

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ASPARTATO
PROTEASES SECRETADAS (*SAP2* E *SAP4*) POR *Candida albicans* EXPOSTA A
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS E CONTATO COM
MACRÓFAGOS**

ALFENAS-MG

2016

JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ASPARTATO
PROTEASES SECRETADAS (*SAP2* E *SAP4*) POR *Candida albicans* EXPOSTA A
CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS E CONTATO COM
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.
Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

ALFENAS-MG

2016

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

Oliver, Josidel Conceição.

Análise da expressão gênica deferencial de aspartato proteases secretadas (SAP2 e SAP4) por *Candida albicans* exposta a concentrações subinibitórias de antifúngicos e contato com macrófagos / Josidel Conceição Oliver. – Alfenas - MG, 2016.

58 f.

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. *Candida*. 2. Ácido Aspártico Protease. 3. Fluconazol. 4. Anfotericina B. 5. Fagócitos. I. Dias, Amanda Latercia Tranches. II. Título.

CDD-571.9

JOSIDEL CONCEIÇÃO OLIVER

"Análise da expressão gênica diferencial de aspartato proteinase secretada por *Candida albicans* exposta a concentrações subinibitórias de antifúngicos e contato com macrófagos"

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

Aprovada em: 26/02/16

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: AmandabDias

Prof. Dr. Eriques Gonçalves da Silva
Instituição: USP

Assinatura: [Assinatura]

Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: [Assinatura]

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, amigos e ao Matheus que sempre me deram apoio incondicional, acreditaram nos meus sonhos e torceram por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, saúde e uma infinidade de bênçãos que me concedeu. Agradeço pelas pessoas e desafios que colocou no meu caminho, pois me fizeram crescer em sabedoria, chegar onde estou e poder alcançar mais essa vitória.

À Prof^a Dra. Amanda Latercia Tranches Dias, orientadora, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Elisângela Monteiro Pereira pelos conhecimentos transmitidos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus pais João e Lucia e toda minha família, que muito me ensinaram e sempre apoiaram minhas escolhas, principalmente nos estudos, incentivando e deixando-me livre para decidir meu próprio futuro.

Ao Matheus que esteve ao meu lado durante toda a pós-graduação, estudando para seleção, ajudando e incentivando meus projetos, e principalmente, me dando carinho e atenção nas horas mais difíceis.

As integrantes do Núcleo de Estudos em Micologia (NEMIC) – Naiara Chaves Silva, Camila Miranda Pernambuco e Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira – que comigo dividiram experiências e colaboraram com este estudo.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo suporte nas atividades desenvolvidas durante os ensaios realizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

As agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

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

A todos vocês, minha eterna gratidão.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

As infecções fúngicas se tornaram um grande problema de saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares. *Candida* spp. são os principais patógenos em infecções fúngicas invasivas. A produção de aspartato proteases secretadas (Sapp) por *Candida* spp. pode estar relacionado com o aumento do número de infecções e resistência aos medicamentos. A produção de proteases é codificada por uma família de 10 genes *SAP1-10*, sendo *SAP2* o gene mais comumente expresso em *Candida albicans*. A expressão de *SAP4* está associada à produção de enzimas Sap4p e formação de hifas que podem contribuir para a invasão dos tecidos hospedeiros e destruição de macrófagos em processos infecciosos. Este trabalho avaliou a expressão dos genes *SAP2* e *SAP4* em *C. albicans* ATCC 10231 cultivadas na presença ou ausência de macrófagos e expostas a concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B. *Candida albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose a 37°C por 24 h, e posteriormente em caldo carbono levedura base enriquecido com soro-albumina bovina (YCB-BSA), e na ausência ou presença de concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B. A linhagem celular monocítica humana de origem leucemia (THP-1) foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 10 dias. Para a indução da diferenciação das células, 10⁶ monócitos foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 100 nM durante 48 h. Foram utilizadas amostras de 5x10⁶ *C. albicans* cultivadas na presença ou ausência de 10⁶ macrófagos e expostas ou não a concentrações subinibitórias de antifúngicos. As amostras foram cultivadas em placas de cultura celular com 6 poços por 1 h a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂. O RNA total foi extraído das amostras utilizando o reagente TRIzol®, após a purificação do RNA com DNase I, este foi convertido em cDNA, e, em seguida, a quantificação do gene *SAP4* foi realizada por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) utilizando *ACT1* como gene normalizador. *Candida albicans* cultivada na presença de macrófagos apresentou regulação positiva na expressão de *SAP2* e *SAP4* (p < 0,01), respectivamente, na ordem de 4,83 e 10,34 vezes maior se comparada com amostras da levedura cultivada sem contato com macrófagos. E ainda, a exposição de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de fluconazol aumentou a expressão de *SAP2* e diminuiu a expressão de *SAP4*, já a exposição da levedura a concentrações subinibitórias de anfotericina B diminuiu a expressão de *SAP2* e *SAP4*. Os genes *SAP2* e *SAP4* são relacionados como fatores de virulência de *C. albicans* e sua expressão pode ser regulada pelo contato com fagócitos ou exposição a antifúngicos. Portanto, compreender a expressão desses genes na patogênese fúngica pode ajudar na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da candidíase, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada a infecções fúngicas.

Palavras-chave: *Candida* spp., *SAP2*, *SAP4*, Fluconazol, Anfotericina B, Fagócitos.

ABSTRACT

Fungal infections have become a major public health problem especially in hospital settings. *Candida* spp. are considered the main pathogen in invasive fungal infections. The production of secreted aspartic proteinases (Sapp) by *Candida* spp. can be related to the increase in the number of infections and drug resistance. The production of proteinases is encoded by a family of 10 genes known as *SAP1-10*, of which, *SAP2* is the most commonly expressed gene in *Candida albicans*. The expression of *SAP4-6* is associated to the production of Sap4-6p enzymes and hyphae formation which can contribute to the invasion of host tissues and destruction of macrophages during infectious processes. This study evaluates *SAP2* and *SAP4* gene expression in *C. albicans* ATCC 10231 grown in the presence or absence of macrophages and exposed to subinhibitory concentrations of fluconazole and amphotericin B. *C. albicans* was grown in Sabouraud Dextrose Agar for 24 h at 37°C and after in yeast carbon base more 0.2% bovine serum albumin (YCB-BSA) in the absence or presence of subinhibitory concentrations of Fluconazole and Amphotericin B. The human monocytic leukemia cell line (THP-1) was grown in RPMI-1640 Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml) and streptomycin (100µg/ml) at 37 °C and atmosphere of 5% CO₂ during 10 days. For the induction of cell differentiation, 10⁶ cells were seeded in RPMI-1640 medium supplemented and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 100 nM for 48 h. The samples of 5x10⁶ *C. albicans* were cultured in the presence or absence of 10⁶ macrophages and these was exposed or not to subinhibitory concentrations of antifungals. All samples were incubated in culture test plates with 6 flat-botton wells for 1 h at 37 °C and atmosphere of 5% CO₂. Total RNA was extracted from the samples using TRIzol[®] reagent, after RNA purification with DNaseI it was converted to cDNA, and then, the relative quantification of the *SAP4* gene was performed by Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) using *ACT1* gene as normalizing endogenous gene. *Candida albicans* grown in the presence of macrophages showed upregulation in the expression of *SAP2* and *SAP4* (p < 0.01), respectively, in the order of 4.83 and 10.34 fold higher as compared to yeast samples grown without contact with macrophages. Concerning exposure to antifungal agents, *C. albicans* exposed to subinhibitory concentrations of amphotericin B showed downregulation in expression of *SAP2* and *SAP4*. However, the yeast's exposure to subinhibitory concentrations of fluconazole caused upregulation in *SAP2* expression and downregulation in *SAP4* expression. *SAP2* and *SAP4* genes are related to virulence factors of *C. albicans* and its expression can be regulated by contact with phagocytes or exposure to antifungals. Therefore, understanding the expression of these genes in fungal pathogenesis may aid in research and development of new drugs for treating candidiasis, thus contributing to reducing the incidence of morbidity and mortality associated with fungal infections.

Keywords: *Candida* spp., *SAP2*, *SAP4*, Fluconazole, Amphotericin B, Phagocytes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Câmara de Neubauer.....25
- Figura 2** – Porcentagem média \pm desvio padrão de células monocíticas suspensas no meio de cultura e de macrófagos aderidos na placa após diferenciação com PMA por 48 horas.....37
- Figura 3** – Macrófagos aderidos em lamínulas de vidro após diferenciação com PMA por 48 horas e corados pelos corantes May Grunwald-Giemsa.....38
- Figura 4** – Microscopia óptica de *C. albicans* cultivadas na presença de macrófagos após ensaio de fagocitose a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos ou 1 hora, lâminas coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa e visualizados em microscópio óptico na objetiva de em microscopia óptica 100x.....40
- Figura 5** – Porcentagem média e desvio padrão da filamentação de *Candida albicans* após cultivo na ausência ou presença de macrófagos e exposição a antifúngicos.....41
- Figura 6** – Microscopia óptica de *C. albicans* cultivadas na presença ou ausência macrófagos e expostas ou não a antifúngicos após incubação a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora, visualizados na em placa de cultivo com RPMI 1640 suplementado e microscópio óptico invertido na objetiva de 40x.....42
- Figura 7** – Expressão diferencial do gene *SAP2* em *Candida albicans* cultivada na presença ou ausência macrófagos e expostas ou não a antifúngicos, incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.....45
- Figura 8** – Expressão diferencial do gene *SAP4* em *Candida albicans* cultivada na presença ou ausência macrófagos e expostas ou não a antifúngicos, incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.....47
- Quadro 1** – Sequência de *primers* e sondas das *SAP2*, *SAP4* e *ACT1* para análise em qPCR..34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória (IC ₅₀ e IC ₉₀) da linhagem padrão de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e sua classificação quanto à sensibilidade aos antifúngicos testados.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT1	– gene da actina.
ATCC	– <i>American tissue culture collection.</i>
ATP	– adenosina trifosfato.
cDNA	– ácido desoxirribonucleico complementar.
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DO	– densidade óptica.
DNA	– ácido desoxirribonucleico.
dNTP's	– desoxirribonucleotídeos fosfatados.
DTT	– ditioneitol.
ERG	– gene ergosterol.
EUCAST	– <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.</i>
GPI	– glicosilfosfatidilinositol.
IC	– concentração inibitória.
MIC	– concentração inibitória mínima.
M-MLV RT	– <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
PBS	– tampão fosfato-salino.
PMA	– forbol-12-miristato-13-acetato.
qPCR	– reação em cadeia da polimerase quantitativa.
RNA	– ácido ribonucleico.
SAP	– gene aspartato protease secretada.
Sapp	– aspartato protease secretada.
SFB	– soro fetal bovino.
YCB-BSA	– caldo carbono levedura base enriquecido com soro-albumina bovina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	<i>Candida</i> spp. E INFECÇÕES OPORTUNISTAS	15
2.2	FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE <i>Candida</i> spp.	16
2.3	ASPARTATO PROTEASES SECRETADAS DE <i>Candida</i> spp.....	16
2.4	FAGÓCITOS	18
2.4	ANTIFÚNGICOS E RESISTÊNCIA FÚNGICA	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	LINHAGENS FÚNGICA E CELULAR.....	23
3.2	CULTIVO DE <i>Candida albicans</i>	23
3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC)	23
3.4	CULTIVO DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS	24
3.5	PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO E FAGOCITOSE.....	25
3.5.1	Ensaio de diferenciação	26
3.5.2	Estimativa de adesão de macrófagos na placa de cultivo celular	26
3.5.3	Ensaio de fagocitose	26
3.5.4	Avaliação da fagocitose pelo método de coloração May Grunwald-Giemsa	27
3.5.5	Porcentagem de filamentação	27
3.5.6	Atividade fungicida de macrófagos por plaqueamento em profundidade em ágar Sabouraud Dextrose	28
3.6	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS	29
3.7	ENSAIO DE FAGOCITOSE	30

3.8	EXTRAÇÃO DE RNA.....	31
3.9	TRATAMENTO DO RNA COM DNase I.....	32
3.10	QUANTIFICAÇÃO DE RNA.....	32
3.11	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SÍNTESE DE cDNA).....	32
3.12	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA	33
3.12.1	Análise e interpretação dos resultados da qPCR.....	34
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM PADRÃO DE <i>C. albicans</i> ATCC 10231 AOS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B.	36
4.2	DIFERENCIAÇÃO E ADESÃO DOS MACRÓFAGOS.....	37
4.3	AVALIAÇÕES DA FAGOCITOSE E ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS.....	38
4.4	QUANTIFICAÇÕES DE RNA E cDNA	43
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA	44
4.5.1	Expressão do gene <i>SAP2</i> em linhagem padrão de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	44
4.5.2	Expressão do gene <i>SAP4</i> em linhagem padrão de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	46
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas são um importante problema de saúde pública (WILSON et al., 2002). A incidência de infecções fúngicas tem aumentado expressivamente especialmente em indivíduos imunocomprometidos (CORNISTEIN et al., 2013; PROCOP; ROBERTS, 2004; SARDI et al., 2013). As espécies do gênero *Candida* spp. são as mais frequentes em infecções fúngicas invasivas correspondendo a cerca de 70% a 80% destas em ambiente hospitalar (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MONTEIRO et al., 2011; PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006). *Candida* spp. ocupam o quarto lugar dentre os patógenos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes com infecções hospitalares no Brasil, sendo que *Candida albicans* é a espécie mais comumente isolada, com índices de 34,3% à 66,6% dos casos (ALMEIDA et al., 2013; COLOMBO et al., 2006, 2013a; MARRA et al., 2011).

As espécies de *Candida* spp. podem ser comensais, vivendo em equilíbrio com a microbiota do hospedeiro sem causar-lhe nenhum dano, ou patogênicas. Alterações na imunidade do hospedeiro, lesões de pele ou variações da microbiota causadas por antibióticos podem mudar o estado de comensalismo para patogenicidade (HA et al., 2011; PIROFSKI; CASADEVALL, 2009). *Candida albicans* pode provocar doenças como aftas, vaginite e infecções invasivas principalmente em pacientes imunocomprometidos (XU; CHEN; LI, 2008).

A imunidade protetora contra fungos patogênicos abrange as respostas inata e adaptativa que envolvem diversas moléculas e células das quais destacam-se as células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos que são importantes fatores na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. (HA et al., 2011; KAUR; MA; CORMACK, 2007). Entretanto, quando o sistema imune não é capaz de impedir a infecção faz-se necessário a utilização de antifúngicos para inibir o crescimento de *C. albicans* (VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010)

A anfotericina B e o fluconazol são dois antifúngicos amplamente utilizados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (KLEPSER, 2011). Entretanto, linhagens de *Candida* spp. têm se mostrado resistentes a alguns antifúngicos, e essa resistência pode estar naturalmente presente ou ser adquirida com as influências ambientais, tais como contato de linhagens com concentrações subinibitórias de antifúngicos (PFALLER, 2012; SILVA et al., 2012).

Tratamentos profiláticos com antifúngicos, recomendados a pacientes transplantados ou internados em unidades de terapia intensiva que são considerados de alto risco para candidíase invasiva, podem expor linhagens de *Candida* spp. a baixas concentrações de antifúngicos por

longos períodos de tempo e este é um dos fatores que pode estimular *Candida* spp. a produzir e secretar fatores de virulência e ainda, selecionar linhagens resistentes (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PFALLER, 2012; SILVA; NERY; DIAS, 2014).

Algumas espécies de *Candida* possuem importantes fatores de virulência, os quais incluem a capacidade de adesão às células hospedeiras, alterações fenotípicas e morfológicas, formação de biofilmes e a capacidade para produzir e secretar enzimas hidrolíticas (SILVA et al., 2012). Dentre estas enzimas destacam-se as proteases aspárticas secretadas (Sapp) que degradam proteínas do hospedeiro, inclusive do sistema imune, e cuja produção está associada a expressão dos genes *SAP* (NAGLIK et al., 2004). Linhagens de *Candida* spp. não patogênicas, em geral, expressam menos genes *SAP* (SILVA; NERY; DIAS, 2014; WHITE; AGABIAN, 1995). E ainda, isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos tendem a secretar mais Sapp do que os isolados sensíveis. Sendo assim, faz-se importante o estudo e comparação entre a expressão de *SAP* e o perfil de sensibilidade dos isolados (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir é descrita uma breve revisão de literatura sobre os principais temas dessa dissertação, que são: *Candida* spp. e infecções oportunistas, fatores associados à virulência de *Candida* spp., Sapp de *Candida* spp., fagócitos, antifúngicos e resistência fúngica.

2.1 *Candida* spp. E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

Candida spp. é um fungo que pode apresentar-se sob a forma leveduriforme ou filamentosa (hifas ou pseudo-hifas), e por isso algumas espécies como *C. albicans* podem ser classificadas como fungos polimórficos (KURZAI et al., 2005; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; VILLAR; KASHLEVA; DONGARI-BAGTZOGLU, 2004).

A forma de levedura possibilita o rápido deslocamento através de superfícies mucosas, fluidos corporais e corrente sanguínea. Em contraste, as hifas permitem a adesão, a formação de biofilmes, a evasão e lise de macrófagos e neutrófilos, a invasão das camadas de células epiteliais e outros tecidos do hospedeiro (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011).

Candida spp. pode estar presente em equilíbrio na microbiota de indivíduos saudáveis. Entretanto, esse fungo é capaz de causar infecções oportunistas quando existem distúrbios na microbiota do homem, como no crescimento numérico fúngico por uso de antimicrobianos de amplo espectro, no comprometimento do sistema imune e em lesões na pele e mucosas (HA et al., 2011).

As infecções por *Candida* spp. predominam dentre as infecções fúngicas oportunistas em todo o mundo. *Candida albicans* é o principal agente de candidemia invasiva seguida por outras espécies de *Candida* não-*albicans* (CORNISTEIN et al., 2013; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A candidíase é uma doença infecciosa causada por *Candida* spp. que pode acometer várias partes do corpo humano, como pele, mucosa orofaríngea, mucosa genital, dentre outras partes. A candidemia ou candidíase invasiva disseminada é uma infecção mais grave resultante da presença do patógeno na corrente sanguínea (PAPPAS et al., 2004).

A candidemia está associada a altos índices de mortalidade e com o aumento dos custos com cuidados e duração da hospitalização (MORGAN et al., 2005; WILSON et al., 2002). Em uma pesquisa em 11 hospitais brasileiros com 712 casos de candidemia, foi observada uma incidência global de 2,49 casos por 1.000 admissões. A mortalidade bruta de 30 dias foi de

54%. A *C. albicans* foi a espécie mais comum (40,9%), seguido por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%) (COLOMBO et al., 2006).

Em uma análise epidemiológica em hospitais brasileiros com 2.563 casos de infecções da corrente sanguínea, 148 casos (6,1%) foram por fungos, dos quais 137 (92,6%) foram *Candida* spp. (MARRA et al., 2011). Em um estudo semelhante, entre 4.363 casos de infecção da corrente sanguínea, 300 foram causados por *Candida* spp. (6,9%). Com taxas de incidência em hospitais públicos de 2,42 episódios por 1.000 admissões (COLOMBO et al., 2013a).

De modo geral, o desenvolvimento e a evolução de processos infecciosos estão relacionados à virulência do microrganismo e a capacidade do hospedeiro em prevenir ou combater à invasão ou colonização microbiana (HUBE; NAGLIK, 2001).

2.2 FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.

Algumas espécies de *Candida* spp. podem apresentar importantes fatores associados à virulência, os quais incluem a capacidade de adesão às células hospedeiras, alterações fenotípicas e morfológicas, formação de biofilmes, capacidade de resistir ao peróxido de hidrogênio e derivados e a capacidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas que danificam tecidos como proteases, fosfolipases e hemolisinas (SILVA et al., 2012).

Em *C. albicans*, a forma de levedura tem papel fundamental na virulência possibilitando a adesão às células hospedeiras, a disseminação na corrente sanguínea e a formação de biofilmes (KADOSH, 2013). Enquanto que, a mudança morfológica da levedura para hifas é um fator de virulência essencial para a invasão dos tecidos, evasão imune, formação de biofilmes e lise de células epiteliais, endoteliais e de macrófagos (GOW; BROWN; ODDS, 2002; KADOSH, 2013).

Outro fator associado à virulência de *C. albicans* é a expressão de genes *SAP* com consequente produção de enzimas Sapp. Esta produção pode ser influenciada pelas condições ambientais ou experimentais, tais como mudanças de pH e da composição do meio de cultura, que podem causar estresse fisiológico na levedura e favorecer a produção de Sapp (SILVA; NERY; DIAS, 2014; WHITE; AGABIAN, 1995).

2.3 ASPARTATO PROTEASES SECRETADAS DE *Candida* spp.

Existe uma família de 10 diferentes genes aspartato proteases secretadas (*SAP1-10*) em *C. albicans*, os quais são responsáveis pela produção das enzimas Sapp: Sap1p, Sap2p, Sap3p, Sap4p, Sap5p, Sap6p, Sap7p, Sap8p, Sap9p e Sap10p, que podem estar ancoradas à parede celular do fungo ou livres no meio extracelular. Estudos apontam que as Sap1-8p são secretadas extracelularmente, enquanto que, a Sap9p e a Sap10p estão ligadas à superfície celular fúngica pelo glicosilfosfatidilinositol (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; STANISZEWSKA et al., 2012). Linhagens de *Candida* spp. não patogênicas, em geral, expressam menos genes *SAP* (PARRA-ORTEGA et al., 2009).

As enzimas Sap possuem ampla especificidade de substrato e 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 proteinases bacterianas. Basicamente, a função dessas enzimas é digerir proteínas disponíveis para fornecer nitrogênio e promover a sobrevivência das células fúngicas. Entretanto, também estão relacionadas à virulência, pois elas acabam por degradar proteínas estruturais e do sistema imunológico do hospedeiro (HUBE; NAGLIK, 2001).

A expressão de genes *SAP* pode ser diferencialmente regulada. A expressão de *SAP1-3* está ligada às alterações fenotípicas nas linhagens, aderência e infecções de mucosa. As Sap1-6p são conhecidas por hidrolisar proteínas do hospedeiro e causar danos teciduais (NAGLIK et al., 2004).

O gene *SAP2* é o mais expresso *in vivo* e Sap2p é a principal enzima secretada *in vitro* (NAGLIK et al., 2004). Sap2p hidrolisa várias proteínas dos hospedeiro como colágeno, lactoferrina salivar, e também proteínas do sistema imune como IgA e enzimas envolvidas no *burst* oxidativo em macrófagos (SCHALLER et al., 2005). Além disso, Sap2p pode induzir modulação imune, visto que foi utilizada com sucesso como um imunógeno na redução de candidíase de mucosas em modelos animais (VILANOVA et al., 2004).

Sabe-se que os genes *SAP4-6* são predominantemente expressos em hifas, sendo estimulados durante a mudança de *C. albicans* de levedura para hifas, contribuindo na invasão de tecidos do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). Outro fator de virulência relacionado às isoenzimas Sap4-6p é que estas podem contribuir para a destruição dos macrófagos e escape de células de *Candida* spp. em processos infecciosos (BORG-VON ZEPELIN et al., 1998). Um estudo recente mostrou que Sap4-6p possuem um aminoácido capaz de se ligar a proteína integrina na superfície de células epiteliais, incluindo queratinócitos, e, desta forma, podem ser

internalizadas por lisossomos, alterando parcialmente a permeabilidade das membranas lisossomais desencadeando a apoptose através da ativação de caspases (WU et al., 2013).

2.4 FAGÓCITOS

Candida albicans pode provocar doenças como aftas, vaginite e infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos (XU; CHEN; LI, 2008). A imunidade protetora contra fungos patogênicos abrange as respostas inata e adaptativa, que envolvem diversas moléculas e células das quais destacam-se as células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos, que são importantes na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. (HA et al., 2011; KAUR; MA; CORMACK, 2007). Os fagócitos reconhecem e ingerem leveduras, e posteriormente, eles podem liberar interleucinas e fator de necrose tumoral, os quais ativam resposta celular Th1, por sua vez, em casos de infecções sistêmicas, as células Th1 liberam interferon- γ que ativa propriedades antifúngicas de macrófagos e neutrófilos (DE ROSSI et al., 2011; PIROFSKI; CASADEVALL, 2009; STANISZEWSKA et al., 2012).

Os monócitos estão presentes na corrente sanguínea periférica e, em processos inflamatórios, podem migrar até os tecidos inflamados e diferenciarem-se em macrófagos. Estas células têm importante papel na remoção de células apoptóticas e na eliminação de compostos tóxicos e de microrganismos invasores (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Os macrófagos são células imunocompetentes que podem regular a resposta imunológica à *C. albicans* e agir como células efetoras na eliminação dessa levedura (VÁZQUEZ-TORRES; BALISH, 1997).

A células monocíticas humanas de origem leucêmicas THP-1 proporcionam um modelo competente *in vitro* de monócitos e macrófagos durante a interação com células fúngicas. Estudos anteriores utilizaram células THP-1 em ensaios de fagocitose de células fúngicas e expressão gênica do hospedeiro em contato com *C. albicans* (BARKER; LIU; ROGERS, 2005; MARR et al., 2001; TAVANTI et al., 2006).

Entretanto, quando o sistema imune não é capaz de impedir a evolução de infecções fúngicas é necessário o uso de antifúngicos para inibir o crescimento de *C. albicans* (VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

2.4 ANTIFÚNGICOS E RESISTÊNCIA FÚNGICA

Os antifúngicos inibem o crescimento ou destroem os fungos patogênicos. Entretanto algumas linhagens de *Candida* spp. têm se mostrado resistentes a alguns antifúngicos, e essa resistência pode estar naturalmente presente ou ser adquirida devido influências ambientais, podendo levar à colonização ou a substituição de uma espécie sensível por uma resistente (PFALLER, 2012).

O meio ambiente do fungo pode mudar à medida que este coloniza e espalha-se dentro de um hospedeiro ou devido à medicação administrada ao hospedeiro humano. Mudanças ambientais tais como: alterações de temperatura, pH, osmolaridade e presença de medicamentos, podem causar estresse fisiológico nas células fúngicas e, em resposta, selecionar aquelas mais adaptadas ao ambiente hostil (CANNON et al., 2009).

Os polienos (anfotericina B) e os azóis (fluconazol) são duas classes de agentes antifúngicos amplamente utilizados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (KLEPSEK, 2011). Estudos epidemiológicos mostram que o fluconazol é o antifúngico mais utilizado em candidemias, com índices que variam de 67,7% a 71,9% dos casos, seguido pela caspofungina e anfotericina B com índices de 38,1% e 17,7% dos casos, respectivamente (CORNISTEIN et al., 2013; HORN et al., 2009).

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).

O mecanismo de ação dos azóis está na sua ligação e consequente inibição da enzima lanosterol 14- α -esterol-desmetilase, a qual está envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol, resultando numa maior permeabilidade da membrana e na inibição do crescimento e reprodução celular (HA et al., 2011; PFALLER, 2012).

A maioria das espécies não-*albicans* do gênero *Candida* são sensíveis ao fluconazol. Entretanto, isolados de *C. krusei* tem apresentado resistência ao fluconazol, em grande parte, o resultado de uma diminuição da sensibilidade da 14 α -desmetilase aos efeitos inibitórios do fluconazol (OROZCO et al., 1998; PFALLER et al., 2013; 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 aumentado por alterações nas bombas de efluxo (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, o citocromo P-450 lanosterol 14 α -desmetilase (Erg11p), ou como resultado de mutações pontuais do gene *ERG11* que codifica a

enzima (PEREA et al., 2001). Outro fator importante que tem diminuído a eficiência do fluconazol e aumentado a incidência de linhagens resistentes aos antimicrobianos é a formação de biofilmes de *Candida* spp. (LEWIS et al., 2002; SARDI et al., 2013).

Outra classe de antifúngicos muito utilizada no tratamento de candidíases são os polienos. A anfotericina B é um potente antifúngico de origem natural isolado em 1955 a partir de uma linhagem de *Streptomyces nodosus*. Apesar de sua utilização ser limitada devido sua nefrotoxicidade, a anfotericina B é indicada em infecções sistêmicas potencialmente fatais causadas por fungos como a *C. albicans*. Após décadas de uso, este antifúngico ainda apresenta contínua e importante função na medicina devido a seu amplo espectro de ação e baixa incidência de resistência fúngica (COLOMBO et al., 2013b; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009; VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

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 e formam canais iônicos na membrana celular causando alterações na permeabilidade da membrana com vazamento de íons, principalmente de potássio (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009; VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

Embora seja raro, algumas linhagens de *Candida* spp. têm apresentado resistência a anfotericina B, há evidências de que a resistência primária e / ou secundária a anfotericina B possa ocorrer em isolados clínicos de *C. lusitaniae*, encontrada com maior frequência em pacientes neutropênicos (ATKINSON; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2008; PFALLER et al., 2014). Acredita-se que resistência a esse antifúngico pode estar ligada a mutações nos genes *ERG2*, *ERG3* e *ERG11* que sintetizam enzimas necessárias para síntese do ergosterol (MEADOWS, 2013; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998).

A resistência aos antifúngicos pode estar relacionada a formação de biofilmes de *Candida* spp. que prejudicam a difusão de antifúngicos até as camadas de células basais, as quais recebem concentrações menores de antifúngicos, podendo se comportar como resistentes ou selecionando linhagens resistentes (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SAMARANAYAKE et al., 2005).

A resistência aos antifúngicos também está associada a tratamentos profiláticos com antifúngicos recomendados a pacientes transplantados ou internados em unidades de terapia intensiva, que são considerados de alto risco para candidíase invasiva (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PFALLER, 2012). Os tratamentos profiláticos podem expor linhagens de *Candida* spp. a concentrações subinibitórias de antifúngicos por longos períodos de tempo e este é um dos fatores que podem estimular *Candida* spp. a produzir e secretar fatores associados à virulência

e ainda, estimular a seleção de linhagens resistentes (FEKETE-FORGÁCS; GYÜRE; LENKEY, 2000; MORES et al., 2011). Isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos tendem a secretar maior quantidade de Sapp do que os isolados sensíveis. Sendo assim, faz-se importante o estudo e comparação entre a expressão de *SAP* e o perfil de sensibilidade dos isolados (SILVA; NERY; DIAS, 2014). A compreensão de inibidores específicos de proteases pode incitar o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos (GAGNON-ARSENAULT; TREMBLAY; BOURBONNAIS, 2006).

2 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas na revisão de literatura, esta pesquisa teve o seguinte objetivo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica de *SAP2* e *SAP4* em *C. albicans* ATCC 10231 cultivadas na presença ou ausência de macrófagos e expostas a concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão gênica diferencial de *SAP2* e *SAP4* em *C. albicans* ATCC 10231 após contato com macrófagos.

Avaliar expressão diferencial de genes *SAP2* e *SAP4* em *C. albicans* ATCC 10231 após exposição da levedura a diferentes concentrações subinibitórias dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia e no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e a metodologia utilizada está descrita a seguir.

3.1 LINHAGENS FÚNGICA E CELULAR

Foi utilizada a linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231 que estavam mantidas a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia. Também foram utilizadas células monocíticas humanas de origem leucêmicas THP-1 mantidas a -80°C , gentilmente cedidas pela Professora Dra Elisângela Monteiro Pereira do Laboratório de Parasitologia Clínica da UNIFAL-MG.

3.2 CULTIVO DE *Candida albicans*

A linhagem de *C. albicans* ATCC 10231 foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose à 37°C por 24 horas, posteriormente, a levedura foi cultivada em caldo YCB-BSA (Carbono levedura base enriquecido com soro-albumina bovina) à 37°C por 24 horas. O cultivo da levedura em caldo YCB-BSA foi realizado em diferentes condições: (1) o caldo sem adição de antifúngico, (2) o caldo acrescido de $\frac{1}{4}$ da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) para fluconazol, (3) o caldo acrescido de $\frac{1}{2}$ IC_{50} para fluconazol, (4) o caldo acrescido de $\frac{1}{4}$ da concentração inibitória de 90% (IC_{90}) para anfotericina B, e (5) o caldo acrescido de $\frac{1}{4}$ IC_{90} para anfotericina B.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC)

A IC de fluconazol para a *C. albicans* ATCC 10231 foi determinada pelo método de microdiluição em caldo segundo as diretrizes nos documentos M27-A3 e M27-S4 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de acordo com CLSI (2008, 2012) e com modificações na leitura por densidade óptica preconizada pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e descrito por Arendrup et al. (2012). A linhagem de *C. albicans* foi cultivada, duas vezes, em meio ágar Sabouraud Dextrose à 37°C por 24 horas. 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, equivalente à presença de $1-5 \times 10^6$ células/mL. Suspensões de trabalho foram feitas pela diluição 1:10, em RPMI 1640 das suspensões anteriores e apresentaram concentração de 1×10^5 a 5×10^5 células/mL. Em microplacas de cultivo celular de 96 poços foram adicionados 100 μ L das suspensões de *C. albicans* por poço. Cada microplaca continha 2 colunas controles sem antifúngicos: uma coluna com controle negativo ou controle do meio que recebeu 200 μ L do meio de cultura não-inoculado, e, uma coluna com controle positivo de crescimento que recebeu 100 μ L de meio de cultura e 100 μ L da suspensão de leveduras. As outras dez colunas receberam 100 μ L de meio de cultura com diluições seriadas do antifúngico, sobre as quais foram adicionados 100 μ L da suspensão de *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, e após esse tempo, foi feita a leitura da densidade óptica (DO) a 530 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas. A linhagem testada teve um controle positivo de crescimento, com sua DO fixada como DO máxima (100%), em todos os poços foi descontada a DO do controle negativo para possibilitar o cálculo da IC. A menor concentração de cada antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% da linhagem foi determinada como a IC₅₀ e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 90% da linhagem determinada como a IC₉₀. A linhagem foi classificada como sensível (S), sensível dose dependente (SDD) ou resistente (R).

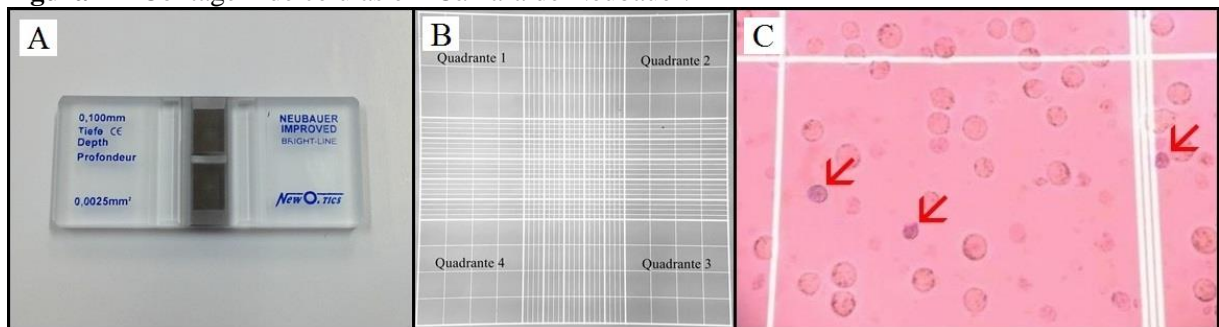
3.4 CULTIVO DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Amostras de linhagem de células monocíticas humanas de origem leucêmicas (THP-1), mantidas a -80°C, foram descongeladas e adicionadas sobre tubos de centrífuga contendo 40 mL de tampão fosfato-salino (PBS), os tubos foram centrifugados à 2000 rpm e 4°C por 8 minutos e o sobrenadante descartado (PEREIRA, 2010). Sobre as células foram adicionados 15 mL do meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL), as células suspensas foram transferidas para garrafas de cultivo celular e incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ (COLLETTE; ZHOU; LORENZ, 2014; PEREIRA, 2010). O cultivo das células foi realizado durante 10 dias, ou até que as células se multiplicassem em confluência e quantidade suficiente para o teste, com troca do meio a cada 48 horas. Para trocar o meio de cultura, o cultivo foi transferido para tubos de centrifuga com capacidade para 50 mL, os tubos foram centrifugados à 2000 rpm e 4°C por 8 minutos, os sobrenadantes foram desprezados, e sobre as células foi adicionado o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos, os tubos foram

homogeneizados, as células suspensas no meio foram transferidas para garrafas de cultivo celular e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. A garrafa de cultivo era observada diariamente em microscópio óptico invertido para visualizar a morfologia e crescimento das células THP-1. O meio de cultura foi aumentado em cerca de 1 mL por dia, de acordo com o crescimento visual em que se notava a confluência celular.

Adicionalmente, para acompanhar a proliferação das células THP-1, alíquotas de 100 µL eram retiradas do cultivo a cada 48 horas, as células eram coradas com 100 µL do corante azul de tripan 0,2% e contadas em Câmara de Neubauer excluindo as células mortas que coram-se de azul, como pode ser observado na Figura 1 (PEREIRA, 2010). O azul de tripan é um corante amplamente utilizado para colorir tecidos ou células mortas seletivamente. O mecanismo de coloração com azul de tripan é baseado nele ser carregado negativamente e não interagir com as células a menos que a membrana esteja danificada (TRAN et al., 2011).

Figura 1 – Contagem de células em Câmara de Neubauer.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A): Câmara de Neubauer; (B): Quadrantes para contagem de monócitos e macrófagos; (C): Células THP-1 com corante azul de tripan 0,2%, em que as células mortas coram-se de azul (setas vermelhas) visualizadas em microscopia óptica (objetiva de 40x) em Câmara de Neubauer.

A contagem em Câmara de Neubauer foi feita pela soma total das células nos 4 quadrantes, dividido por 4 (número de quadrantes contados), multiplicado por 2 (fator de diluição) e multiplicado por 10⁴ (fator de correção do volume de cada quadrante da câmara), assim obteve-se o número de células/mL (FIGURA 1).

3.5 PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO E FAGOCITOSE

A seguir são descritas a metodologias utilizadas para padronizar os ensaios de diferenciação das células THP-1 em macrófagos e de fagocitose de *C. albicans*.

3.5.1 Ensaio de diferenciação

Após as células THP-1 serem cultivadas por cerca de 10 dias e multiplicarem-se até apresentarem confluência e cerca de 5×10^7 células, quantidade suficiente para os testes, as células suspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos contidas na garrafa de cultivo foram transferidas para tubos estéreis com capacidade de 50 mL, os tubos foram centrifugados à 2000 rpm e 4°C por 8 minutos e os sobrenadantes descartados. Sobre as células foram adicionados 30 mL de meio RPMI 1640 com antibióticos e sem SFB, pois a privação de SFB diminui a velocidade de proliferação celular, as células foram transferidas para garrafas de cultivo celular e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas (PEREIRA, 2010). Posteriormente, as células foram centrifugadas à 2000 rpm e 4°C por 8 minutos, o sobrenadante descartado, e as células foram ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos.

Em placas para cultura celular com 24 poços foi colocada uma lamínula de vidro estéril (0,13 mm espessura x 13 mm de diâmetro) por poço, posteriormente, foi adicionado 0,5 mL da suspensão de células THP-1 em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos de concentração 2×10^6 células/mL e 0,5 mL da solução de PMA a 200 nM em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos, perfazendo um volume final de 1 mL com 10^6 células e 100 nM de PMA por poço, semelhante a Tavanti et al. (2006) com modificações. As placas foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

3.5.2 Estimativa de adesão de macrófagos na placa de cultivo celular

Após as 48 horas de diferenciação, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada poço e transferidas para tubos com capacidade de 1 mL, adicionou-se 100 µL do corante azul de tripan 0,2%, e a esta suspensão foi transferida para Câmara de Neubauer. As células foram contadas excluindo as células mortas coradas pelo corante azul de tripan, o resultado foi multiplicado pelo volume total do poço, e este foi subtraído de 10^6 que foi número de células adicionadas no início da diferenciação celular (PEREIRA, 2010).

3.5.3 Ensaio de fagocitose

Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi descartado, os poços foram delicadamente lavados 2 vezes com 1 mL de PBS e os sobrenadantes novamente foram

descartados. Foi utilizada a proporção de 1:5 (macrófago:levedura) selecionada a partir de estudos anteriores em que as proporções variaram entre 1:3, segundo Bain et al. (2012) e Lewis et al. (2012); 1:5 segundo Németh et al. (2014) e 1:6 segundo Uwamahoro et al. (2014), assim, em cada placa de cultivo celular foram adicionadas 5×10^6 *C. albicans*/poço, as leveduras estavam suspensas em RPMI suplementado com SFB e antibióticos. As placas foram centrifugadas a 2000 rpm e 25°C por 2 minutos para facilitar o contato das leveduras com os macrófagos no fundo das placas. Uma placa foi incubada por 30 minutos e outra foi incubada por 1 hora a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.5.4 Avaliação da fagocitose pelo método de coloração May Grunwald-Giemsa

Utilizando as placas anteriormente descritas no item 3.5.3, após o término do tempo de incubação cada poço das placas foi delicadamente lavado 2 vezes com 1 mL de PBS e os sobrenadantes foram descartado. As lamínulas foram removidas dos poços com auxílio de pinças estéreis e coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa, o qual cora as leveduras vivas de azul enquanto as leveduras mortas não se coram (HERSCOWITZ; HOLDEN; GHAFTAR, 1981 modificado por CORAZZINI, 1993). As células foram observadas em microscópio óptico, objetiva de 100x, e foi contado o número de células de *C. albicans* fagocitadas por 100 macrófagos, em triplicata, assim obteve-se a média de leveduras fagocitadas por macrófago (UWAMAHORO et al., 2014).

3.5.5 Porcentagem de filamentação

Foi realizado um ensaio para avaliar a filamentação de *C. albicans* após exposição à concentrações subinibitórias dos antifúngicos. A diferenciação das células fagocíticas foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente (item 3.5.1). Após as 48 horas de diferenciação, foram adicionadas 5×10^6 *C. albicans* por poço, as quais estavam suspensas em 0,5 mL de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, em triplicata, e sobre esses 3 poços foi adicionado 0,5 mL do mesmo meio de cultura para amostras controles não expostas à antifúngicos. Em outros 3 poços foram adicionadas 5×10^6 *C. albicans* por poço, as quais estavam suspensas em 0,5 mL de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, e que foram cultivadas em YCB-BSA contendo $\frac{1}{4}$ da IC₅₀ de fluconazol, sobre esses poços foi adicionado 0,5 mL do meio de cultura acrescido de 0,250 µg/mL de fluconazol para perfazer a concentração final de 0,125 µg/mL ($\frac{1}{4}$ da IC₅₀) de fluconazol por poço. De modo

semelhante, foram feitas as outras soluções de antifúngicos no meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, para que após distribuição em cada um dos 3 poços (triplicata), a levedura fosse mantida sob as mesmas condições de exposição em que foi cultivada no caldo YCB-BSA, ou seja, 0,250 µg/mL de fluconazol ($\frac{1}{2}$ da IC₅₀), 0,125 µg/mL de anfotericina B ($\frac{1}{4}$ da IC₉₀) e 0,250 µg/mL de anfotericina B ($\frac{1}{2}$ da IC₉₀).

Desse modo, o volume final de cada poço foi de 1 mL com aproximadamente 10⁶ macrófagos e 5x10⁶ *C. albicans*. A proporção de 1:5 (macrófago:levedura) foi selecionada a partir de estudos anteriores, como de Németh et al. (2014) e por ensaio de padronização descrito acima (item 3.5.3). As placas foram centrifugadas a 2000 rpm e 25°C por 2 minutos para facilitar o contato das leveduras com os macrófagos sobre as lamínulas no fundo das placas e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.

Semelhante ao item 3.5.4, após o término do tempo de incubação cada poço da placa foi delicadamente lavado 2 vezes com 1 mL de PBS e os sobrenadantes foram descartados. As lamínulas foram removidas dos poços com auxílio de pinças estéreis e coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa, o qual cora as leveduras vivas de azul enquanto as leveduras mortas não se coram (HERSCOWITZ; HOLDEN; GHAFTAR, 1981 modificado por CORAZZINI, 1993). As células foram observadas em microscópio óptico, objetiva de 100x, e foram contadas o número de leveduras que filamentaram em 100 células de *C. albicans*, em triplicata, assim obteve-se a porcentagem média e desvio padrão de leveduras que filamentaram.

3.5.6 Atividade fungicida de macrófagos por plaqueamento em profundidade em ágar Sabouraud Dextrose

A atividade fungicida dos fagócitos foi avaliada por plaqueamento em profundidade com ágar Sabouraud Dextrose, semelhante a Loyola et al. (2002), Newman et al. (2005) e Tavanti et al. (2006) com adaptações. Em placas de cultivo de 6 poços contendo 10⁶ macrófagos foram adicionadas 5x10⁶ *C. albicans* por poço, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm e 25°C por 2 minutos e incubadas em estufa por 1 hora a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. Após o término do tempo de incubação, descartou-se o sobrenadante de cada poço e adicionou-se 600 µL de tampão PBS (pH 7,2) e cada poço foi raspado como raspadores celulares estéreis, e a suspensão celular foi transferida, com auxílio de pipeta de 1 mL, para tubos de centrífuga com capacidade de 2 mL. O poço foi ainda lavado com mais 600 µL de tampão PBS para remover todas as células, e o conteúdo novamente foi transferido, com auxílio de pipeta de 1 mL, para os tubos de centrífuga, perfazendo um total 1,2 mL de suspensão de macrófagos e

leveduras que foram homogeneizados em vórtex. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas até 10^{-6} e 100 μL de cada diluição foram inoculados em placas estéreis, sobre o inóculo foi adicionado em ágar Sabouraud Dextrose e as placas foram incubadas a 37°C por 48h. A porcentagem de redução de unidades formadoras de colônia (UFC) com média e desvio padrão foi determinada como se segue: porcentagem de redução = $100 - (\text{UFC do grupo experimental} / \text{UFC grupo controle}) \times 100$. As culturas controle consistiam em células de *C. albicans* incubadas na ausência de macrófagos.

3.6 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Após as células THP-1 serem cultivados por cerca de 10 dias, multiplicarem-se e apresentarem cerca de 5×10^7 células, quantidade suficiente para os testes, as células suspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos contidas na garrafa de cultivo foram transferidas para um tubo de centrifuga, o tubo foi centrifugado à 2000 rpm e 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Sobre as células foram adicionados 30 mL de meio RPMI 1640 com antibióticos e sem SFB, a privação de SFB diminui a velocidade de proliferação celular, as células foram transferidas para uma garrafa de cultivo celular e incubadas a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas (PEREIRA, 2010).

Posteriormente, as células THP-1 foram transferidas para um tubo de centrifuga, o tubo foi centrifugado à 2000 rpm e 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Sobre as células foi adicionado 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB acrescido de estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL), e foi retirada uma alíquota de 100 μL para contagem das células em Câmara de Neubauer excluindo as células mortas pela inclusão do corante azul de tripan (PEREIRA, 2010). Após contagem das células, em tubo de centrifuga foi preparada uma suspensão contendo 5×10^5 células/mL em RPMI suplementado com SFB e antibióticos. Em outro tubo de centrifuga foi preparada uma solução de PMA a 300 nM em RPMI suplementado com SFB e antibióticos. Em placas para cultura celular em poliestireno com 6 poços estéreis foram adicionados 2 mL da suspensão de células THP-1 com concentração de 5×10^5 células/mL e 1 mL da solução de PMA a 300 nM/mL, perfazendo um volume final de 3 mL com 10^6 células e 100 nM de PMA por poço, semelhante a Tavanti et al. (2006) com modificações. As placas foram incubadas a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 por 48 horas. De acordo com Daigneault et al. (2010) as células THP-1 ao serem estimuladas pelo PMA diferenciam-se de monócitos para macrófagos e, assim, podem aderir ao fundo do poço da placa de cultivo.

3.7 ENSAIO DE FAGOCITOSE

Os ensaios de infecção de macrófagos foram realizados logo após o término do ensaio de diferenciação das células THP-1 com PMA. As placas foram retiradas da estufa, alíquotas de 100 μ L foram retiradas de cada poço e transferidas para tubos com capacidade de 1 mL, adicionou-se 100 μ L do corante azul de tripan 0,2%, e a esta suspensão foi transferida para Câmara de Neubauer. As células suspensas foram contadas excluindo as células mortas coradas pelo corante azul de tripan e foi estimado o número de macrófagos aderidos na placa pela diferença das células totais adicionadas por poço e a média das células suspensas por poço (PEREIRA, 2010). Cada poço da placa foi delicadamente lavado 2 vezes com 1 mL de PBS e os sobrenadantes foram descartados, procedimento realizado para retirar células não aderidas.

Em 3 poços foram adicionadas 5×10^6 *C. albicans* suspensas em 2 mL de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, e sobre esses poços foi adicionado 1 mL do mesmo meio de cultura para amostras controles não expostas à antifúngicos. Em outros 3 poços foram adicionadas 5×10^6 *C. albicans* por poço, as quais estavam suspensas em 1 mL de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, e que foram cultivadas em YCB-BSA contendo $\frac{1}{4}$ da IC_{50} de fluconazol, sobre esses poços foi adicionado 1 mL do meio de cultura acrescido de 0,375 μ g/mL de fluconazol para perfazer a concentração final de 0,125 μ g/mL ($\frac{1}{4}$ da IC_{50}) de fluconazol por poço. De modo semelhante, foram feitas as outras soluções de antifúngicos no meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e antibióticos, para que após distribuição em cada um dos 3 poços (triplicata), a levedura fosse mantida sob as mesmas condições de exposição em que foi cultivada no caldo YCB-BSA, ou seja, 0,250 μ g/mL de fluconazol ($\frac{1}{2}$ da IC_{50}), 0,125 μ g/mL de anfotericina B ($\frac{1}{4}$ da IC_{90}) e 0,250 μ g/mL de anfotericina B ($\frac{1}{2}$ da IC_{90}).

Desse modo, o volume final de cada poço foi de 3 mL com aproximadamente 10^6 macrófagos e 5×10^6 *C. albicans*. A proporção de 1:5 (macrófago:levedura) foi selecionada a partir de estudos anteriores, como de Németh et al. (2014) e por ensaio de padronização descrito acima (item 3.5.3). As placas foram centrifugadas a 2000 rpm e 25°C por 2 minutos para facilitar o contato das leveduras com os macrófagos no fundo das placas e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.

De modo que ao final, obteve-se 6 grupos de amostras de *C. albicans*:

- a) Cultivadas na ausência de antifúngicos e sem contato com macrófagos;
- b) Cultivadas na ausência de antifúngicos e contato com macrófagos;

- c) Cultivadas na presença de $\frac{1}{4}$ da IC de fluconazol e contato com macrófagos;
- d) Cultivadas na presença de $\frac{1}{4}$ da IC de anfotericina B e contato com macrófagos;
- e) Cultivadas na presença de $\frac{1}{2}$ da IC de fluconazol e contato com macrófagos;
- f) Cultivadas na presença de $\frac{1}{2}$ da IC de anfotericina B e contato com macrófagos.

Posteriormente, alíquotas de 100 μ L foram retiradas de cada poço e transferidas para tubos com capacidade de 1 mL, adicionou-se 100 μ L do corante azul de tripan 0,2%, e a esta suspensão foi transferida para Câmara de Neubauer. As células suspensas foram contadas excluindo as células mortas coradas pelo corante azul de tripan (PEREIRA, 2010).

Cada poço foi delicadamente lavado com 1 mL de PBS para que as células de levedura não fagocitadas ou não aderidas fossem removidas pela lavagem, a lavagem foi realizada 2 vezes e os sobrenadantes desprezados. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS em cada poço, a placa foi colocada sobre banho de gelo por 1 minuto para facilitar o desprendimento das células, cada poço foi raspado com o auxílio de raspadores de células estéreis e descartáveis, as células de leveduras e macrófagos suspensas em PBS foram transferidas para tubos de centrífuga de capacidade 1,5 mL e centrifugadas a 13.500 rpm e 4°C por 5 minutos, condição na qual as células precipitaram e o sobrenadante foi descartado. A partir das amostras contidas em cada tubo seguiu-se com a extração de ácido ribonucleico (RNA).

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA

Sobre as células geradas ao final do ensaio de fagocitose foram adicionados 100 μ L de RNAlater® solution (Ambion™) e os amostras foram agitados por 60 segundos em vórtex, posteriormente, 40 μ L de liticase (50 unidades, obtida de *Arthrobacter luteus*, Sigma), 60 μ L de tampão (EDTA/sorbitol/ β -mercaptoetanol) e 80 μ L de pérolas de vidro (450-600 μ m, Sigma), os tubos foram agitados por 15 segundos em vórtex e incubados 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida, foram adicionados 1 mL de Trizol® Reagente (Ambion™) e os tubos foram mantidos por 20 minutos em banho de gelo, pois temperaturas baixas ajudam manter a integridade do RNA, e após, a cada amostra foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (10% v/v), os tubos foram homogeneizados em vórtex por 15 segundos, incubados por 20 minutos em banho de gelo para evitar a degradação do RNA e centrifugados por 15 minutos a 13500 rpm e 4°C. A fase aquosa foi transferida para outros tubos de centrífuga e sobre este foi adicionado 600 μ L de isopropanol gelado com a finalidade de precipitar o RNA. Os tubos foram incubados por 16 horas à -20°C, centrifugados por 30 minutos a 13500 rpm e 4°C, e após, o sobrenadante foi retirado e o precipitado de RNA foi lavado 2 vezes com 1 mL de álcool etílico

75%, os tubos centrifugados por 10 minutos a 13500 rpm e 4°C, e o sobrenadante foi desprezado. Sobre o precipitado foram adicionados 10 µL de água DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato) autoclavada para solubilização do RNA. O RNA extraído foi armazenado a -20°C por no máximo 48 horas, até ser quantificado, purificado e utilizado na reação de transcrição reversa para síntese de cDNA, e posteriormente o RNA foi armazenado a -80°C.

3.9 TRATAMENTO DO RNA COM DNase I

O RNA de cada amostra foi purificado utilizando DNase I (Desoxirribonuclease I, Sigma-Aldrich) para remover DNA contaminante. A utilização de DNase para purificar RNA já foi descrita anteriormente (DUNKEL et al., 2014; FREIRE et al., 2015; NAGLIK et al., 2008). Para cada reação de purificação foi utilizado um tubo para termociclador de capacidade 0,2 mL onde foram adicionados 2000 ng de RNA suspensos em 8 µL de água DEPC, 1 µL de DNase I (1 unidade/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) que ficaram 15 minutos em temperatura ambiente para degradação de DNA, em seguida foi adicionado 1 µL de solução de parada (50 mM EDTA) para prevenir que os íons metálicos (Mg/Ca) catalisem a hidrólise do RNA durante o aquecimento, e posteriormente os tubos foram incubados por 10 minutos a 70°C afim de desnaturar a DNase I, resultando ao final em 11 µL por amostra de RNA. Após purificação de RNA, foi realizada nova quantificação em (ng/µL) utilizando o espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop[®] 2000c (Thermo Scientific) e então, seguiu-se para a síntese de cDNA.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop[®] 2000c (Thermo Scientific), a leitura foi feita com 1 µL de cada amostra e foram anotadas as concentrações em ng/µL e razão entre as absorbâncias em 260 nm e 280nm.

3.11 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (SÍNTESE DE cDNA)

Sobre 1000 ng de RNA purificado suspensos em 11 µL de água DEPC foram adicionados 1µL de Oligo(dT)₁₈ Primer na concentração de 0.5 µg/µL (ThermoScientific) e 1 µL de uma mistura contendo os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados “dNTP’s” (dATP

- desoxiAdenosina Trifosfatada, dCTP - desoxiCitidina Trifosfatada, dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada, dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada) na concentração de 10 mM (Invitrogen). As reações foram levadas ao termociclador *Gene Amp[®] PCR System 9700* (Applied Biosystem) por 5 minutos a 65°C. Após, os tubos contendo a mistura de reação foram colocados no banho de gelo por 20 segundos para evitar anelamentos inadequados. Em seguida, 2 µL de ditiotreitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen) e 4 µL de tampão (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen) foram adicionados aos demais componentes como cofatores da reação e os tubos colocados novamente no termociclador a 37°C. Após 20 segundos a 37°C, temperatura necessária para promover o anelamento dos *primers*, foi adicionado 1 µL da enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Invitrogen) que é a responsável pela transcrição reversa e consequente síntese do cDNA, a partir do RNA inicial. Após 50 minutos a 37°C no termociclador, um ciclo de 95°C por 5 minutos promoveu a inativação da enzima e a remoção dos *primers*. Ao final da reação, os tubos contendo as amostras de cDNA foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C para posterior utilização em ensaios de reação em cadeia da polimerase em quantitativa (qPCR).

3.12 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA

Para qPCR foram utilizadas reações do tipo sondas de hidrólise composta pelos *primers forward* e *reverse* (para o gene correspondente) e sondas duplamente marcadas com o fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e o inibidor não-fluorescente *lowa Black[®] FQ* na 3'. A sequência dos *primers* a serem utilizados para detectar os genes *SAP2* e *SAP4* estão descritos no Quadro 1, assim como, o *primer* para o gene da actina (*ACT1*) que foi utilizado como gene endógeno normalizador. A utilização de *ACT1* como gene normalizador já foi descrito em estudos anteriores de expressão de genes *SAP* (NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014; THEBERGE et al., 2013).

Para a detecção dos genes *SAP2* e *SAP4* foram feitas qPCR com 200 ng de cDNA suspensos em 1,5 µL de água DEPC, mais 5 µL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems) e 0,5 µL da mistura contendo os *primers forward* e *reverse* (18 µM) para o gene correspondente e a sonda (5µM) e 3 µL de água DEPC, totalizando um volume de 10µL por reação e cada reação foi feita em duplicata. Controles positivos (cDNA padronizado) e negativos (amostra sem cDNA) foram preparados paralelamente às amostras. As reações dos controles e das amostras foram realizadas no equipamento *StepOne[™] Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). O ciclo utilizado foi de 50°C por 2 minutos, pois esta condição promove

a remoção de qualquer ligação inadequada e evita contaminação cruzada. Em seguida, adotou-se um ciclo de 95°C por 10 minutos promovendo 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.

Quadro 1 - Sequência de *primers* e sondas das *SAP2*, *SAP4* e *ACT1* para análise em qPCR.

Gene	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')	Sonda (5'–3')
<i>SAP2</i>	TCCTGATGTTAATGTTGAT TGCAAG	TGGATCATATGTCCCCT TTTGTT	CACTTATAGTGATCAAAC TGCAGATTTCT
<i>SAP4</i>	CAATTTAACTGCAACAGG TCCTCTT	AGATATTGAGCCCACAG AAATTCC	TGCCACATCATTCTAC CAGTATCGTCG
<i>ACT1</i>	GCTGGTAGAGACTTGACC AACCA	GACAATTTCTCTTTTCAG CACTAGTAGTGA	ACTGTAACACGTTTCAGA CAAATCTTGGACAA

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

3.12.1 Análise e interpretação dos resultados da qPCR

A qPCR fornece valores de *Cycle Threshold* (C_T), ciclo em que cada reação atinge o limiar da fase exponencial de fluorescência, estes foram registrados e analisados. A determinação de valores de C_T para os genes *SAP2*, *SAP4* e *ACT1* em até 40 ciclos, permitiu detectar a presença de genes *SAP* nas amostras e validar a amplificação. Amostras com C_T indeterminado para *SAP2* e *SAP4*, e determinado para *ACT1* foram considerados válidos e relatados como negativos para a presença do gene *SAP* na amostra. 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 do gene a partir de experimento por qPCR (NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014). Os valores de C_T foram fornecidos pela qPCR e analisados da seguinte forma: foi calculada a média dos C_T para *SAP* e para *ACT1* entre as duplicatas de cada amostra e esta média foi chamada de C_T médio; $\Delta C_T = C_T$ médio da *SAP* - C_T médio da *ACT1*; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ amostra tratada - ΔC_T amostra não tratada, e finalmente a quantidade relativa pode ser expressa por $2^{-\Delta\Delta C_T}$ das amostras tratadas em relação a amostra não tratada, também chamada de controle (que deve ser igual a 1), as amostras tratadas que exibem $2^{-\Delta\Delta C_T}$ menor que 1 expressam menos *SAP* que o controle e as amostras tratadas que exibem $2^{-\Delta\Delta C_T}$ maior que 1 expressam mais *SAP* que o controle.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados que apresentaram normalidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de *Tukey* com intervalo de confiança de 95% e 99%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste trabalho são apresentados a seguir.

4.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM PADRÃO DE *C. albicans* ATCC 10231 AOS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B.

O perfil de sensibilidade da linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231 aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B foi determinado como descrito anteriormente, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. A concentração inibitória de fluconazol para inibir 50% do crescimento da linhagem de *C. albicans* foi de 0,5 µg/mL, e a concentração inibitória de anfotericina B para inibir 90% do crescimento da linhagem de *C. albicans* foi 0,5 µg/mL. Desse modo, para expor a levedura a concentrações subinibitórias dos antifúngicos nos ensaios de fagocitose, *C. albicans* foi cultivada em 0,125 e 0,250 µg/mL, ¼ e ½ da IC₅₀ de fluconazol, respectivamente, e 0,125 e 0,250 µg/mL, ¼ e ½ da IC₉₀ de anfotericina B.

Tabela 1 - Concentração inibitória (IC₅₀ e IC₉₀) da linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231 e sua classificação quanto à sensibilidade aos antifúngicos testados.

Fluconazol		Anfotericina B	
IC ₅₀ (µg/mL)	Classificação	IC ₉₀ (µg/mL)	Classificação
0,500	S	0,500	S

Fonte: Do autor

Legenda: S: sensível; IC₅₀: concentração do antifúngico que inibe 50% da linhagem (µg/mL); IC₉₀: concentração do antifúngico que inibe 90% da linhagem (µg/mL).

Candida albicans ATCC 10231 foi classificada como sensível aos dois antifúngicos, pois os documentos M27-A3 e M27-S4 do CLSI (2008, 2012) preconizam que linhagens que apresentarem MIC ≤ 2 µg/mL para fluconazol devem ser consideradas sensíveis, bem como as que mostrarem MIC ≤ 1 µg/mL para anfotericina B. A variação nos tempos de leitura da densidade óptica, realizadas após 24 a 48 horas de incubação foi devido as metodologias preconizadas nos documentos acima citados e pelo EUCAST, e devido ao fato que nos testes de sensibilidade fúngica, algumas linhagens de *Candida* spp. podem não apresentar crescimento suficiente após 24 horas de incubação, assim aquelas linhagens que não apresentarem DO > 0,2 devem ser incubadas por mais 12 ou 24 horas (ARENDRUP et al., 2012).

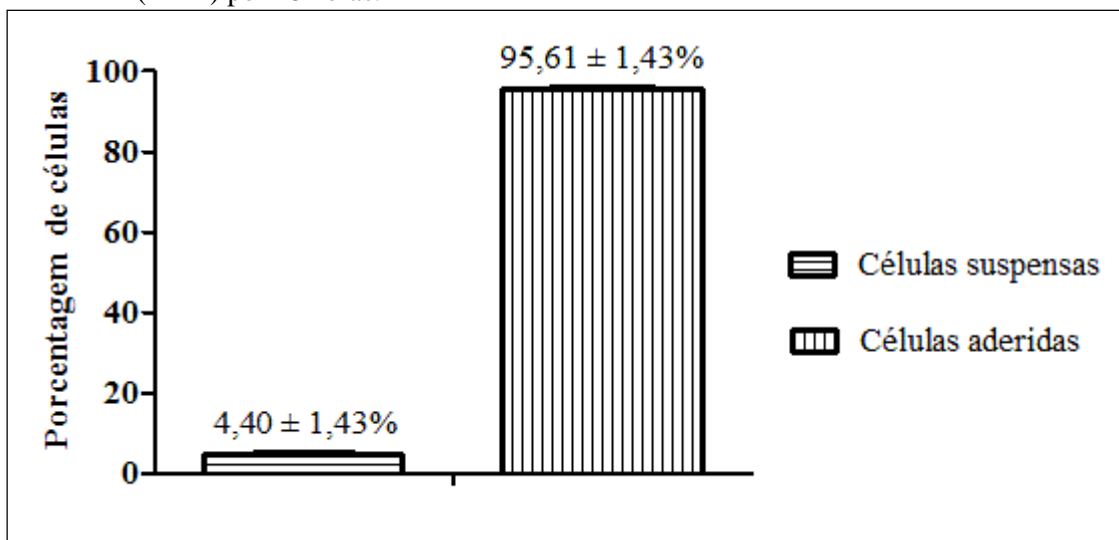
Estudos anteriores quanto à sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol exibiram IC₅₀ igual a 1 µg/mL, concentração próxima a encontrada neste trabalho (FERNANDES et al., 2014; SOUZA et al., 2014). Outra pesquisa de suscetibilidade de *C. albicans* ATCC 10231 a antifúngicos apresentou concentração inibitória mínima de 1,0 µg/mL para anfotericina B e 0,25 µg/mL para fluconazol (COELHO et al., 2012).

4.2 DIFERENCIAÇÃO E ADESÃO DOS MACRÓFAGOS

As células THP-1 ao serem estimuladas pelo PMA diferem-se de monócitos para macrófagos e aderem ao fundo e às paredes dos poços da placa de cultivo ou lamínula de vidro, portanto, as células suspensas provavelmente são monócitos não diferenciados. Após 48 horas de diferenciação cerca de $95,61 \pm 1,43\%$ das células foram diferenciadas em macrófagos (FIGURA 2).

Resultado semelhante ao descrito nesse trabalho foi encontrado em um estudo de diferenciação de células THP-1, em que mais de 90% das células diferenciaram-se em macrófagos após serem mantidas em contato com PMA em concentrações de 5 a 100 ng/mL (8 a 162 nM) por 48 horas (PARK et al., 2007).

Figura 2 - Porcentagem média \pm desvio padrão de células monocíticas suspensas no meio de cultura e de macrófagos aderidos na placa após diferenciação com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 48 horas.

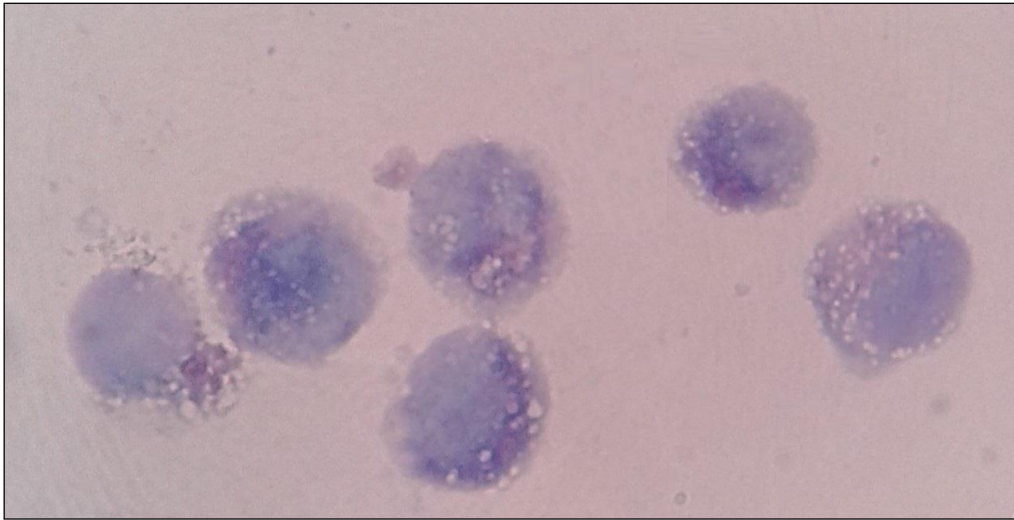


Fonte: Do autor.

A diferenciação celular também pode ser observada pela visualização das lamínulas coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa (FIGURA 3). A diferenciação fenotípica de

macrófagos depende do órgão para o qual ele migra, entretanto algumas características são comumente observadas. Os monócitos são células circulares de 10-15 μM com núcleo em formato de feijão e citoplasma finamente granular, após diferenciação em macrófagos estes apresentam aumento no tamanho da célula e na relação núcleo/citoplasma apresentando numerosos vacúolos fagocíticos e organelas citoplasmáticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 3 - Macrófagos aderidos em lamínulas de vidro após diferenciação com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 48 horas e corados pelos corantes May Grunwald-Giemsa.



Fonte: Do autor.

A células THP-1 proporcionam um modelo competente *in vitro* de monócitos e macrófagos durante a interação com células fúngicas, sendo utilizadas anteriormente em ensaios de fagocitose e expressão gênica (BARKER; LIU; ROGERS, 2005; MARR et al., 2001; TAVANTI et al., 2006). A utilização de PMA pode aumentar a diferenciação de células THP-1 em macrófagos, aumentando ainda, o número de mitocôndrias e lisossomos, a resistência a apoptose e a potência de receptores de membrana TLR2, componentes importantes na diferenciação de macrófagos (DAIGNEAULT et al., 2010; TAVANTI et al., 2006).

4.3 AVALIAÇÕES DA FAGOCITOSE E ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS

A observação de lamínulas coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa possibilitou observar que após 30 minutos de incubação, *C. albicans* na presença ou ausência de macrófagos permaneceram predominantemente na forma de levedura. Entretanto, após 1 hora de incubação,

C. albicans na presença ou ausência de macrófagos formam tubos germinativos, pseudo-hifas e ou hifas (FIGURA 4).

Morfologicamente, o ensaio de fagocitose mostrou que *C. albicans* pode rapidamente diferenciar-se de levedura em pseudo-hifas e hifas, que podem crescer para fora do macrófago, e eventualmente, rompê-lo. A diferenciação entre hifa verdadeira e pseudo-hifa pode ser feita pela observação da formação do tubo germinativo. A partir da célula leveduriforme, na formação da hifa verdadeira não há a constrição entre a célula-mãe e o filamento, em pseudo-hifas forma-se a constrição no septo entre a célula-mãe e o comprimento do filamento (BARBEDO; SGARBI, 2010; WHITEWAY; BACHEWICH, 2007).

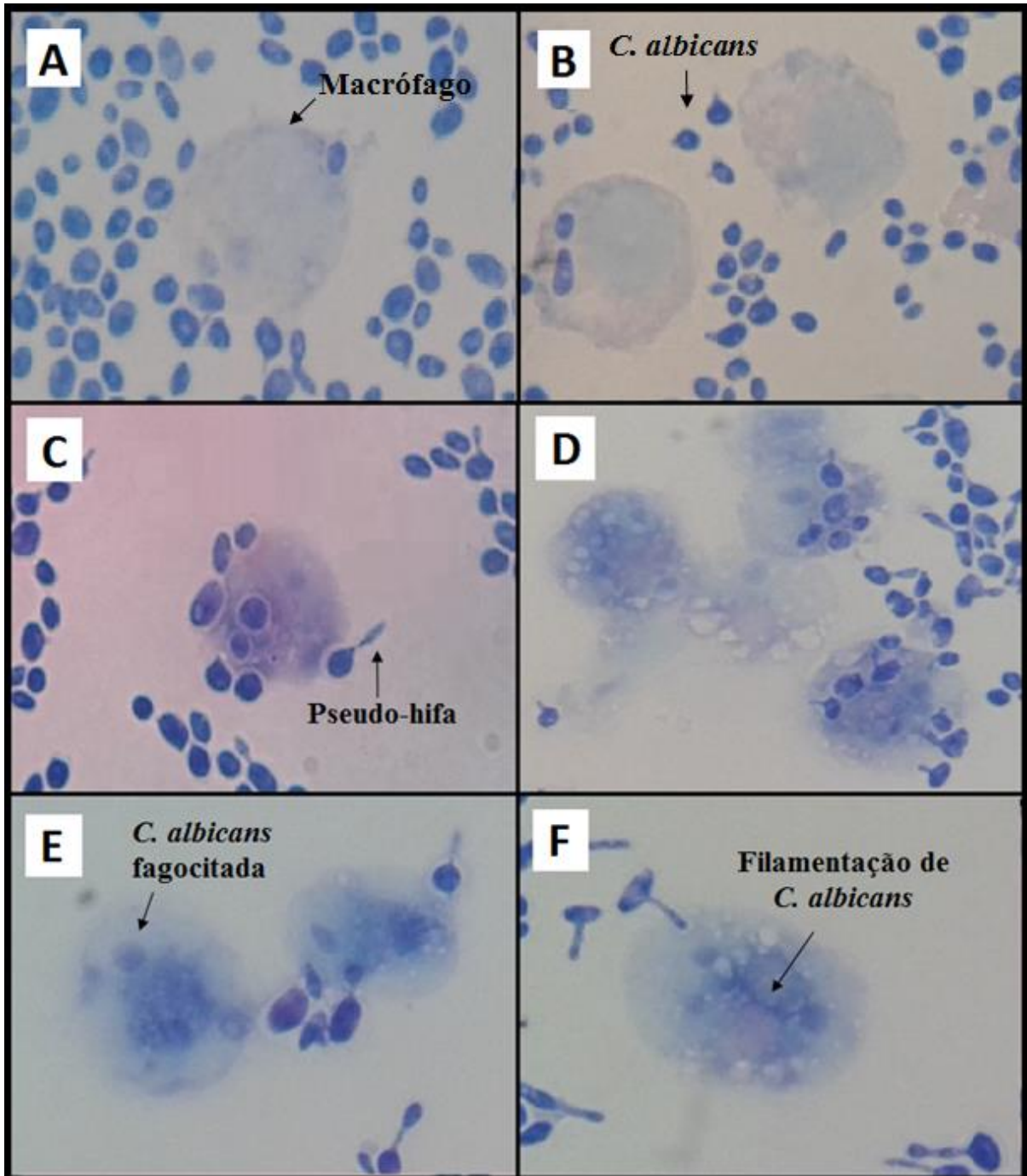
O crescimento de hifas de *C. albicans* e perfuração da membrana celular de fagócitos já foi descrita anteriormente (BAIN et al., 2014; LO et al., 1997; MIRAMÓN; KASPER; HUBE, 2013; UWAMAHORO et al., 2014). Na maioria dos casos, as membranas dos macrófagos não restringem a expansão de hifas, resultando em eventual ruptura do fagócito. *Candida albicans* englobadas por macrófagos podem formar hifas, perfurar a membrana do fagócito e evadir-se deste a partir de 40 minutos após a fagocitose (BAIN et al., 2012).

Segundo estudos anteriores, a expressão dos genes *SAP4-6* pode ser estimulada durante a mudança de *C. albicans* de levedura para hifas e ocorre predominantemente em hifas (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). Portanto foi escolhido o tempo de 1 hora de incubação para os ensaios de fagocitose nas diferentes condições de exposição de *C. albicans*, e assim, possibilitar a formação de pseudo-hifas.

A observação de lamínulas coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa possibilitou ainda, a contagem de leveduras interiorizadas pelos macrófagos após 1 hora de incubação (FIGURA 4). Contando 100 macrófagos em cerca de 32 campos com a objetiva de 100x, pode-se observar a taxa média de fagocitose de 3 *C. albicans* por macrófago.

Adicionalmente, a atividade fungicida dos macrófagos foi avaliada após 1h de contato com as leveduras e pesquisada em ágar Sabouraud Dextrose, a qual apresentou média de $32,68\% \pm 1,65$ de *C. albicans* mortas pelos macrófagos. Esse resultado é semelhante a estudos anteriores que também avaliaram a atividade fungicida após 1 hora de contato entre as leveduras e células fagocíticas, como o trabalho de Tavanti et al. (2006) em que os macrófagos mataram 37,4% de *C. albicans*, e de Newman et al. (2005) no qual monócitos e macrófagos mataram 48% a 57% do inóculo inicial de *C. albicans*.

Figura 4 – Microscopia óptica de *C. albicans* cultivadas na presença de macrófagos após ensaio de fagocitose a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos ou 1 hora, lâminas coradas pelos corantes May Grunwald-Giemsa e visualizados em microscópio óptico na objetiva de em microscopia óptica 100x.



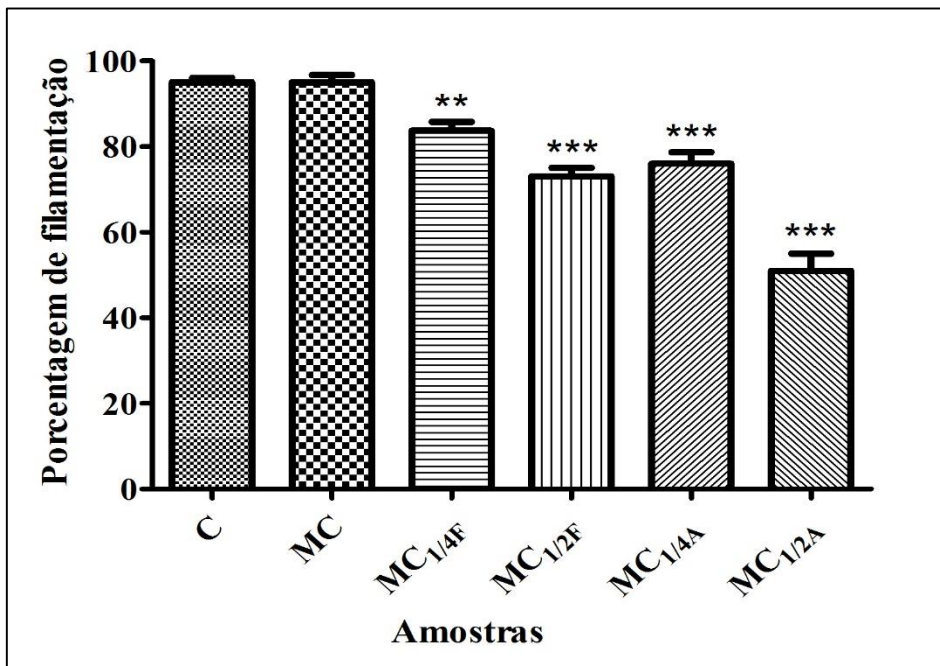
Fonte: Do autor.

Legenda: (A-B) Lâminas do ensaio de fagocitose de 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. *C. albicans* estava predominantemente na forma de leveduras. (C-F) Lâminas do ensaio de fagocitose de 1 hora a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, pode-se observar a formação de pseudo-hifas de *C. albicans* e a interiorização de leveduras pelos macrófagos.

A observação das placas de cultivo em microscópio óptico invertido durante a realização do ensaio de fagocitose nas diferentes condições de exposição de *C. albicans*, bem como, a

coloração de lamínulas pelos corantes May Grunwald-Giemsa, possibilitaram visualizar as mudanças morfológicas da levedura após ser exposta aos antifúngicos (FIGURAS 5 e 6). As amostras de *C. albicans* expostas ao fluconazol e a anfotericina B apresentaram prejuízo na filimentação da levedura ($p < 0,01$), o qual foi maior em *C. albicans* exposta a $0,250 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B ($\frac{1}{2}$ da IC_{90}) que exibiu redução percentual na filimentação da levedura igual a $46,32\% \pm 4,21\%$ quando comparada com as amostras de *C. albicans* cultivadas na ausência de antifúngicos (FIGURA 5). As amostras de levedura cultivadas na presença de macrófagos e expostas a $0,125 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B ($\frac{1}{4}$ da IC_{90}) mostraram redução na filimentação igual a $20,00\% \pm 2,79\%$ quando comparadas as amostras de *C. albicans* cultivadas na ausência de antifúngicos. As amostras de levedura cultivadas na presença de macrófagos e $0,125 \mu\text{g/mL}$ e $0,250 \mu\text{g/mL}$ de fluconazol, respectivamente $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da IC_{50} do antifúngico, apresentaram redução na filimentação de $11,93\% \pm 2,19\%$ e $23,16\% \pm 2,11\%$ quando comparadas com as amostras de *C. albicans* cultivadas na ausência de antifúngicos.

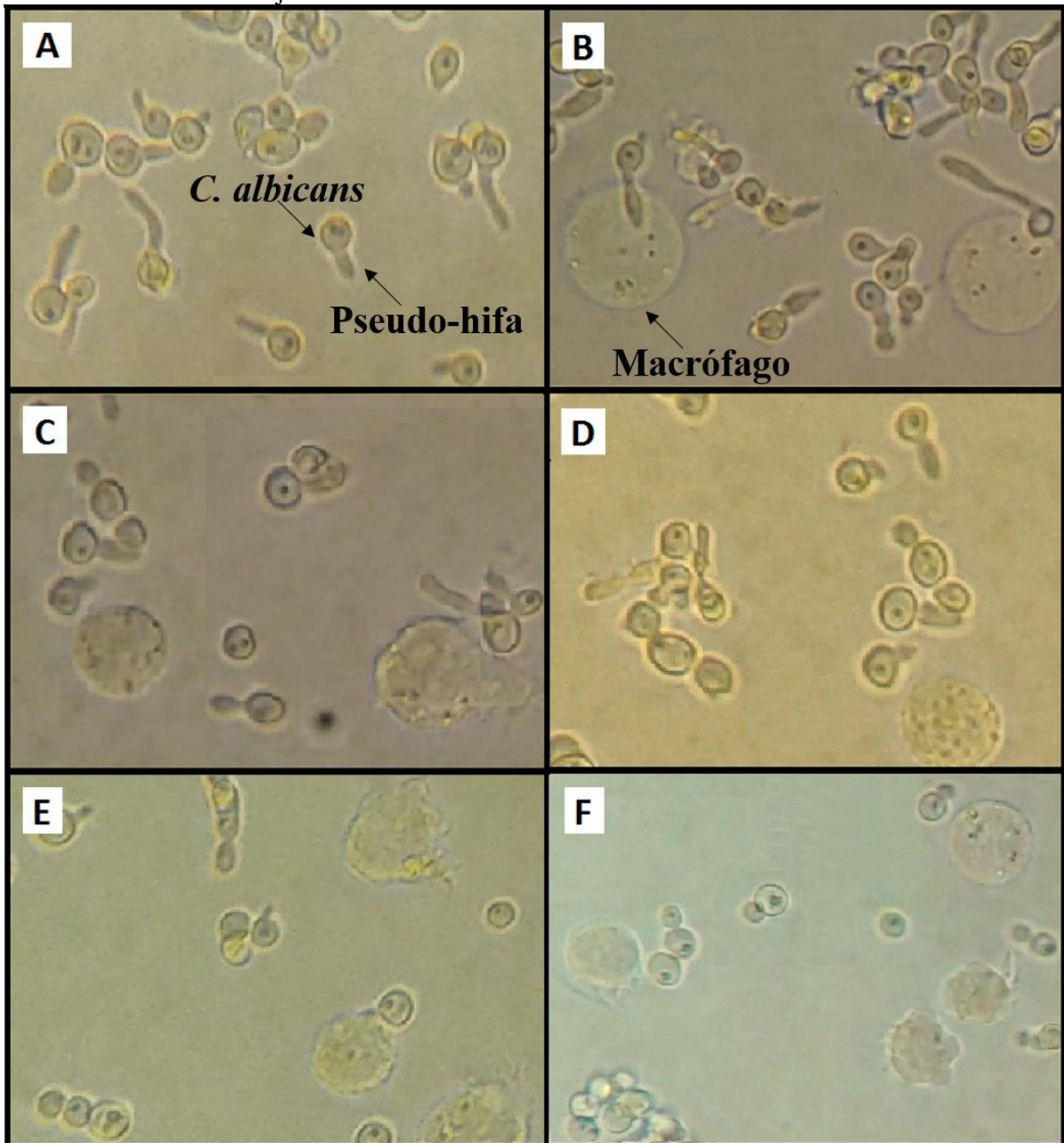
Figura 5 – Porcentagem média e desvio padrão da filimentação de *Candida albicans* após cultivo na ausência ou presença de macrófagos e exposição a antifúngicos.



Fonte: Do autor.

Legenda: C: *Candida albicans*; MC: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; MC_{1/4F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e $0,125 \mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{4}$ da IC_{50}) de fluconazol; MC_{1/2F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e $0,250 \mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ da IC_{50}) de fluconazol; MC_{1/4A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e $0,125 \mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{4}$ da IC_{90}) de anfotericina B; MC_{1/2A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e $0,250 \mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ da IC_{90}) de anfotericina B; ** ***: escala crescente de significância estatística, segundo Teste de Tukey com intervalo de 99% de confiança, amostras significativamente diferentes das amostras não expostas aos antifúngicos.

Figura 6 – Microscopia óptica de *C. albicans* cultivadas na presença ou ausência macrófagos e expostas ou não a antifúngicos após incubação a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora, visualizados na em placa de cultivo com RPMI 1640 suplementado e microscópio óptico invertido na objetiva de 40x.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) *Candida albicans*; (B) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; (C) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (¼ da IC₅₀) de fluconazol; (D) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (½ da IC₅₀) de fluconazol; (E) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (¼ da IC₉₀) de anfotericina B; (F) *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (½ da IC₉₀) de anfotericina B.

Observação semelhante foi feita em um estudo que mostrou as mudanças morfológicas em *C. albicans* expostas a 0,5 mg/L fluconazol, afetando também a integridade da membrana e parede celular fúngica. Culturas tratadas com fluconazol cresceram predominantemente na

forma de levedura com alguns aglomerados de células de levedura não dissociadas e poucas pseudo-hifas e hifas estavam presentes em comparação com o controle não tratado, o qual consistia de uma mistura de levedura, pseudo-hifas, e hifas (SORGO et al., 2011).

Candida albicans cultivadas em meios de cultura com apenas 0,1 µg/mL de fluconazol ou concentrações mais elevadas são eficazes na redução da formação de hifas em isolados susceptíveis. No entanto, a formação de hifas em isolados resistentes podem não ser afetada pela presença de fluconazol, a não ser na presença de fluconazol em concentrações de 100 µg/mL ou maiores (HA; WHITE, 1999). Atualmente o documento M27-S4 do CLSI (2012) preconiza que sejam consideradas resistentes ao fluconazol os isolados de *C. albicans* que apresentem MIC \geq 8 µg/mL para leitura após 24 horas do teste.

Sabe-se que anfotericina B pode inibir o crescimento de *C. albicans* na sua forma filamentosa (GIL; PÉREZ-DIAZ; NOMBELA, 1994). Pesquisas mostraram que culturas de *C. albicans* expostas a 4 µg/mL e 10 µg/mL desse antifúngico exibiram inibição na formação de hifas pela levedura (BARODKA et al., 2006; THEBERGE et al., 2013) . Comportamento semelhante ao observado neste trabalho, em que as concentrações subinibitórias de 0,125 e 0,250 µg/mL de anfotericina B prejudicaram a filamentação da levedura.

4.4 QUANTIFICAÇÕES DE RNA E cDNA

Após purificação das amostras de RNA com DNase I obteve-se amostras de RNA com 11 µL e concentrações que variaram entre 200-300 ng/µL, e relação 260/280 variando entre 1,90-2,11 com média igual a 1,97. E após reação de transcrição reversa as amostras de cDNA foram quantificadas para padronização da quantidade de cDNA empregado na qPCR. As amostras variaram entre 1000-1575 ng/µL e relação 260/280 variando entre 1,78-1,83 com média igual a 1,80.

A leitura em espectrofotômetro a 280 nm pode revelar contaminação por proteínas, pois nesse comprimento de onda as ligações peptídicas das proteínas fluorescem. Para avaliar o nível de pureza dos ácidos nucleicos na amostra, fazem-se leituras a 260 e 280 nm, analisando-se a relação 260/280. Se o resultado obtido estiver entre 1,8 e 2,0, a amostra se encontra em boas condições de análise, contendo pouca interferência de proteínas (MOLINARO, 2013). Sendo a relação 260/280 de aproximadamente 1,8 geralmente aceito como "puro" por DNA; e aproximadamente 2,0 geralmente aceito como "puro" para o RNA (THERMO SCIENTIFIC, 2012). Caso a leitura seja menor do que 1,6 é necessário novo processo de purificação dos

ácidos nucleicos (MOLINARO, 2013). Portanto, as amostras dessa pesquisa foram consideradas adequadas para realização da qPCR.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA

A qPCR possibilitou analisar a da expressão gênica diferencial de *SAP2* e *SAP4* em *C. albicans* cultivadas em diferentes condições, e os resultados estão descritos a seguir.

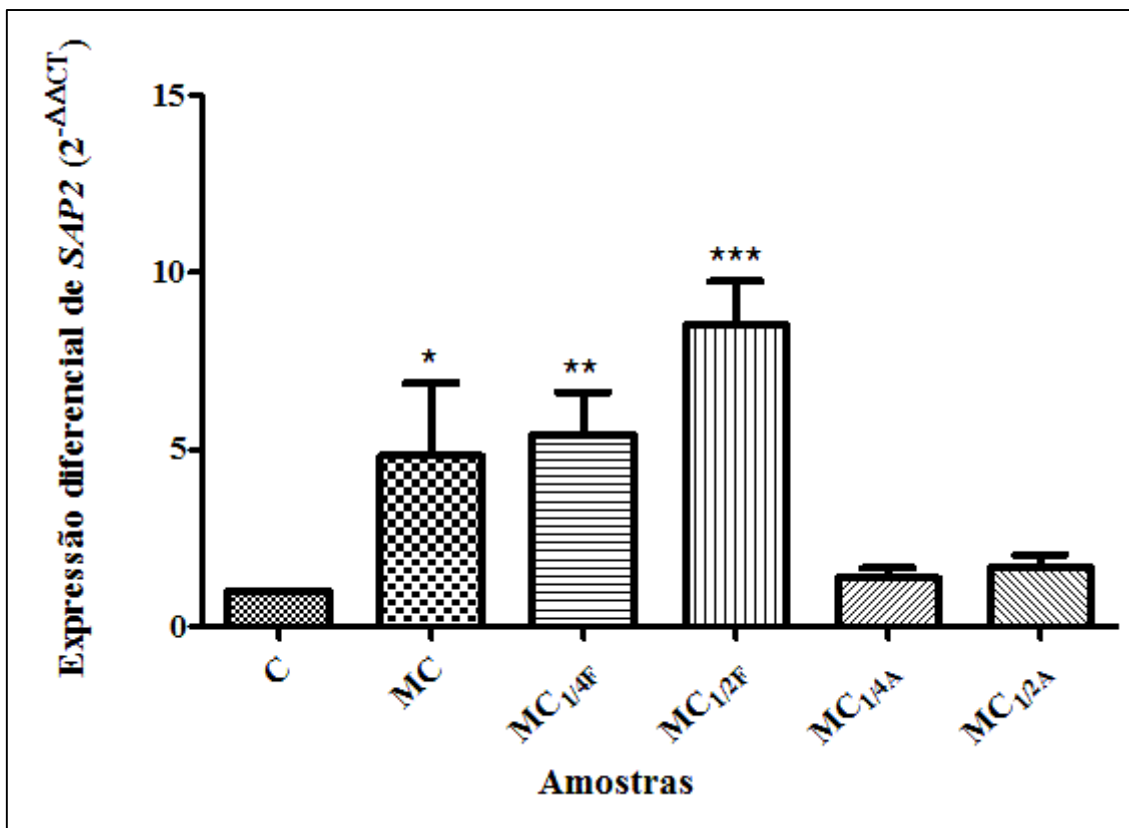
4.5.1 Expressão do gene *SAP2* em linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231.

A análise dos resultados da qPCR mostrou regulação positiva ($p < 0,01$) para o gene *SAP2* em *C. albicans* cultivadas na presença de macrófagos (MC), com média $4,83 \pm 2,05$ vezes maior que as amostras de *C. albicans* controle (C) cultivadas na ausência de macrófagos e nas mesmas condições de temperatura e atmosfera (FIGURA 7).

Em relação à exposição a antifúngicos, verificou-se aumento significativo ($p < 0,01$) na expressão gênica de *SAP2* após exposição ao fluconazol e não significativo ($p > 0,01$) após exposição a anfotericina B. As amostras de *C. albicans* incubadas na presença de macrófagos e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol, respectivamente $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da IC_{50} do antifúngico, expressaram $5,42 \pm 1,21$ e $8,51 \pm 1,24$ vezes mais *SAP2* que as amostras de *C. albicans* controle. As amostras de *C. albicans* expostas a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da IC_{90} do antifúngico) expressaram, respectivamente, $1,37 \pm 0,27$ e $1,66 \pm 0,38$ vezes mais *SAP2* que as amostras controle (FIGURA 7).

Comparando as amostras de levedura cultivadas na presença de macrófagos e expostas aos antifúngicos com as amostras cultivadas na presença de macrófagos mas não expostas aos antifúngicos (MC) foi observado diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na expressão de *SAP2* em *C. albicans*. A exposição a 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol ($\text{MC}_{1/2\text{F}}$) revelou regulação positiva na expressão de *SAP2* com média $3,68 \pm 2,07$ vezes maior que nas amostras MC. Entretanto, a exposição a anfotericina B revelou regulação negativa na expressão de *SAP2* nas amostras $\text{MC}_{1/4\text{A}}$ e $\text{MC}_{1/2\text{A}}$, com médias respectivamente iguais a $3,46 \pm 2,08$ e $3,17 \pm 2,14$ vezes menor quando comparadas as amostras MC.

Figura 7 – Expressão diferencial do gene *SAP2* em *Candida albicans* cultivada na presença ou ausência de macrófagos e expostas ou não a antifúngicos, incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.



Fonte: Do autor.

Legenda: C: *Candida albicans*; MC: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; MC_{1/4F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (1/4 da IC₅₀) de fluconazol; MC_{1/2F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (1/2 da IC₅₀) de fluconazol; MC_{1/4A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (1/4 da IC₉₀) de anfotericina B; MC_{1/2A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (1/2 da IC₉₀) de anfotericina B; * ** ***: escala crescente de significância estatística, segundo Teste de Tukey com intervalo de 99% de confiança, amostras significativamente diferentes das amostras controle (C).

O gene *SAP2*, codificador da isoenzima Sap2p, foi regulado positivamente pelo contato das células fúngicas com os macrófagos, sendo ou não fagocitadas, uma vez que, não foi possível separar as células de levedura que foram cultivadas na presença de macrófagos daquelas que foram efetivamente fagocitadas pelos macrófagos. Tavanti et al. (2006) também observaram regulação positiva qualitativa na expressão de *SAP2* em isolados orais de *C. albicans* após fagocitose por macrófagos diferenciados a partir de células THP-1, utilizando reação em cadeia de polimerase convencional e gel de agarose.

A exposição de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de fluconazol regulou positivamente a expressão de *SAP2*. Similar a estudos anteriores como de Copping et al. (2005) que utilizaram concentrações de 0,5 e 1 µg/mL de fluconazol em isolados de *C. albicans* e

observaram aumento na expressão de *SAP2* em relação ao aumento da dose do antifúngico, assim como Wu et al. (2000) que também observaram aumento na secreção de isoenzimas Sapp em isolados de *C. albicans* após exposição a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ MIC de fluconazol e regulação positiva para *SAP2*. E ainda, similar a resultados recentes do nosso grupo de pesquisa em que *C. albicans* expostas a concentrações subinibitórias de fluconazol também mostrou aumento na expressão de *SAP2*, cerca de 2 vezes maior que as amostras não expostas (SILVA et al., 2015).

Embora a exposição da levedura a anfotericina B não tenha apresentado diferença significativa em relação às amostras de *C. albicans* controle (C) não expostas a macrófagos e antifúngicos, *C. albicans* exposta a anfotericina B apresentou regulação negativa para *SAP2* ($p < 0,05$) em relação as amostras de leveduras cultivadas em contato com macrófagos (MC) (FIGURA 7). Semelhantes a esses resultados aqui apresentados, estudos recentes mostraram redução na expressão de *SAP2* em *C. albicans* ATCC 64548 exposta a $\frac{1}{4}$ da IC_{90} de anfotericina B, de aproximadamente 4 vezes, quando comparada as amostras de levedura não expostas aos antifúngicos (SILVA et al., 2015).

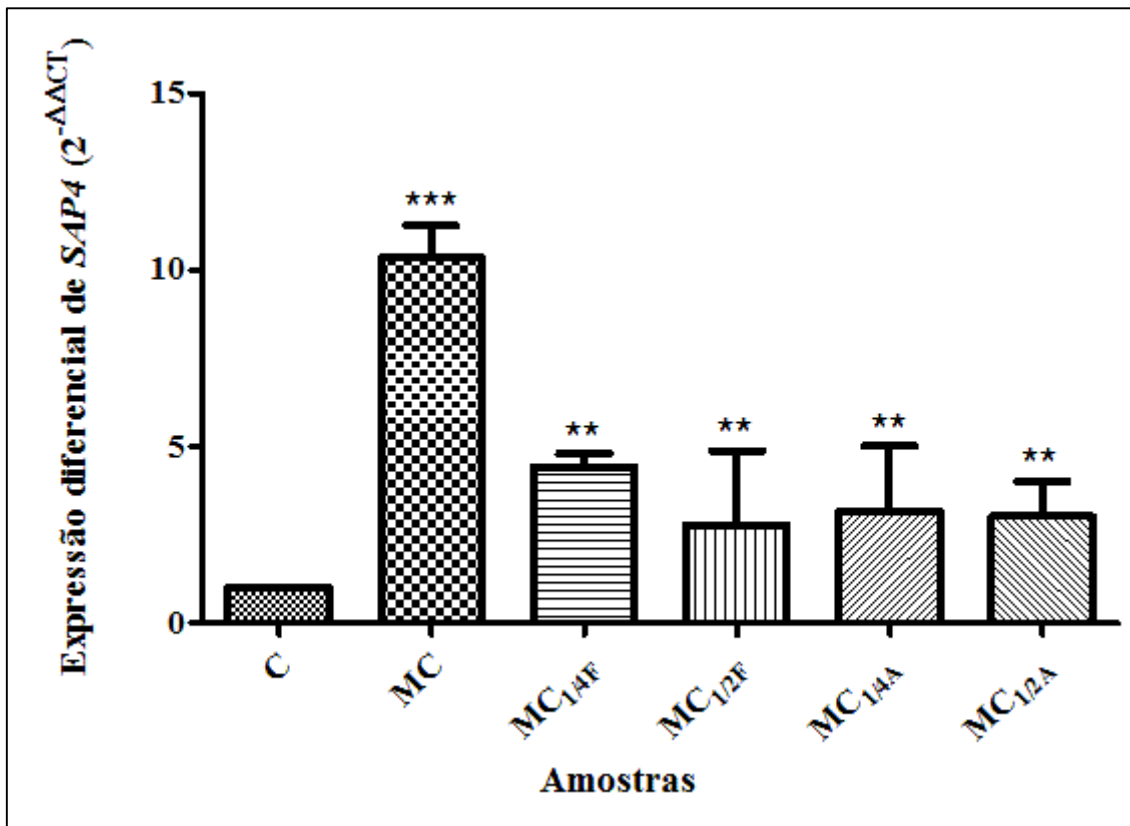
Os genes *SAP1-3* são positivamente reguladas durante infecções, sendo que *SAP2* é um dos genes mais expressos em candidíases oral e vaginal (NAGLIK et al., 2008). Além disso, Sap2p pode induzir modulação imune e foi utilizada com sucesso como um imunógeno para reduzir candidíase de mucosas em modelos animais (VILANOVA et al., 2004).

Em relação a utilização de *ACT1* como gene normalizador, nesse trabalho a média e desvio padrão dos C_t de *ACT1* das amostras em diferentes condições de cultivo foi igual a $37,63 \pm 0,93$, ou seja, variou menos de 2 ciclos. O gene *ACT1* é muito utilizado como gene endógeno controle em expressão gênica de *Candida* spp. e não é regulado durante a morfogênese, o que possibilitou seu uso neste trabalho (DELBRÜCK; ERNST, 1993; LACKEY et al., 2013; LEUKER; HAHN; ERNST, 1992; MARTIN et al., 2013; NAGLIK et al., 2008; NASEEM; ARAYA; KONOPKA, 2015; STANISZEWSKA et al., 2014; VINCES; HAAS; KUMAMOTO, 2006).

4.5.2 Expressão do gene *SAP4* em linhagem padrão de *C. albicans* ATCC 10231

A análises dos resultados da qPCR mostrou regulação positiva para o gene *SAP4* ($p < 0,001$) em *C. albicans* cultivadas na presença de macrófagos (MC), com média $10,34 \pm 0,90$ vezes maior que as amostras de *C. albicans* (C) cultivadas na ausência de macrófagos e nas mesmas condições de temperatura e atmosfera (FIGURA 8).

Figura 8 – Expressão diferencial do gene *SAP4* em *Candida albicans* cultivada na presença ou ausência de macrófagos e exposta ou não a antifúngicos, incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.



Fonte: Do autor.

Legenda: C: *Candida albicans*; MC: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; MC_{1/4F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (¼ da IC₅₀) de fluconazol; MC_{1/2F}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (½ da IC₅₀) de fluconazol; MC_{1/4A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (¼ da IC₉₀) de anfotericina B; MC_{1/2A}: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,250 µg/mL (½ da IC₉₀) de anfotericina B; **: significância estatística, segundo Teste de Tukey com intervalo de 99% de confiança, amostras significativamente diferentes da amostra (MC); ***: significância estatística, segundo Teste de Tukey com intervalo de 99% de confiança, amostra significativamente diferente da amostra controle (C).

Em relação à exposição a antifúngicos, *C. albicans* incubada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL de fluconazol, respectivamente ¼ e ½ da IC₅₀ do antifúngico, expressaram $4,44 \pm 0,36$ e $2,77 \pm 2,11$ vezes mais *SAP4* que o controle (C). As amostras de *C. albicans* expostas a 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL de anfotericina B (¼ e ½ da IC₉₀ do antifúngico) expressaram, respectivamente, $3,16 \pm 1,86$ e $3,03 \pm 0,99$ vezes mais *SAP4* que as amostras controle (C) (FIGURA 8). Entretanto, esse aumento na expressão gênica de *SAP4* nas amostras expostas aos antifúngicos se comparadas as amostras controle (C) não foi significativamente diferente ($p > 0,05$).

Contudo, comparando as amostras de levedura cultivadas na presença de macrófagos e expostas aos antifúngicos com as amostras cultivadas na presença de macrófagos mas não expostas aos antifúngicos (MC) foi observado diminuição significativa ($p < 0,01$) na ordem de 2,33 a 3,73 vezes menor na expressão de *SAP4* em *C. albicans* exposta aos antifúngicos. Possivelmente, o contato da levedura com macrófagos aumente a expressão desse gene, enquanto que a exposição aos antifúngicos pode inibir parcialmente a expressão do mesmo.

A expressão diminuída de *SAP4* nas amostras de levedura cultivadas na presença de macrófagos e expostas a concentrações subinibitórias de antifúngicos pode estar relacionada ao prejuízo na filamentação de *C. albicans* causado pelos antifúngicos. Os antifúngicos fluconazol e anfotericina B podem prejudicar ou inibir a formação de hifas em *C. albicans* (BARODKA et al., 2006; GIL; PÉREZ-DIAZ; NOMBELA, 1994; SORGO et al., 2011).

Esta regulação negativa pode ser comparável à observada em um estudo com *C. albicans* expostas à concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B e cultivadas na ausência de soro fetal de vitelo por 6 horas a qual não mostrou formação de hifas e expressou 5 vezes menos *SAP4* que o controle sem antifúngico (THEBERGE et al., 2013).

Contrariamente aos resultados aqui apresentados, *C. albicans* exposta à 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol e cultivadas em meio RPMI 1640 na ausência de soro por 2 horas apresentaram formação de hifas e pseudo-hifas e regulação positiva dos genes associados a virulência *SAP4*, *SAP5* e *SAP6*, respectivamente, por uma média de 5,2 vezes, 3,5 vezes e 4,9 vezes (BARELLE et al., 2008). *Candida albicans* exposta à 1 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B e cultivadas na presença de soro fetal de vitelo por 6 horas para indução de hifas expressaram 2,5 vezes mais *SAP4* que o controle sem antifúngicos, porém os dados não mostraram se realmente houve formação de hifas (THEBERGE et al., 2013). Possivelmente, a concentração de antifúngicos e o tempo de contato são determinantes para prejudicar ou inibir a filamentação da levedura.

O contato de *C. albicans* e macrófagos pode ter aumentado o estresse da levedura com consequente aumento na expressão de *SAP4*. Este resultado pode ser comparado com estudos anteriores, em que, a expressão de *SAP4* relaciona-se diretamente ao processo de fagocitose, uma vez que, nessas condições, *C. albicans* formam hifas como forma de defesa, escape e destruição de macrófagos (BORG-VON ZEPELIN et al., 1998). Os genes *SAP4-6* são estimulados durante a mudança de *C. albicans* de levedura para hifas e esses genes são conhecidos por contribuírem na invasão de tecidos do hospedeiro (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). A expressão de *SAP4-6* ocorre predominantemente em hifas, as quais se apresentam em grande parte em modelos *in vivo* de biofilmes (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; RICICOVÁ et al., 2010). Além disso, a expressão de *SAP4* é fortemente regulada

de forma positiva após 1 a 3 horas em ensaios *in vitro*, quando a filamentação de *C. albicans* é estimulada pela presença de soro (NAGLIK et al., 2008).

A expressão de *SAP4* pode ter correlação com o processo de fagocitose, o qual, possivelmente, funcione como estímulo às células de *C. albicans* a expressar o gene *SAP4* (BORG-VON ZEPPELIN et al., 1998). Entretanto, *SAP2* é um dos genes *SAP* mais comumente expressos em *C. albicans* e, como observado em diversos estudos, sua expressão independe da fagocitose ou diferenciação morfológica e pode ocorrer em células fúngicas que passaram por condições de estresse bem como o contato com concentração subinibitórias de antifúngicos, como o fluconazol (COPPING et al., 2005; NAGLIK et al., 2003, 2008).

Assim, conhecer o perfil de expressão gênica de *C. albicans* durante processos infecciosos pode auxiliar no direcionamento para esquemas terapêuticos mais eficazes, principalmente em âmbito hospitalar, onde se espera encontrar indivíduos com o sistema imune debilitado e mais propensos às infecções invasivas por *C. albicans*.

5 CONCLUSÕES

O contato entre *C. albicans* e macrófagos aumenta a expressão dos genes *SAP2* e *SAP4*. A exposição de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de fluconazol pode aumentar a expressão de *SAP2* e diminuir a expressão de *SAP4*. Entretanto, a exposição de *C. albicans* a concentrações subinibitórias de anfotericina B pode diminuir a expressão tanto de *SAP2* quanto de *SAP4*. Além disso, a exposição da levedura aos antifúngicos prejudicou o processo de filamentação.

Ambos os genes *SAP2* e *SAP4* são relacionados como fatores de virulência de *C. albicans*, e quando em contato com células do sistema imune, como em infecções fúngicas invasivas, podem estimular as leveduras a aderir, filamentar e invadir tecidos do hospedeiro. Assim, compreender sua expressão gênica na patogênese fúngica pode ajudar na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de candidíases, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada a infecções fúngicas invasivas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. v. 8^a ed.
- ALMEIDA, A. A. DE et al. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 335–339, June 2013.
- ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. E246–E247, July 2012.
- ATKINSON, B. J.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 541–6, 2008.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 669–692, Apr. 2009.
- BAIN, J. M. et al. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 9, p. 677–678, 2012.
- BAIN, J. M. et al. *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of β -glucan inhibit macrophage phagosome maturation. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e01874–14, 31 Dec. 2014.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.
- BARELLE, C. J. et al. Azole antifungals induce up-regulation of *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells in vitro and in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 315–322, 2008.
- BARKER, K. S.; LIU, T.; ROGERS, P. D. Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 901–912, 2005.
- BARODKA, V. M. et al. Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans*. **Journal of Translational Medicine**, v. 4, p. 46, 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.
- 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.
- CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009.

CLSI - CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third edition. CLSI document M27-A3.** Wayne, USA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI - CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4.** Wayne, USA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2012.

COELHO, I. M. et al. Antifungal susceptibility evaluation of *Candida albicans* isolated from buccal lesions of hiv-positive and HIV-negative patients. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 156–166, 26 July 2012.

COLLETTE, J. R.; ZHOU, H.; LORENZ, M. C. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

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. 2816–23, 1 Aug. 2006.

COLOMBO, A. L. et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical mycology**, v. 51, n. 1, p. 38–44, 2013a.

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**, v. 17, n. 3, p. 283–312, May 2013b.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

COPPING, V. M. S. et al. 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, 2005.

CORAZZINI, R. **Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos ao choque térmico.** 1993. 156f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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, 2013.

DAIGNEAULT, M. et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8668, 13 Jan. 2010.

DE ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15–28, 30 jul. 2011.

DELBRÜCK, S.; ERNST, J. F. Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 859–866, 1993.

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

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.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, set. 2014.

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.

GAGNON-ARSENAULT, I.; TREMBLAY, J.; BOURBONNAIS, Y. Fungal yapsins and cell wall: A unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 966–978, 2006.

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.

GOW, N. A. .; BROWN, A. J. .; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 366–371, Aug. 2002.

HA, J. F. et al. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181–195, Mar. 2011.

HA, K. C.; WHITE, T. C. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 763–768, 1999.

HERSCOWITZ, H. B.; HOLDEN, H. T.; GHAFAR, A. A. **Manual of macrophage methodology**. Nova York: Marcell Dekker, 1981.

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 June 2009.

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

KADOSH, D. Shaping up for battle: morphological control mechanisms in human fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003795, jan. 2013.

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**, v. 104, n. 18, p. 7628–7633, 1 May 2007.

- KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225.e1–225.e10, abr. 2011.
- KURZAI, O. et al. Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 295, n. 2, p. 121–127, 2005.
- LACKEY, E. et al. Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida species*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 10, p. 1356–1368, 2013.
- LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, Aug. 2005.
- LEUKER, C. E.; HAHN, A.-M.; ERNST, J. F. β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lae4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 235, p. 235–241, 1992.
- LEWIS, L. E. et al. *Candida albicans* infection inhibits macrophage cell division and proliferation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 9, p. 679–680, 2012.
- LEWIS, R. E. et al. Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3499–505, Nov. 2002.
- LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939–49, 5 Sept. 1997.
- LOYOLA, W. et al. Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 201–208, 2002.
- MARR, K. A. et al. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1240–7, 1 nov. 2001.
- 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, 1 May 2011.
- MARTIN, R. et al. A core filamentation response network in *Candida albicans* is restricted to eight genes. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e58613, 2013.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 25 Nov. 2013.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 Feb. 2013.
- MEADOWS, R. A welcome chink in drug resistance. **PLoS biology**, v. 11, n. 10, p. e1001693, Oct. 2013.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, Feb. 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.
- MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, n. 3, p. 183–195, June 2013.
- MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 3. ed. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- MONTEIRO, D. U. et al. Prevalência de *Candida* e *Cryptococcus* em hemoculturas oriundas de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria, RS (HUSM) no ano de 2006. **Saúde (Santa Maria)**, v. 37, n. 2, p. 81–88, 2011.
- 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, 2011.
- MORGAN, J. et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 540–547, 2005.
- NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, Oct. 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 Sept. 2003.
- NASEEM, S.; ARAYA, E.; KONOPKA, J. B. Hyphal growth in *Candida albicans* does not require induction of hyphal-specific gene expression. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 6, p. 1174–1187, 15 Mar. 2015.
- NÉMETH, T. et al. Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 65, p. 48–56, 2014.
- NEWMAN, S. L. et al. Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 770–7, Feb. 2005.
- 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. 2290–2303, 15 Mar. 2009.
- OROZCO, A. S. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–2649, 1998.

- PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161–189, 2004.
- PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 45–50, 2007.
- 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. 1696–1699, 1995.
- PARRA-ORTEGA, B. et al. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 505–12, May 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, 1 Oct. 2001.
- PEREIRA, E. M. **A β 2-glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de fase aguda**. 2010. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-17012011-164607/publico/ElisangelaPereira.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3–13, Jan. 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2571–81, 1 Aug. 2013.
- PFALLER, M. A. et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 1 jan. 2007.
- PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 1, p. S3–S14, 2006.
- PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 269–73, 16 Feb. 2009.
- PROCOP, G. W.; ROBERTS, G. D. Emerging fungal diseases: the importance of the host. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 24, n. 3, p. 691–719, Sept. 2004.
- RICICOVÁ, M. et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 3, p. 909–19, 2010.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 818–825, 1 Feb. 2005.

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. Pt_1, p. 10–24, 1 Jan. 2013.

SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, Nov. 2005.

SILVA, K. E. S. et al. SILVA, K. E. S.; SILVA, N. C.; OLIVER, J. C.; CANTORE, M. S.; FERREIRA, C. B. R. J.; ARIOSIA, M. C. F.; DIAS, A. L. T. *SAP2* expression in standard strains of *Candida albicans* maintained under stress conditions. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 28, 2015, Florianópolis-SC. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2015. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/cd28cbm/resumos/R1057-2.PDF>>. Acesso em 15 dez. 2015.

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, 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, Mar. 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.

SOUZA, T. B. DE et al. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 496–502, Jan. 2014.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 2, p. 244–51, 15 Jan. 2006.

STANISZEWSKA, M. et al. Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. **Postepy Mikrobiologii**, v. 51, n. 3, p. 236, 2012.

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.

TAVANTI, A. et al. *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 3, p. 791–800, Mar. 2006.

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.

THERMO SCIENTIFIC, D. NanoDrop Lite: interpretation of nucleic acid 260/280 ratios. **Protocols and Product Manuals**, n. T123, p. 1, 2012.

- THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–82, 1 Sept. 2011.
- 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.
- UWAMAHORO, N. et al. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. **mBio**, v. 5, n. 2, p. e00003–14–e00003–14, 25 Mar. 2014.
- VÁZQUEZ-TORRES, A.; BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 170–92, June 1997.
- VILANOVA, M. et al. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 334–342, Mar. 2004.
- VILLAR, C. C.; KASHLEVA, H.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 262–9, 2004.
- VINCES, M. D.; HAAS, C.; KUMAMOTO, C. A. Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene *CZF1* and its regulation by Efg1p and Czf1p. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 5, p. 825–835, 2006.
- 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. 1329–1349, 2010.
- 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. 5215–21, Sept. 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, Apr. 1998.
- WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–53, 1 Oct. 2007.
- WILSON, L. S. et al. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value in health**, v. 5, n. 1, p. 26–34, 2002.
- WU, H. et al. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. **FASEB Journal**, v. 27, n. 6, p. 2132–2144, 2013.
- 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. 1200–1208, 1 May 2000.
- XU, Y.; CHEN, L.; LI, C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 798–804, 2008.