos agentes antifúngicos disponíveis dificulta a prevenção, o diagnóstico e o tratamento de tais infecções fúngicas (PAPON et al., 2013). Apenas 50% dos pacientes com

candidíase invasiva tem hemocultura positiva e o diagnóstico é confirmado em apenas 15 a 40% dos casos (HINRICHSEN et al., 2009; STORTI et al., 2012).

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, que favorecem o espalhamento e colonização de leveduras patogênicas (GLOLO; SVIDZINSKI, 2010; TURNER; BUTLER, 2014). 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 importância como fatores de pré-disposição (MORA-MONTES et al., 2009; PAPPAS et al., 2003).

Historicamente, o termo *Candida* referiu-se a leveduras assexuadas ou imperfeitas, mas sabe-se hoje que muitas espécies de *Candida* são competentes para reprodução sexual ou parassexual e podem ser divididas em haploides e diploides (BUTLER et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2006). O gênero *Candida*, que engloba as principais leveduras patogênicas, é classificado atualmente, como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina e classe Ascomycetes (BENNETT; TURGEON, 2016; BRANDT; LOCKHART, 2012; GABALDÓN; NARANJO-ORTÍZ; MARCET-HOUBEN, 2016). As espécies de *Candida* são agrupadas em famílias segundo suas semelhanças genéticas e as principais espécies de importância médica estão distribuídas nas famílias Metschnikowiaceae e Saccharomycetacea (WOLFE; BUTLER, 2017).

Candida albicans, principal espécie do gênero *Candida* isolada em ambientes hospitalares (ALP et al., 2015; CAGGIANO et al., 2015; MCMANUS; COLEMAN, 2014), é uma levedura polimórfica, que pode e apresentar em diferentes formas no ambiente, condição que pode favorecer sua patogênese, uma vez linhagens bloqueadas na morfogênese provaram ser não virulentas (KUMAMOTO; VINCES, 2005; STANISZEWSKA et al., 2013; YANG et al., 2009). Independente da presença ou ausência de oxigênio e nutrientes, *Candida albicans* se baseia na obtenção de carbono e nitrogênio através da degradação de proteínas e carboidratos presentes no meio (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014; GLOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Candida spp. são encontradas, em geral, nos tratos gastrointestinal e geniturinário além da mucosa oral e pele humana, fazendo parte de sua microbiota (BUU; CHEN, 2014; KUMAMOTO; VINCES, 2005; KUMAR et al., 2015b). A relação entre este fungo e o

hospedeiro é estável, controlada tanto pelo sistema imunológico quanto por competição com outros microrganismos presentes na microbiota local permitindo, assim, que o fungo sobreviva de forma comensal (CALDERONE; ODDS; BOEKHOUT, 2009; DE STEENHUIJSEN PITERS; SANDERS; BOGAERT, 2015; GLOLO; SVIDZINSKI, 2010; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013).

Atualmente existem mais de 150 espécies do gênero *Candida*, mas apenas 15 espécies já foram isoladas como agentes infecciosos em micoses superficiais ou invasivas (KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015). *C. albicans*, que corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar (COLOMBO et al., 2013; SARDI et al., 2013b) foi a espécie mais comumente encontrada (65,3%) em estudo realizado entre 1997-2007 (PFALLER et al., 2010), no entanto, este panorama tem sido alterado pelo aumento da incidência de espécies não-*Candida albicans* como *Candida tropicalis*, complexo *C. parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* etc. (HORN et al., 2009; KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015; STORTI et al., 2012).

Estudo realizado anteriormente já havia identificado a alta prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, que chegaram a ser responsáveis por 35 a 65% das candidíases (COSTA et al., 2010c). Segundo trabalho conduzido por Horn et al. (2009) a incidência de candidemia causada por espécies não-*Candida albicans* foi de 54,4% contra 45,6% de incidência de candidemia causada por *C. albicans*. Espécies não-*Candida albicans* muitas vezes são refratárias às terapias antifúngicas convencionais (TAMURA et al., 2007) e tal refratariedade é um fato preocupante já que o fluconazol é amplamente empregado no tratamento de infecções fúngicas no Brasil, assim como em outros países (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER, 2012; SILVA et al., 2012).

Cinco espécies de *Candida* causadoras de infecções em humanos eram conhecidas, até 1963: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *Candida guilliermondii* (COLOMBO et al., 2003). Em estudo recente, além da *C. albicans*, as espécies não-*Candida albicans* mais implicadas em processos infecciosos foram: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. norvegensis* e *C. auris* (KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015; TODD, 2017).

C. auris, relatada pela primeira vez em 2009 (SATO et al., 2009), é uma espécie emergente capaz de causar desde fungemias até infecções profundas em indivíduos de alto risco, como pacientes severamente doentes, submetidos a procedimentos invasivos ou que

estejam submetidos à terapia com o uso de antibióticos de amplo espectro de ação. Infecções por *C. auris* são muito preocupantes, uma vez que isolados de tal espécie geralmente são altamente resistentes aos azólicos, e eventualmente, ainda podem apresentar resistência às equinocandinas e anfotericina B (CALVO et al., 2016; TODD, 2017). O maior surto de *C. auris* até o momento, foi descrito recentemente em Londres (UK), quando 22 pacientes adultos de clínica cardio-torácica, foram diagnosticados com infecções de corrente sanguínea, ferida cirúrgica e urinária, além de outros 28 pacientes colonizados pela levedura em questão (SCHELENZ et al., 2016).

C. africana é a espécie relacionada à *C. albicans* mais recentemente descrita (ODDS, 2010; ROMEO; TIETZ; CRISEO, 2013; TIETZ et al., 1995, 2001). Ela foi considerada inicialmente como uma linhagem de *C. albicans* atípica que produz pseudo-hifas e não consegue produzir clamidósporos (TIETZ et al., 1995). Até hoje, *C. africana* foi isolada da Angola, Camarões, Chile, Alemanha, Índia, Itália, Reino Unido, EUA, Nigéria, Arábia Saudita, Senegal, Espanha, Colômbia, Argentina, China e Irã (BORMAN et al., 2013; HAZIROLAN et al., 2017; ODDS, 2010). A maioria dessas cepas foi isolada de espécimes vulvovaginais, muitas vezes obtidos de mulheres jovens, mesmo que alguns isolados fossem originados de infecções sistêmicas (ROMEO; TIETZ; CRISEO, 2013). Seu papel na patologia humana ainda está sob investigação (BORMAN et al., 2013; HU et al., 2015). *C. africana*, que exibe padrões de susceptibilidade semelhantes à *C. albicans*, foram encontrados como suscetíveis ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, flucitosina, anfotericina B, micafungina, anidulafungina e caspofungina (ROMEO; CRISEO, 2011; ROMEO; TIETZ; CRISEO, 2013).

Aliado ao surgimento de leveduras emergentes, espécies já conhecidas tem sido submetidas à reclassificação taxonômica, especialmente devido à invalidação da antiga regra taxonômica “um fungo-dois nomes”, por ter gerado muitas confusões nas últimas décadas pela dificuldade de reconhecer os fungos por dois nomes diferentes (BRANDT; LOCKHART, 2012; HAWKSWORTH, 2012). Segundo tal regra, dois nomes poderiam descrever um mesmo microrganismo, como por exemplo, a identificação *C. kefyra* para o nome assexual e *Kluyveromyces marxianus* para o nome sexual de uma mesma espécie fúngica (BRANDT; LOCKHART, 2012). Em 2011, a prática citada foi abolida e uma nova regra foi publicada: “um fungo-um nome” (HAWKSWORTH, 2012).

C. dubliniensis é intimamente relacionada à *C. albicans* genética e fenotipicamente, enquanto *C. bracarensis* e *C. nivariensis* são geneticamente relacionadas à *C. glabrata*,

inclusive em relação à redução de sensibilidade por elevação de concentrações inibitórias mínimas de azóis (MIC) (BRANDT; LOCKHART, 2012; WARREN et al., 2010). *C. krusei*, que é bem conhecida por sua resistência inata ao fluconazol e reduzida sensibilidade a anfotericina B teve sua identificação fixada pelo nome sexual *Pichia kudriavzevii* por ser geneticamente mais relacionada à *Pichia (Candida) norvogensis* e *Candida inconspicua* (BRANDT; LOCKHART, 2012).

O novo gênero *Meyerozyma* passou a incluir *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondi*), o qual apresentou sensibilidade reduzida aos azólicos em um estudo em que a maioria dos isolados avaliados eram sensíveis (SAVINI et al., 2011), e *C. fermentati* (*Meyerozyma caribbica*). Algumas espécies são frequentemente reportadas por seus nomes sexuais: *Pichia (C. norvogensis)*, *Lindnera (C. utilis)*, *Clavispora (C. lusitaniae)*, *Debaryomyces (C. famata)*, *Kluyveromyces (C. kefir)*, *Trichomonascus (C. sciferrii)*, *Yarrowia (C. lipolytica)* etc (BRANDT; LOCKHART, 2012; GABALDÓN; NARANJO-ORTÍZ; MARCET-HOUBEN, 2016).

C. rugosa tem sido relatada como patógeno fúngico emergente e pode se apresentar também com os membros *C. pararugosa* e *C. pseudorugosa* que compreendem um complexo de organismos muito semelhantes. Achados como esses, ou a existência de *C. orthopilosis* e *C. metapsilosis* dentro do complexo *C. parapsilosis* tem levado à reavaliação da definição de espécie, que é geralmente determinada por relações filogenéticas com avaliação do nível de identidade de sequências (BRANDT; LOCKHART, 2012).

Candida spp. fazem parte da microbiota normal de aproximadamente 50% dos indivíduos e geralmente residem como organismo comensal, entretanto se o equilíbrio é rompido, comensais podem se tornar patogênicos (MORAGUES et al., 2003). 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). 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, uma vez que a capacidade de *Candida* spp. causar infecções também depende de suas características intrínsecas ou atributos de virulência (WHITE; AGABIAN, 1995).

2.2 Fatores associados à virulência de *Candida* spp.

Candida spp. contam com diversos fatores associados à virulência que garantem sua capacidade de colonizar e provocar infecções, tais como capacidade de se aderir às células do hospedeiro, promover alterações fenotípicas, convergir entre leveduras e pseudohifas, formar biofilmes, produzir substâncias tóxicas às células, como hemolisinas, resistir ao peróxido de hidrogênio e produzir e secretar enzimas hidrolíticas (LYON et al., 2011; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003a; WHITE; AGABIAN, 1995).

Enzimas hidrolíticas como proteases e fosfolipases desempenham importante função nutricional, mas, sobretudo, são importantes fatores de virulência, uma vez que estão associadas ao dano celular e à disseminação fúngica no organismo hospedeiro (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; NAILIS et al., 2010). Fosfolipases estão envolvidas com a aderência e penetração no hospedeiro, pois são responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídios constituintes da membrana celular, tendo assim alta atividade durante a invasão tecidual (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; MISHRA et al., 2007).

Estudos anteriores relataram que *Candida* spp. secretoras de enzimas como Sapp, hialuronidases, condroitinases e fosfolipases apresentaram maior capacidade de invadir tecidos do que as não secretoras, o que destacou a relevância dessas enzimas como fatores associados à virulência (ABU-ELTEEN; ELKARMI; HAMAD, 2001; SHIMIZU et al., 1996). Este fato foi confirmado por estudos posteriores que apontam que *C. albicans*, isoladas de casos de candidíase oral, são capazes de produzir enzimas hidrolíticas e adesinas, e que estas devido à suas propriedades adesivas poderiam se apresentar como um dos maiores fatores associados à virulência (NEUGNOT et al., 2002; NOUMI et al., 2010).

Estudos demonstram que leveduras que apresentam aumento na síntese e atividade de fosfolipases e proteases têm maior potencial patogênico, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (COSTA et al., 2010b; GLOLO; SVIDZINSKI, 2010). Segundo Costa et al. (2010a) a atividade de proteases e fosfolipases relaciona-se diretamente com a promoção e o estabelecimento de infecções, e, dentre elas, destacam-se as proteases aspárticas. As proteases aspárticas degradam diversas proteínas do hospedeiro, inclusive as do sistema imunológico como imunoglobulinas e proteínas do complemento e parecem estar envolvidas com a capacidade das células fúngicas colonizarem e penetrarem tecidos do

hospedeiro, além de estarem associadas a outros fatores de virulência, como a formação de hifas, capacidade de adesão e mudança fenotípica (MISHRA et al., 2007; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003a).

2.3 “Secreted aspartyl proteinase” (Sapp) de *Candida* spp.

A Sapp foi descrita pela primeira vez em 1965, quando foi denominada de protease ácida de *Candida* (Cap), por ter sido encontrada primeiramente em *Candida* spp. e possuir um perfil de atividade ótima em faixas de pH ácido (RAY; PAYNE, 1990; STAIB, 1965). As proteases podem contribuir para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro através da degradação de estruturas celulares ou por destruição de células e moléculas do sistema imune e, assim, evitar ou resistir ao ataque microbiano (HAMAL et al., 2004; HORNBACH et al., 2009; WHITE; AGABIAN, 1995).

As Sapp possuem ampla especificidade de substrato, pois podem 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 proteases bacterianas (HUBE; NAGLIK, 2001; RAY; PAYNE, 1990; SANGLARD et al., 1997). Basicamente essas enzimas efetuam a digestão das proteínas disponíveis, com o objetivo de fornecer fontes de nitrogênio para promover a sobrevivência das células fúngicas. Em um primeiro momento, elas parecem ter a função de aquisição de nutrientes (HUBE; NAGLIK, 2001; SANGLARD et al., 1997), entretanto, as Sapp podem desenvolver outras funções mais direcionadas à virulência, pois elas acabam por degradar proteínas estruturais e do sistema imunológico (HUBE; NAGLIK, 2001; STAIB, 1965; WHITE; AGABIAN, 1995). Todas as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, no entanto, o que as diferencia é a especificidade e o mecanismo de ação (BARRETT; RAWLINGS, 1991).

Em *C. albicans* a produção de Sapp é codificada por uma família de 10 genes *SAP* que são agrupados em seis subgrupos ou subfamílias de genes: *SAP1-3*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8*, *SAP9* e *SAP10* (MONOD et al., 1994). A transcrição destes genes gera isoenzimas, denominadas desta forma devido à existência de semelhanças estruturais e conformacionais entre elas (BORELLI et al., 2008; FELK et al., 2002; MONOD et al., 1994).

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; CHALLACOMBE; HUBE, 2003b). 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; PARRA-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 proteases aspárticas se mantêm conservados (HUBE; NAGLIK, 2001).

As Sapp ativadas são empacotadas dentro de vesículas secretoras e transportadas para a membrana celular, onde podem se ligar ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteína ancoradora da membrana ou da parede celular, como Sap9p e Sap10p; ou ser liberada para o espaço extracelular como no caso das outras isoenzimas (ALBRECHT et al., 2006; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003b). As Sapp têm uma estrutura semelhante às yapsinas, uma família de cinco proteases não secretoras e ancoradas por GPI (*YPS1-3*, *YPS6* e *YPS7*) de *Sacharomyces cerevisiae* envolvidas na integridade da parede celular e interações célula-célula (ALBRECHT et al., 2006; MONOD et al., 1998).

Todos os membros da família de proteínas Sapp possuem quatro resíduos de cisteína e dois resíduos de aspartato conservados. A comparação entre as sequências de aminoácidos revelou que Sap9p e Sap10p diferem das outras isoenzimas Sap1-Sap8p, 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 (ALBRECHT et al., 2006; EISENHABER et al., 2004; MONOD et al., 1998). Sap1-Sap3p possuem identidade de sequências de até 67%, enquanto Sap4-Sap6p de até 89%. Sap1-Sap3p e Sap4-Sap6p estão intimamente agrupadas. Sap7p tem apenas 20-27% de identidade em relação a outras proteases e está externamente posicionada. Sap8p está relacionada aos grupos formados por Sap1-Sap3p e Sap4-Sap6p. Sap9p e Sap10p, que apresentam as maiores diferenças no arranjo proteico do qual são formadas, tem a menor identidade de sequência com as outras isoenzimas (Sap1-8p) e por isso constituem um grupo distinto (FIGURA 1) (ALBRECHT et al., 2006; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003b; PARRA-ORTEGA et al., 2009).

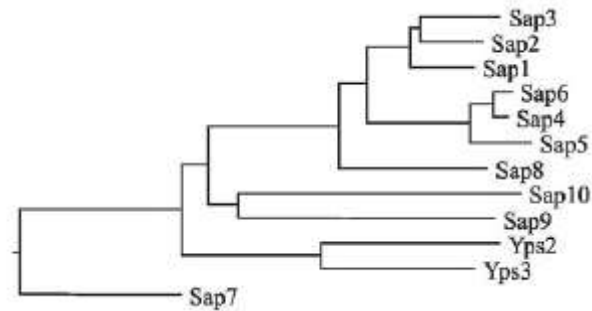


Figura 1 - Dendrograma mostrando a relação da família de isoenzimas Sapp de *Candida albicans* e as duas yapsinas de *Saccharomyces cerevisiae* que mostraram elevada similaridade com Sap9p e Sap10p.

Fonte: ALBRECHT et al. (2006).

No genoma de *C. tropicalis*, o qual tem seqüências depositadas nas bases de dados de *Candida* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_group/MultiHome.html) e GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), existe uma subfamília de quatro genes, *SAPT1-SAPT4*, sendo *SAPT4* um possível ortólogo de *SAP1* devido à similaridade de 71,8%. No genoma do complexo *C. parapsilosis* os genes *SAPP1-SAPP3* são codificadores da subfamília Sap1-Sap3p (PARRA-ORTEGA et al., 2009; ZAUGG et al., 2001). Oito genes codificadores de Sapp foram encontrados no genoma de *C. dubliniensis* *SAPCD1-SAPCD4* e *SAPCD7-SAPCD10*, embora estudos *in vitro* não tenham identificado a produção das proteases correspondentes (PARRA-ORTEGA et al., 2009; PICHOVÁ et al., 2001; ZAUGG et al., 2001).

Parra-Ortega et al. (2009) propuseram uma árvore filogenética com um total de 12 famílias Sapp de seis espécies patogênicas e oportunistas de *Candida*, contendo proteínas com pelo menos 50% de similaridade em seqüências de aminoácidos e arranjos proteicos. *C. albicans* e *C. dubliniensis* tem genes ortólogos com alta similaridade (> 90%), que foram agrupados juntos (*SAP1-4-SAP7-10*) e distribuídos em seis famílias, enquanto *SAP5-6* foram exclusivos para *C. albicans*, conforme representado na Tabela 1 (PARRA-ORTEGA et al., 2009).

Genes *SAP* não foram encontrados no genoma de *C. krusei* e *C. kefyr* (PARRA-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 a sua estreita relação filogenética com *S. cerevisiae*, ela possui pelo menos 11 genes *YAP*, alguns dos quais são expressos quando ela é internalizada em macrófagos (KAUR; MA; CORMACK, 2007; PARRA-ORTEGA et al., 2009).

Tabela 1 - Distribuição das famílias de genes *SAP* em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*.

Família	Espécie	Genes
Família 1	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>	<i>SAP1-3</i>
	<i>C. tropicalis</i>	<i>SAP4</i>
Família 2	<i>C. albicans</i>	<i>SAP4-6</i>
	<i>C. dubliniensis</i>	<i>SAP4</i>
Família 3	<i>C. parapsilosis</i>	<i>SAPP1-3</i>
Família 4	<i>C. tropicalis</i>	<i>SAPT1</i>
	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>	<i>SAP8</i>
Família 5	<i>C. tropicalis</i>	<i>SAPT2</i>
Família 6	<i>C. guilliermondii</i>	<i>SAPGU</i>
	<i>C. lusitaniae</i>	<i>SAPLU</i>
Família 7	<i>C. tropicalis</i>	<i>SAPT3</i>
Família 8 e 9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>SAPP</i>
Família 10	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	<i>SAP7</i>
Família 11	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	<i>SAP10</i>
Família 12	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitaniae</i>	<i>SAP9</i>

Fonte: Adaptado de (PARRA-ORTEGA et al., 2009).

Acredita-se na existência de correlação entre a expansão dos genes *SAP* e a transição de microrganismos entre comensais e patogênicos. Espécies de *Candida* não patogênicas geralmente possuem menos genes codificadores de *Sapp* do que espécies patogênicas oportunistas e este fato pode ser confirmado pelo sequenciamento dessas linhagens, entretanto, isto não é regra, uma vez que existem

espécies tais como *C. glabrata* ou *C. krusei* que não possuem genes *SAP*, mas são produtoras de proteases semelhantes codificadas pelos genes *YPS* (PARRA-ORTEGA et al., 2009; SIKORA et al., 2011).

Os genes *SAP* estão envolvidos diferentemente no desenvolvimento e manutenção de infecções. Genes *SAP1-SAP3* parecem ser essenciais em infecções mucosas, enquanto *SAP4-SAP6* em infecções sistêmicas (DE BERNARDIS et al., 1999; LIAN; LIU, 2007; SANGULARD et al., 1997). Acredita-se que *SAP2* tenha um papel funcional na invasão e

espalhamento de infecções sistêmicas (DE BERNARDIS et al., 1999; NAGLIK et al., 2004). Um modelo de vaginite demonstrou ativação inicial de *SAP5* seguida de ativação posterior e tardia de *SAP4* em um número menor de células do que aquelas ativadas para expressão de *SAP5* (TAYLOR et al., 2005). Diferente das outras isoenzimas do grupo, a Sap6p codificada por *SAP6* pode ter função inovadora na agregação célula-célula pela presença de resíduos específicos ligados à integrina (KUMAR et al., 2015b). *SAP7* pode atuar durante a adaptação inicial de *C. albicans* ao trato intestinal e sua expressão pode ser regulada pelos reguladores da morfogênese durante a colonização do epitélio (STANISZEWSKA et al., 2015). *SAP8* é geralmente expressa de forma transitória e preferencialmente em fases tardias de infecção (RIPEAU et al., 2002; SCHALLER et al., 1998). As proteases codificadas por *SAP9* e *SAP10* são cruciais para o processo invasivo, pois parecem ter funções na integridade celular, adesão e separação da célula após brotamento (ALBRECHT et al., 2006).

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, bem como as condições ambientais de predisposição a infecções (HUBE; NAGLIK, 2001). A descoberta de que a família de genes *SAP* é diferencialmente expressa em uma variedade de condições ambientais *in vitro* (HUBE; NAGLIK, 2001; 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. habitarem um diverso número de nichos no hospedeiro estimulou estudos subsequentes de investigação da expressão dos genes *SAP* (NAGLIK et al., 2008).

Em um hospedeiro infectado é possível encontrar *Candida* spp. na forma leveduriforme ou filamentosa (hifa e pseudo-hifa). 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 (FELK et al., 2002; PHAN; BELANGER; FILLER, 2000). A diferenciação entre hifa verdadeira e pseudo-hifa pode ser feita pela observação da formação do tubo germinativo. Não há a constrição entre a célula-mãe e o filamento na formação da hifa verdadeira, enquanto em pseudo-hifas forma-se a constrição no septo entre a célula-mãe e o comprimento do filamento (BARBEDO; SGARBI, 2010; WHITEWAY; BACHEWICH, 2007).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que *SAP1-SAP3* são expressos pela fase leveduriforme, enquanto a expressão dos genes *SAP4-SAP6* está associada à formação de hifas (FIGURA 2) (FELK et al., 2002; HUBE et al., 1994, 1998; SCHALLER et al., 1999). A

expressão desses genes e o desenvolvimento de hifas não estão estritamente ligados, mas regulados pelos mesmos fatores (FELK et al., 2002).

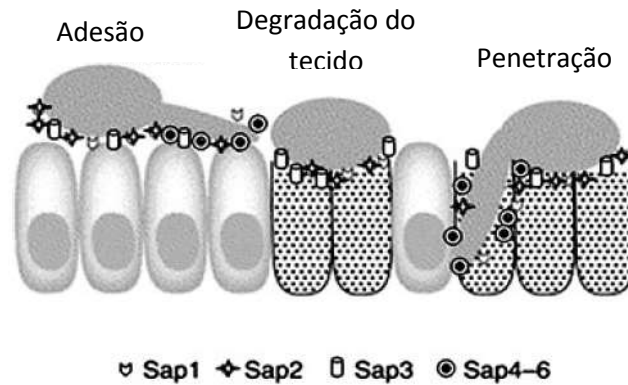


Figura 2 - Expressão de diferentes subclasses de Sapp por *C. albicans* durante o processo infeccioso.

Fonte: Adaptado de MUNRO, HUBE (2002).

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

O estudo das condições nas quais as Sapp são estimuladas ou inibidas *in vivo* e seus possíveis mecanismos de atuação e inibição nessas condições é extremamente necessário para que 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; COLACITE; ABEGG, 2009).

Segundo Parra-Ortega et al. (2009), o padrão de expressão dos genes *SAP* pode ser modificado de acordo com as condições de exposição e, geralmente, condições de estresse fisiológico podem promover aumento da secreção de Sapp. White, Agabian (1995) foram um dos primeiros a sugerir que o tipo celular pode ser um dos fatores capazes de controlar o

padrão de expressão das isoenzimas Sapp. A expressão dos genes é variável e pode ser influenciada por condições ambientais *in vivo* e experimentais *in vitro* (NAGLIK et al., 2003).

A secreção de Sapp 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 “white/opaque” (HUBE et al., 1997; KHAN et al., 2010b). Em pesquisa realizada por Hube et al. (1997), mutações em *SAP1-SAP3* resultaram em diminuição da virulência em camundongos modelo de infecção disseminada. *SAP4-SAP6* são necessários para sobrevivência e escape de macrófagos, uma vez que o mutante triplo *SAP4-SAP6* é eliminado mais eficientemente após fagocitose (BORG-VON ZEPPELIN et al., 1998). *SAP6* parece contribuir principalmente para o dano tecidual do fígado e outros órgãos parenquimais (FELK et al., 2002). Outras pesquisas têm indicado expressão aumentada de genes *SAP*, especialmente *SAP5*, *SAP6* e *SAP9*, em células sésseis comparados às células planctônicas (GREEN, 2004; NAGLIK et al., 2008).

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, nas quais *SAP2* e *SAP4-SAP6* foram os principais genes expressos. No estudo citado, a expressão de *SAP1* e *SAP3* foi encontrada especialmente em mulheres com quadros de candidíase vulvovaginal, enquanto *SAP7* foi encontrada principalmente em portadoras assintomáticas (LIAN; LIU, 2007). Através da técnica de RT-PCR, a expressão de *SAP1-SAP3* e *SAP6* e ausência de expressão de *SAP4* e *SAP5* foram resultados obtidos a partir do estudo de um modelo de infecção vaginal baseado em epitélio humano reconstituído (RHE), estudo este que permitiu que os pesquisadores sugerissem que os genes *SAP1-SAP3* devam ser necessários para manter os níveis de dano tecidual neste modelo (SCHALLER et al., 1998).

O papel das Sapp 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, Morschauser (2008) sugeriram que Sap1-Sap6p 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.

Vários estudos apontam uma expressão diferencial dos genes *SAP* e papéis específicos durante colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro (KORTING et al., 2003; NAGLIK et al., 2008; SCHALLER et al., 1999, 2003), 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 *Candida* spp.

Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a detecção e identificação de proteínas codificadas por famílias multigênicas, como a família de isoenzimas Sapp, e, dentre esses métodos a técnica de RT-PCR vem sendo descrita em vários estudos, (FELK et al., 2002; KORTING et al., 2003; MONROY-PÉREZ et al., 2013; NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014, 2015). A maioria desses estudos avaliou, em condições laboratoriais *in vitro* e/ou experimentais *in vivo*, a expressão gênica de *SAP* e outros genes codificadores de proteases importantes como as adesinas, as quais também são descritas como fatores associados à virulência fúngica.

2.4 Antifúngicos e Secreção de Sapp

O tratamento antifúngico objetiva reduzir a patogênese e o crescimento do patógeno a fim de eliminar a infecção (HAZEN et al., 2000; KONTOYIANNIS et al., 2001). Novos agentes antifúngicos foram patenteados, após ausência de concessão de patentes entre 1990 e 1999: Voriconazol (2000), posaconazol (2005) e ravuconazol (2007) são do grupo dos azóis e caspofungina (2002), anidulafungina (2004) e micafungina (2006) são 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 e a anfotericina B, isolada em 1955 a partir de uma linhagem de *Streptomyces nodosus* é um importante representante deste grupo (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009). O mecanismo de ação da anfotericina B ainda não foi totalmente esclarecido, entretanto, um modelo amplamente aceito é que várias moléculas do antifúngico ligam-se ao

ergosterol, formando canais iônicos na membrana celular que levam à perda do potencial transmembrana, o que causa alterações na permeabilidade da membrana com vazamento de íons, principalmente de potássio e afeta a viabilidade das células fúngicas (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009; VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

Entre os antifúngicos poliênicos, formulações de anfotericina B (convencional, lipossomal e complexo lipídeo) são mais comumente usadas (ARAÚJO, R.; ESPINEL-INGROFF, 2010). Embora seja extremamente raro, algumas linhagens de *Candida* spp. têm apresentado resistência a anfotericina B. O que pode estar ligado a mutações nos genes *ERG2*, *ERG3* e *ERG11* que sintetizam enzimas necessárias para síntese do ergosterol (MEADOWS, 2013; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

Outra classe de antifúngicos muito utilizados no tratamento de candidíases compreende os fármacos azólicos. O fluconazol é um antifúngico triazólico, descoberto na década de 1980, seguro e eficaz no tratamento de candidíase disseminada (MINNEBRUGGEN et al., 2010; SPELLBERG; FILLER; EDWARDS, 2006). Os azóis agem por bloqueio da via de biossíntese de ergosterol, especificamente as enzimas lanosterol 14- α - demetilase em leveduras ou esterol 14- α - demetilase em fungos filamentosos (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; PFALLER, 2012). Estas enzimas do citocromo são codificadas pelos genes *ERG11* e *CYP51*, respectivamente, em leveduras e fungos filamentosos (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009).

O fluconazol é comumente usado para tratar a candidíase em lactentes por ser considerado seguro e é ativo contra as espécies mais frequentemente isoladas de *Candida* spp. (HAJJEH et al., 2004). A maioria das espécies não-*C. albicans* do gênero *Candida* spp. são sensíveis ao fluconazol. Entretanto, linhagens de *C. krusei* tem apresentado resistência ao fluconazol, em grande parte devido ao resultado de uma diminuição da sensibilidade de 14 α -demetilase aos efeitos inibitórios do fluconazol (OROZCO et al., 1998; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). Muitos isolados de *C. glabrata* também são resistentes ao triazol, no entanto, o mecanismo de resistência para essa espécie é muitas vezes o efluxo da droga (BENNETT; IZUMIKAWA; MARR, 2004; PARKINSON; FALCONER; HITCHCOCK, 1995).

A resistência ao fluconazol por *C. albicans* é um processo multifatorial mediado por vários mecanismos, tais como alterações na enzima-alvo, citocromo P-450 lanosterol 14 α -desmetilase (Erg11p), ou como resultado de mutações pontuais do gene (*ERG11*) que codifica a enzima citada (PEREA et al., 2001). Outro fator importante que tem diminuído a eficiência

do fluconazol e aumentado o número de linhagens resistentes aos antifúngicos, em geral, é a formação de biofilmes de *Candida* spp. (LEWIS et al., 2012; SARDI et al., 2013b), que podem dificultar a difusão do antifúngico até as camadas de células mais basais que acabam por receber menores concentrações de antifúngicos, podendo favorecer a seleção de isolados resistentes (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SAMARANAYAKE et al., 2005).

As equinocandinas representam uma classe única de agentes antifúngicos que agem pelo bloqueio da atividade da 1,3- β -D-glucana sintase (GS), uma importante enzima para a formação do componente da parede celular 1,3- β -D-glucana. Caspofungina foi o primeiro agente a ser liberado para o tratamento de candidemia em pacientes neutropênicos e não neutropênicos (BENNETT, 2006; PAPPAS; IERODIAKONOU; FALAGAS, 2009). Flucitosina é um análogo da base pirimidina que age por inibição da síntese de DNA e RNA, mas raramente é utilizada para o tratamento sistêmico de infecções fúngicas (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). A terbinafina pertence à classe de alilaminas e inibe a atividade da enzima esqualeno epoxidase, que participa na síntese do ergosterol. Tal como flucitosina, terbinafina é normalmente administrada em combinação com outros agentes antifúngicos no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos (SANGLARD et al., 1997).

Na década de 90, os regimes convencionais de tratamento 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, um triazólico de segunda geração com espectro de ação mais amplo do que os azólicos anteriores, se tornou parte do grupo (GEORGOPAPADAKOU, 2002; WHITE et al., 1997). Anfotericina B foi droga de primeira escolha no tratamento de candidíase sistêmica em neonatos por um bom tempo (PAPPAS et al., 2004), entretanto, apesar de mais efetiva, a anfotericina B, que é nefrotóxica, tinha seu uso inviabilizado em pacientes com doenças renais crônicas, o que forçava a escolha de outros agentes como opções para o tratamento antifúngico (PAPPAS et al., 2009).

O tratamento de escolha para candidemias em hospitais públicos no Brasil é o fluconazol (STORTI et al., 2012). Fluconazol tem atividade contra dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp., exceto *C. krusei* que possui resistência primária e *C. glabrata* que possui menor sensibilidade, principalmente em pacientes com exposição prévia a esse antifúngico. Fluconazol possui ação tanto em candidíase superficial quanto em

candidíase sistêmica. Em casos de *C. krusei* e *C. glabrata* os azólicos usados são o voriconazol e posaconazol (COLOMBO et al., 2013).

Segundo observado em estudos clínicos, a caspofungina é eficaz no tratamento de pacientes pediátricos e indivíduos imunocomprometidos, por apresentar atividade antifúngica com toxicidade comparada a outros fármacos tais como azóis e anfotericina B (WIEDERHOLD; HERRERA, 2012). As recomendações para o gerenciamento da candidíase foram revisadas e a caspofungina passou a ser indicada para o tratamento de infecções por *Candida* spp., na maioria das situações, especialmente no caso de linhagens resistente aos azóis, entretanto, uma vez que apresenta alto custo, a Caspofungina não é usada como fármaco de primeira escolha (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2016). Assim como o Voriconazol, ela é comumente reservada para o tratamento de infecções graves ou não responsivas a outros antifúngicos (KLASTERSKY, 2004).

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 (PAPPAS et al., 2009, 2016). 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 (PAPPAS et al., 2016; PFALLER, 2012). A seleção dos antifúngicos leva em consideração especialmente a susceptibilidade do agente causal provável ou definido, a existência de apresentações para uso endovenoso e oral, interações medicamentosas e o custo do tratamento (RAPP, 2004).

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 a exposição a diferentes fatores que podem provocar o aparecimento de mutações, como a exposição à radiação ultravioleta, por exemplo) (PFALLER, 2012; PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

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; SCHMIDT-WESTHAUSEN; MORSCHHÄUSER, 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 Sapp (HAZEN et al., 2000; JARVIS, 1995; NAVARATHNA et al., 2005). A redução de sensibilidade aos derivados azólicos é mais comum entre as espécies não-*C. albicans* (HAJJEH et al., 2004). A resistência aos antifúngicos também pode estar associada aos tratamentos profiláticos que, geralmente, são recomendados para utilização em indivíduos imunocomprometidos, que apresentam alto risco para o desenvolvimento de candidíase invasiva (PFALLER, 2012; VAZQUEZ et al., 1998).

A frequência de infecções fúngicas invasivas e a resistência à terapia antifúngica têm aumentado apesar da introdução de novos agentes antifúngicos, o que dificulta o tratamento de pacientes com micoses agudas ou crônicas (COWEN et al., 2015). O uso excessivo de antifúngicos, especialmente fluconazol, como tratamento profilático em indivíduos suscetíveis como pacientes transplantados ou internados em unidades de terapia intensiva, promove a exposição de *Candida* spp. por longos períodos a baixas concentrações do antifúngico por via sistêmica, o que pode levar à seleção de isolados que se adaptaram por possuírem mecanismos de resistência ao fármaco (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; VAZQUEZ et al., 1993). Outros estudos também observaram aumento da incidência de infecções causadas por *Candida* spp. como resultado do uso profilático com azóis como o fluconazol (VAZQUEZ et al., 1998; WINGARD et al., 1991, 1993).

Candida spp., quando expostas a concentrações subinibitórias de antifúngicos são capazes de promover o potencial patogênico através do estímulo de seus fatores de virulência (FEKETE-FORGÁCS; GYÜRE; LENKEY, 2000; MORES et al., 2011) e aumentar a produção e secreção de enzimas hidrolíticas para melhorar a aderência ao tecido e garantir sua sobrevivência (HAZEN et al., 2000; NAVARATHNA et al., 2005). Assim, a reação do patógeno ao estímulo pode resultar no aumento da destruição dos tecidos e o risco de morte em modelos animais (BORG-VON ZEPPELIN et al., 2002; NAVARATHNA et al., 2005).

A influência de azóis, anfotericina B, caspofungina e 5-flucitosina sobre a expressão de *SAP* em isolados de *C. albicans* foi avaliada por estudo conduzido em 2005, que descreveu um aumento de expressão de *SAP2* na maioria dos isolados (COPPING, 2005). A influência de fluconazol sobre a atividade de Sapp de *Candida* spp. foi avaliada em um estudo, que encontrou aumento de atividade das proteases nos isolados avaliados, especialmente naqueles resistentes aos azóis (COSTA et al., 2010a). Outro estudo a respeito da influência de agentes

antifúngicos revelou atividade de Sapp aumentada em isolados de *Candida* spp. resistentes a anfotericina B (KUMAR; SHUKLA, 2010). Segundo um estudo publicado em 2011, isolados de *Candida* spp. resistentes aos azóis apresentam atividade mais alta de Sapp do que isolados suscetíveis (SENEVIRATNE et al., 2011).

Vários estudos, como os citados acima, apontam alterações no padrão de secreção e atividade de Sapp na presença de agentes antifúngicos, no entanto, alguns desses estudos não encontraram resultados expressivos. Segundo Wu et al. (2000) tais discrepâncias podem ser relacionadas a diferenças na sensibilidade das metodologias usadas para avaliar a atividade proteolítica de Sapp. As diferenças na atividade de Sapp exibida por isolados susceptíveis aos azóis quando expostos a essas drogas permite sugerir que existam outros fatores desconhecidos que interferem nessa resposta (COSTA et al., 2010a).

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 aumento do número de isolados resistentes a esses fármacos (WU et al., 2000). Estudo publicado em 2016 aponta resultados promissores de atividade inibitória do extrato de *Lawsonia inermis* de forma dose dependente contra proteases e fosfolipases, com percentual de inibição de 27-33% e 44,5%, respectivamente (RAVICHANDRAN; MUTHURAMAN, 2016). Fatores de virulência, como a secreção de Sapp, estão atraindo atenção como alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos, pois estudos tem demonstrado que a inibição de proteases através do uso de inibidores pode ser um alvo terapêutico promissor no desenvolvimento de novos fármacos (CURVELO et al., 2014; DIAS et al., 2013; SANTOS; BRAGA-SILVA, 2013).

2.5 Inibidores de proteases, proteases do vírus HIV-1 e Sapp

Desde o aparecimento da AIDS, descobriu-se muito sobre o ciclo de replicação e a diversidade dos agentes etiológicos da doença (HIV-1 e HIV-2). Os medicamentos antirretrovirais (ARVs), sofisticados e caros, surgiram com o poder de inibir a replicação viral, favorecer a recuperação do sistema imunológico das pessoas infectadas e resultar na redução da ocorrência de infecções oportunistas, como as infecções causadas por *Candida* spp., entre outras morbidades (FAUCI, 2006).

O tratamento utilizado em pacientes com AIDS, chamado HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), utiliza inibidores de transcriptase reversa, nucleosídicos ou não, e um ou mais inibidores de protease. Este tratamento promete reduzir a carga viral no plasma para níveis indetectáveis, fornecendo benefícios clínicos duradouros, entretanto, nem todos os pacientes respondem bem ao tratamento (CARIDE et al., 2001).

Inibidores de protease são enzimas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (LINGARAJU; GOWDA, 2008). Qualquer composto que diminua a razão de hidrólise de um dado substrato é, em princípio, um inibidor enzimático. Proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases, podem ser denominadas de inibidores de proteases e encontrar-se em plantas, microrganismos e animais (NEURATH, 1984, 1990).

Os inibidores de proteases ligam-se ao sítio ativo da enzima, impedindo que poliproteínas precursoras sejam clivadas originando as proteínas virais maduras. Esses inibidores existem em diferentes formas e são frequentemente agrupados com base em seus mecanismos de reação, origem ou similaridades estruturais. Quanto à especificidade, três grupos podem ser reconhecidos: aqueles que reagem com mais de uma classe de proteases, aqueles que são específicos para uma das classes e os inibidores que apresentam alta especificidade para uma única protease (PERONA; CRAIK, 2008).

De acordo com o modo de ação, os inibidores podem ser enquadrados em dois grupos: inibidores sítio-específicos, que modificam irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo, e aqueles que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como pseudosubstratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais imitam o substrato, competindo com o mesmo na ligação com o sítio ativo das proteases (TRAVIS; SALVESEN, 1983).

Em geral, a inibição da atividade catalítica das principais proteases é alcançada pela interação entre o inibidor e o sítio catalítico enzimático, fato que os caracteriza como competitivos. A maioria das moléculas conhecidas divide-se em quatro classes de acordo com sua especificidade: inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloprotease (MACEDO et al., 2007). Os inibidores conhecidos estão descritos na tabela 2.

Baseado em sua sequência de aminoácidos, inibição por pepstatina e estrutura cristalina, a protease do HIV-1 foi classificada como uma protease aspártica. Devido ao seu envolvimento no ciclo de replicação viral, com funções na maturação e formação de partículas infecciosas, a inibição completa da protease levaria à formação de partículas virais imaturas e, portanto, não infecciosas (ROBERTS et al., 1990).

Tabela 2 - 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	MARKWARDT et al., 1973; WALSMANN; RICHTER; MARKWARDT, 1972
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	GRAY; TSAI, 1994; HEWLETT, 1990
Bestatina-HCl	344,8	(R) Metalopeptidases.	MetOH 5 mg/mL; 1 - 150 mM	UMEZAWA et al., 1976a, 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, 1976; BENISTANT et al., 1994
Pepstatina A	685,9	(R) Proteases aspárticas; Modificação química do sítio ativo.	MetOH (1 mg/mL), DMSO; 1 - 10 µM	LAMMERS; JAMIESON, 1988; UMEZAWA, 1976
PMSF	174,2	(R) Serino proteases; Promove sulfonilação do resíduo de serina.	Isopropanol, EtOH, MetOH (100 – 200 mM); 0.1 - 1 mM	JAMES, 1978; PROUTY; GOLDBERG, 1972

Dez inibidores de protease de HIV aprovados pelo FDA (*Food and Drug administration*) estão comercialmente disponíveis: amprenavir (Agenerase), saquinavir (Invirase), ritonavir (Norvir), Lopinavir/ritonavir (Kaletra), indinavir (Crixivan), nelfinavir (Viracept), atazanavir (Reyataz), tipranavir (Aptivus), fosamprenavir (Lexiva) e darunavir (Prezista) (GÜNTARD et al., 2016), entretanto, esta é situação atual, décadas atrás o cenário era muito diferente, uma vez que não havia tantas opções para o combate ao vírus HIV.

O primeiro inibidor de proteases do vírus HIV-1 descoberto foi a pepstatina, um inibidor de pepsina, que também é uma protease aspártica (ROBERTS et al., 1990). Em seguida, o FDA aprovou a zidovudina (AZT) em 1987 e a Didanosina (DDI) em 1989. Em

1995, com a aprovação de uma segunda classe de antirretrovirais, um importante inibidor de protease denominado saquinavir (SQV) mudou o cenário de tratamento de pacientes com AIDS. A partir de então, se iniciou a era da TARV (Terapia antirretroviral) altamente eficaz, que possibilitou a redução de incidência de doenças oportunistas e, conseqüentemente de mortes por decorrência da AIDS (COOPER; MERIGAN, 1996).

As aspártico proteases, grupo ao qual pertencem as Sapp de *Candida* spp., são inativadas por compostos diazoacetil, assim como por pepstatina (BISHOP et al., 1981). As Sapp possuem estrutura tridimensional semelhante a de outras proteases aspárticas, e por esta razão, a Pepstatina A, inibidor da classe das proteases aspárticas, têm alta afinidade por elas. A Pepstatina A é um inibidor não específico, pois é capaz de promover inibição de todas as isoenzimas Sapp, em maior ou menor grau, de acordo com a constante de inibição das mesmas (BORELLI et al., 2008; DAVIES, 1990; DOSTÁL et al., 2009; TANG; WONG, 1987).

As isoenzimas Sapp são proteases aspárticas, e conseqüentemente, possuem o mecanismo catalítico, arquitetura do sítio ativo e estrutura química semelhante às proteases do HIV-1, o que sugere que os inibidores de protease usados no tratamento e prevenção da AIDS possam interagir com as proteases de *Candida* spp. Acredita-se que os inibidores sejam capazes de agir sobre as Sapp promovendo a redução da adesão às células epiteliais e atenuação das infecções mucosas, que envolvem Sap1-Sap3p (BACKMAN; MONOD; DANIELSON, 2006; BORG-VON ZEPELIN et al., 1999). No entanto, os inibidores de protease parecem não produzir efeito na prevenção de infecções sistêmicas geralmente desenvolvidas na presença de Sap4-Sap6p, sugerindo que não exista interação dos inibidores com as proteases em questão (KORTING et al., 1999).

Estudos mostraram que pacientes tratados com inibidores de protease anti-HIV-1 tem redução na frequência de candidíase orofaríngeal devido à inibição das proteases de *Candida* spp., mesmo persistindo a depressão do sistema imunológico. Backman, Monod, Danielson (2006) avaliaram a afinidade de inibidores das proteases HIV-1 pelas proteases aspárticas de *Candida* spp. e seus resultados mostraram que os antivirais Saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir e nelfinavir apresentaram afinidade média pelas proteases, que pode ter relação com uma menor taxa de associação ao alvo, no entanto, o fármaco antiviral ritonavir, da classe dos inibidores de protease, apresentou afinidade um pouco mais elevada por Sap1p e Sap2p, assim como os compostos derivados dele.

Estudos conduzidos por Korting et al. (1999) mostraram redução significativa de atividade de protease de *C. albicans* por antirretrovirais de uma maneira dose-dependente após exposição à proteases do vírus HIV. Ainda segundo esses autores, os efeitos inibidores de Saquinavir foram semelhantes aos promovidos por pepstatina A e indicam a utilidade deste inibidor de proteases do vírus HIV como potencial agente no combate à candidíase. Em respostas a testes promissores *in vitro*, Borg-von Zepelin et al. (1999) usaram inibidores de proteases do vírus HIV em ensaios de aderência de células de *Candida* spp. a células epiteliais e observaram inibição de aderência por parte do Saquinavir, enquanto Indinavir não apresentou efeito algum.

A fim de tentar compreender os processos metabólicos que levam à ativação, modulação ou inibição de mecanismos associados à virulência de *Candida* spp. especialmente em pacientes imunodeprimidos, como aqueles submetidos ao tratamento contra o vírus HIV-1, estudos de investigação a respeito da influência de substâncias ativas como agentes antifúngicos e inibidores de proteases podem ser feitos por quantificação relativa de genes *SAP* e possibilitar a discussão de hipóteses a partir de observações indiretamente relacionadas à prática clínica.

2.6 Métodos de avaliação da influência de substâncias ativas

A quantificação relativa de genes *SAP* permite identificar se a exposição a substâncias ativas pode influenciar a regulação da síntese e reposição das proteases Sap, as quais tem papel importante como fator associado à virulência de *Candida* spp., entretanto, outros ensaios devem ser conduzidos se o objetivo é identificar de que forma se dá essa influência. Diferentes métodos podem ser adotados para realizar tal investigação, sendo a avaliação por Citometria de fluxo e a quantificação do teor de ergosterol de membrana dois métodos muito úteis para auxiliar na compreensão da forma como as substâncias podem influenciar a expressão de *SAP* e o desenvolvimento de *Candida* spp.

2.6.1 *Citometria de fluxo*

A Citometria de Fluxo tem-se revelado uma técnica com importantes aplicações nas áreas da Biologia e Medicina por permitir a contagem, análise e classificação de células suspensas num fluido. Essa técnica realiza, simultaneamente, uma análise multiparamétrica de características físicas e químicas célula a célula, através de aparelhos de detecção ópticos e/ou eletrônicos (BERGQUIST et al., 2009).

Na Microbiologia, a citometria de fluxo já havia mostrado várias potencialidades, e com recurso a marcadores fluorescentes, é considerada uma excelente ferramenta para avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos por ser uma técnica simples e de rápida execução, que fornece resultados muito reprodutíveis e de fácil interpretação, num tempo máximo de duas horas e que permite ainda inferir sobre o mecanismo de ação/resistência a fármacos e substâncias bioativas (PINA-VAZ; RODRIGUES, 2010; PINA-VAZ et al., 2001; RAMANI; RAMANI; WONG, 1997; RUDENSKY et al., 2005).

A citometria pode identificar células metabolicamente ativas e capazes de se replicar, assim como células que mostram atividade metabólica com membranas intactas, sem a capacidade de se replicar. A capacidade para distinguir diferentes estados fisiológicos é especialmente importante na avaliação da sobrevivência de microrganismos patogênicos (CZECHOWSKA; JOHNSON; VAN DER MEER, 2008). A técnica também constitui uma ferramenta de elevada sensibilidade e especificidade para detecção de efeitos sinérgico e antagonista, e por isso tem sido usada como um método para avaliação do efeito de associações entre antifúngicos, representando um importante avanço relativamente à metodologia clássica (PINA-VAZ; RODRIGUES, 2010; PINA-VAZ et al., 2001).

Genericamente o processo baseia-se na passagem de um grande número de partículas (cerca de 50.000), uma a uma, através de uma fonte de excitação (sensor iluminado) e medição da magnitude do impulso gerado pelo desvio dessa luz, utilizando filtros e detectores apropriados. Quando uma célula é interceptada pelo feixe laser, a luz transmitida (formada por dois componentes, a luz dispersa e a luz fluorescente) é recolhida por lentes ou espelhos que a transferem para fotomultiplicadores que, por sua vez, amplificam e convertem o sinal recebido. Estes sinais são avaliados eletronicamente, permitindo quantificar células com características idênticas (tamanho e complexidade), construindo-se um histograma da

população analisada. Com esta técnica é ainda possível inferir sobre a heterogeneidade da população em estudo (BERGQUIST et al., 2009).

Através da utilização de diferentes marcadores fluorescentes capazes de medir parâmetros biológicos como o conteúdo em ácidos nucléicos, a taxa de respiração, a atividade enzimática intracelular e a integridade da membrana citoplasmática ou da parede, a citometria pode avaliar os diferentes estados de viabilidade (CZECHOWSKA; JOHNSON; VAN DER MEER, 2008). Além de ser uma metodologia automatizada, apresenta a vantagem adicional de fornecer resposta em tempo útil, tão importante em microbiologia clínica. Alguns citômetros (*cell sorters*) são ainda capazes de separar fisicamente as células com base em determinadas características (DAVEY, 2002).

2.6.2 Ergosterol e suas funções como constituinte essencial em leveduras

O ergosterol é o principal esterol presente nas células ou membranas miceliais da grande maioria dos fungos. Os maiores níveis deste composto encontram-se nas camadas fosfolípídicas da membrana fúngica (PEACOCK; GOOSEY, 1989), nas quais o ergosterol desempenha importante função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (GOAD, 1994). O ergosterol é um composto fundamental na arquitetura da membrana citoplasmática dos fungos e encontra-se igualmente presente na membrana mitocondrial dos fungos, parecendo haver uma estreita relação entre a sua presença e a respiração dos fungos, em particular das leveduras (CAHAGNIER B, 1988).

Devido à sua estrutura e natureza, o ergosterol aumenta a microviscosidade da membrana e participa, juntamente com os fosfolípidos, na regulação das trocas transmembranares (CAHAGNIER B, 1988; PEACOCK; GOOSEY, 1989). A ação do ergosterol sobre a microviscosidade da membrana dos fungos influencia a fluidez e o movimento molecular dos lipídios restantes, que por sua vez, modulam a atividade de enzimas da membrana, como ATPases e sintetases. Assim, a biossíntese do ergosterol é essencial para o crescimento normal e desenvolvimento fisiológico da célula fúngica (PEACOCK; GOOSEY, 1989).

Vários processos de biossíntese de fosfolípidos são regulados pelo ergosterol. A composição dos fosfolípidos é afetada pela taxa de transferência de fosfolípidos pela proteína

fosfatidilinositol (PI) quando estimulada pelo ergosterol (SZOLDERITS et al., 1989). O ergosterol livre e o ergosterol esterificado desempenham funções distintas. O ergosterol livre é mais importante para a integridade das células e contribui para uma variedade de funções celulares. Porém, os ésteres do ergosterol, captados pelas partículas lipídicas citosólicas, constituem uma forma de armazenamento inerte de esteróis e podem servir de intermediários para o fornecimento de ergosterol (YUAN et al., 2008).

O ergosterol livre e o ergosterol esterificado desempenham funções distintas. O ergosterol livre é mais importante para a integridade das células e contribui para uma variedade de funções celulares. Porém, os ésteres do ergosterol, captados pelas partículas lipídicas citosólicas, constituem uma forma de armazenamento inerte de esteróis e podem servir de intermediários para o fornecimento do ergosterol livre que compõe a membrana celular (YUAN et al., 2008).

O ergosterol possui uma cadeia lateral com uma dupla ligação em C22 e duas ligações duplas ao nível das posições C5 e C7 (anel B), sendo responsáveis pelo máximo de absorção na gama UV entre 300 a 240 nm. Em muitos dos outros esteróis, a ligação dupla em C7 está ausente, sendo a sua absorção na faixa de radiação UV mais baixa (Figura 3) (CAHAGNIER B, 1988).



Figura 3 - Estrutura química de uma molécula de ergosterol (YUAN et al., 2006).

O ergosterol é pouco estável quimicamente e a estrutura da molécula é bem conhecida. O oxigênio faz parte de um grupo hidroxila na posição C3, a partir do qual se podem obter ésteres. A molécula tem três duplas ligações e por isso pode ser hidrogenada cataliticamente e receber seis átomos de hidrogênio na estrutura base. Ácidos podem alterar a posição das duplas ligações, sendo que podem originar peróxidos com o oxigênio e diferentes compostos desidrogenados com o hidrogênio (FERREIRA, 2005).

Este composto é praticamente insolúvel em água, mas apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos. Além disso, possui boa estabilidade na manipulação laboratorial, principalmente, quando conservado em meio alcalino (GESSNER; SCHMITT, 1996) e protegido da luz ultravioleta (SCHWADORF; MUELLER, 1989). Esteróis como o ergosterol são resistentes à saponificação, por isso, a maioria dos estudos realizados para a extração do ergosterol baseia-se, fundamentalmente, na saponificação, que consiste na hidrólise alcalina do conteúdo celular a fim de permitir a separação das frações saponificável e insaponificável da amostra seguida da extração líquido-líquido da fração insaponificável.

De uma forma genérica, o método consiste em usar a saponificação direta do ergosterol com solventes polares, nomeadamente, metanol e/ou etanol (mais usuais), sendo que o extrato obtido é tratado com uma base (hidróxido de potássio ou de sódio) que hidrolisa o ergosterol esterificado a ergosterol livre de modo a facilitar a sua detecção. A mistura é submetida a um aquecimento, durante 30 a 60 minutos, dependendo da proposta da amostra segundo os pesquisadores, a uma temperatura de 80 °C, com o objetivo de libertar o ergosterol esterificado recalcitrante que ainda tenha ficado na amostra (JANAKAKUMARA, 2005; PASANEN et al., 1999; ZILL; ENGELHARDT; WALLNÖFER, 1988).

A extração líquido-líquido da fração insaponificável, na qual se encontra o ergosterol livre, é, habitualmente, efetuada com N-hexano puro ou misturado com solventes mais polares (p. ex. etanol, metanol), de forma a aumentar o rendimento extrativo. A maior afinidade do ergosterol para o n-hexano do que para o metanol ou etanol, bem como a imiscibilidade entre o n-hexano e os álcoois, permite realizar a separação do ergosterol de outras substâncias interferentes, através de uma cromatografia de partição líquido-líquido, em que o ergosterol passa para o n-hexano, enquanto as moléculas de menor afinidade permanecem na solução alcoólica (ZILL; ENGELHARDT; WALLNÖFER, 1988).

O ergosterol é termoestável, mas fotossensível, uma vez que sob influência da luz ultravioleta, o anel diênico B abre-se, originando o ergocalciferol (vitamina D₂), a mais importante das pró-vitaminas D (JANAKAKUMARA, 2005). O ergosterol é facilmente detectado na região UV pois apresenta picos de absorção em comprimentos de onda de 262, 271, 282 e 293 nm, sendo sua absorção máxima obtida a 282 nm (Solomons, 1990). Devido à sua capacidade absorptiva nesses comprimentos de onda a realização de um perfil espectrofotométrico entre 240 e 300 nm pode ser usado como um método analítico para quantificação do ergosterol presente nas amostras. As duplas ligações em C5 e C7 são responsáveis pela forte absorção do ergosterol entre 240 e 300 nm, enquanto que os outros

esteróis apresentam baixa absorção acima de 240 nm (NAEWBANIJ et al., 1984; SCHWADORF; MUELLER, 1989).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão listados a seguir.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar a expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* em isolados de *Candida albicans* cultivados na presença e ausência de concentrações inibitórias e subinibitórias de antifúngicos e efetivas e subefetivas de inibidores de proteases.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a sensibilidade dos isolados de *C. albicans* selecionados aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol e determinar a concentração inibitória mínima desses agentes aos isolados em questão;

Cultivar os isolados de *C. albicans* na presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de proteases em concentrações inibitórias/efetivas e subinibitórias/subefetivas e comparar o nível de expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* nos isolados de *C. albicans* cultivados nessas condições;

Avaliar o padrão de alteração celular nos isolados de *Candida albicans* mantidos sob influência dos antifúngicos e inibidores de proteases.

4 METODOLOGIA

Os materiais e métodos envolvidos na realização deste trabalho estão apresentados a seguir.

4.1 Local de execução e seleção de amostras

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e Imunologia básicas e de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Três isolados de *C. albicans* foram eleitos para o estudo, sendo um deles o isolado de *C. albicans* SC5314 (gentilmente cedido pela Profa Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan) e os isolados *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257, ambos provenientes de casos de infecção hospitalar fúngica, foram obtidos por intermédio de outros projetos de pesquisa realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias e que hoje fazem parte da micoteca do laboratório citado. *C. albicans* SC5314 é um isolado clínico humano do tipo selvagem obtido por “Spanish Collection”, de identificação taxonômica no NCBI 237561, que é conhecido, principalmente, por ter sido usado no projeto de sequenciamento sistemático do genoma de *C. albicans* (ODDS; BROWN; GOW, 2004). Todos os isolados são mantidos a -80°C em um ultrafreezer presente no laboratório citado acima.

4.2 Teste de sensibilidade dos isolados de *Candida albicans* aos antifúngicos

Foi determinado o perfil de sensibilidade dos isolados de *C. albicans* frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol através do método de microdiluição em caldo, que foi executado e interpretado conforme adaptações das diretrizes propostas no documento EDef 7.3.1 Revision (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017).

Os antifúngicos foram preparadas a partir de suas respectivas formas em pó, nas concentrações de 1600 µg/mL e 5120 µg/mL para anfotericina B e fluconazol, respectivamente. O fluconazol foi diluído em água e a anfotericina B, devido à sua insolubilidade em água, foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec). Pequenas alíquotas das soluções foram mantidas temporariamente a -20°C em tubos de 1 mL tipo Eppendorf® para posterior diluição e preparo de soluções estoque para uso de 160 µg/mL e 512 µg/mL para anfotericina B e fluconazol, respectivamente.

A partir da solução estoque de cada antifúngico foram preparadas as diluições em meio RPMI-1640 GIBCO® (Invitrogen), sem bicarbonato, com L-glutamina e vermelho de fenol, tamponado a pH 7,0 com a solução tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] 0,165 mol/L e suplementado com 2% de glicose. Foram preparadas diluições com concentrações de 32 a 0,06 µg/mL para a anfotericina B e 128 a 0,25 µg/mL para o fluconazol, que após acréscimo do inóculo foram diluídas e formaram as concentrações-teste. Volumes de 100 µl de cada diluição foram dispensados em sequência em placas descartáveis estéreis de microdiluição, de 96 poços e fundo chato, com auxílio de uma pipeta multicanal, nas colunas de número 02 a 11. As concentrações testadas foram dispostas de forma decrescente nas diluições 1-10 dos agentes antifúngicos.

Os isolados de *C. albicans* foram cultivados em meio ágar Sabouraud-dextrose por 24 horas a 37°C, e este cultivo repetido novamente. A partir do segundo cultivo, suspensões em solução salina estéril (0,85%) foram preparadas e ajustadas por comparação com a solução-padrão da escala 0,5 de Mcfarland até obter a densidade ótica (DO), em 530 nm, equivalente a presença de $1-5 \times 10^6$ células/mL. Suspensões de trabalho foram feitas pela diluição 1:10 das suspensões preparadas conforme descrito em meio RPMI-1640 GIBCO® (Invitrogen), produzindo uma concentração de $1-5 \times 10^5$ células/mL. Logo após o preparo, volumes de 100 µl das suspensões 2x concentradas, foram distribuídos com o auxílio de pipeta multicanal nos poços 2-12, sendo um isolado por linha da placa.

O teste foi realizado em duplicata e duas linhagens padrão de referência de *C. krusei* ATCC 6258, resistente ao fluconazol e *C. parapsilosis* ATCC 22019, sensível a fluconazol (EUCAST, 2017) foram avaliadas juntamente com os isolados de *C. albicans* selecionados no trabalho para servir como controle do teste. As diluições dos agentes antifúngicos compreenderam os poços das colunas 2-11. O controle negativo ou controle de crescimento do meio foi feito na coluna 1, com adição de 200 µl do meio de cultura não-inoculado e o controle de crescimento ou controle positivo foi feito na coluna 12, com ausência de

antifúngicos em que foram adicionados 100 µl de meio de cultura e 100 µl das suspensões de *C. albicans*, e as placas foram incubadas a 35° C por 24-48h (FIGURA 4).

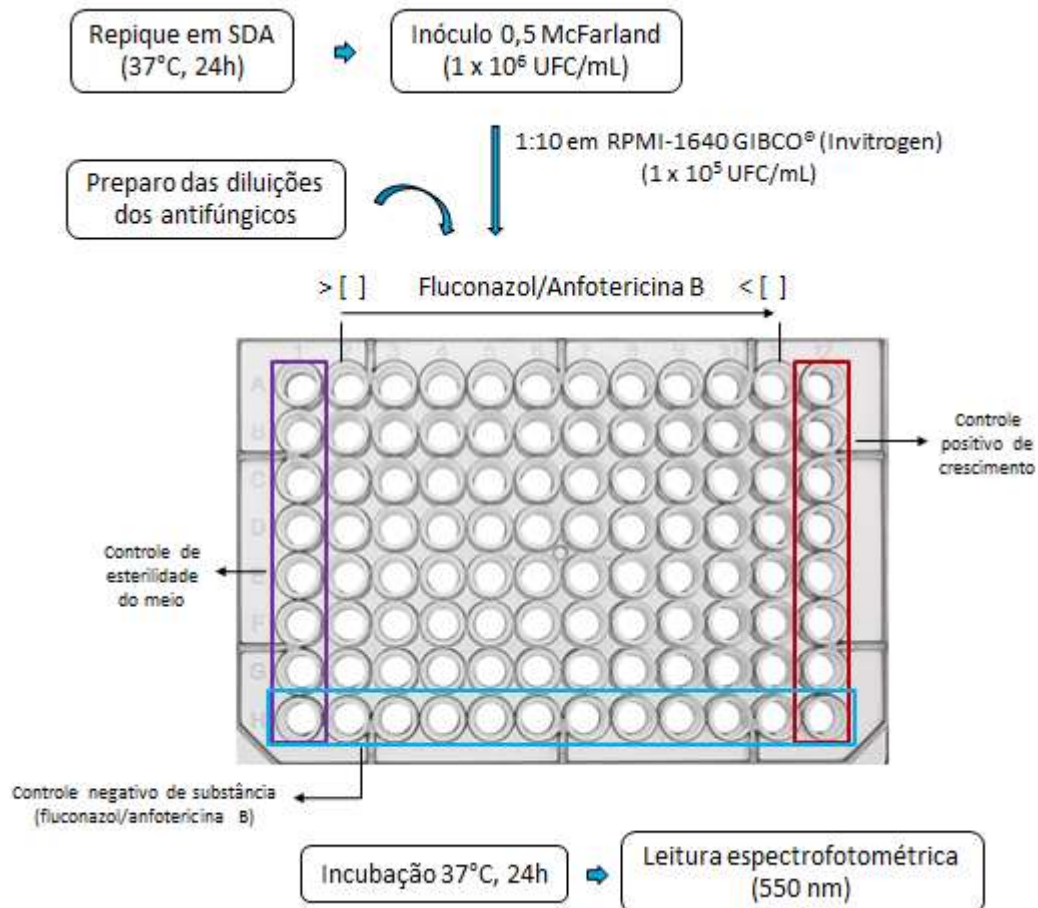


Figura 4 – Esquema representativo da montagem do teste de sensibilidade dos isolados de *C. albicans* aos agentes antifúngicos fluconazol e anfotericina B com distribuição das diferentes diluições dos antifúngicos em microplacas de poliestireno de 96 poços contendo 1 x 10⁵ UFC/mL dos isolados.

Nota: SDA: Ágar Sabouraud Dextrose; < []: Menor concentração; > []: Maior concentração.

Fonte: Da autora, 2017.

4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₅₀ e MIC₉₀)

Foi feita a leitura da densidade ótica (DO) da microplaca a 530 nm no leitor de placas automatizado (Zenith[®]) e cada isolado de *C. albicans* avaliado teve o controle positivo de

crescimento, com sua DO fixada como DO máxima (100%). Para retirar a interferência do meio de cultura nos resultados, descontou-se da DO de cada diluição a DO do controle negativo. A Concentração inibitória mínima (MIC) é a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento populacional do isolado contra o qual o agente foi testado, portanto, a menor concentração de fluconazol capaz de inibir o crescimento de cerca de 50% da população celular dos isolados no teste foi determinada como MIC₅₀ e a menor concentração de anfotericina B capaz de inibir o crescimento de cerca de 90% da população celular dos isolados no teste foi determinada como MIC₉₀.

Os perfis de sensibilidade x resistência aos antifúngicos foram interpretados conforme adaptações do proposto pelos documentos citados anteriormente (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017) (TABELA 3). Os isolados foram classificados como sensíveis (S), sensíveis dose dependente (SDD), resistentes (R) de acordo com o valor de MIC apresentado no teste.

Tabela 3 - Concentrações inibitórias mínimas (MIC) estabelecidas para interpretação do perfil de sensibilidade x resistência de *Candida albicans* frente aos antifúngicos, segundo o documento EDef 7.3.1 (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017).

Drogas Antifúngicas (µg/mL)	MIC (µg/mL)		
	S	SDD	R
Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1

(S) Sensível; (SDD) Sensível dose dependente; (R) Resistente.

4.3 Indução à produção de Sapp

A partir de um pré-cultivo dos isolados de *C. albicans* em ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas a 37°C foram preparadas suspensões em caldo “*Yeast Carbon Base*” suplementado com 0,2% (m/v) de soro albumina bovina (*YCB-BSA*) com turbidez correspondente a escala 0,5 de Mcfarland, que é compatível com contagem de 1-5 x 10⁶ células/mL de meio (Adaptado de BRAGA-SILVA et al., 2009). Estas suspensões foram adicionadas na proporção de 1:10 a 50 mL de um novo meio *YCB-BSA* para que o inóculo inicial tivesse entre 1-5 x 10⁵ células/mL. As suspensões de *C. albicans* a serem cultivadas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 180 rpm.

Após o cultivo, as culturas foram transferidas para tubos volumétricos de 50 mL tipo Falcon[®], os quais foram submetidos à centrifugação por 15 minutos a 4°C e 4000 rpm. Para cada amostra, o sobrenadante de cultura foi descartado, o sedimento formado foi ressuspensionado com adição de 1 mL de tampão PBS 1X (Na₂HPO₄ 0,144%; KH₂PO₄ 0,024%; NaCl 0,8%; KCl 0,02%), o volume transferido para tubos tipo Eppendorf[®] estéreis de 2,0 mL, centrifugados por 2 minutos a 4°C e 14000 rpm e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido nos tubos tipo Eppendorf[®] e o sobrenadante descartado novamente. Procedeu-se à extração de RNA total a partir do sedimento lavado.

4.3.1 Indução à produção de Sapp na presença de antifúngicos

Paralelamente ao cultivo dos isolados de *C. albicans* sem tratamento com substâncias ativas (denominado controle), os isolados foram cultivados na presença de concentrações inibitórias e subinibitórias dos agentes antifúngicos anfotericina B e fluconazol, as quais foram fixadas a partir do valor de MIC dos antifúngicos determinado para cada isolado. Tal exposição objetivou simular, *in vitro*, condições existentes em pacientes submetidos a tratamentos profiláticos e investigar possíveis influências da presença desses agentes sobre virulência de *C. albicans*, especialmente em relação à expressão dos genes *SAP*. Assim, esses isolados foram cultivados na presença de concentrações inibitórias de fluconazol e anfotericina B (referentes aos valores de MIC determinados para cada isolado no teste de sensibilidade anteriormente descrito) e subinibitórias (determinadas pela adição de ¼ do valor de MIC dos antifúngicos para cada isolado).

As suspensões dos isolados de *C. albicans* foram preparadas a partir da diluição 1:10 de um inóculo previamente preparado em *YCB-BSA*, com turbidez correspondente a escala 0,5 de McFarland, em 50 mL de caldo *YCB-BSA* estéril. Quatro condições de cultivo foram obtidas para cada isolado nesse processo, sendo duas para cada um dos antifúngicos eleitos fluconazol e anfotericina B, correspondentes à inibição e subinibição. Tais condições foram geradas por adição de soluções concentradas dos antifúngicos ao caldo de cultivo dos isolados em pequenos volumes, os quais foram determinados segundo a concentração final desejado no meio de cultivo, que no caso de *C. albicans* SC5314 foi de 0,5 e 0,125 µg/mL (MIC₅₀ e ¼ MIC₅₀) para o fluconazol e 0,25 e 0,0625 µg/mL (MIC₉₀ e ¼ MIC₉₀) para anfotericina B.

A incubação das culturas foi feita assim como feito para as amostras não tratadas (24 horas a 37°C e 180 rpm). Assim como feito com as amostras não tratadas, as amostras foram coletadas em tubos Falcon[®] de 50 mL, o sedimento obtido após centrifugação (15 minutos, 4°C e 4000 rpm) foi lavado duas vezes com tampão PBS 1X em tubos tipo Eppendorf[®] de 2,0 mL, com centrifugação por 2 minutos, 4°C e 14000 rpm e descarte do sobrenadante. O sedimento lavado foi submetido à extração de RNA total.

4.3.2 Indução à produção de Sapp na presença de inibidores de proteases – condições determinadas em dependência da realização de ensaios prévios

Assim como descrito no tópico anterior, suspensões dos isolados de *C. albicans* foram preparadas em 50 mL de caldo *YCB-BSA* com turbidez correspondente a escala 0,5 de McFarland. A fim de configurar o cultivo dos isolados de *C. albicans* na presença dos inibidores de proteases, elegeu-se Pepstatina A (inibidor de proteases aspárticas) e Saquinavir (inibidor das proteases do vírus HIV). Para determinar as possíveis concentrações dos inibidores a se adicionar no cultivo dos isolados, ensaios prévios foram realizados com base em trabalhos científicos ou relatos de prática clínica utilizando a linhagem de *C. albicans* SC5314.

Sabendo-se que os valores de IC₅₀ de Pepstatina A podem variar entre 0,04 e 15 µM (EID et al., 1981; SARUBBI et al., 1993) de acordo com o alvo de inibição pretendido e sabendo-se também que a concentração mais usada do inibidor em testes de inibição enzimática é 1 µM, foram propostas as cinco concentrações seguintes de Pepstatina A para os testes-piloto: 0,0145, 0,145, 1,45, 0,7 e 1,0 µM. Para o antirretroviral Saquinavir, devido à existência de grandes variações nas concentrações relatadas em estudos de inibição, propôs-se a avaliação das seguintes concentrações em testes-piloto: 0,01 µM a fim de testar uma concentração ainda menor do relatado em literatura, 0,075 µM avaliado em pesquisa anterior (KORTING et al., 1999), 0,28 e 0,4 µM, que são variações de concentrações séricas da droga após administração oral (DEEKS et al., 1997; HOETELMANS et al., 1997) e 32 µM, por ser a maior concentração avaliada em estudo anterior (BORG-VON ZEPPELIN et al., 1999).

C. albicans SC5314 foi cultivada em *YCB-BSA* adicionado dos inibidores de proteases Saquinavir e Pepstatina A segundo volume de solução de trabalho necessário para se obter as

concentrações citadas acima. Os cultivos foram incubados por 24 horas a 37°C, 180 rpm. Após incubação, foi feita para cada amostra, a leitura da densidade ótica das suspensões celulares a 530 nm e a contagem diferencial de células em Câmara de Neubauer usando azul de tripan 0,2% como marcador de células viáveis por exclusão. Os dados gerados permitiram a determinação da concentração de partida para os testes de avaliação da influência dos inibidores de proteases sobre a expressão gênica de *SAP* e testes relacionados que seriam realizados com o isolado de *C. albicans* SC5314 e os isolados provenientes de casos de infecção hospitalar selecionados para o estudo.

As condições do ensaio foram padronizadas, e a partir dos resultados preliminares (expostos no item 5.2), as concentrações de interesse para os testes subsequentes de exposição dos isolados de *C. albicans* propostos aos inibidores em concentrações efetivas e subefetivas foram determinadas: 0,01 e 0,28 µM de Saquinavir e 0,0145 e 0,7 µM de Pepstatina A. Dessa forma, pequenos volumes de soluções concentradas desses inibidores foram adicionados diretamente ao caldo de cultivo dos isolados de *C. albicans* de acordo com a concentração final desejada. Quatro condições de cultivo foram geradas para cada isolado de *C. albicans* nesse processo e a incubação das culturas foi feita assim como feito com as amostras não tratadas, ou seja, cultivadas por 24 horas a 37°C e 180 rpm. Assim como no tópico anterior, as amostras foram coletadas em tubos Falcon® de 50 mL, o sedimento obtido após centrifugação (15 minutos, 4°C e 4000 rpm) foi lavado duas vezes com tampão PBS 1X em tubos tipo Eppendorf® de 2,0 mL, com centrifugação por 2 minutos, 4°C e 14000 rpm e descarte do sobrenadante. Seguiu-se à extração de RNA total a partir do sedimento lavado.

4.4 Configuração de amostras para o estudo proposto

No processo de indução à produção de Sapp por *C. albicans* nove amostras de cada isolado foram conduzidas, conforme relacionadas a seguir:

- 1 - Fluconazol em concentração inibitória (fixada individualmente para cada isolado: MIC₅₀);
- 2 - Anfotericina B em concentração inibitória (fixada individualmente para cada isolado: MIC₉₀);

- 3 - Saquinavir na concentração eleita como efetiva (0,28 μM), independente do isolado;
- 4 - Pespstatina A na concentração eleita como efetiva (0,7 μM), independente do isolado;
- 5 - Fluconazol em concentração subinibitória (fixada individualmente para cada isolado: $\frac{1}{4}$ MIC_{50});
- 6 - Anfotericina B em concentração subinibitória (fixada individualmente para cada isolado: $\frac{1}{4}$ MIC_{90});
- 7 - Saquinavir na concentração eleita como subefetiva (0,01 μM), independente do isolado;
- 8 - Pespstatina A na concentração eleita como subefetiva (0,145 μM), independente do isolado;
- 9 - Cultivo sem acréscimo de substâncias ativas, identificado como controle.

Dessa forma, a extração do RNA total dos isolados de *C. albicans* foi feita a partir do sedimento obtido pós-cultivo das amostras nas nove condições de exposição para indução de Sapp acima citadas, que estão apresentadas de forma resumida na figura 5.

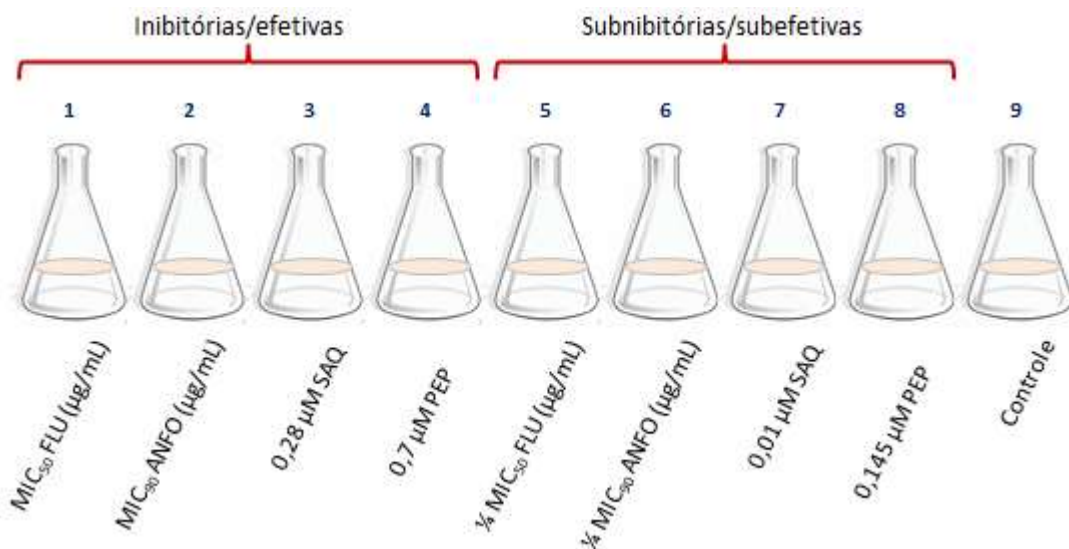


Figura 5 - Configuração das nove amostras propostas para estudo dos isolados de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121, *C. albicans* 257.

Nota: FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina; SAQ: Saquinavir; PEP: Pespstatina A, MIC_{50} : concentração inibitória de 50% do crescimento celular, MIC_{90} : concentração inibitória de 90% do crescimento celular, $\frac{1}{4}$ MIC_{50} : Um quarto da concentração inibitória de 50% do crescimento celular, $\frac{1}{4}$ MIC_{90} : Um quarto da concentração inibitória de 90% do crescimento celular.

4.5 Extração de RNA total

Sobre os *pellets* (sedimentos) lavados, obtidos do cultivo das amostras em caldo *YCB-BSA*, adicionou-se 1 mL de tampão de extração [76% de H₂O preparada com Dietilpirocarbonato (Sigma[®]), 10% de Tris-HCl 2M (pH 8,0), 4% de NaCl 0,25M, 5% de EDTA 0,5M (pH 8,0), 5% de SDS 100 mg/mL] e cerca de 400 µL de pérolas de vidro (450-600 µm, Sigma) (4:1 pérola/pellet). Os tubos com as amostras foram homogeneizados vigorosamente em equipamento tipo vórtex por 20 minutos com alternância entre vórtex e banho de gelo a cada 15 segundos dentro desse período para evitar aquecimento das amostras e consequente degradação do (RNA), uma vez que este é sensível a altas temperaturas.

Os tubos agitados foram centrifugados por 2 minutos, 4°C e 14000 rpm e cerca de 800µl do lisado (sobrenadante da centrifugação) foram transferidos para novos tubos tipo Eppendorf[®] de 2,0 mL contendo 1 mL de Trizol[®] reagente (Invitrogen). O processo de homogeneização foi repetido com alternância entre vórtex e gelo (15/15 segundos) por 10 minutos. Adicionou-se 400 µL de clorofórmio sobre a mistura e repetiu-se o processo de homogeneização com alternância entre vórtex e gelo (15/15 segundos) por 10 minutos. Após 3 minutos em banho de gelo os tubos foram centrifugados por 15 min, a 4°C e 14000 rpm.

Houve separação de fases, sendo uma fase inferior fenólica, avermelhada, que geralmente contém contaminantes ou interferentes (fenóis, proteínas e fragmentos de DNA), uma interface (DNA) e uma fase superior aquosa, que deve conter o produto de interesse (RNA total). Cerca de 900 µL da fase aquosa obtida após centrifugação foi transferida para novos tubos tipo Eppendorf[®] de 1,5 mL (gelados) e 600 µL de isopropanol foi adicionado sobre ela a fim de promover a precipitação do RNA total.

Os tubos contendo as amostras foram mantidos em freezer (-20°C) por 30 minutos e, em seguida, foram centrifugados por 15 minutos, 4°C e 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e o RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de álcool 75%, centrifugado por 10 minutos, 4°C e 14000 rpm. Todo o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos por cerca de 10 minutos em temperatura ambiente para eliminar restos de álcool do RNA extraído. O RNA foi ressuscitado por adição de 30 µl de água preparada com dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) e armazenado a -20°C por 48 horas até sua purificação e utilização na reação de transcrição reversa para síntese de cDNA. O armazenamento permanente das amostras de RNA foi feito a -80°C.

4.6 Avaliação da qualidade e rendimento do RNA extraído

A qualidade do RNA extraído foi avaliada através da realização de uma quantificação espectrofotométrica com estimativa de pureza do mesmo e eletroforese em gel de agarose para observação das bandas características do RNA ribossomal. Caso as condições mínimas exigidas para o material não fossem atingidas procedia-se nova extração de RNA com repetição de toda a sequência de processos desde a realização dos cultivos dos isolados de *Candida* spp. nas condições propostas. Feita a avaliação prévia das condições do RNA extraído, este foi tratado com DNase I para, em seguida, ser convertido em DNA complementar.

4.6.1 Quantificação de RNA

O RNA total extraído de cada amostra foi quantificado utilizando um espectrofotômetro UV/Vis do tipo NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e a leitura foi feita a partir de 1 μ L das amostras. A leitura em espectrofotômetro é útil para estimar a quantidade de RNA presente no produto de extração além de possibilitar a revelação de contaminantes, uma vez que é gerado um gráfico que demonstra a presença de contaminantes proteicos ou fenólicos através da relação entre valores de absorbâncias determinadas, assim, devem ser observadas as relações entre as absorbâncias 260/280 e 230/260. As concentrações de RNA apontadas pelo software (ng/ μ L) fornecem uma quantificação aproximada, enquanto que o gráfico de absorção e a relação entre as absorbâncias $A_{260/280}$ e $A_{230/260}$ fornecem uma medida do nível de pureza do RNA extraído. Esses dados foram levados em consideração para as etapas seguintes.

4.6.2 *Eletroforese em gel de agarose*

Fez-se uma eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do RNA extraído. Montou-se o sistema de eletroforese e preparou-se um gel de agarose na concentração de 1% em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 0,001M) com 0,5 µl/mL de brometo de etídio para a corrida. Um marcador padrão de peso molecular foi empregado na eletroforese para direcionar a observação das bandas pela migração do RNA das amostras. Para garantir a observação do RNA no gel determinou-se uma quantidade fixa de aplicação de 1000 ng para cada amostra e, a estas, um volume proporcional do tampão de amostra que contém glicerol e azul de bromofenol foi adicionado antes de cada aplicação. A corrida eletroforética se processou a 90V por 50 minutos, o gel foi visualizado e fotografado sob luz UV e a qualidade das bandas apresentadas foi avaliada segundo proposto por estudo anterior (ISHIKAWA, 1977), o qual diz que um RNA íntegro deve apresentar duas bandas próximas e perfeitamente marcadas, 28s e 18s, sendo a primeira mais intensa do que a segunda. Em alguns casos pode aparecer ainda uma terceira banda (5s), entretanto, ela dificilmente aparece em uma eletroforese não desnaturante (ISHIKAWA, 1977). Feita a avaliação dos géis, prosseguiu-se para o tratamento do RNA e etapa de síntese do cDNA.

4.7 **Tratamento do RNA**

A purificação do RNA extraído foi realizada através da utilização da DNase I (Desoxirribonuclease I, Promega), reagente que é amplamente empregado na remoção de moléculas de DNA potencialmente contaminantes (DUNKEL et al., 2014; FREIRE et al., 2015; NAGLIK et al., 2008).

O RNA total das amostras previamente avaliado quanto a sua integridade foi purificado utilizando DNase I. O emprego da DNase I na purificação do RNA já havia sido descrito e padronizado anteriormente, de forma que a reação de purificação é feita em um termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Utilizou-se um tubo de PCR de capacidade 0,2 mL onde foram adicionados 1000-2000 ng de RNA em um volume final de pelo menos 8 µl (completado com H₂O-DEPC, quando necessário), 1 µl de DNase I

(1 U/mL em 50% de glicerol, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM) e 1 µl de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM).

A reação de purificação do RNA se processou por uma etapa inicial de degradação de moléculas de DNA contaminante por contato com a DNase I durante 15 minutos em temperatura ambiente, seguida da adição de 1 µl de solução de parada (50 mM EDTA) a fim de evitar que os íons metálicos (Mg²⁺/Ca²⁺) catalisem a hidrólise do RNA durante o aquecimento da última etapa de purificação. Finalmente, os tubos foram incubados por 10 minutos a 70°C para promover a desnaturação da DNase I, o que resultou em um volume de 11 µl por amostra de RNA purificado ao final do processo. A partir das amostras de RNA purificado, foi feita a síntese de cDNA pelo método de transcrição reversa.

4.8 Reação de Transcrição reversa para a síntese de cDNA

O RNA total purificado de cada amostra foi reversamente transcrito para cDNA em um termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Em um tubo de PCR de capacidade 0,2 mL, 1000 ng de RNA purificado solubilizado em um volume de 11 µL, adicionado de H₂O-DEPC quando necessário, foi adicionado junto a 1µL de Oligo(dT) Primer na concentração de 0.5 µg/µL (Thermo Scientific) e 1 µL de uma mistura contendo os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados “dNTPs” (dATP - desoxiAdenosina Trifosfatada, dCTP - desoxiCitidina Trifosfatada, dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada, dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada) na concentração de 10 mM (Invitrogen).

As reações foram levadas ao termociclador por 5 minutos a 65°C para promover a ligação dos iniciadores às caudas poli A do RNA. Após, os tubos contendo a mistura de reação foram colocados no banho de gelo para evitar anelamentos inadequados. Após 20 segundos, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen), 4 µL de *Buffer 5X* (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen) e 1 µL da enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) 200 U/ µL (Invitrogen), que é a responsável pela transcrição reversa e consequente síntese do cDNA a partir do RNA inicial, foram adicionados aos demais componentes como cofatores da reação e os tubos colocados novamente no termociclador a 37°C. Após 50 minutos a 37°C no termociclador, um ciclo de 95°C por 5 minutos promoveu a inativação da enzima e a remoção dos iniciadores. Ao final

da reação, os tubos contendo as amostras de cDNA foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C, utilizados imediatamente em ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e posteriormente armazenados a -80°C por tempo indeterminado.

4.9 Avaliação da expressão de *SAP* nos isolados de *Candida albicans* eleitos no estudo

Foi proposta a avaliação da expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* nos isolados padrão e de fonte de infecção hospitalar de *C. albicans* cultivados na ausência e na presença de concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol e anfotericina B e efetivas e subefetivas de Saquinavir e Pepstatina A. O gene *ACT1* foi escolhido como controle endógeno por ser um gene constitutivo de expressão relativamente constante e ser considerado um bom gene normalizador dos dados de expressão gênica. A expressão dos genes *SAP* foi avaliada para os três isolados propostos no estudo e *ACT1* foi pesquisado simultaneamente com os demais genes para permitir que fosse determinada a expressão relativa dos genes *SAP*.

4.9.1 Padronização das condições de realização da Reação em cadeia da polimerase quantitativa para os genes pesquisados

Antes da condução dos testes com os isolados de *C. albicans* nas condições propostas, realizou-se a padronização das condições de realização das reações de PCR quantitativo e determinação do comportamento dos *primers* dos genes selecionados para o estudo (*SAP* e *ACT1*) em uma reação para quantificação dos mesmos a partir das amostras denominadas controle de cada isolado. A fim de determinar a melhor diluição do cDNA para obtenção de valores de C_T (“Cycle Threshold”) médios e equivalentes (entre 20 e 30) para o grupo de amostras em estudo e aplicar essas informações nas reações de qPCR propostas no projeto, reações-piloto foram conduzidas para cada gene pesquisado, a partir do material genético obtido de cada isolado cultivado na ausência das substâncias ativas utilizando-se de diferentes

concentrações de cDNA. Foram testadas amostras de cDNA diluídas de 1:1 até 1:50 e uma diluição “ideal”, que permita a detecção de cópias gênicas com valores de C_T entre 20 e 30, foi escolhida para o cDNA do grupo de isolados avaliados. Dessa forma, tem-se a concentração média de cDNA ideal para a pesquisa e quantificação dos genes *SAP* e *ACT1* a partir do cDNA das amostras geradas após o cultivo nas condições de exposição propostas.

4.9.2 Quantificação dos genes por Reação em cadeia da polimerase quantitativa

Na reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) reações do tipo sondas de hidrólise composta pelos senso e antisenso (para o gene correspondente) e sondas duplamente marcadas do tipo TaqMan, que possuem o fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e o inibidor (*quencher*) *lowa Black*[®] FQ na 3' foram empregadas. A sequência dos *primers* utilizados para detectar a expressão dos genes *SAP* de interesse foram propostas por Naglik et al. (2008) e estão na tabela 4.

Tabela 4 - Sequências de *primers* e sondas para os genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7*, *SAP9* e *ACT1* para análise de expressão por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Sonda (5'-3')
<i>SAP2</i>	TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG	TGGATCATATGTCCCTTTTGT	CACTTATAGTGATCAAACCTGCAGATTTCT
<i>SAP4</i>	CAATTTAACTGCAACAGGTCTCTT	AGATATTGAGCCACAGAAATTCC	TGCCACATCATTTCTACCAGTATCGTCG
<i>SAP7</i>	ATGGACACAGTGTGAAATATGAAGTG	TCAGTGGAGGATGGACCATTAGA	CATTGCCCTCTTCATCAGCACAAAAAGG
<i>SAP9</i>	ATTTACTCCACAGTTTATCACTGAAGGT	CCACCAGAACCACCTCAGTT	CAGGTGCATATTCAACGTTCTCCCCATTG
<i>ACT1</i>	GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA	GACAATTTCTTTTCAGCACTAGTAGTGA	ACTGTAACCACGTTTCAGACAAAATCTTGGACAA

Fonte: Adaptado de NAGLIK et al. (2008).

Foi utilizado o gene codificador da actina (*ACT1*) como gene endógeno normalizador, assim como descrito em estudos anteriores de expressão de genes *SAP* (NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014; THEBERGE et al., 2013). Controles positivos (cDNA padronizado) e negativos (amostra sem cDNA) foram adicionados ao conjunto de reações.

As reações de qPCR para a quantificação dos genes *SAP* do conjunto de amostras do estudo se processaram por adição de 1,5 µL do cDNA sintetizado ao volume de reação composto por 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 3 µL de H₂O Mili-Q e 0,5 µL

da mistura que contém os iniciadores “*forward* e *reverse*” (18 μM) para o gene correspondente e a sonda TaqMan (5 μM).

A qPCR foi realizada em um *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), em um volume final de 10 μL por reação. Um ciclo de 50°C por 2 minutos remove qualquer ligação inadequada e evita contaminação cruzada. Em seguida, um ciclo de 95°C por 10 minutos promove a desnaturação das cadeias de cDNA e a ativação da Taq polimerase. A amplificação ocorre através da realização de 40 ciclos, sendo cada um de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram conduzidas em duplicata, e ao fim, os valores de C_T (“Cycle Threshold”) foram relacionados em uma tabela para posterior normalização e interpretação.

4.9.3 *Análise e interpretação dos resultados da qPCR*

Para análise e interpretação dos resultados, a “baseline” (nível de background fluorescente) e o “Threshold” (limiar) para a fluorescência FAM foram programados manualmente. Foi feita a análise das curvas de amplificação gênica e dos valores de C_T , ciclo no qual cada reação atinge o valor limiar da fase exponencial de fluorescência. A determinação do C_T para os genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7*, *SAP9* e *ACT1*, permitiu detectar a presença do mRNA alvo transcrito e validar a amplificação. Resultados com C_T indeterminado foram considerados válidos e relatados como negativos para a presença do mRNA alvo e consequentemente negativos para a expressão do gene *SAP* em questão. Resultados com $C_T \leq 39$ foram relatados como positivos para a presença do mRNA alvo. Quanto maior o valor do C_T , menor o número de cópias do gene amplificado.

Os resultados foram analisados pelo método do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) utilizado para analisar as alterações relativas na expressão dos genes a partir de uma amostra controle por qPCR (NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014). Os valores de C_T fornecidos pela qPCR foram agrupados pela média, assim, a união das duplicatas de C_T para os genes *SAP* e *ACT1* foram chamados de C_T médio. O ΔC_T é obtido pela subtração entre o C_T médio da *SAP* e o C_T médio da *ACT1*. Já o $\Delta\Delta C_T$ é obtido pela subtração entre o ΔC_T da amostra tratada e o ΔC_T da amostra não tratada, e finalmente, a quantidade relativa do gene pesquisado para as amostras tratadas em relação à amostra não tratada pode ser expressa pela função $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

$\Delta\Delta CT$. A amostra não tratada pode ser chamada de controle e deve ter valor comparativo de expressão fixado em 1. As amostras tratadas que exibem $2^{-\Delta\Delta CT}$ menor que 1 expressam menos *SAP* que o controle e as amostras tratadas que exibem $2^{-\Delta\Delta CT}$ maior que 1 expressam mais *SAP* que o controle.

4.10 Avaliação do padrão de alteração celular nos isolados de *Candida albicans* mantidos sob influência dos antifúngicos e inibidores de proteases

Com objetivo de investigar tais alterações, ensaios que permitam avaliar as condições dos isolados de *C. albicans* após exposição aos antifúngicos e inibidores de proteases e relacionar esses dados com os níveis de expressão dos genes *SAP*, como avaliação da viabilidade por coloração, análise em citômetro de fluxo por utilização de marcador de viabilidade e determinação do teor de ergosterol de membrana foram propostos. Os ensaios foram úteis para investigar de que forma essas substâncias podem influenciar o crescimento celular dos isolados de *C. albicans* e a expressão gênica de *SAP*, além de auxiliar na detecção de possíveis alterações celulares que impactem de alguma forma sua capacidade adaptativa.

Assim como foi feito para a avaliação da expressão dos genes *SAP* nos três isolados de *C. albicans* estudados, novos cultivos dos isolados de *C. albicans* em *YCB-BSA* foram preparados com adição dos agentes antifúngicos e inibidores de proteases em concentrações inibitórias/efetivas e subinibitórias/subefetivas conforme determinado anteriormente para cada isolado selecionado para o estudo.

Seguindo a mesma proposição de avaliação de influência das substâncias ativas citadas, nove amostras foram obtidas para cada isolado de *C. albicans*, que foram incubadas por 24 horas a 37°C, 180 rpm. Após esse tempo, o cultivo foi transferido para um tubo Falcon® de 50 mL submetido à centrifugação por 5 minutos a 4°C e 4000 rpm. O sedimento obtido foi ressuscitado em 1 mL de tampão PBS 1X, lavado uma vez e novamente ressuscitado em PBS. Desse material, uma alíquota de 20 µL foi retirada para a contagem por exclusão através da utilização do azul de tripan e o restante submetido à avaliação em citômetro de fluxo.

4.10.1 Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan

O teste de exclusão por azul de tripan foi feito porque permite quantificar separadamente as células viáveis das células não viáveis após exposição aos antifúngicos e inibidores de proteases, uma vez que o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o azul de tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

Às alíquotas de 20 μL retiradas do material lavado e mantido em PBS adicionou-se 20 μL do corante azul de tripan 0,2% preparado em PBS, para que as células mortas fossem coradas em azul (TRAN et al., 2011) e a contagem diferencial fosse possível. A contagem de células em Câmara de Neubauer (FIGURA 6) foi feita pela contagem total das células vivas/mortas nos quatro quadrantes, dividido por 4 (número de quadrantes contados), multiplicado por 2 (fator de diluição) e multiplicado por 10^4 (fator de correção do volume da câmara), assim obteve-se a número de células/mL.

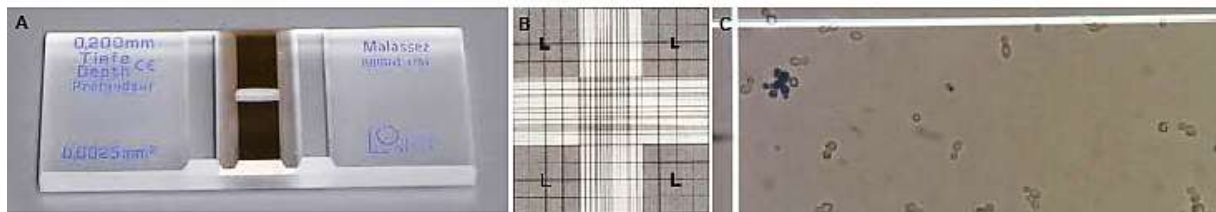


Figura 6 - Contagem celular. (A): Câmara de Neubauer; (B): Quadrantes para contagem; (C): Células de *C. albicans* observadas por microscopia óptica com azul de tripan 0,2%, células mortas (coradas em azul).

Fonte: O autor.

4.10.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, que se baseia no desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado é importante ferramenta para auxiliar na identificação de alterações celulares, sejam elas morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares. As células de *C. albicans* colhidas e mantidas em tampão PBS após exposição aos agentes antifúngicos e inibidores de proteases foram conduzidas para a análise através da citometria de fluxo.

Antes de conduzir o teste foi necessário definir um controle positivo de morte celular para determinar a intensidade de fluorescência emitida pelas células mortas e possibilitar a comparação com as condições de cultivo propostas. Este controle foi preparado por contato de etanol 70% com o sedimento obtido a partir de uma amostra controle (sem adição de substâncias ativas) por 15 minutos seguidos da coleta das células por centrifugação e ressuspensão em PBS. Para todas as análises dos eventos celulares dos isolados, um controle negativo contendo *C. albicans* não exposta às substâncias propostas também se fez necessário.

A realização da análise depende do tratamento prévio das amostras com 9 μM de iodeto de propídio (PI), um marcador de integridade de membrana, que é capaz de atravessar membranas lesionadas e se ligar aos ácidos nucleicos emitindo fluorescência vermelha. Em células com membrana íntegra este marcador não consegue penetrar e não apresenta fluorescência (PINA-VAZ et al., 2001; VALE-SILVA et al., 2006).

Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e ausência de luz (HWANG et al., 2010), as células foram analisadas através de um citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ 8HT) que utiliza laser azul argônio (488 nm). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados e os parâmetros intrínsecos como complexidade celular, tamanho e fluorescência da luz vermelha foram observados.

4.10.3 Determinação do teor de ergosterol presente em cada amostra após exposição aos agentes antifúngicos e inibidores de proteases

A quantificação do ergosterol prosseguiu conforme protocolo descrito em 1957 com algumas modificações (BREIVIK; OWADES, 1957). A partir de um cultivo de *C. albicans* em ágar Sabouraud dextrose por 24h, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de Caldo Sabouraud dextrose contendo as mesmas substâncias, nas mesmas concentrações conforme proposto para avaliação da expressão gênica (IC e $\frac{1}{4}$ IC dos antifúngicos e concentração efetiva e subefetiva dos inibidores de proteases). Assim como feito para a análise de expressão, um controle sem adição de substâncias ativas e um controle sem adição dos isolados de *C. albicans* (branco) também foram conduzidos junto ao teste.

Os cultivos foram incubados “overnight” (cerca de 16 horas) a 35°C e 130 rpm. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação a 2700 rpm por 5 minutos, lavadas 1x com água destilada estéril em tubos tipo Falcon® e o peso do sedimento foi determinado pela diferença entre o peso do tubo contendo o sedimento e o peso do tubo vazio. Em cada amostra foram adicionados 3 mL de solução alcoólica de KOH 25%, preparada por diluição de 25g de KOH em 35mL de água destilada estéril e quantidade suficiente para (q.s.p.) 100 mL de Etanol P.A. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 1 minuto, em seguida as suspensões foram transferidas para tubos de vidro com tampa e incubados durante 1 hora em banho-maria a 85°C. Após resfriamento, o esterol foi separado pela adição de 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de N-heptano sobre os tubos já à temperatura ambiente, seguido por agitação vigorosa durante 3 minutos. Após separação das fases, foi feita a transferência da fase transparente para novos tubos de vidro, que foram incubadas a -20°C por 24 horas.

Para a quantificação do ergosterol das amostras, uma alíquota de 0,6 mL de cada uma foi diluída 5x em Etanol PA, e através da utilização de cubetas de quartzo, varredura espectrofotométrica das amostras foi realizada entre 230 e 300nm (UV). A presença do ergosterol e do esterol intermediário 24(28) DHE (Dehidroxi ergosterol) resultam em uma curva de 4 picos (conforme figura 7) e, a ausência destes, em uma linha tênue (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 1999).

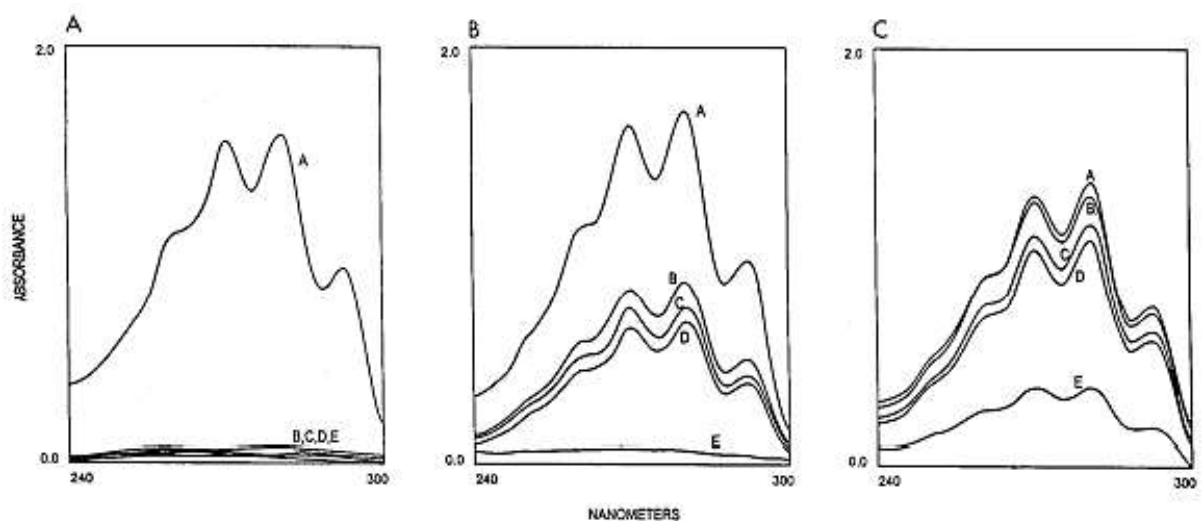


Figura 7 - Perfis espectrais de esteróis representativos de isolados de *C. albicans* determinados por espectrofotometria na luz ultra-violeta (UV) entre 240 nm e 300 nm. Isolados sensíveis ao fluconazol (A), sensíveis dependendo da dose (B) e resistentes ao fluconazol (C). Teor de ergosterol a partir de cultivo sem adição de fluconazol (Curva A), com adição de 1 µg/mL (Curva B), 4 µg/mL (Curva C), 16 µg/mL (Curva D) ou 64 µg/mL (Curva E).

Fonte: ARTHINGTON-SKAGGS et al. (1999).

O teor de ergosterol é calculado por exclusão do estero intermediário 24(28) DHE:

$$\% \text{ Ergosterol} = [\% \text{ esteróis} - \% \text{ 24(28) DHE}]$$

Uma leitura individual da absorbância das amostras a 281,5 nm foi feita a fim de permitir a realização dos cálculos de quantificação, uma vez que tanto o ergosterol quanto o 24(28) DHE são absorvidos nesse comprimento de onda. A determinação da absorbância das amostras em 230 nm também é muito importante para a quantificação do ergosterol, pois o estero intermediário 24(28) DHE é fortemente absorvido a 230 nm.

A determinação da quantidade de esteróis totais e do estero intermediário é feita com base na quantidade de células ou peso do sedimento e obedece a equação geral:

$$\% \text{ Ergosterol} = \left(\frac{[A_{(281,5)} / 290] \times F}{\text{Peso do sedimento}} \right) \left(\frac{[A_{(230)} / 518] \times F}{\text{Peso do sedimento}} \right)$$

Na equação acima descrita, F é o fator de diluição das amostras no Etanol e 290 e 518 são os E values (%/cm) determinados pelo ergosterol e 24(28)DHE cristalinos, respectivamente (BREIVIK; OWADES, 1956).

4.11 Análise estatística

Os dados que apresentam normalidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com teste de Tukey ou Bonferroni para o teste de médias (ambos com intervalo de 95% de confiança).

Em todas as análises matemáticas foi utilizado o software GraphPad® Prism 5.01 (2009), com exceção das análises de citometria de fluxo, nas quais os gráficos apresentados foram gerados pelo programa existente no citômetro Guava EasyCyte™ 8HT.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho e a discussão dos mesmos estão apresentados a seguir.

5.1 Teste de sensibilidade aos antifúngicos – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₅₀ e MIC₉₀) dos antifúngicos

Foram propostos para teste três isolados de *C. albicans*, sendo *C. albicans* SC5314 e dois isolados provenientes de casos de infecção hospitalar. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de fluconazol e Anfotericina B necessários para inibir 50% e 90% do crescimento de células, respectivamente, foram determinados em µg/mL como descrito anteriormente e com base nesses valores foi possível classificar os isolados quanto à sensibilidade e/ou resistência aos antifúngicos (TABELA 5).

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (MIC₅₀ e MIC₉₀) do crescimento e classificação dos isolados de *Candida albicans* quanto à sensibilidade aos antifúngicos, determinada por microdiluição em caldo conforme documento E Def 7.3.1 (ARENDRUP1 et al., 2017; EUCAST, 2017).

Código	Espécie	Fluconazol		Anfotericina B	
		MIC ₅₀	C	MIC ₉₀	C
SC5314	<i>C. albicans</i>	0,500	S	0,250	S
121	<i>C. albicans</i>	0,250	S	0,250	S
257	<i>C. albicans</i>	0,250	S	0,125	S
ATCC6258	<i>C. krusei</i>	8,000	R	0,250	S
ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i>	1,000	S	0,125	S

MIC: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL); C: Classificação quanto à sensibilidade; S: Sensível.

Os isolados de *C. albicans* apresentaram-se sensíveis aos antifúngicos testados e os valores de MIC dos antifúngicos foram pelo menos quatro vezes menor que os pontos de corte indicados no documento citado anteriormente (EUCAST, 2017). Os isolados provenientes de casos de infecção hospitalar, também sensíveis ao fluconazol, apresentaram valores de MIC menores ou iguais à linhagem padrão *C. albicans* SC5314. Comportamento

semelhante, com valores de MIC reduzidos em clínicos de *C. albicans*, também já havia sido relatado em estudos anteriores (PEMÁN et al., 2012; SAVASTANO et al., 2016).

A MIC₅₀ de fluconazol para *C. albicans* SC5314 foi de 0,5 µg/mL, metade do valor apontado em estudos anteriores realizados com esse isolado, como aqueles que propuseram a avaliação do impacto de fluconazol sobre a capacidade de formar biofilmes ou a determinação do teor de sódio intracelular (KOLECKA; CHORVÁT; BUJDÁKOVÁ, 2015; KOLECKA et al., 2009).

Os três isolados de *C. albicans* se apresentaram sensíveis à anfotericina B, e diferente dos demais isolados, *C. albicans* 257 apresentou MIC₉₀ igual a 0,125 µg/mL, que correspondente à metade da MIC₉₀ de *C. albicans* SC5314 e *C. albicans* 121.

A partir dos valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ de fluconazol e anfotericina B, respectivamente, para os isolados de *C. albicans* determinou-se as concentrações dos antifúngicos referentes às condições de exposição propostas. Soluções de trabalho dos agentes antifúngicos foram preparadas (fluconazol: 512 µg/mL e anfotericina B: 160 µg/mL) para adição no caldo cultivo de modo que permitisse promover a exposição dos isolados de *C. albicans* a concentrações inibitórias e subinibitórias de fluconazol e anfotericina B.

5.2 Indução à produção de Sapp na presença e na ausência de antifúngicos e inibidores de proteases

A indução à produção de Sapp na presença e ausência de antifúngicos e inibidores de proteases foi realizada de acordo com o proposto anteriormente e a partir de cada isolado de *C. albicans* foram geradas nove amostras, uma vez que os isolados foram cultivados em nove condições diferentes. Após incubação das amostras por 24 horas foi possível observar diferenças visuais nos níveis de turvação dos cultivos o que implica em diferentes níveis de crescimento.

Observou-se, de maneira geral, maior proliferação celular dos isolados de *C. albicans* quando expostos à presença de fluconazol e anfotericina B. Esse comportamento já era esperado em relação ao fluconazol, pois estudos de avaliação subterapêutica relacionam ativação de fatores de virulência à capacidade de adaptação. Um estudo conduzido por Pemán et al. (2012), mostrou que pacientes submetidos ao tratamento profilático com fluconazol são

mais suscetíveis à colonização e infecção por espécies de *Candida* spp. porque a exposição à concentrações subterapêuticas de fluconazol pode resultar em emergência de resistência, uma vez que esses isolados costumam ser capazes de se adaptar às condições de estresse e se desenvolver ainda mais, fato que também já havia sido comentado por Naglik et al., 2004. Anfotericina B, agente antifúngico de ação fungicida, quando adicionado ao cultivo em concentrações subinibitórias, pode ter estimulado a proliferação celular dos isolados de *C. albicans* em relação à amostra controle e às demais condições de cultivo, uma vez que se observou maior turvação do meio de cultivo.

Nos ensaios prévios de avaliação da influência dos inibidores de proteases sobre o crescimento celular de *C. albicans* SC5314 as primeiras observações feitas indicaram uma redução na turvação dos cultivos adicionados dos inibidores em relação ao controle sem adição de inibidores. Essa observação se confirmou na leitura da densidade ótica (DO) dos cultivos em 530 nm, pois a absorbância de todas as amostras foi menor do que a do controle. Assim como a leitura da DO, a contagem em Câmara de Neubauer também confirmou as primeiras observações, uma vez que o número de células viáveis contadas em todas as condições propostas para os tratamentos foi menor do que a contagem no controle.

A absorbância apresentada pelo controle (sem adição dos inibidores) foi fixada como 100% de crescimento celular para efeito comparativo, o que permitiu estimar o crescimento celular (%) das amostras tratadas com os inibidores de proteases em relação ao controle. Esses dados permitiram a construção de gráficos que ilustrassem a influência dos inibidores nas cinco diferentes concentrações testadas sobre o crescimento celular de *C. albicans* SC5314. A figura 8 apresenta dois gráficos criados no GraphPad® Prism por plotagem das doses dos inibidores de proteases com seus respectivos efeitos sobre o crescimento celular de *C. albicans* SC5314.

No gráfico A, o qual foi denominado Dose-Resposta, cada ponto das curvas representativas do efeito dos inibidores corresponde à absorção espectrofotométrica, em 530 nm, de um cultivo na presença de uma determinada dose dos mesmos. Ele tem seu desenho determinado pela distribuição dos pontos de interação correspondentes (dose dos inibidores e seu efeito sobre as células) e a ação inibidora sobre o crescimento celular é tão maior quanto maior for a inclinação da linha que une os pontos em direção ao eixo X. No gráfico apresentado, a amostra controle está representada por uma linha horizontal tracejada no ponto correspondente à densidade ótica de 0,135 a 530 nm.

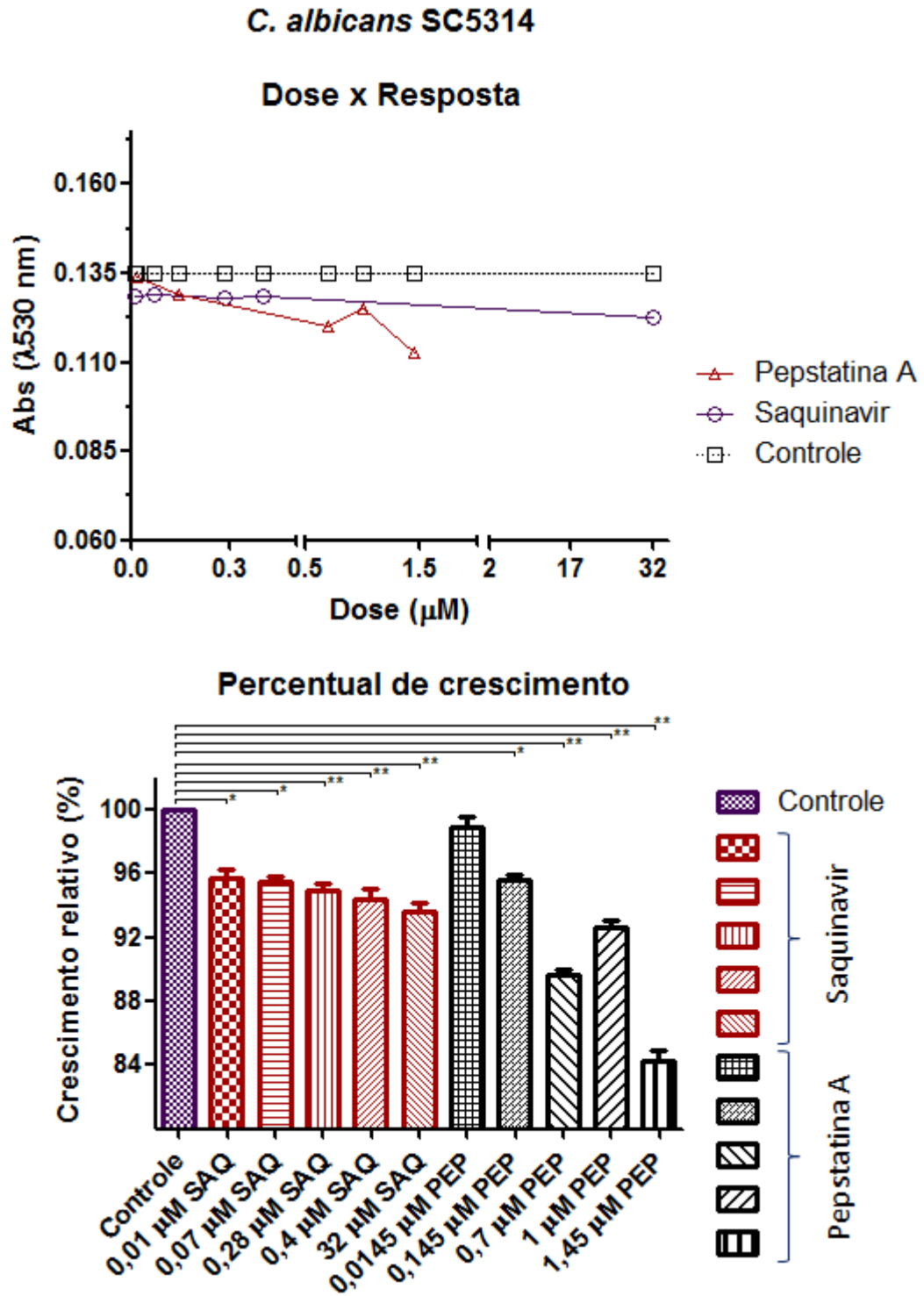


Figura 8 - Curvas Dose-Resposta (A) e percentual de crescimento relativo (%) (B) de Saquinavir e Pepstatina A, ambos obtidos por avaliação espectrofotométrica do efeito dos inibidores de proteases sobre o crescimento de *C. albicans* SC5314 após 24 h de incubação a 37°C, 180 rpm. Gráficos elaborados pelo Graph Pad® Prism.

Nota: Controle: Cultivo de *C. albicans* sem adição de inibidores; SAQ: Saquinavir (0,01 - 32 µM); PEP: Pepstatina A (0,0145 - 1,45 µM).

No gráfico B, tem-se o efeito dos inibidores através do percentual de crescimento relativo de cada amostra em relação à amostra controle. Houve redução do percentual de crescimento celular de *C. albicans* SC5314 na presença dos inibidores, em relação ao controle e tal redução foi tanto maior quanto maior a dose, com exceção de uma situação, especialmente para a Pepstatina A, em que a situação se inverteu e observou-se menor influência do aumento da dose sobre o percentual de crescimento celular. Se considerados os números absolutos, pode-se dizer que todas as doses avaliadas promoveram redução do crescimento celular, entretanto, tal redução foi menor do que 10% na presença de todas as doses de Saquinavir testadas e menor do que 20% na presença das doses de Pepstatina A.

Para caracterizar as condições de exposição aos inibidores de proteases em condições efetivas, propôs-se, dentre as doses testadas, a utilização de doses compatíveis com estudos de inibição, como a utilização de 0,28 μM de Saquinavir por Deeks et al. (1997) por ser uma variação de concentrações séricas da droga após administração oral, além do mais, tal concentração apresentou maior efeito de inibição do percentual de crescimento do que as doses de concentrações mais baixas. Levando-se em consideração os mesmos fatores, elegeu-se a dose de concentração igual a 0,7 μM de Pepstatina A para a condição efetiva. Apesar de todas as doses testadas terem apresentado algum nível de inibição, elegeu-se a menor concentração de ambos inibidores de proteases para denominar de concentração subefetiva, que corresponde a adição de 0,01 μM de Saquinavir e 0,0145 μM de Pepstatina A aos cultivos.

Os resultados dos ensaios prévios de indução à produção de Sapp na presença de inibidores foram essenciais para a determinação das condições às quais o isolado de *C. albicans* SC5314 e os isolados provenientes de infecção hospitalar *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 seriam expostos para avaliação da expressão de SAP e permitir a análise da influência dos agentes antifúngicos e inibidores de proteases selecionados para o estudo.

Assim, a indução à produção de Sapp na presença das concentrações selecionadas para a exposição aos inibidores de proteases Saquinavir e Pepstatina A foi feita segundo os mesmos critérios, entretanto, a resposta dos isolados não foi tão semelhante à observada frente aos antifúngicos. Segundo a observação visual dos cultivos, a influência dos inibidores sobre a proliferação celular de *C. albicans* não deve obedecer padrões segundo o tipo de substância ativa adicionada, uma vez que a turvação dos cultivos não foi semelhante para os inibidores. Diferente do que se observou para a Pepstatina A, a proliferação celular dos isolados evidenciada pela turvação dos cultivos na presença de Saquinavir foi menor do que na

amostra controle. Tal observação na presença de Saquinavir permite sugerir que essa influência esteja diretamente relacionada à inibição das proteases Sapp, uma vez que Pepstatina A é um inibidor específico de proteases aspárticas e, por esta razão, talvez possa inibir o crescimento de *C. albicans*.

Sabe-se que a secreção das isoenzimas Sapp é regulada pela expressão dos genes *SAP*, entretanto, resta saber como se comportam os genes *SAP* nessas condições de cultivo, ou seja, se há expressão diferencial desses genes nos isolados de *C. albicans* selecionados para esse estudo.

5.3 Extração de RNA total

O RNA total dos isolados de *C. albicans* submetidos ao cultivo nas diferentes condições de exposição foi extraído e a qualidade dos mesmos foi avaliada por quantificação espectrofotométrica (NanoDrop[®] 2000) e realização de eletroforese. Em relação às leituras espectrofométricas, o produto de extração das amostras conduzidas pode ser considerado de boa qualidade, uma vez que as razões entre absorbâncias 260/280 e 230/260 apresentaram média igual a 1,99 e 1,88, respectivamente. Sabe-se que ligações peptídicas de proteínas absorvem em 280 nm, dessa forma quanto mais próximo de 2,0 a relação $A_{260/280}$ estiver, maior será a pureza do RNA extraído. Se a razão entre essas absorbâncias estiver entre 1,8 e 2,0, a amostra se encontra em boas condições de análise, contendo pouca interferência de proteínas, segundo Molinaro (2013). A relação $A_{260/280}$ de aproximadamente 1,8 geralmente caracteriza o DNA como "puro", enquanto que para o RNA é necessário um valor mais próximo de 2,0 para que ele seja considerado "puro" (THERMO SCIENTIFIC, 2012). Já a relação $A_{260/230}$ revela contaminação por fenóis e quanto menor for a razão entre as absorbâncias, menor a pureza em relação aos contaminantes fenólicos. A concentração estimada pelo NanoDrop[®] para o RNA das amostras extraídas variou entre 200 e 450 ng/ μ L.

A figura 9 ilustra o RNA total extraído do isolado padrão *C. albicans* SC5314 nas nove condições de cultivo já citadas anteriormente. Assim como esperado pelo proposto por Ishikawa (1977), que diz que um RNA íntegro deve apresentar duas bandas próximas e perfeitamente marcadas, 28s e 18s, sendo a primeira mais intensa do que a segunda, o RNA total das amostras apareceu dividido em duas bandas estreitas, que correspondem às bandas

28S e 18S. Abaixo das bandas foi possível observar uma mancha levemente marcada que, possivelmente, corresponde a uma pequena quantidade de RNA degradado no processo.

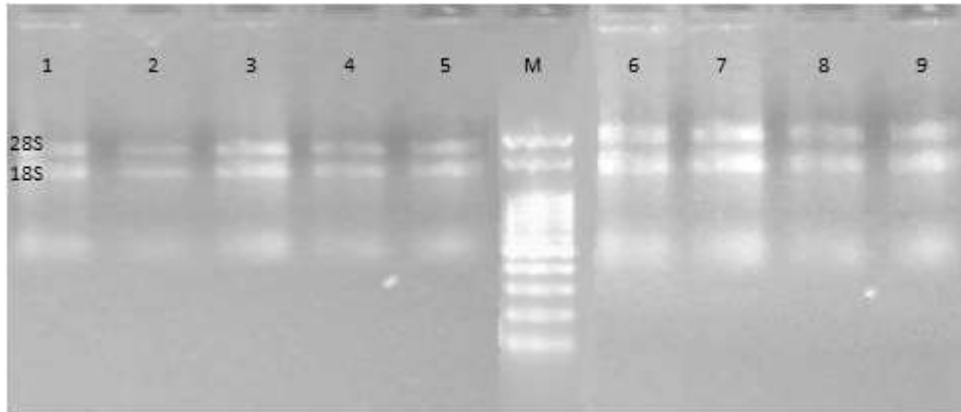


Figura 9 - Análise do RNA total de *C. albicans* SC5314 por eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, (2) Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, (3) Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, (4) Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, (5) Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, (6) Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, (7) Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, (8) Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, (9) Controle, cultivo na ausência de substâncias ativas, M: marcador de peso molecular.

O RNA é uma molécula extremamente sensível e pode ser facilmente degradado, dessa forma, diversas alterações na metodologia proposta para extração de RNA foram empregadas ao longo da execução dos testes preliminares e testes-piloto a fim de se obter um RNA íntegro e de boa qualidade. Todos os cuidados empregados, em especial a preocupação com a manutenção de baixas temperaturas no processo tiveram por objetivo proteger o produto da extração (RNA) e facilitar a manipulação das amostras com menores riscos de perda por degradação e conseqüentemente maior rendimento final.

Assim como observado para *C. albicans* SC5314, o RNA extraído dos demais isolados submetidos às mesmas condições apresentou perfil semelhante na eletroforese de forma que possibilitou seguir para a síntese do cDNA.

5.4 Tratamento do RNA total e síntese de cDNA

Para todas as amostras de RNA total obtidas das condições de experimentação dos isolados de *C. albicans* o tratamento foi feito com o intuito de obter melhores níveis de pureza

e tal objetivo foi alcançado, pois foi possível observar através de análises espectrofotométricas pós-tratamento que as relações entre as absorbâncias reveladoras dos níveis de pureza do RNA melhoraram ainda mais. O cDNA, sintetizado a partir de quantidade fixa de RNA para todas as condições, conforme especificado anteriormente, foi armazenado a -20°C para a realização de ensaios posteriores.

5.5 Avaliação da expressão de *SAP* nos isolados de *Candida albicans* eleitos no estudo

A expressão gênica de *SAP* foi quantificada através da utilização do método do PCR quantitativo, o qual permitiu realizar a quantificação relativa e comparar os níveis de expressão para os genes *SAP* nas diferentes condições propostas para o cultivo dos isolados de *C. albicans* avaliados nesse trabalho. Os resultados e análises estão apresentados a seguir.

5.5.1 PCR quantitativo

As reações de qPCR foram realizadas em um *StepOne*TM Real-Time PCR Systems (*Applied Biosystems*), que permitiu a utilização de pequenos volumes de reação com segurança nos resultados. As reações foram anteriormente padronizadas nesse mesmo equipamento a fim de garantir a obtenção de resultados confiáveis.

Para cada isolado de *C. albicans* nove materiais extrativos relativos às condições de exposição foram obtidos, sendo que, para cada condição de cultivo cinco reações foram ensaiadas, em duplicata, com os *primers* referentes aos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7*, *SAP9* e *ACT1*. A análise de expressão através da reação de PCR quantitativo em tempo real emitiu curvas de amplificação e uma relação de valores de C_T para as amostras e os genes pesquisados, como ilustrado na figura 10.

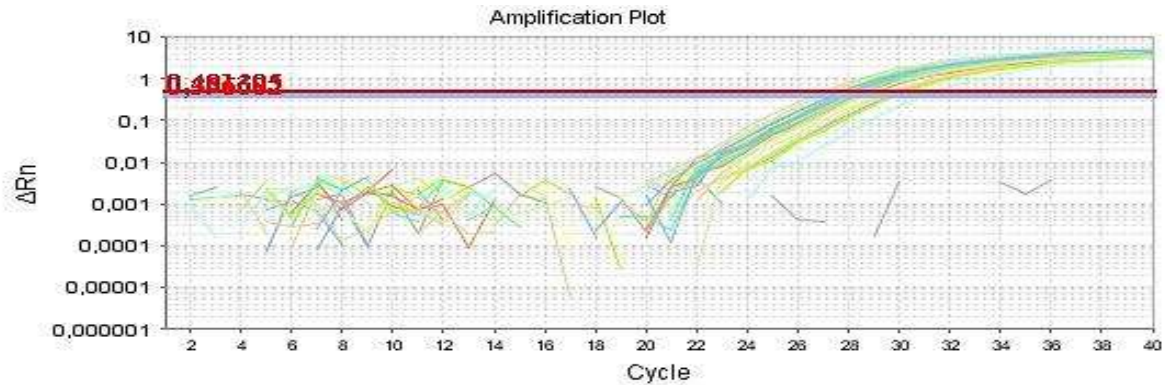


Figura 10 - Curva de amplificação dos genes *ACT1*, *SAP2*, *SAP4* e *SAP7* de *C. albicans* SC5314. As linhas que ultrapassaram o “Threshold” correspondem às curvas de amplificação de cada condição.

5.5.2 Análise e interpretação dos resultados da qPCR

A observação dos valores absolutos de C_T das amostras possibilitou dizer apenas que houve expressão do gene pesquisado, no entanto, para diferenciar esses níveis, fez-se necessário a normalização dos dados. Os resultados obtidos permitiram estimar a expressão relativa dos genes pesquisados, ou seja, a expressão do gene constitutivo *ACT1* é essencial para fornecer dados de quantificação relativa da expressão. Em algumas reações, o valor C_T foi próximo de 39, e após normalização observou-se que a expressão dos genes em questão nas condições em que esses isolados foram cultivados foi quase nula.

Seis genes foram pesquisados, incluindo *ACT1* que tem função especial de normalização dos dados gerados no estudo. A variação dos valores de C_T referentes à pesquisa do gene *ACT1* foi de até dois ciclos (dois C_{Ts}) nas condições de exposição propostas, no entanto, a avaliação de sua expressão foi feita, principalmente, para fornecer confiabilidade à análise. *ACT1* é o gene controle do experimento, pelo fato de ser um gene constitutivo de membrana e porque sua expressão está diretamente relacionada à integridade celular e sobrevivência da célula.

A partir dos valores de C_T das amostras, foi feita a quantificação relativa dos genes pesquisados e os dados gerados após normalização com o gene constitutivo *ACT1* estão apresentados na figura 11.

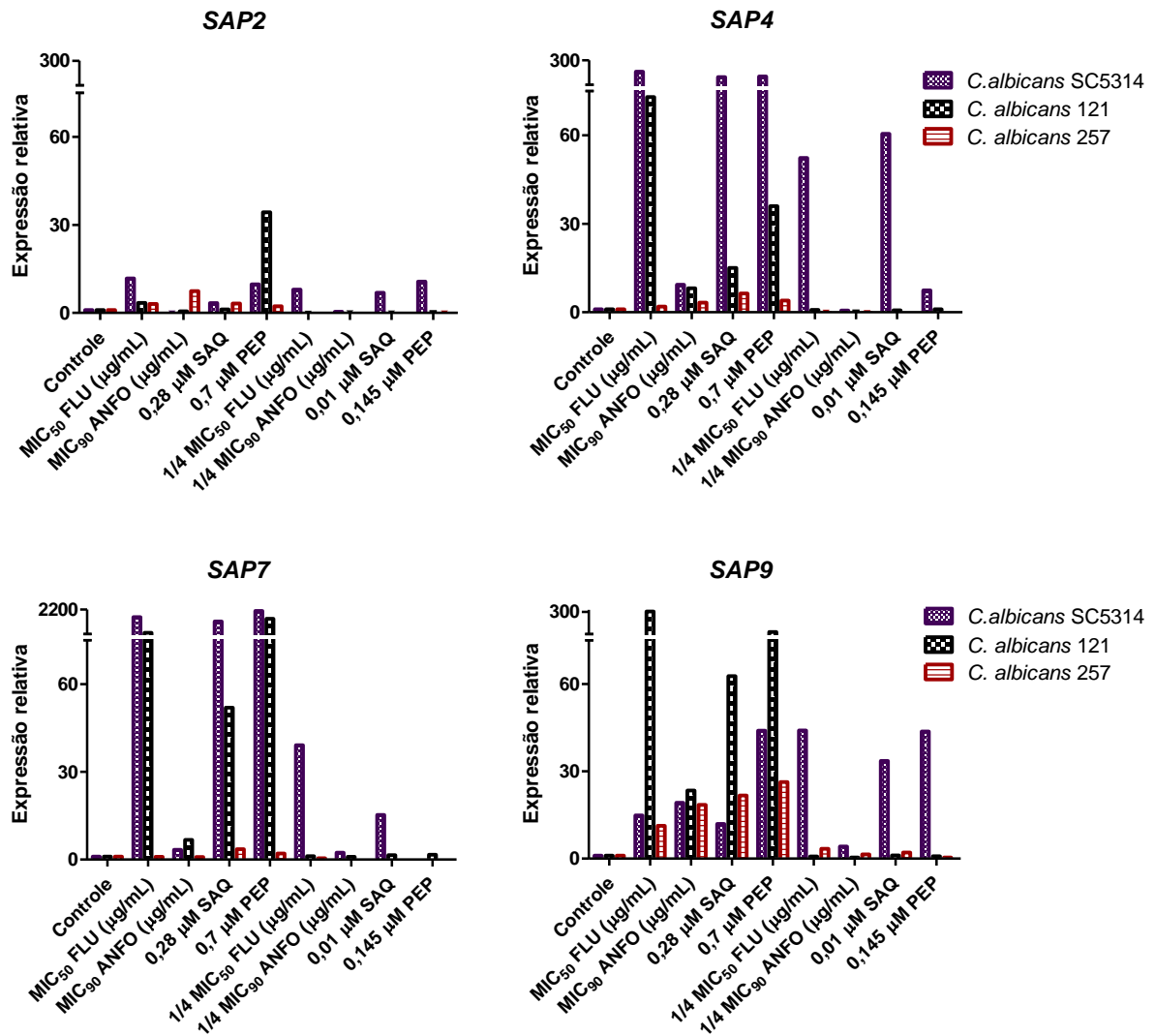


Figura 11 - Avaliação da expressão relativa dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP9* de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 na presença e ausência de fluconazol, anfotericina B, saquinavir e pepstatina A em concentrações inibitórias e subinibitórias/efetivas dos mesmos, conforme especificado na figura.

Nota: FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina B; SAQ: Saquinavir; PEP: Pepstatina A.

A observação da figura acima permite dizer que os genes *SAP* pesquisados foram detectados na maior parte das amostras avaliadas e apresentaram expressão relativa maior do que na amostra controle (não tratada) na maioria das condições de exposição. De acordo com os resultados acima expostos, a expressão dos genes *SAP* avaliados parece não seguir um perfil padrão nos isolados segundo as condições de exposição, uma vez que há pequenas semelhanças no perfil de expressão nas condições avaliadas, especialmente nos dois isolados provenientes de casos de infecção hospitalar.

Em geral, os isolados de *C. albicans* apresentaram, em comparação com o controle, maior expressão de *SAP* na presença de concentrações inibitórias/efetivas dos antifúngicos e inibidores de proteases. O isolado de *C. albicans* SC5314 foi o isolado de maior expressão relativa de *SAP*, pois foi o que apresentou maior aumento de expressão dos genes *SAP* (↑ até 2200 vezes). O aumento de expressão foi observado na maioria das condições de exposição, salvo raras exceções, como para *SAP2* nas condições de MIC₉₀ ANFO e 0,7 μM PEP, para *SAP7* na condição de MIC₉₀ ANFO e para *SAP9* nas concentrações inibitórias/efetivas.

O isolado de *C. albicans* 257 foi o isolado menos responsivo às substâncias avaliadas, uma vez que apresentou, em comparação com o controle, menores alterações de *SAP* por influência das diferentes condições de exposição. Para a maioria dos genes *SAP* pesquisados, a alteração na expressão foi muito pequena em valores absolutos, entretanto, para o gene *SAP9* observou-se um aumento de até 30 vezes em condições inibitórias/efetivas dos antifúngicos e inibidores.

A maior expressão relativa de *SAP* foi detectada para o gene *SAP7*, que apresentou maior aumento de expressão, em números absolutos e o isolado no qual se observou esse aumento foi *C. albicans* SC5314. A expressão relativa de tal gene em *C. albicans* SC5314 foi extremamente alta (↑ até 2100 vezes em relação ao controle) na presença de concentrações inibitórias/efetivas. Em contrapartida, observou-se expressão relativa muito baixa e até nula para os isolados avaliados na presença de concentrações subinibitórias/subefetivas dos antifúngicos e inibidores de proteases.

Estudo conduzido por Aoki et al. (2012) avaliou a atividade de Sap7 a partir da clonagem de *SAP7* de *C. albicans* SC5314 a fim de investigar a capacidade inibitória de Pepstatina A enquanto inibidor das proteases Sap. Tal estudo revelou que a isoenzima Sap7 codificada pelo gene *SAP7* é insensível à inibição por Pepstatina A e sugeriu que juntas, Sap7, Sap9 e Sap10 possam ter um papel importante na compensação devido à atividade reduzida das outras isoenzimas inibidas pela Pepstatina A. Ainda segundo os autores, é possível que esta capacidade evolutiva de *C. albicans* seja uma contramedida contra inibidores naturais da protease aspártica (AOKI et al., 2012).

Staniszewska et al. (2014) já haviam feito tal observação a respeito da maior expressão de *SAP7* em relação aos demais genes quando avaliaram a expressão de *SAP7*, *SAP8*, *SAP9* e *SAP10* em um isolado de *C. albicans* SC5314 e mutantes produzidos a partir dele cultivados sob influência de soro humano em condições simuladoras de infecções sistêmicas. No estudo

citado, a expressão de *SAP7* foi aumentada ainda mais em mutantes que tiveram perda de *SAP9* e/ou *SAP10*.

No presente trabalho, observou-se indução de expressão de *SAP7* e *SAP9* simultaneamente em *C. albicans* SC5314, entretanto, o aumento de expressão de *SAP7* foi muito superior em valores absolutos do que o aumento de expressão de *SAP9* (↑ até 2100 vezes em *SAP7* e ↑ até 45 vezes em *SAP9*) comparado ao controle. Assim como o isolado padrão citado, *C. albicans* 121 manteve níveis aumentados de expressão em ambos os genes em questão, entretanto o aumento de expressão registrado para *SAP9* foi maior em números absolutos comparado ao controle do que em *C. albicans* SC5314.

C. albicans 121 apresentou expressão de *SAP7* mais de 1000 vezes maior do que a amostra controle na presença da MIC₅₀ de fluconazol e quase 1500 vezes na presença de concentração efetiva de pepstatina A. Tais alterações sugerem a existência de uma importante estratégia no sentido de promover reposição de proteases que influenciem direta ou indiretamente a morfogênese e ofereça uma alternativa de escape à presença de tais substâncias por mudança de morfologia. A observação em questão reforça a ideia de que os fatores associados à virulência são interligados e agem por influência ou influenciando outros processos.

Na maioria das condições de exposição, salvo raras exceções, a expressão relativa de *SAP* em *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 foi menor do que a expressão observada em *C. albicans* SC5314. Como destaque para os resultados obtidos entre os isolados provenientes de casos de infecção hospitalar, *C. albicans* 121 apresentou maior aumento de expressão relativa do que *C. albicans* SC5314 para *SAP2* e *SAP7* na presença de concentração efetiva de pepstatina A e para *SAP9* na presença de concentração inibitória de fluconazol. Essas observações confirmam dados relatados por estudo anterior que apontou tais substâncias como ativadoras de mecanismos associados à virulência, como a secreção de Sapp por indução de expressão (NAGLIK et al., 2008).

C. albicans SC5314 apresentou maior expressão relativa de *SAP2* na presença de concentrações inibitórias/efetivas e subinibitórias/subefetivas de fluconazol, saquinavir e pepstatina A do que os demais isolados. Tal expressão foi aumentada em até 12 vezes na presença da concentração inibitória de fluconazol e até oito vezes na presença de concentração subinibitória de fluconazol, entretanto, a expressão desse gene foi quase nula na presença de anfotericina B, independente da dose. Os isolados provenientes de casos de infecção hospitalar tiveram expressão relativa desse gene mantida ou reduzida na maioria das

condições, exceto para a exposição de *C. albicans* 121 a 0,7 μ M de pepstatina A, condição que apresentou expressão relativa até 35 vezes maior do que a amostra controle.

Copping et al. (2005) avaliaram a expressão relativa de *SAP2* e *SAP9* em isolados clínicos de *C. albicans* cultivados em condições semelhantes às conduzidas no presente trabalho e também observaram aumento de expressão desses genes na presença de concentrações subinibitórias de antifúngicos, especialmente azóis e caspofungina (\uparrow até 24,1 para *SAP2* e até 5,9 vezes para *SAP9*). Apesar da observação de resultados concordantes, discrepâncias nos resultados de estudos conduzidos sobre condições semelhantes também poderiam ocorrer, especialmente devido ao fato de que os fatores associados à virulência são correlacionados para garantir a patogenicidade e podem se comportar de forma variável de acordo com suas necessidades, graças à sua grande capacidade adaptativa (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

A expressão de *SAP2* foi quase nula em condições de subinibição e subefetividade nos isolados de *C. albicans* provenientes de casos de infecção hospitalar, fato que não era esperado, uma vez que segundo observado por Naglik et al. (2003) *SAP2* é o principal gene expresso em testes *in vitro*. Entretanto, devido ao fato de que o método de análise de expressão realizado é comparativo, tais resultados não indicam que a expressão de *SAP2* é baixa, indicam apenas que a expressão de tal gene não foi muito maior ou menor do que a amostra controle e provavelmente não sofre grande influência dos antifúngicos ou inibidores de proteases em subdoses. Outra explicação para o fato, é que segundo estudos anteriores, *SAP2* desempenha um papel funcional na invasão e espalhamento de infecções sistêmicas (DE BERNARDIS et al., 1999; NAGLIK et al., 2004), e as condições de exposição propostas não necessariamente simulam diretamente um processo infeccioso.

Houve redução da expressão de *SAP2* e *SAP4* nos três isolados de *C. albicans* avaliados na presença de $\frac{1}{4}$ MIC₉₀ de anfotericina B (\downarrow até 10 vezes para ambos os genes em *C. albicans* 257). Tal observação também havia sido feita em estudo conduzido por Theberg et al. (2013), no qual houve redução de até cinco vezes no nível de expressão de *SAP4* de isolados clínicos na presença de 1 μ g/mL de anfotericina B. Entretanto, a expressão relativa de *SAP7* e *SAP9* se manteve semelhante ao controle ou apresentou um aumento de até quatro vezes (*SAP9* em *C. albicans* SC5314). Tal observação é condizente com implicações teóricas e estudos anteriores, pois *SAP7* e *SAP9* tem importante ligação com os processos reprodutivos e proliferação celular pelo fato de que *SAP7* influencia indiretamente a morfogênese e *SAP9*

tem papel importante na separação da célula pós-brotamento (ALBRECHT et al., 2006; NAGLIK et al., 2008).

Com algumas exceções, os três isolados de *C. albicans* apresentaram menor expressão de *SAP* nas amostras geradas por exposição aos agentes antifúngicos do que nas amostras geradas por exposição aos inibidores de proteases. Dentre esses resultados, a expressão relativa de *SAP* dos isolados cultivados na presença de fluconazol foi tão maior quanto maior a dose do antifúngico, especialmente para *SAP2*, *SAP4* e *SAP7*. Copping et al. (2005), que também utilizaram diferentes concentrações de fluconazol (0,5 e 1 µg/mL) em isolados de *C. albicans*, observaram aumento relativo na expressão de *SAP2* diretamente relacionado ao aumento da dose do antifúngico adicionado ao cultivo. Assim como Copping et al. (2005), Wu et al. (2000) também observaram regulação positiva para *SAP2* em *C. albicans* na presença de ½ e ¼ da MIC₅₀ de fluconazol, além de aumento na secreção de isoenzimas Sapp em isolados de *C. albicans* expostos ao antifúngico em questão.

No presente trabalho, a expressão relativa de *SAP9* em *C. albicans* S5314 sofreu regulação inversa frente ao fluconazol se comparado aos demais genes *SAP* avaliados, já que a maior expressão relativa do gene na presença de fluconazol foi observada na condição subinibitória (¼ MIC₅₀ FLU). A expressão de *SAP* aumentada em muitas vezes na presença dos antifúngicos pode estar relacionada à indução gênica por reposição de proteases como estratégia de sobrevivência, uma vez que sabe-se que os antifúngicos podem causar prejuízo na filamentação de *C. albicans* por inibir a formação ou interferir nas funções das hifas (BARODKA et al., 2006; GIL; PÉREZ-DIAZ; NOMBELA, 1994; SORGO et al., 2011).

Os genes *SAP2* e *SAP4* têm sido extensivamente estudados em diferentes situações e condições de exposição nos últimos anos, entretanto os genes *SAP7*, *SAP9* e *SAP10* são pouco abordados em estudos de expressão relativa de *SAP*. Indução à expressão de *SAP7* também já havia sido observada por Naglik et al. (2003), que encontrou resposta em modelo de infecção de epitélio humano reconstituído e em isolados de pacientes. Com exceção do gene *SAP2*, que é considerado o principal gene *SAP* expresso *in vitro*, tal comportamento em relação à expressão de *SAP7* foi semelhante ao observado em nosso estudo especialmente para exposição aos agentes antifúngicos. Revisão conduzida por Silva et al. (2014) já havia observado que, em muitos estudos, isolados de *Candida* spp. submetidos à exposição prolongada a drogas antifúngicas, como observado em tratamentos profiláticos, podem apresentar alterações no padrão de expressão de *SAP* e aumento na atividade proteolítica das proteases em questão.

Como já havia sido observado por (PARRA-ORTEGA et al., 2009), o padrão de expressão dos genes *SAP* pode ser modificado de acordo com as condições de exposição e, geralmente, condições de estresse fisiológico podem promover aumento da secreção de Sapp. Assim como já se esperava, a presença de um determinado gene no genoma do microrganismo em estudo não implica necessariamente na expressão do mesmo e em algumas situações observou-se expressão gênica quase nula em comparação à amostra controle.

Isolados de *C. albicans* provenientes de casos de infecção hospitalar que apresentem perfil de sensibilidade diferenciado ou algum nível de resistência aos agentes antifúngicos talvez possam apresentar diferentes perfis de expressão com resultados e interpretações muito interessantes, uma vez, que esses isolados costumam apresentar maiores capacidades adaptativas. Estudos como este, que relacionam também a influência de inibidores de protease como saquinavir e pepstatina A sobre a expressão de *SAP* podem ser considerados pioneiros, pois pouco se falou até hoje sobre a influência desses inibidores sobre a expressão dos genes e secreção dessas enzimas proteolíticas.

À medida que os pesquisadores se familiarizaram melhor com os atributos de virulência de microrganismos que podem se associar de maneira comensal com o hospedeiro, como *Candida* spp., eles também reconheceram que a virulência ocasionalmente expressa por esses microrganismos deva ser uma consequência de múltiplos fatores que funcionam em conjunto.

Sabe-se atualmente, que os fatores associados à virulência são correlacionados a fim de garantir a patogenicidade fúngica, e por este motivo, conhecer a expressão diferencial dos genes *SAP*, avaliar como eles se comportam nessas condições e investigar que outras alterações poderiam ser observadas é extremamente importante para auxiliar na criação de estratégias que visem a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada a infecções fúngicas.

A compreensão desses mecanismos é especialmente importante para a profilaxia de pacientes internados que fazem uso de imunossupressores e/ou indivíduos com o sistema imune debilitado e mais propensos às infecções invasivas por *C. albicans*. Investigações como essas ainda podem auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos direcionados especialmente para o tratamento da candidíase.

5.6 Avaliação do padrão de alteração celular nos isolados de *Candida albicans* mantidos sob influência dos antifúngicos e inibidores de proteases

Os resultados dos ensaios que objetivaram a investigação do padrão de alteração celular provocado por influência das substâncias ativas estão apresentados a seguir.

5.6.1 Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán

A contagem diferencial de células dos isolados de *C. albicans* analisados pela utilização do azul de tripan foi útil como ferramenta auxiliar na compreensão da influência exercida pelos agentes antifúngicos e inibidores de proteases sobre a proliferação celular desses isolados e ainda pode ajudar no direcionamento da investigação dos possíveis mecanismos pelos quais a exposição a essas substâncias pode regular a expressão gênica de *SAP*. Na figura 12 tem-se a imagem da Câmara de Neubauer montada para contagem.

O número de células determinados por contagem, foi aumentado em condições inibitórias/efetivas dos antifúngicos e inibidores para todos os isolados analisados, independente de estarem viáveis, enquanto em condições subinibitórias/subefetivas as alterações são mínimas, exceto para o aumento no número de células mortas desses isolados na presença de concentrações subefetivas de saquinavir e pepstatina A.

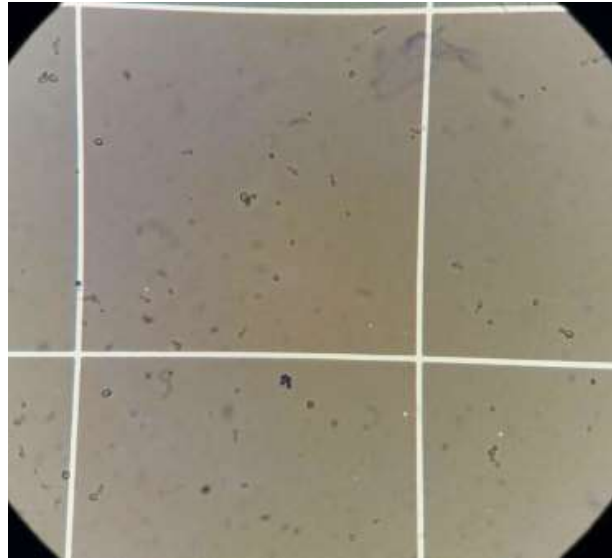


Figura 12 - Contagem celular. Amostra controle de *C. albicans* SC5314 (sem adição de substâncias), observadas por microscopia óptica com azul de tripan 0,2%, células mortas (coradas em azul).

Nos três isolados de *C. albicans* avaliados, o número de células coradas pelo azul de tripan nos cultivos realizados por exposição aos inibidores de proteases foi superior ao número observado por análise da amostra controle e das demais condições de exposição, sendo que o número de células mortas foi tão maior quanto maior a dose de inibidor adicionada ao cultivo. Tal observação condiz com o esperado, uma vez que células de *Candida* spp. com prejuízo da aquisição de nutrientes podem entrar facilmente em apoptose e sabe-se que as proteases Sapp tem função muito importante na digestão de proteínas (HUBE; NAGLIK, 2001). A adição de fluconazol e anfotericina B, em concentrações subinibitórias, não promoveu alterações no número ou formato das células avaliadas por microscopia ótica, fazendo com que elas se assemelhassem muito com a amostra controle, nos três isolados analisados.

5.6.2 Citometria de fluxo

Uma vez que os agentes antifúngicos e inibidores de proteases influenciaram a expressão dos genes *SAP*, especialmente de genes que apresentam funções relacionadas direta ou indiretamente com a estrutura celular, como *SAP7*, que influencia a morfogênese e *SAP9*,

que codifica proteases responsáveis pela integridade celular após brotamento (ALBRECHT et al., 2006; STANISZEWSKA et al., 2015), resolveu-se investigar possíveis mecanismos pelos quais essas substâncias podem atuar sobre as células para promover tais influências sobre a expressão gênica.

As amostras geradas por adição dos agentes antifúngicos e inibidores de proteases apresentaram resposta muito semelhante ao controle na avaliação da complexidade celular e granulosidade por citometria (FIGURAS 13, 14 e 15).

O perfil de distribuição das células na análise citométrica, com avaliação da complexidade celular, granulosidade e atividade de morte demonstrou que as alterações de expressão gênica experimentadas pela presença dos antifúngicos e inibidores de proteases talvez não tenha relação direta com a estrutura e o metabolismo celular, uma vez que mesmo quando usadas nas concentrações inibitórias/efetivas, as substâncias não promoveram variação no tamanho celular ou desvio de fluorescência compatível com alta atividade de morte.

A aplicação de citometria de fluxo para sondar a superfície microbiana tem sido utilizada em menor grau do que para a coleta de células de mamíferos em pesquisas de imunologia e câncer (WAROLIN; ESSMANN; LARSEN, 2005; WOLFF et al., 2000). No entanto, a citometria de fluxo tem a capacidade de interrogar as superfícies de um grande número de microrganismos com alta velocidade. Isso significa que diferenças, relativamente pequenas, nos parâmetros de fluorescência na faixa de 3-5% dentro de uma experiência controlada individual são significativas, já que a maioria das experiências examina 10.000 células de levedura, assim como conduzidos nos experimentos do presente trabalho (WAROLIN; ESSMANN; LARSEN, 2005).

Estudo conduzido por Mercure et al. (1996), que objetivou criar um procedimento, baseado na citometria de fluxo para determinação de sorotipos de *C. albicans*, relatou que diferenças nos padrões de intensidade de fluorescência foram observadas apenas quando os isolados foram avaliados como diferentes por métodos de tipificação genotípica, o que corrobora com os resultados observados no presente trabalho, pois o cultivo dos isolados em diferentes condições de exposição imprime apenas variações fenotípicas aos mesmos. Segundo o estudo citado, os padrões de fluorescência essencialmente idênticos observados em linhagens idênticas de um mesmo paciente foram evidências adicionais que sustentam a confiabilidade do procedimento de citometria de fluxo.

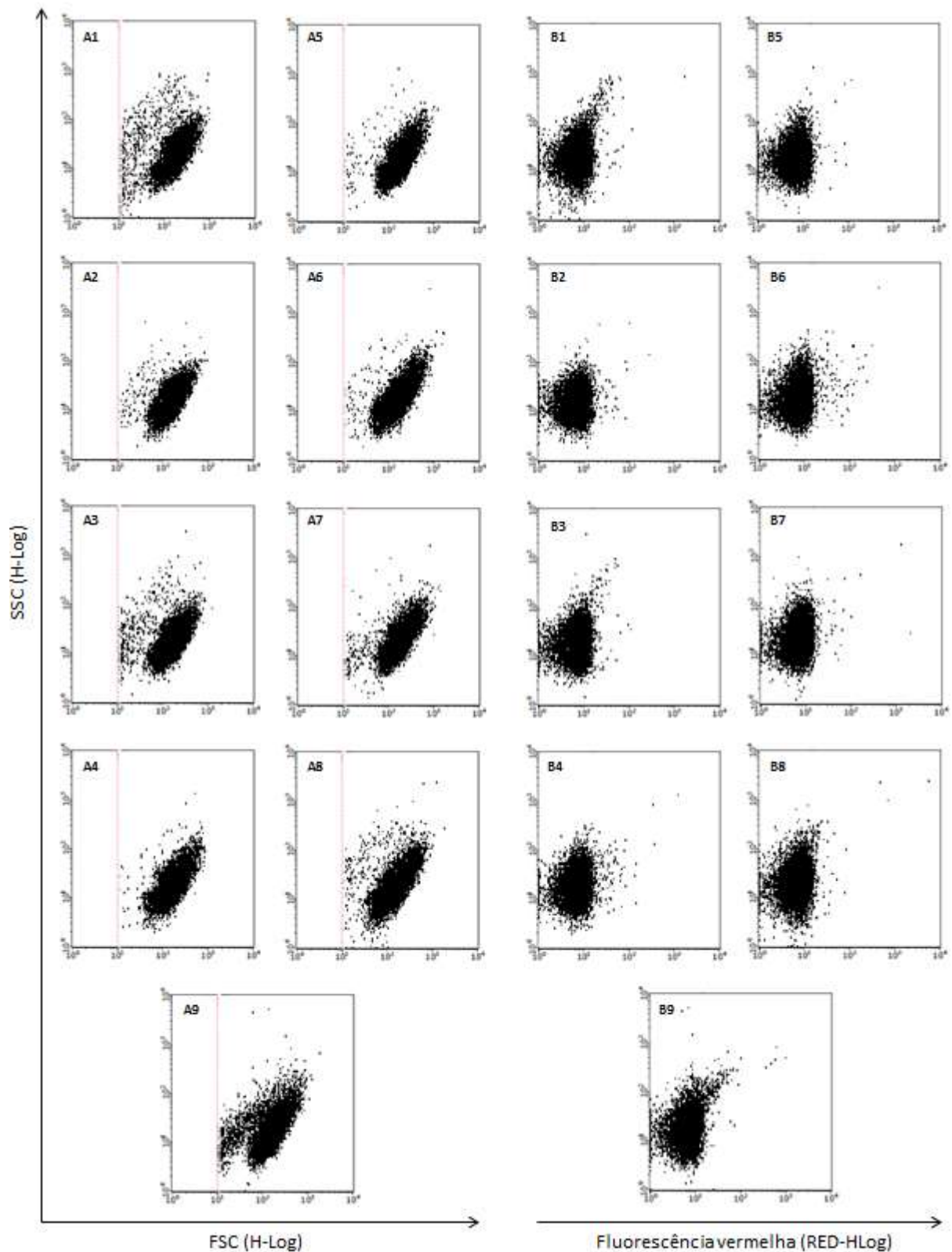


Figura 13 - Análise citométrica de *C. albicans* SC5314, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

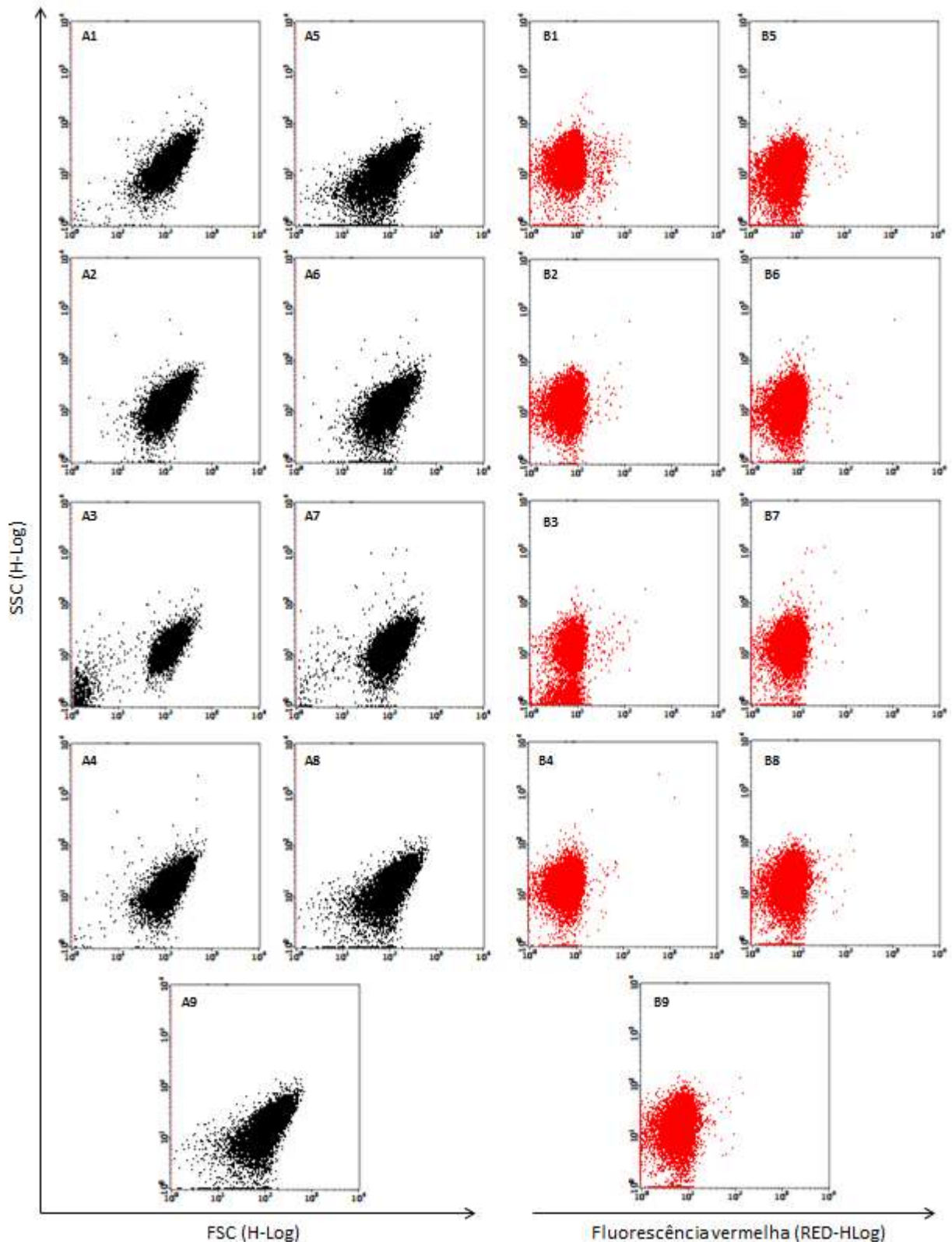


Figura 14 - Análise citométrica de *C. albicans* 121, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 μ M de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 μ M de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de $\frac{1}{4}$ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de $\frac{1}{4}$ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 μ M de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 μ M de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

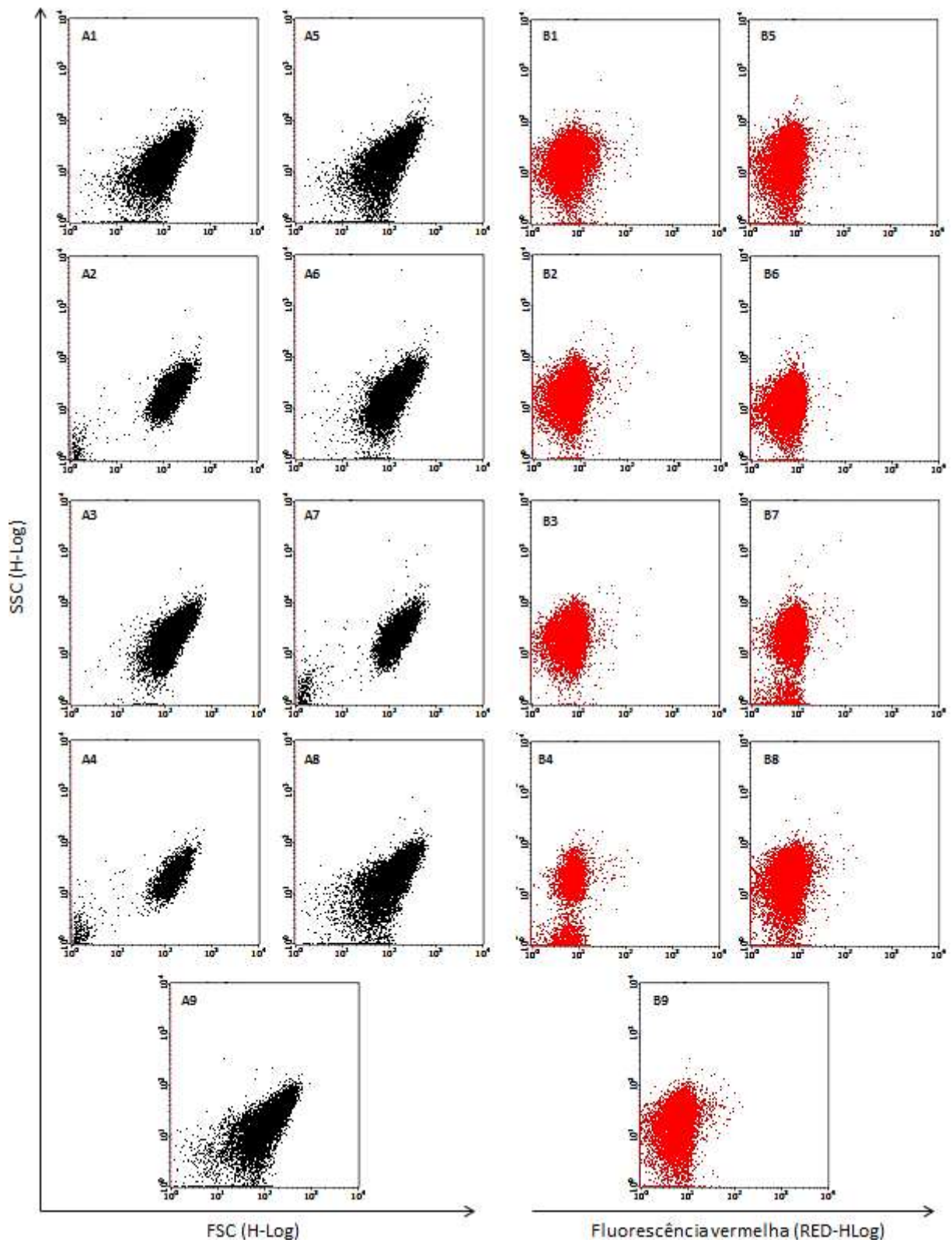


Figura 15 - Análise citométrica de *C. albicans* 257, por utilização de iodeto de propídio. A1-9: Complexidade celular (SSC) versus tamanho (FSC), B1-9: Complexidade celular (SSC) versus fluorescência vermelha (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 μM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 μM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 μM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 μM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

Os histogramas ilustrados nas figuras 16, 17 e 18 representam a distribuição de células dos isolados de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257, cultivados nas diferentes condições de exposição, quanto ao desvio de fluorescência referente à atividade de morte em relação ao número de células avaliado. Os gráficos obtidos são muito semelhantes entre si e especialmente muito semelhantes ao gráfico representativo da amostra controle (sem adição de substâncias).

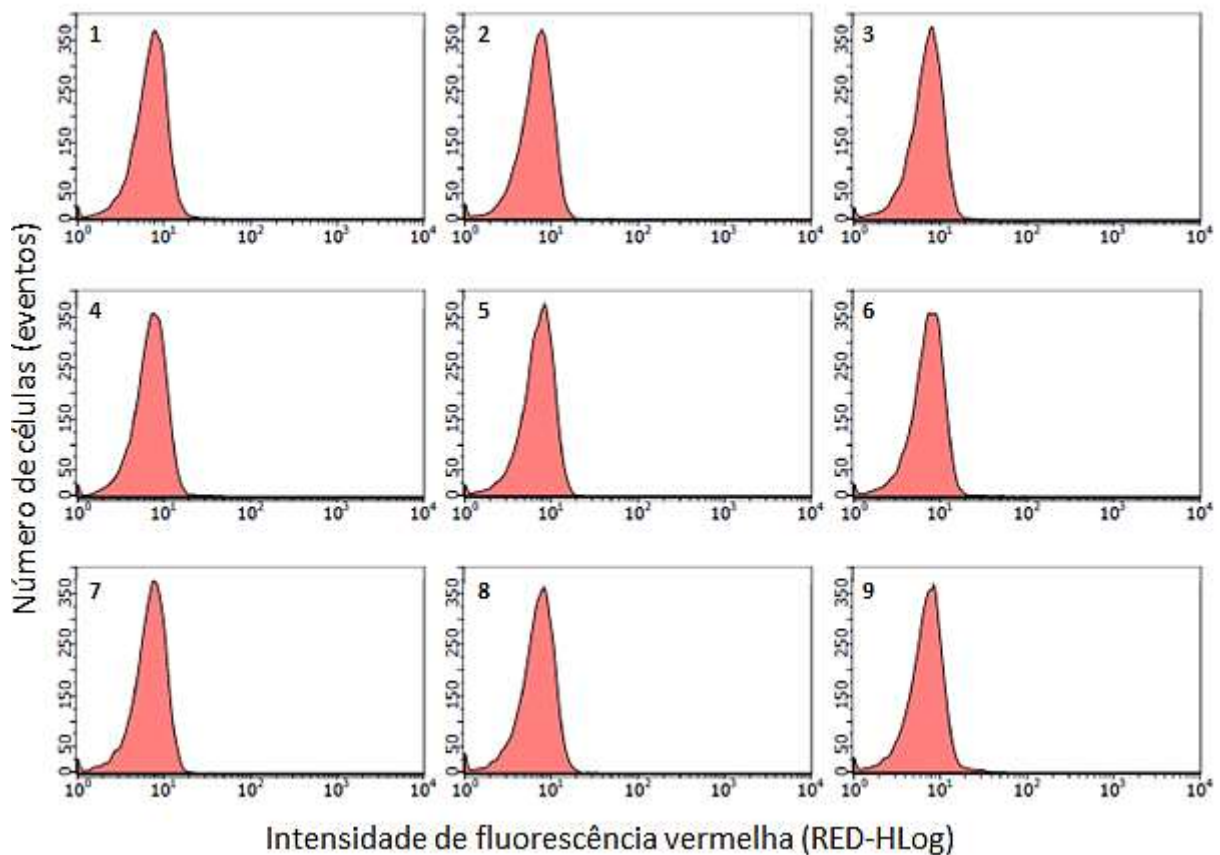


Figura 16 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* SC5314 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

Os histogramas representativos da plotagem do número de eventos pela intensidade de fluorescência vermelha de *C. albicans* SC5314, demonstrados na figura acima, são muito semelhantes entre as condições de exposição, e por este motivo, a observação visual dos resultados apresentados pela análise desse isolado não permite falar a respeito de diferenças entre as amostras.

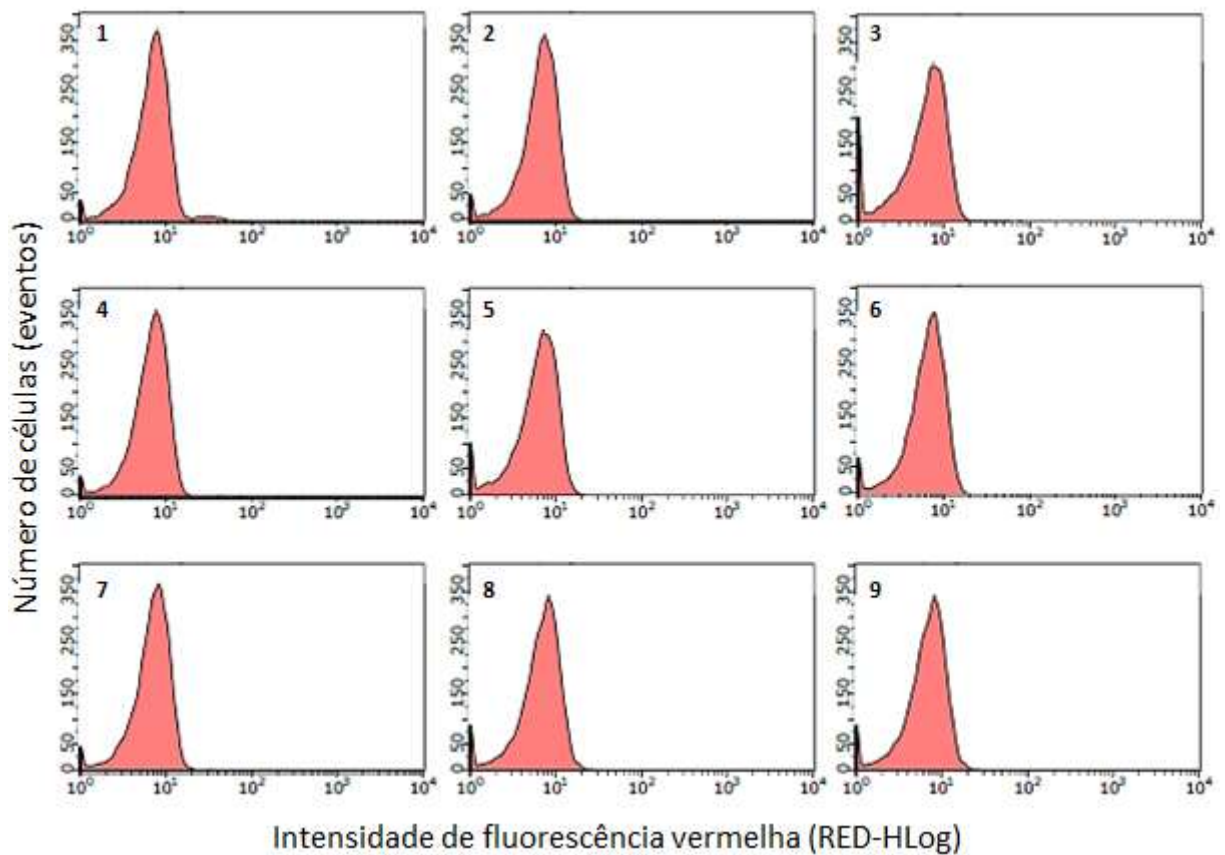


Figura 17 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* 121 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 µM de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 µM de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 µM de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 µM de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

Em *C. albicans* 121 pequenas mudanças no perfil de histogramas representativos das diferentes condições de exposição foram observadas. Em alguns casos, como na presença de ¼ MIC₅₀ de fluconazol (5) houve alteração no número de eventos, enquanto em outros como na presença de 0,28 µM de saquinavir (3) houve aumento da área sob a base do gráfico, além de redução no número de eventos. A observação visual também permite dizer que o histograma gerado após cultivo na presença de pepstatina A em concentrações subinibitórias (8) é praticamente idêntico ao histograma de referência (amostra controle: 9).

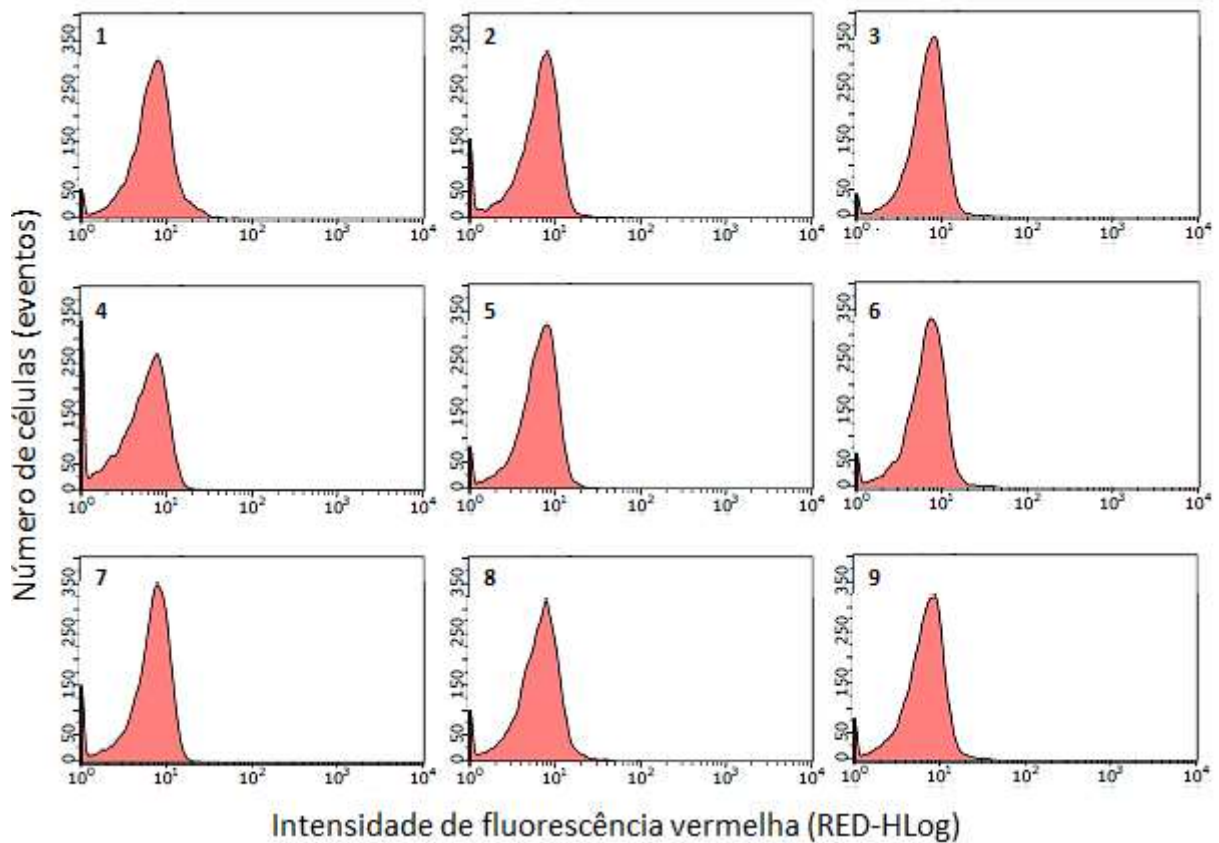


Figura 18 - Histograma gerado pela avaliação dos cultivos por citometria de fluxo. O histograma traça o número de células (eventos) de *C. albicans* 257 no eixo vertical contra a fluorescência relativa dessas células (RED-HLog). 1: Cultivo na presença da MIC₅₀ de fluconazol, 2: Na presença da MIC₉₀ de anfotericina B, 3: Na presença de 0,28 μ M de Saquinavir, 4: Na presença de 0,7 μ M de Pepstatina A, 5: Cultivo na presença de $\frac{1}{4}$ MIC₅₀ de fluconazol, 6: Na presença de $\frac{1}{4}$ MIC₉₀ de anfotericina B, 7: Na presença de 0,01 μ M de Saquinavir, 8: Na presença de 0,145 μ M de Pepstatina A, 9: Controle, cultivo na ausência das substâncias.

Assim como no isolado apresentado anteriormente, foram observadas pequenas mudanças no perfil de histogramas representativos das diferentes condições de exposição em *C. albicans* 257. Comparado ao histograma da amostra controle (9), houve redução no número de eventos na presença da MIC₅₀ de fluconazol (1) e aumento da área sob o gráfico além de redução no número de eventos na presença de 0,7 μ M de pepstatina A (4).

Baseado em observações visuais, não é possível afirmar, de fato, que mudanças no pico ou na área sob o gráfico estejam relacionadas à maior capacidade adaptativa dos isolados de *C. albicans*. Apesar de a citometria de fluxo ser conhecida como uma metodologia auxiliar muito útil para emprego em estudos que possibilitem desvendar possíveis mecanismos de ação de fármacos, a análise dos isolados cultivados nas nove condições de exposição propostas para este trabalho não permitiu relacionar a influência dos agentes antifúngicos e inibidores de proteases sobre a expressão dos genes *SAP* avaliados.

5.6.3 Determinação do teor de ergosterol

Assim como proposto pela utilização da citometria de fluxo, a determinação do teor de ergosterol também permite contribuir na elucidação dos mecanismos de influência das substâncias ativas usadas nesse trabalho, uma vez que se sabe que o fluconazol age por bloqueio da via de biossíntese de ergosterol, inibindo especificamente, no caso de leveduras, a enzima lanosterol 14- α - demetilase. Assim, através da quantificação do ergosterol a partir dos cultivos realizados, pode-se investigar a possibilidade de que as demais substâncias ativas possam agir por redução do ergosterol de membrana como o fluconazol o faz.

As curvas de doseamento do ergosterol para cada isolado de *C. albicans* estão apresentadas nas figuras 19, 20 e 21. Dois gráficos foram montados para cada isolado, sendo um para as condições inibitórias/efetivas e outro para as subinibitórias/subefetivas. O controle sem adição de antifúngicos ou inibidores de proteases está apresentado em ambos os gráficos.

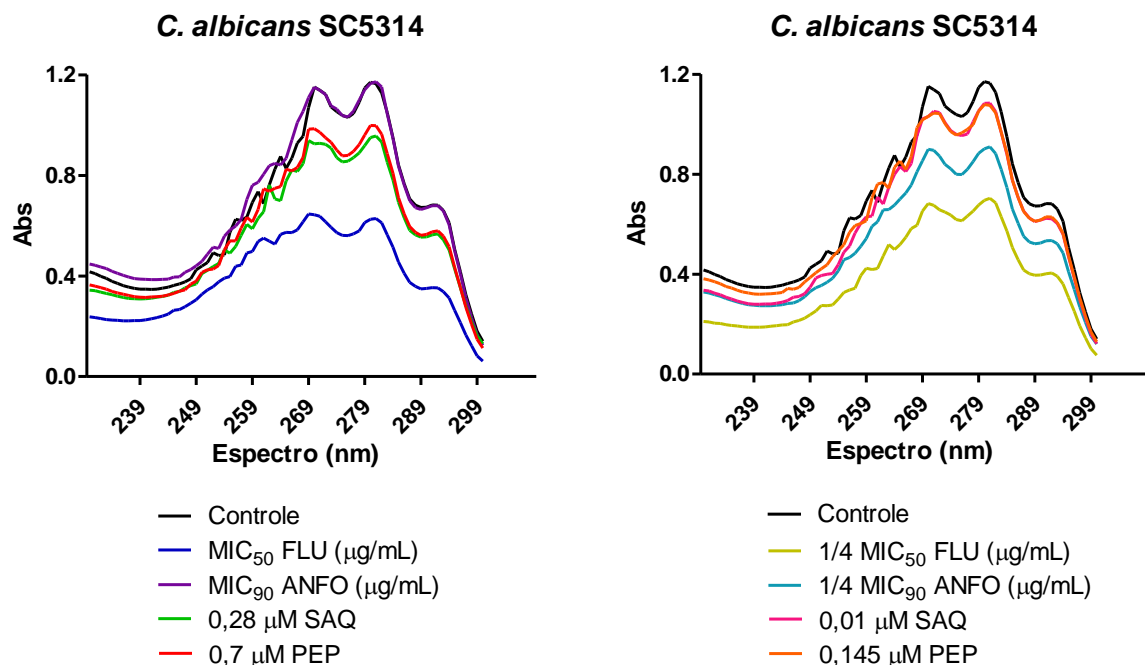


Figura 19 - Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol apresentado pelo isolado de *C. albicans* SC5314 em nove condições de exposição relativas à presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de proteases em condições inibitórias/subinibitórias e efetivas/subefetivas, conforme discriminado na figura. Curvas elaboradas no Graph Pad Prism®.

Nota: As nove condições estão discriminadas na legenda figura. FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina B; SAQ: Saquinavir; PEP: Pepstatina A. A quantidade do ergosterol é percebida pela altura dos picos, pois quanto mais alta a linha com os picos, maior o teor de ergosterol da amostra.

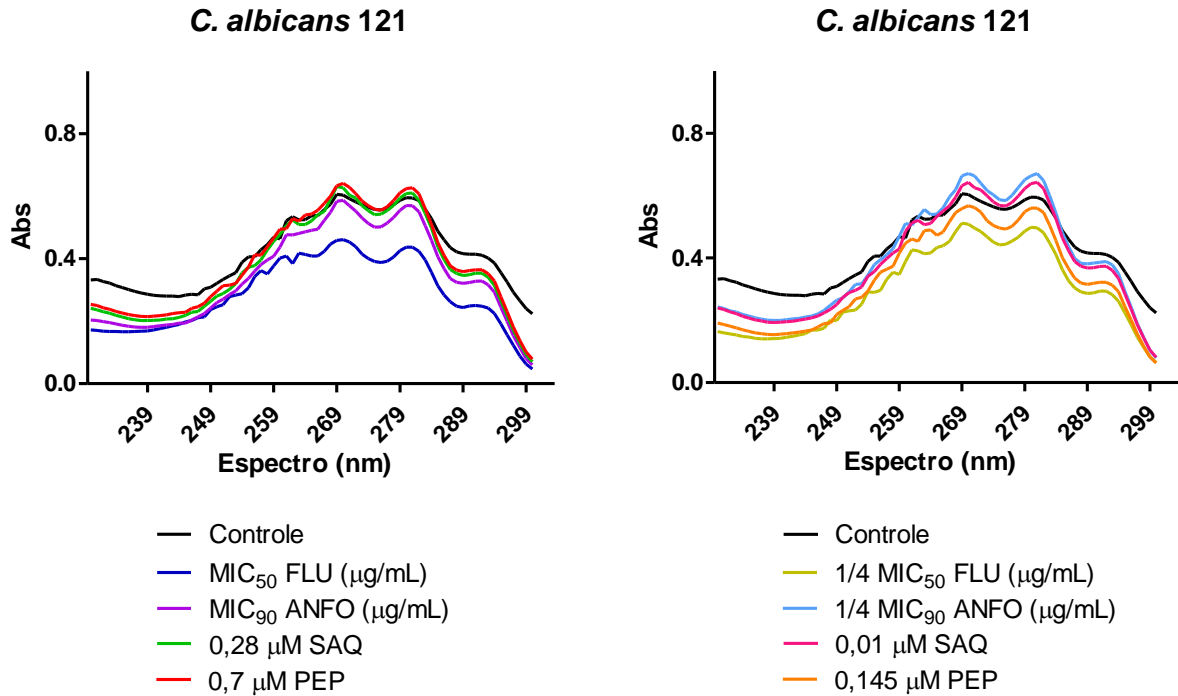


Figura 19 - Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol apresentado pelo isolado de *C. albicans* 121 em nove condições de exposição relativas à presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de em condições inibitórias/subinibitórias e efetivas/subefetivas, conforme discriminado na figura. Curvas elaboradas no Graph Pad Prism®.

Nota: As nove condições estão discriminadas na legenda figura. FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina B; SAQ: Saquinavir; PEP: Pepstatina A. A quantidade do ergosterol é percebida pela altura dos picos, pois quanto mais alta a linha com os picos, maior o teor de ergosterol da amostra.

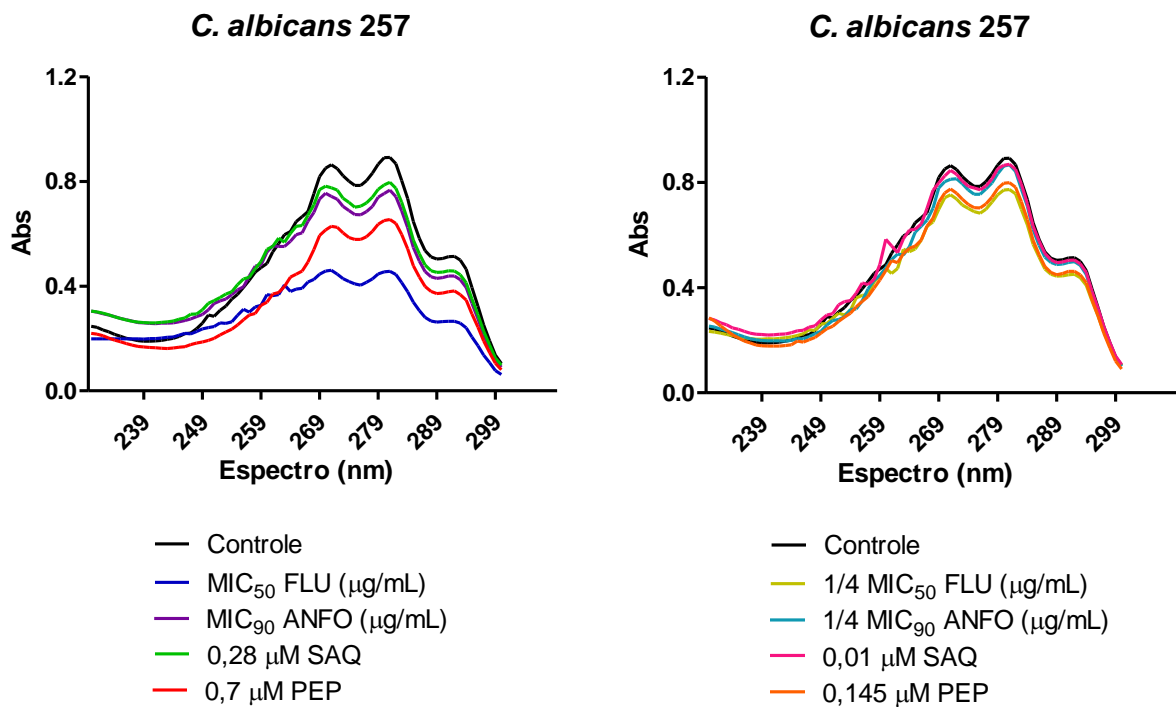


Figura 20 - Perfil espectrofotométrico UV (240 a 300 nm) do esterol apresentado pelo isolado de *C. albicans* 257 em nove condições de exposição relativas à presença e ausência de agentes antifúngicos e inibidores de em condições inibitórias/subinibitórias e efetivas/subefetivas, conforme discriminado na figura. Curvas elaboradas no Graph Pad Prism®.

Nota: As nove condições estão discriminadas na legenda figura. FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina B; SAQ: Saquinavir; PEP: Pepstatina A. A quantidade do ergosterol é percebida pela altura dos picos, pois quanto mais alta a linha com os picos, maior o teor de ergosterol da amostra.

A análise dos gráficos, por observação visual e apoio estatístico por realização da ANOVA e teste de Turkey para comparação de médias, com 99% de confiança, aponta diferenças significativas no teor de ergosterol do grupo de amostras avaliadas para cada isolado ($p\text{-value} < 0,0001$). Essa análise permite inferir que o teor de ergosterol presente nos isolados de *C. albicans* é diferente, mesmo ao se considerar apenas a amostra controle, pois o teor de ergosterol de uma amostra é tão maior quanto mais alta for a linha com os picos no gráfico.

Pode-se dizer que o teor de ergosterol dos isolados é realmente menor na presença da MIC₅₀ de fluconazol (linha azul escura) do que na ausência de ativos (amostra controle). Nas demais condições de exposição, pode-se observar alteração do teor de ergosterol, sendo que dentre as principais alterações observados no perfil espectrofotométrico apresentado, a redução dos picos com consequente redução do teor de ergosterol foi detectada na maioria das amostras.

Em *C. albicans* SC5314 as amostras que apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) foram os cultivos na presença de MIC₅₀ e ¼ MIC₅₀ de fluconazol e na presença de ¼ MIC₉₀ de anfotericina B. Em *C. albicans* 121 a situação foi semelhante ao observado para as condições na presença de fluconazol, entretanto, não houve diferença significativa na presença de anfotericina B e sim na presença de 0,145 µM de pepstatina A. Assim como nos isolados citados, em *C. albicans* 257 houve diferença significativa na presença de MIC₅₀ de fluconazol, mas o mesmo não foi observado para a condição de subinibição. Nesse isolado também houve diferença significativa na presença de 0,7 µM de pepstatina A. Apesar de a observação visual dos picos sugerir redução do teor de ergosterol em algumas das amostras não citadas, a análise estatística não identificou diferença significava ($p > 0,05$) entre as demais condições de exposição e a amostra controle.

Os três isolados de *C. albicans* avaliados nesse estudo são sensíveis ao fluconazol, portanto o perfil espectrofotométrico dos mesmos na presença desse antifúngico em concentrações inibitórias apresenta redução semelhante do teor desse importante esterol de membrana. Isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol geralmente apresentam, em testes como esse, um perfil espectrofotométrico semelhante à amostra não tratada (controle), pois tal resistência é, em grande parte, o resultado de uma diminuição da sensibilidade da lanosterol 14 α -demetilase aos efeitos inibitórios do fluconazol (OROZCO et al., 1998; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

A observação visual dos gráficos de percentual de produção de ergosterol correspondentes às análises dos três isolados de *C. albicans* permite sugerir que *C. albicans* SC5314 apresente maior teor de produção de ergosterol, em geral, uma vez que a quantificação do ergosterol nas amostras geradas pelo cultivo do isolado em questão foi superior, em números absolutos, à quantificação observada nos outros isolados. Diferença significativa de teor de ergosterol foi observada para os três isolados apenas na presença da MIC₅₀ de fluconazol, assim como observado nas curvas de detecção de ergosterol.

O percentual de produção de ergosterol, principal esterol da membrana fúngica, alvo dos compostos triazólicos (MORSCHHÄUSER, 2002) e de terapias auxiliares em desenvolvimento (KARACA GENÇER et al., 2017), que foi determinado através do cálculo anteriormente exposto no qual se empregam os dados referentes à extração de ergosterol e do esterol intermediário para cada um dos isolados de *C. albicans*, variou nas condições de exposição analisadas. A análise preliminar mostrou, com 95% de confiança, diferença estatística significativa apenas em *C. albicans* SC5314 ($p = 0,0139$) e *C. albicans* 257 ($p =$

0,0244), pois o *p-value* de *C. albicans* 121 segundo *Kruskal-Wallis* foi igual a 0,5551, entretanto a realização do pós-teste Bonferroni detectou diferença estatística significativa para a condição de exposição de MIC₅₀ FLU em *C. albicans* 121 (FIGURA 22).

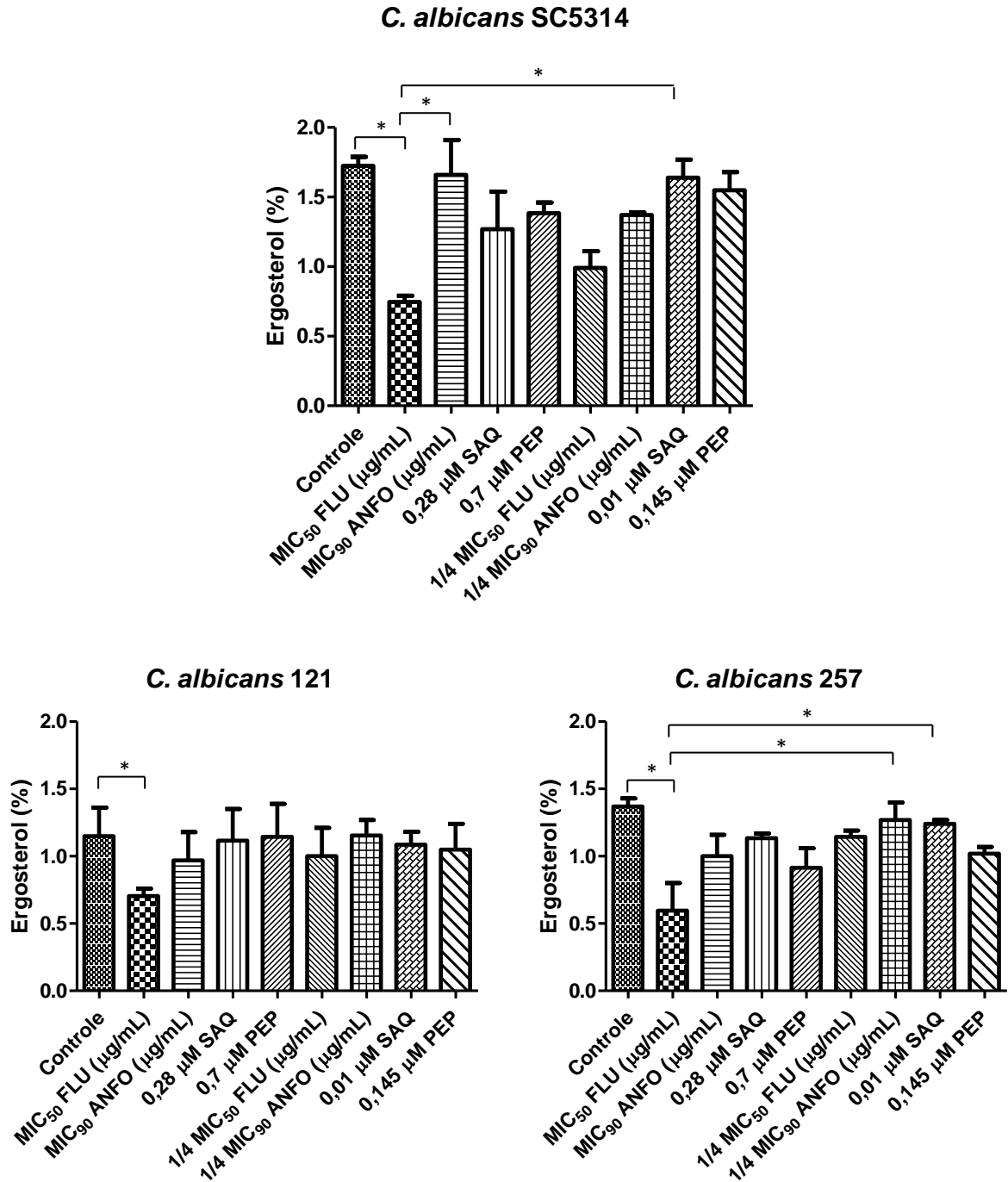


Figura 21 - Percentual de ergosterol no sedimento obtido de *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121 e *C. albicans* 257 nas nove condições de exposição propostas, conforme discriminado na figura. Os dados foram apresentados como média + desvio padrão.

Nota: FLU: Fluconazol; ANFO: Anfotericina B; SAQ: Saquinavir; PEP: Pepstatina A.

C. albicans 121, apesar de ter sido classificado nesse estudo como um isolado sensível ao fluconazol ($MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/mL}$), talvez possa apresentar menor sensibilidade à inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase, uma vez que o percentual de ergosterol produzido na presença de fluconazol tanto em condições inibitórias quanto subinibitórias é estatisticamente semelhante ao controle ($p > 0,05$). O percentual de produção de ergosterol dos isolados de *C. albicans* SC5314 e *C. albicans* 257 na presença da MIC_{50} de fluconazol, foi significativamente menor do que o percentual apresentado pela amostra controle e apresentou maior redução em valores percentuais do que a mesma condição em *C. albicans* 121. Em ambos os isolados provenientes de casos de infecção hospitalar, o percentual apresentado na condição citada foi significativamente menor do que na presença de $0,01 \mu\text{M}$ de saquinavir.

A redução do teor de ergosterol na presença de fluconazol, especialmente na presença de concentrações inibitórias do mesmo, já era esperada, uma vez que o fluconazol atua por bloqueio da biossíntese de ergosterol ao promover inibição da enzima 14- α -lanosterol demetilase em leveduras como *Candida* spp. (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009; PFALLER, 2012). Nas demais condições de exposição, reduções significativas dos picos com consequente redução do teor de ergosterol não foram detectadas como observado para o cultivo na presença de fluconazol, portanto, não se pode afirmar que exista algum tipo de relação entre a alteração de expressão de *SAP* e a quantidade de ergosterol presente na membrana celular.

Estudo conduzido por Rocha et al. (2017) avaliou a resistência de *C. albicans* aos azólicos, por doseamento de ergosterol, medição da atividade de bombas de efluxo e superexpressão gênica como tentativa de elucidação dos mecanismos de resistência e não encontrou diferenças significativas entre linhagens sensíveis e resistentes, mesmo após exposição a concentrações subinibitórias ($\frac{1}{4} MIC_{50}$) de fluconazol. Segundo o estudo citado, a pré-exposição ao fluconazol ($\frac{1}{4} MIC_{50}$) não desencadeou alterações nos esteróis celulares, possivelmente, por superprodução de ergosterol em resposta a uma superexpressão genética para antagonizar a ação desses azóis, estabilizando o conteúdo final de ergosterol e a consequente viabilidade de células fúngicas (WHITE, 1997). Essa hipótese parece razoável, mas outros estudos são necessários para melhor compreender a dinâmica da biossíntese do ergosterol e adaptação em isolados de *C. albicans* (LV; YAN; JIANG, 2016).

Karaca et al. (2017) avaliaram a atividade anti-*Candida* de novos híbridos triazólicos por determinação do teor de ergosterol e em seus estudos eles observaram que os novos

compostos apresentaram redução do percentual de ergosterol semelhante ao fluconazol (fármaco eleito como controle do experimento). Tais resultados evidenciaram redução percentual de ergosterol quase duas vezes maior do que observado no presente trabalho. Redução dos percentuais de produção de ergosterol na presença de fluconazol semelhantes aos observados nesse trabalho foi verificada por Aneja et al. (2016) em seu estudo, no qual dois compostos bioativos selecionados durante a pesquisa apresentaram potencial atividade anti-*Candida* por promoção de alterações em estruturas celulares de isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol, detectadas pela redução na produção de ergosterol como resultado da inibição de sua biossíntese e consequente perda de integridade e viabilidade celular.

Muitos estudos empregam os métodos de determinação do teor de ergosterol como ferramenta para a avaliação do efeito antifúngico de moléculas com potencial atividade contra *Candida* spp. além de auxiliar na elucidação dos mecanismos pelos quais elas atuam (ANEJA et al., 2016; ANSARI; FATIMA; HAMEED, 2016; KARACA GENÇER et al., 2017; KHAN et al., 2010a; PEIXOTO et al., 2017; RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013; RAJPUT et al., 2013). Agentes antifúngicos que agem diretamente na biossíntese de um componente estrutural de membrana tão importante como o ergosterol propiciam a formação de um esterol tóxico, que aumenta a fluidez da membrana, permitindo a entrada de outros compostos (SORGO et al., 2011) e resultando em perda de integridade, paralisação do crescimento e morte celular.

O interesse em se trabalhar com exposição de isolados de *C. albicans* a agentes antifúngicos e inibidores de proteases surgiu, principalmente, a partir da análise de relatos que apontam o uso excessivo de antifúngicos, especialmente fluconazol, como tratamento profilático em indivíduos suscetíveis como pacientes transplantados ou internados em unidades de terapia intensiva (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; VAZQUEZ et al., 1993). Estudos de vigilância epidemiológica que relataram redução na frequência de candidíase orofaríngea em pacientes tratados com inibidores de protease anti-HIV-1, devido à inibição das proteases de *Candida* spp., mesmo persistindo a depressão do sistema imunológico (BACKMAN; MONOD; DANIELSON, 2006) também foram considerados importantes nesse sentido. Tais relatos nortearam o presente trabalho, que encontrou resultados compatíveis com o esperado, especialmente no sentido de confirmar a importância da regulação dos genes *SAP* na manutenção da virulência de *C. albicans*.

Baseado em relatos de estudos de vários pesquisadores, acredita-se que possa haver maior relação entre a regulação da expressão de *SAP* e a alteração de complexidade celular ou

atividade de morte ou o doseamento do ergosterol de membrana em isolados classificados como resistentes aos antifúngicos, especialmente àqueles da classe dos azólicos como resultado do desenvolvimento de mecanismos adaptativos (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 1999; COPPING, 2005; LIAN; LIU, 2007).

Embora seja estimulante, a procura por respostas para as relações entre efeitos, processos bioquímicos normais e mecanismos associados à virulência, não é tão simples, entretanto, pode direcionar os avanços no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos especialmente baseados na necessidade de uma compreensão completa da virulência microbiana, pois a descoberta de agentes que interferem diretamente com os fatores de virulência oferece uma abordagem interessante para o controle de agentes infecciosos e pode dar origem a novos tipos de antimicrobianos.

6 CONCLUSÃO

Os isolados de *Candida albicans* avaliados no presente trabalho identificados como *C. albicans* SC5314, *C. albicans* 121, *C. albicans* 257 se mostraram sensíveis aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Os isolados em questão apresentaram maior expressão relativa de *SAP* na presença de concentrações inibitórias/efetivas das substâncias, sendo ainda maior para os inibidores de proteases do que para os antifúngicos.

A expressão de *SAP* em *C. albicans* SC5314 foi observada em quase todas as condições de exposição avaliadas, embora tal quadro não tenha se repetido nos demais isolados. *SAP7* foi o gene de maior expressão relativa e *C. albicans* SC5314 foi o isolado de maior expressão relativa de *SAP*.

As avaliações de complexidade celular, granulabilidade e atividade de morte por citometria sugerem que as alterações de expressão gênica experimentadas pela presença dos antifúngicos e inibidores de proteases não tenham relação direta com a estrutura e o metabolismo celular.

O teor de ergosterol dos isolados foi menor em concentração inibitória de fluconazol e tal redução em relação à amostra controle já era esperada devido à ação do fluconazol sobre a biossíntese do ergosterol. Entretanto, redução significativa do teor de ergosterol não foi detectada em todas as amostras, o que permite inferir que a alteração de expressão de *SAP* observada nessas condições não deve ter relação direta com a quantidade de ergosterol presente na membrana celular.

REFERÊNCIAS

ABU-ELTEEN, K. H.; ELKARMI, A. Z.; HAMAD, M. Characterization of phenotype-based pathogenic determinants of various *Candida albicans* strains in Jordan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 229–236, 2001.

AGARWAL, R. R. et al. Epidemiology of Invasive Fungal Infections at Two Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units Over a 12-Year Period (2000-2011). **Global Pediatric Health**, v. 4, p. 2333794X1769668, 30 jan. 2017.

ALBRECHT, A. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of *Candida albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 688–694, 13 jan. 2006.

ALP, S. et al. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 498–505, ago. 2015.

ANEJA, B. et al. Effect of novel triazole–amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: in vitro and in vivo studies. **Org. Biomol. Chem.**, v. 14, n. 45, p. 10599–10619, 2016.

ANSARI, M. A.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Anticandidal Effect and Mechanisms of Monoterpenoid, Perillyl Alcohol against *Candida albicans*. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162465, 2016.

AOKI, W. et al. *Candida albicans* Possesses Sap7 as a Pepstatin A-Insensitive Secreted Aspartic Protease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32513, 27 fev. 2012.

ARAÚJO, R.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal Resistance: Cellular and Molecular Mechanisms. In: AHMAD, I.; OWAIS, M.; SHAHID, M.; AQIL, F. (Ed.). . **Combating Fungal Infections: Problems and remedy**. London: Springer Heidelberg Dordrecht, 2010. p. 125–46.

ARENDRUP1, M. C. et al. EUCAST E.DEF 7.3.1 January 2017 EUCAST antifungal MIC method for yeasts. n. January, p. 1–21, 2017.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. et al. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3332–7, out. 1999.

BACKMAN, D.; MONOD, M.; DANIELSON, U. H. Biosensor-Based Screening and

Characterization of HIV-1 Inhibitor Interactions with Sap 1, Sap 2, and Sap 3 from *Candida albicans*. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 2, p. 165–175, 16 mar. 2006.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.

BARCHIESI, F. et al. Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1578–1584, 1 jun. 2000.

BARODKA, V. M. et al. Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans*. **Journal of translational medicine**, v. 4, p. 46, 2006.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Types and families of endopeptidases. **Biochemical Society transactions**, v. 19, n. 3, p. 707–15, ago. 1991.

BENNETT, J. E. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 11, p. 1154–9, 14 set. 2006.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1773–7, maio 2004.

BENNETT, R. J.; TURGEON, B. G. Fungal Sex: The Ascomycota. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–28, 13 out. 2016.

BERGQUIST, P. L. et al. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 13, n. 3, p. 389–401, maio 2009.

BISHOP, P. D. et al. Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6, p. 3536–40, jun. 1981.

BORATE, H. B. et al. Novel hybrids of fluconazole and furanones: Design, synthesis and antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 16, p. 4873–4878, ago. 2011.

BORELLI, C. et al. X-ray structures of Sap1 and Sap5: Structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 72, n. 4, p. 1308–1319, 2 abr. 2008.

BORG-VON ZEPELIN, M. et al. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 543–554, abr. 1998.

BORG-VON ZEPELIN, M. et al. HIV-Protease Inhibitors Reduce Cell Adherence of *Candida albicans* Strains by Inhibition of Yeast Secreted Aspartic Proteases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 5, p. 747–751, nov. 1999.

BORG-VON ZEPELIN, M. et al. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. **AIDS (London, England)**, v. 16, n. 9, p. 1237–44, 2002.

BORMAN, A. M. et al. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 3, p. 967–72, mar. 2013.

BRAGA-SILVA, L. A. et al. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 765–770, ago. 2009.

BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 3, p. 170–177, 2012.

BREIVIK, O. N.; OWADES, J. L. Yeast Analysis, Spectrophotometric Semimicrodetermination of Ergosterol in Yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 360–363, maio 1957.

BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657–662, 4 jun. 2009.

BUU, L.-M.; CHEN, Y.-C. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 22, 15 mar. 2014.

CAGGIANO, G. et al. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **BioMed research international**, v. 2015, n. January 1998, p. 256580, 2015.

CAHAGNIER B. Qualite microbiologique des grains et teneurs en ergosterol. **Industries Alimentaires et Agricoles**, v. 1, p. 5–16, 1988.

CALDERONE, R.; ODDS, F. C.; BOEKHOUT, T. *Candida albicans*: fundamental research on an opportunistic human pathogen. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 7, p. 971–2, out. 2009.

CALVO, B. et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **The Journal of infection**, v. 73, n. 4, p. 369–74, out. 2016.

CARIDE, E. et al. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virus genes**, v. 23, n. 2, p. 193–202, 2001.

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. 971–6, mar. 2000.

COLOMBO, A. L. et al. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical mycology**, v. 41, n. 3, p. 235–9, jun. 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, n. 8, p. 2816–2823, 1 ago. 2006.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, maio 2013.

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.

COOPER, D. A.; MERIGAN, T. C. Clinical treatment. **AIDS (London, England)**, v. 10, p. S133–134, 1996.

COPPING, V. M. S. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 645–654, 8 abr. 2005.

CORNISTEIN, W. et al. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, jun. 2013.

COSTA, C. R. et al. Effects of Antifungal Agents in Sap Activity of *Candida albicans*

Isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 91–98, fev. 2010a.

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, jun. 2010b.

COSTA, E. et al. Potential virulence factors of *Candida* spp. isolated from clinical and food sources. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 3, p. 240–241, jul. 2010c.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, jul. 2015.

CURVELO, J. A. D. R. et al. Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on *Candida albicans* biological processes: a therapeutic alternative? **Archives of oral biology**, v. 59, n. 9, p. 928–37, set. 2014.

CZECHOWSKA, K.; JOHNSON, D. R.; VAN DER MEER, J. R. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 3, p. 205–12, jun. 2008.

DAVEY, H. M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. **Methods in Cell Science**, v. 24, n. 1/3, p. 91–97, 2002.

DAVIES, D. R. The structure and function of the aspartic proteinases. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 19, n. 1, p. 189–215, jun. 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, jan. 1999.

DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; SANDERS, E. A. M.; BOGAERT, D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1675, p. 20140294, 19 ago. 2015.

DEEKS, S. G. et al. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. **Jama**, v. 277, n. 2, p. 145–153, 1997.

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. **The protein journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, jan. 2013.

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, n. 2, p. 145–52, ago. 2009.

DUNKEL, N. et al. Control of morphogenesis, protease secretion and gene expression in *Candida albicans* by the preferred nitrogen source ammonium. **Microbiology**, v. 160, n. Pt_8, p. 1599–1608, 1 ago. 2014.

EID, M. et al. New renin inhibitors homologous with pepstatin. **The Biochemical journal**, v. 197, n. 2, p. 465–71, 1 ago. 1981.

EISENHABER, B. et al. 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, n. 2, p. 243–253, mar. 2004.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. **Eucast**, p. 1–5, 2017.

FAUCI, A. S. Twenty-Five Years of HIV/AIDS. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 409–409, 28 jul. 2006.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYÜRE, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7-8, p. 273–279, 2000.

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, 1 jul. 2002.

FERREIRA, F. A. G. **Nutrição Humana**. 2005. ed. [s.l: s.n.].

FITZPATRICK, D. A et al. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. **BMC evolutionary biology**, v. 6, n. 1, p. 99, 22 nov. 2006.

FREIRE, F. et al. Evaluation of gene expression *SAP5*, *LIP9*, and *PLB2* of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1511–1518, 2015.

GABALDÓN, T.; NARANJO-ORTÍZ, M. A.; MARCET-HOUBEN, M. Evolutionary

genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 6, p. fow064, set. 2016.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PEREZ, M. G.; BAGAN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J Clin Exp Dent**, v. 6, n. 5, p. e576–82, 2014.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. **Drug resistance updates**, v. 5, n. 5, p. 181–191, 2002.

GESSNER, M. O.; SCHMITT, A. L. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 2, p. 415–9, fev. 1996.

GIL, C.; PÉREZ-DIAZ, R.; NOMBELA, C. Inhibitory and morphological effects of several antifungal agents on three types of *Candida albicans* morphological mutants. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n. 3, p. 151–162, jan. 1994.

GLOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, jun. 2010.

GOAD, L. J. The effects of antifungal compounds on growth and sterol metabolism in plants and protozoa. **Biochemical Society transactions**, v. 22, n. 3, p. 629–35, ago. 1994.

GRAY, E. S.; TSAI, R. W. Characterization of striped bass growth hormone receptors by disulfide-bond reduction and cross-linking studies. **Journal of Experimental Zoology**, v. 268, n. 6, p. 428–435, 1 maio 1994.

GRAYBILL, J. R. et al. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2938–42, nov. 1998.

GREEN, C. B. RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 267–275, 1 fev. 2004.

GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 9, p. 1172–7, 1 nov. 2003.

GÜNTHARD, H. F. et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. **JAMA**, v. 316, n. 2, p. 191–210, 12 jul. 2016.

HAIJEH, 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, n. 4, p. 1519–1527, 2004.

HAMAL, P. et al. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. **Folia microbiologica**, v. 49, n. 4, p. 491–496, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. **IMA fungus**, v. 3, n. 1, p. 15–24, jun. 2012.

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, 1 fev. 2000.

HAZIROLAN, G. et al. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 3, p. 376–381, set. 2017.

HEWLETT, G. Apropos aprotinin: a review. **Biotechnology (Nature Publishing Company)**, v. 8, n. 6, p. 565–6, 568, jun. 1990.

HINRICHSEN, S. L. et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325–328, jun. 2009.

HOETELMANS, R. M. et al. Clinical pharmacology of HIV protease inhibitors: focus on saquinavir, indinavir, and ritonavir. **Pharmacy world & science : PWS**, v. 19, n. 4, p. 159–75, ago. 1997.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, 15 jun. 2009.

HORNBAACH, 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, 1 dez. 2009.

HU, Y. et al. Molecular Characterization of *Candida africana* in Genital Specimens in Shanghai, China. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 25–30, 2015.

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. et al. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3529–3538, 1997.

HUBE, B. et al. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 436, p. 339–44, 1998.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997–2005, 1 jun. 2001.

HWANG, B. et al. Antifungal properties and mode of action of psacothecin, a novel knottin-type peptide derived from *Psacotheca hiliaris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 3, p. 352–357, 2010.

ISHIKAWA, H. Evolution of ribosomal RNA. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 1–7, 1977.

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, 15 mar. 2007.

JAMES, G. T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 574–9, 1 jun. 1978.

JANAKAKUMARA, J. V. **Conversion of ergosterol in edible mushrooms to vitamin D2 by UV irradiation**. 2005. 156f. Tese (Doctorate em Philosophy Food Science And Technology Programme). Department of Chemistry National, University of Singapore, 2005.

JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 20, n. 6, p. 1526–1530, 1995.

KARACA GENÇER, H. et al. New Benzimidazole-1,2,4-Triazole Hybrid Compounds: Synthesis, Anticandidal Activity and Cytotoxicity Evaluation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 4, p. 1–22, 27 mar. 2017.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–24, 11 abr. 2009.

KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Invasive Fungal Infections in Pediatric Solid Organ Transplant Patients: Epidemiology and Management. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 2, p. 57–64, 17 jun. 2015.

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. 7628–7633, 2007.

KHAN, A. et al. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816–23, dez. 2010a.

KHAN, M. S. A. et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: AHMAD, I. et al. (Eds.). . **Combating Fungal Infections**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010b. p. 21–45.

KLASTERSKY, J. Empirical antifungal therapy. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 2, p. 105–12, fev. 2004.

KOLECKA, A. et al. Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and -sensitive *Candida albicans* strains. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 5, p. 605–10, maio 2009.

KOLECKA, A.; CHORVÁT, D.; BUJDÁKOVÁ, H. The impact of growth conditions on biofilm formation and the cell surface hydrophobicity in fluconazole susceptible and tolerant *Candida albicans*. **Folia microbiologica**, v. 60, n. 1, p. 45–51, jan. 2015.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Effect of fluconazole on agar invasion by *Candida albicans*. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 78–82, 1 jan. 2001.

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. 2038–42, ago. 1999.

KORTING, H. C. 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, n. 8, p. 623–632, 2003.

KRCMERY, V.; KALAVSKY, E. Antifungal drug discovery, six new molecules patented after 10 years of feast: why do we need new patented drugs apart from new strategies? **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 182–7, nov. 2007.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology**, v.7, n. 11, 1546-1554, 2005.

KUMAR, D. et al. Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 2, p. 296–303, abr. 2015a.

KUMAR, R. et al. Novel Aggregation Properties of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase Sap6 Mediate Virulence in Oral Candidiasis. **Infection and immunity**, v. 83, n. 7, p. 2614–26, jul. 2015b.

KUMAR, R.; SHUKLA, P. K. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2-3, p. 189–197, 2010.

LAMMERS, G.; JAMIESON, J. C. The role of a cathepsin D-like activity in the release of Galb1-4GlcNAc a2-6-sialyltransferase from rat liver Golgi membranes during the acute-phase response. **Biochemical Journal**, v. 256, p. 623–631, 1988.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–62, ago. 2005.

LERMANN, U.; MORSCHHÄUSER, J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3281–3295, 2008.

LEWIS, L. E. et al. *Candida albicans* infection inhibits macrophage cell division and proliferation. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 49, n. 9, p. 679–80, set. 2012.

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

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, n. 5, p. 850–5, maio 2008.

LV, Q.-Z.; YAN, L.; JIANG, Y.-Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. **Virulence**, v. 7, n. 6, p. 649–59, 17 ago. 2016.

LYON, J. P. et al. Inhibition of virulence factors of *Candida* spp. by different surfactants. **Mycopathologia**, v. 171, n. 2, p. 93–101, fev. 2011.

MACEDO, M. L. R. et al. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p.

1104–11, abr. 2007.

MARKWARDT, F. et al. [Synthetic serin protease inhibitors. 1. Inhibition of trypsin, plasmin and thrombin by amidino- and guanidinobenzoic acid esters]. **Die Pharmazie**, v. 28, n. 5, p. 326–30, maio 1973.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–64, nov. 2013.

MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 21, p. 166–78, jan. 2014.

MEADOWS, R. A welcome chink in drug resistance. **PLoS biology**, v. 11, n. 10, p. e1001693, out. 2013.

MERCURE, S. et al. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2106–12, set. 1996.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, fev. 2011.

MINNEBRUGGEN, G. VAN et al. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, n. 1, p. 22–32, 6 jul. 2010.

MISHRA, N. et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 201–235, set. 2007.

MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 357–368, jul. 1994.

MONOD, M. et al. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 144, n. 10, p. 2731–2737, 1998.

MONROY-PÉREZ, E. et al. SAP Expression in *Candida albicans* Strains Isolated from

Mexican Patients with Vaginal Candidosis. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 04, n. 01, p. 25–31, 2013.

MORAGUES, M. D. et al. A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-*C. albicans* Activities. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5273–5279, 1 set. 2003.

MORA-MONTES, H. M. et al. Protein glycosylation in *Candida*. **Future microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1167–1183, 2009.

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, maio 2011.

MORRISON, C. J. et al. Purification and characterization of the extracellular aspartyl proteinase of *Candida albicans*: removal of extraneous proteins and cell wall mannoprotein and evidence for lack of glycosylation. **Journal of general microbiology**, v. 139 Pt 6, p. 1177–86, jun. 1993.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2-3, p. 240–248, 2002.

MUNRO, C. A.; HUBE, B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 173–177, abr. 2002.

NAEWBANIJ, M. et al. Determination of Ergosterol Using Thin-Layer Chromatography and Ultraviolet Spectroscopy. **Cereal Chem**, v. 61, n.5, 385-388, 1984.

NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, 2004.

NAGLIK, J. R. et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 3, p. 469–479, 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, n. 11, p. 3266–3280, 1 nov. 2008.

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, 1 set. 2003a.

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, 1 set. 2003b.

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, n. 1, p. 114, 16 abr. 2010.

NAVARATHNA, D. H. M. L. P. 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, n. 6, p. 1156–1159, 2005.

NEUGNOT, V. et al. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 6, p. 1734–1745, 2002.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4647, p. 350–7, 1984.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). . **Proteolytic enzymes - a practical approach**. Oxford: JRL Press, 1990. p. 259.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2290–303, 15 mar. 2009.

NOUMI, E. et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. **Mycopathologia**, v. 169, n. 4, p. 269–278, 2010.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

ODDS, F. C. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. **Future Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 67–79, jan. 2010.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. **Genome biology**, v. 5, n. 7, p. 230, 2004.

OROZCO, A. S. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–9, out. 1998.

PAPON, N. et al. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 26 set. 2013.

PAPPAS, G.; IERODIAKONOU, V.; FALAGAS, M. E. Lost in translation: differences in antimicrobial indication approval policies between the United States and Europe. **Clinical therapeutics**, v. 31, n. 7, p. 1595–603, jul. 2009.

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, n. 5, p. 634–643, 2003.

PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for Treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161–189, 15 jan. 2004.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 5, p. 503–35, 1 mar. 2009.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 4, p. e1–50, 15 fev. 2016.

PARKINSON, T.; FALCONER, D. J.; HITCHCOCK, C. A. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 8, p. 1696–9, ago. 1995.

PARRA-ORTEGA, B. et al. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 505–12, maio 2009.

PASANEN et al. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 1, p. 138–42, jan. 1999.

PEACOCK, G. A.; GOOSEY, M. W. Separation of fungal sterols by normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 469, n. C, p. 293–304, jan. 1989.

PEIXOTO, L. R. et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 179–185, jan. 2017.

PEMÁN, J. et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1181–1187, 2012.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–60, maio 2009.

PEREA, S. et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2676–84, out. 2001.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 2, n. 4, p. 259–269, ago. 1999.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337–360, 24 dez. 2008.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 1 abr. 2010.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, p. S3–S13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–63, 1 jan. 2007.

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.

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

PINA-VAZ, C. et al. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 609–18, nov. 2001.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry. In: **Methods Mol Biol.** [s.l: s.n.]. v. 638p. 281–289.

PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. **Medicina Clínica**, v. 126, n. Supl 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, 25 maio 1972.

RAJPUT, S. B. et al. Anti-*Candida* properties of asaronaldehyde of *Acorus gramineus* rhizome and three structural isomers. **Chinese medicine**, v. 8, n. 1, p. 18, 8 set. 2013.

RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 26, dez. 2013.

RAMANI, R.; RAMANI, A.; WONG, S. J. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2320–2324, 1997.

RAPP, R. P. Changing Strategies for the Management of Invasive Fungal Infections. **Pharmacotherapy**, v. 24, n. 2 Part 2, p. 4S–28S, fev. 2004.

RAVICHANDRAN, S.; MUTHURAMAN, S. Examining the anti-candidal activity of 10 selected Indian herbs and investigating the effect of Lawsonia inermis extract on germ tube formation, protease, phospholipase, and aspartate dehydrogenase enzyme activity in *Candida albicans*. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 1, p. 47–52, 2016.

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.

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. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 8, p. 1094–1102, 2002.

ROBERTS, N. A. et al. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4953, p. 358–61, 20 abr. 1990.

ROCHA, M. F. G. et al. Azole resistance in *Candida albicans* from animals: Highlights on efflux pump activity and gene overexpression. **Mycoses**, v. 60, n. 7, p. 462–468, jul. 2017.

ROMEO, O.; CRISEO, G. *Candida africana* and its closest relatives. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 475–486, nov. 2011.

ROMEO, O.; TIETZ, H.-J.; CRISEO, G. *Candida africana*: Is It a Fungal Pathogen? **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 192–197, 30 set. 2013.

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, abr. 2009.

RUDENSKY, B. et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 106–9, jan. 2005.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A; MORSCHHÄUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 291–295, 2000.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 818–25, fev. 2005.

SANGLARD, D. et al. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3539–3546, 1997.

SANTOS, A. L. S.; BRAGA-SILVA, L. A. Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 155–62, jan. 2013.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013a.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013b.

SARUBBI, E. et al. Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. **FEBS Letters**, v. 319, n. 3, p. 253–256, 1993.

SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and immunology**, v.

53, n. 1, p. 41–4, jan. 2009.

SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 367–372, 2016.

SAVINI, V. et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 434–41, set. 2011.

SCHALLER, M. et al. 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, n. 2, p. 605–615, jul. 1998.

SCHALLER, M. et al. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 169–180, 1999.

SCHALLER, M. 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, n. 6, p. 3227–3234, 2003.

SCHELENZ, S. et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 5, n. 1, p. 35, 2016.

SCHWADORF, K.; MUELLER, H.-M. Determination of Ergosterol in Cereals, Mixed Feed Components, and Mixed Feeds by Liquid Chromatography. **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, v. 72, n. 3, p. 457–462, 1989.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Antifungal Susceptibility and Virulence Attributes of Bloodstream Isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland. **Mycopathologia**, v. 172, n. 5, p. 389–395, 9 nov. 2011.

SHIMIZU, M. T. et al. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses**, v. 39, n. 5-6, p. 161–7, 1996.

SIKORA, M. et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 2, p. 143–148, 1 mar. 2011.

SILVA, A. P. et al. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3546–3556, 2011.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1–11, jan. 2014.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SORGO, A. G. et al. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 8, p. 1071–1081, 2011.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 2, p. 244–51, 15 jan. 2006.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabouraudia**, v. 4, n. 3, p. 187–93, out. 1965.

STANISZEWSKA, M. et al. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 813–21, 2013.

STANISZEWSKA, M. et al. Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes *SAP7*, *SAP8*, *SAP9*, *SAP10* in human serum in vitro. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 15–20, 2014.

STANISZEWSKA, M. et al. Role of *SAP7-10* and Morphological Regulators (*EFG1*, *CPHI*) in *Candida albicans*' Hypha Formation and Adhesion to Colorectal Carcinoma Caco-2. **Polish journal of microbiology**, v. 64, n. 3, p. 203–10, 2015.

STORTI, L. R. et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the pediatric unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, state of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 225–231, abr. 2012.

SZOLDERITS, G. et al. Membrane properties modulate the activity of a phosphatidylinositol transfer protein from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 986, n. 2, p. 301–9, 27 nov. 1989.

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, fev. 2007.

TANG, J.; WONG, R. N. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. **Journal of cellular biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 53–63, jan. 1987.

TAYLOR, B. N. et al. Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 3, p. 1828–35, mar. 2005.

THEBERGE, S. et al. *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 246, 2013.

TIETZ, H. J. et al. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2462–5, set. 1995.

TIETZ, H. J. et al. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? **Mycoses**, v. 44, n. 11-12, p. 437–45, dez. 2001.

TODD, B. Clinical Alert: *Candida auris*. A new pathogen is making its presence known. **The American journal of nursing**, v. 117, n. 4, p. 53–55, abr. 2017.

TRAN, S. L. et al. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. Human plasma proteinase inhibitors. **Annual review of biochemistry**, v. 52, p. 655–709, 1983.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 9, p. a019778–a019778, 1 set. 2014.

UMEZAWA, H. et al. Enhancement of delayed-type hypersensitivity by bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 8, p. 857–859, 1976a.

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

UMEZAWA, H. et al. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. **The Journal of antibiotics**, v. 29, n. 1, p. 97–9, jan. 1976b.

VALE-SILVA, L. A. et al. Investigation of the mechanism of action of 3-(4-bromophenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-one against *Candida albicans* by flow cytometry.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 16, n. 9, p. 2492–2495, maio 2006.

VAZQUEZ, J. A. et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **The Journal of infectious diseases**, v. 168, n. 1, p. 195–201, jul. 1993.

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

VERMES, A; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 2000.

VOLMER, A. A.; SZPILMAN, A. M.; CARREIRA, E. M. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. **Natural product reports**, v. 27, n. 9, p. 1329–49, set. 2010.

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.

WAROLIN, J.; ESSMANN, M.; LARSEN, B. Flow cytometry of *Candida albicans* for investigations of surface marker expression and phagocytosis. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 35, n. 3, p. 302–11, 2005.

WARREN, T. A. et al. *Candida braccarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4677–9, dez. 2010.

WHITE, T. C. et al. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. **Oral diseases**, v. 3 Suppl 1, p. S102–9, maio 1997.

WHITE, T. C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1482–7, jul. 1997.

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.

WHITE, T. C.; MARR, K. A; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 382–

402, 1998.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual review of microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–53, out. 2007.

WIEDERHOLD, N. P.; HERRERA, L. A. Caspofungin for the treatment of immunocompromised and severely ill children and neonates with invasive fungal infections. **Clinical medicine insights. Pediatrics**, v. 6, p. 19–31, jun. 2012.

WINGARD, J. R. et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 18, p. 1274–1277, 1991.

WINGARD, J. R. et al. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 9, p. 1847–1849, 1993.

WOLFE, K. H.; BUTLER, G. Evolution of Mating in the Saccharomycotina. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 197–214, 8 set. 2017.

WOLFF, S. N. et al. Fluconazole vs low-dose amphotericin B for the prevention of fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation: a study of the North American Marrow Transplant Group. **Bone Marrow Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 853–859, abr. 2000.

WU, T. et al. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1200–8, maio 2000.

YANG, Y.-L. Virulence factors of *Candida* species. **journal of microbiology immunology and infection**, v. 36, n. 4, p. 223–228, 2003.

YANG, Y.-L. et al. Non-lethal *Candida albicans* cph1/cph1 efg1/efg1 mutant partially protects mice from systemic infections by lethal wild-type cells. **Mycological Research**, v. 113, n. 3, p. 388–390, mar. 2009.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95, fev. 2014.

YUAN, J.-P. et al. Determination of ergosterol in ganoderma spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6172–6, 23 ago. 2006.

YUAN, J.-P. et al. Evaluation of ergosterol and its esters in the pileus, gill, and stipe tissues of agaric fungi and their relative changes in the comminuted fungal tissues. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 459–65, set. 2008.

ZAUGG, C. et al. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 405–412, 1 jan. 2001.

ZILL, G.; ENGELHARDT, G.; WALLNÖFER, P. R. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 187, n. 3, p. 246–9, set. 1988.