

JOSÉ ALEXANDRE DA ROCHA CURVELO

**ATIVIDADE ANTI-*Candida* DO INIBIDOR DE
PROTEASES LEUCOCITÁRIAS SECRETADAS
(SLPI)**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)



ORIENTADOR: Rosangela Maria de Araújo Soares

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Curvelo, Jose Alexandre da Rocha

Atividade Anti-*Candida* do Inibidor de Proteases Leucocitárias Secretadas(SLPI)/

José Alexandre da Rocha Curvelo - Rio de Janeiro, 2010

xv, 73p.: il

Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia
Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Rosangela Maria de Araújo Soares

Referencias bibliográficas: f. 53

1. *Candida albicans* 2.SLPI 3.Fatores de virulência 4. Biofilme
5. Antifúngico 6. Inibidor de protease

I. Soares, Rosangela Maria de Araújo

II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em
Ciências Biológicas

III. Efeito Anti-*Candida* do Inibidor de Proteases Leucocitárias
Secretadas (SLPI)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jose Alexandre da Rocha Curvelo

**Atividade Anti-*Candida* do Inibidor de Proteases
Leucocitárias Secretadas (SLPI)**

Rio de Janeiro, 24 de fevereiro de 2010

Rosangela Maria A. Soares, Doutorado em Ciências, IMPPG/ UFRJ

Ana Paula Vieira Colombo, Doutorado em Medical Sciences,
IMPPG/UFRJ

Antonio Ferreira Pereira, Doutorado em Química, IMPPG/UFRJ

Lucimar Ferreira Kneipp, Doutorado em Microbiologia e Imunologia,
IOC/FIOCRUZ- RJ

Daniela Salles Alviano, Doutorado em Ciências, IMPPG/UFRJ

*A pesquisa intitulada “**Atividade Anti-Candida do Inibidor de Proteases Leucocitárias Secretadas (SLPI)**” foi realizada no Laboratório de Biologia de Protistas do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob orientação da Prof. ^a Dra Rosângela Maria de Araújo Soares (Professor Associado do Departamento de Microbiologia Geral do IMPPG/CCS/UFRJ*

“Forever in debt to your priceless advice”

Kurt Cobain

Sim, essa dissertação é a realização de um sonho, que não seria possível sem o esforço e a colaboração de pessoas extremamente generosas. E a elas o meu sincero e profundo agradecimento. Em especial:

À professora Elisa Janini, por permitir o meu retorno ao meio acadêmico;

Ao meu querido amigo Dennis Ferreira, por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava;

À professora Rosangela Soares, por aceitar o risco de me orientar;

À Senda Charone, pequena no tamanho e grande na competência, por ter me ensinado os métodos básicos laboratoriais, em particular sobre o cultivo de leveduras;

À minha grande companheira de curso e de bandejão Anna Lea Barreto, que dividiu comigo todas as alegrias e tensões do mestrado, além de me ensinar toda a base de funcionamento de um laboratório, menos como fazer PBS;

À mangueirense, flamenguista e cientista Maristela Portela, pela paciência, amizade e ensinamentos. Sem a sua experiência e competência, a elaboração dessa dissertação não seria possível. Claro que o café com biscoitos também ajudaram bastante;

À professora Daniela Alviano, pela disponibilidade, gentileza e pelos ensinamentos transmitidos. Além de me aceitar para o treinamento didático, pelos experimentos de citometria do fluxo e pela revisão tão valiosa e criteriosa dessa dissertação;

À professora Celuta Alviano, por sua competência e simpatia e por manter o astral do laboratório sempre alto. Um exemplo a ser seguido;

Ao professor Antonio Pereira e à Aline Garcia, pelas colaborações, paciência e ensinamentos transmitidos, principalmente nas horas de desespero;

À professora Maria Auxiliadora Kaplan e seus alunos, pela gentileza, colaboração e motivação constante;

À professora Thais S. Padron e sua equipe (Camila, Anne, Robertinha e Venicio) pelos experimentos de microscopia eletrônica;

Às alunas do laboratório de biologia de protistas Sinthia, Ariadne e Camila pela ajuda constante nos experimentos dessa dissertação;

Aos companheiros de laboratório Fátima, Luis, Davi, Vanila, Gleiser, Danielle e Cristina pelo companheirismo e pela generosidade em compartilhar suas experiências;

Aos alunos Eber, Elisa e Vinicius, companheiros de congresso;

Às amigas Catia e Mariana, companheiras de 485 e da passarela do HU;

Ao professor Cláudio Rezende pela revisão do português dessa dissertação;

À minha irmã, que promoveu o início dessa jornada;

À minha mãe “in memoriam” que formou meus valores de retidão e honestidade. É uma pena que tenhamos convivido tão pouco.

À Ana e Odília, por representarem a minha mãe depois que ela partiu. Fizeram e ainda fazem muito bem;

Aos meus amigos de berçário (Natacha, Liliane, Marcelo, Rinaldo, Taty, Leo, Érika, Isa e Mafe), por tornarem o caminho menos solitário;

Ao CNPq e a FAPERJ pelo financiamento dos estudos durante o curso.

JOSÉ ALEXANDRE DA ROCHA CURVELO

ATIVIDADE ANTI-*Candida* DO INIBIDOR DE PROTEASES LEUCITÁRIAS SECRETADAS (SLPI)

ORIENTADOR: Rosangela Maria de Araújo Soares

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

A infecção por *Candida* spp. em humanos pode se apresentar de variadas formas, que vão desde de uma infecção superficial e branda, até quadros sistêmicos invasivos que podem levar o paciente à morte. A alta prevalência desta infecção em pacientes imunocomprometidos como portadores do HIV tem estimulado pesquisas com o objetivo de esclarecer os fatores de virulência que podem aumentar a patogenicidade deste microrganismo. O inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) é uma proteína endógena, presente em secreções mucosas como saliva, leite e sêmen, com o poder de inibir a atividade de um grande número de proteases. Além de seu papel inibitório, a proteína SLPI apresenta uma importante atividade antimicrobiana, inclusive sobre fungos. Por este motivo, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito dessa proteína sobre o crescimento e os processos biológicos que podem interferir na patogenicidade de *Candida albicans*.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, uma cepa isolada da mucosa oral de um paciente portador do HIV resistente ao fluconazol e uma cepa ATCC 24433. Inicialmente foi investigada a concentração mínima inibitória (MIC) e fungicida (MFC) da proteína SLPI sobre as cepas testadas. Os resultados obtidos de MIC e MFC foram relativamente semelhantes apontando para uma atividade primariamente fungicida e dentro dos padrões fisiológicos de secreção. A proteína SLPI age sinergicamente com a nistatina, aumentando o efeito deste antifúngico em 20%.

Em relação à interferência da SLPI nos processos biológicos relacionados na virulência do isolado clínico de *C. albicans*, nossos resultados

demonstraram que: (1) a atividade de serina proteinases secretadas por *C. albicans* foi significativamente inibida pela ação da SLPI; (2) a morfo diferenciação em tubo germinativo foi significativamente regulada por essa proteína; (3) a SLPI aumentou significativamente a hidrofobicidade da superfície celular (4) a formação de biofilme sob a influência direta da SLPI foi significativamente reduzida em 38% (5) a análise por citometria de fluxo sugere a existência de sítios de ligação para a proteína SLPI na superfície de *C. albicans*, de maneira dose dependente; (6) o tratamento com 80 µM de SLPI aparentemente reduziu a expressão de manoproteínas na superfície das leveduras de *C. albicans* em 20%; (7) pela análise por microscopia eletrônica de transmissão foi possível identificar alterações ultraestruturais significativas nas células tratadas com SLPI, como o esvaziamento citoplasmático e a presença de estruturas membranares no interior do citoplasma.

Os resultados obtidos indicam um importante efeito biológico da proteína SLPI em *C. albicans*, o que pode ser promissor para a criação de novas metodologias de controle e de tratamento para a candidíase.

Palavras-chave: *Candida albicans*, SLPI, Fatores de virulência, Biofilme, Antifúngico, Inibidor de protease

JOSÉ ALEXANDRE DA ROCHA CURVELO

ATIVIDADE ANTI-*Candida* DO INIBIDOR DE PROTEASES LEUCITÁRIAS SECRETADAS (SLPI)

ORIENTADOR: Rosangela Maria de Araújo Soares

Abstract da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Candidiasis in humans can occur in many forms, ranging from a mild disease to a severe systemic infection that can lead patients to death. The high prevalence of this disease in immunocompromised individuals such as HIV patients have stimulated studies focused on elucidating virulence factors that may increase the pathogenicity of this microorganism. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is an endogenous protein present in mucosal secretions such as saliva, milk and semen, which can inhibit the activity of a large number of proteases. In addition to its inhibitory role, SLPI has a valuable antimicrobial, including antifungal activity. Therefore, the objective of this study was to analyze the effect of this protein on growth and biological processes that may interfere with the pathogenicity of *Candida albicans*

In this study, we used two strains of *C. albicans*, one strain resistant to fluconazole isolated from the oral mucosa of a patient with HIV and the ATCC 24433 strain. Initially we investigated the minimum inhibitory (MIC) and fungicidal (MFC) concentration of SLPI on the test strains. The results of MIC and MFC were relatively similar pointing to a primarily fungicidal activity within the physiological patterns of secretion. Furthermore, SLPI acted synergistically with nystatin, increasing the antifungal effect up to 20%.

Regarding the SLPI influence on biological processes related to the virulence of the clinical isolate of *C. albicans*, our results showed that: (1) the activity of serine proteinases secreted by *C. albicans* was significantly inhibited by SLPI; (2) the germ tube differentiation of *C. albicans* was significantly regulated by this protein; (3) the SLPI increased cell surface hydrophobicity significantly; (4) biofilm formation under the direct interference of SLPI was reduced in 38%; (5) the analysis by flow cytometry suggests the existence of binding sites for SLPI on the surface of *C. albicans*, in a dose dependent manner; (6) treatment with 80 mM of SLPI has successfully reduced the

expression of mannoproteins on the surface of the yeasts in 20%, and (7) the analysis by transmission electron microscopy showed ultrastructural alterations on cells treated with SLPI, such as cytoplasmatic emptiness and the presence of cytoplasmic membrane structures within the cytoplasm.

Therefore, our results indicate an important biological effect of SLPI protein in *C. albicans*, which can be promising for the development of new methods of control and treatment for candidiasis.

Keywords: *Candida albicans*, SLPI, Virulence factors, Biofilm, Antifungal, Protease inhibitor

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Candida spp e Candidíase	1
1.2 Dimorfismo	2
1.3 Enzimas proteolíticas	3
1.4 Parede celular	4
1.5 Biofilme	6
1.6 HIV/AIDS	6
1.7 Terapia antifúngica	8
1.8 Inibidor de proteases leucocitárias secretadas	11
2- JUSTIFICATIVA	16
3- OBJETIVO GERAL	17
3.1- Objetivos específicos	17
4- MATERIAL E METODOS	19
4.1 Microrganismo	19
4.2 Proteína recombinante	19
4.3 Cultivo e preparo do inóculo	20
4.4 Concentração mínima inibitória e fungicida	20
4.5 Interação com a Nistatina	22
4.6 Inibição da atividade proteolítica pela SLPI	22
4.7- Influência da SLPI na Hidrofobicidade de <i>C. albicans</i>	23
4.8- Influência da proteína SLPI na morfogênese de <i>C. albicans</i>	23
4.9 - Análise de receptores para a SLPI por citometria de fluxo.	24
4.10- Efeito da SLPI na expressão de manoproteínas por citometria de fluxo.	25
4.11- Efeito da SLPI na ultraestrutura de <i>C. albicans</i>	25
4.12 - Efeito da SLPI na formação de biofilme por <i>C. albicans</i>	26
4.13 – Análise dos resultados	26
5- RESULTADOS	28
5.1 - Concentração Mínima Inibitória (MIC)	28
5.2 – Concentração Mínima Fungicida (MFC)	29
5.3 – Efeito combinado entre a SLPI e o antifúngico Nistatina	30
5.4– Efeitos da SLPI na inibição da atividade proteolítica	30
5.5 – Efeito da SLPI sobre a morfodiferenciação de <i>C. albicans</i>	31
5.6 – Efeito da SLPI sobre a hidrofobicidade de <i>C. albicans</i>	32
5.7 – Efeito da SLPI sobre a formação de biofilme por <i>C. albicans</i>	33
5.8 - Presença de receptores específicos da SLPI em <i>C. albicans</i>	34
5.9 – Efeito da SLPI na expressão de manoproteínas em <i>C. albicans</i>	36
5.10 – Efeito da SLPI sobre a Ultraestrutura de <i>C. albicans</i>	38
6- DISCUSSÃO	40
7- CONCLUSÕES	52
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALK	Antileucoprotease
AMP	Adenosina Monofosfato
anti-hSLPI	Anticorpo anti SLPI humana
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BSA	Soro Albumina Bovina
Ca⁺²	Íon Cálcio
CaCl	Cloreto de Cálcio
CAMP	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
<i>Candida spp.</i>	Espécies do gênero <i>Candida</i>
CD26	Cluster de diferenciação do tipo 26
CD4	Cluster de diferenciação do tipo 4
cel/ml	Células por mililitro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Con-A	Concanavalina A
Con-A FITC	Con-A conjugada a Isotiocianato de Fluoresceína
CSH	Hidrofobicidade da superfície celular
CTRL	Grupo controle
CWP	Proteínas associadas à parede celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFG	Fator de Crescimento Epitelial
EXP	Grupo Testado (Experimento)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GMP	Monofosfato de Guanosina Cíclica.
GP120	Glicoproteína 120
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPI-CWP	Proteínas de parede celular ancoradas por GPI
HAART	Terapia Antiretroviral Combinada

HEPES	Ácido Hidroxietilpiperazina Etanossulfônico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
INF γ	Interferon gama
kDa	Kilodalton
LMI	Inibidor de protease de baixo peso molecular
loop V3	Alça V3
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAP	Proteínas ativadas por mitógenos
MFC	Concentração mínima fungicida
mg/dia	Miligrama por dia
mg/ml	Miligrama por mililitro
MIC	Concentração Mínima Inibitoria
ml	Mililitro
mol/l	Molaridade por litro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,2-difeniltetrazolio
mW	miliwatts
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanomolar
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PIR	Proteins with Internal Repetitions
PRI	Isolado clinico de <i>C. albicans</i> resistente ao fluconazol

RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SAP	Aspártico protease secretada
SDA	Meio de Cultura Sabouraud Dextrose Agar
SFB	Soro Fetal Bovino
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Notificação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de informação de Exames laboratoriais
SLPI	Inibidor de Proteases Leucocitárias Secretadas
SPK-843	Novo antifúngico poliênico
T-2307	Novo antifúngico alilamina
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
WHO	Organização mundial da Saúde

1-INTRODUÇÃO

1.1- *Candida* spp. e Candidíase

O gênero *Candida* pertence à família Cryptococcaceae da classe Ascomycetes do filo Ascomycota. Esse microrganismo é caracterizado por seu aspecto leveduriforme arredondado ou oval medindo aproximadamente 3,0 µm e por se reproduzir assexuadamente por brotamento ou gemulação (GUARRO, 1998). As espécies do gênero *Candida* são ubíquas e facilmente isoladas no ambiente. Dentre as mais de 200 espécies descritas, aproximadamente 20 estão associadas às infecções humanas e animais, dentre elas *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (CALDERONE, 2002). Esses microrganismos são conceituados como patógenos oportunistas que, em humanos, vivem de forma comensal em inúmeros sítios anatômicos, como a cavidade oral, o trato gastrointestinal, o epitélio broncoatraqueal, a mucosa anal e vaginal, assim como demais sítios cutâneos de indivíduos saudáveis (SOLL, 2002).

O aumento da incidência de infecções originadas por fungos como a candidíase tem sido continuamente documentado nas duas últimas décadas, provavelmente devido ao aumento do número de indivíduos suscetíveis a essas infecções, como pacientes portadores de imunossupressão induzida, como transplantados ou imunossupressão adquirida, como portadores de imunodeficiências primárias e HIV (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Além disso, o aumento da expectativa de vida na população mundial e o desenvolvimento de antibióticos com espectro de ação cada vez maiores contribuem significativamente para essa situação (JAHAGIRDAR & MORRISON, 2002; CANUTO & RODERO, 2002)

A infecção por *Candida* spp. em humanos pode se apresentar de variadas formas, desde uma infecção superficial e branda, até quadros sistêmicos invasivos e graves que podem levar o paciente à morte (ODDS, 1988). Essa variação na patogenicidade se deve, em grande parte, aos fatores de virulência do fungo que podem determinar o curso da infecção. De forma

geral, as candidíases de superfícies podem se apresentar como cutânea, mucocutânea, orofaríngea, vaginal e onicomicose (MASUR, ROSEN & ARMSTRONG, 1977). Dentre essas formas, a candidíase orofaríngea é a infecção fúngica oportunista mais freqüente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), e foi estimado que mais de 90% desses pacientes desenvolvem com freqüência esta infecção debilitante durante a progressão da doença (IMBERT-BERNARD *et al.*, 1994; FIDEL, 2006). Em pacientes pediátricos infectados pelo HIV, a candidíase é a lesão oral mais comumente observada (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2000; PORTELA *et al.*, 2004) sendo reportado que cerca de 20 a 70% desses pacientes mostram sinais clínicos de candidíase oral, marcador importante e indicativo da disfunção imunológica progressiva e do avanço da doença AIDS (WILLIAMS & LEWIS, 2000; KLINE, 1996).

1.2- Dimorfismo

Os mecanismos de patogenicidade desenvolvidos por espécies de *Candida* são responsáveis pelo sucesso da colonização ou infecção do hospedeiro. *C. albicans*, em particular, desenvolveu um conjunto efetivo de fatores de virulência e estratégias específicas que podem determinar o curso da infecção (CUTLER, 1991; ODDS, 1994). Embora muitos fatores sejam sugeridos como atributos de virulência para *C. albicans*, a conversão morfológica do microrganismo para a forma filamentosa (dimorfismo), o reconhecimento de moléculas de superfície, a mudança fenotípica e a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteases secretadas têm sido as mais bem estudadas até hoje (KRETSCHMAR *et al.*, 1999; NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003).

Enquanto as barreiras físicas e o sistema imune do hospedeiro são condições cruciais para a manutenção do estágio comensal do fungo, alguns atributos relacionados à virulência fúngica podem ser expressos e requeridos dependendo do sítio de instalação, do estágio de invasão e da natureza da resposta do hospedeiro (ODDS, 1994). Nesse sentido, o dimorfismo encontrado em *C. albicans* contribui significativamente para o aumento da

virulência e conseqüente instalação da infecção fúngica (KUMAMOTO & VINCES, 2005).

Diferentes formas morfológicas podem ocorrer durante a diferenciação de *C. albicans*. As hifas e as pseudo-hifas são consideradas as formas invasivas desse fungo, e podem promover penetração tecidual durante os estágios iniciais da infecção, enquanto as leveduras são encontradas na disseminação sanguínea (SUDBERY, GROW & BERMAN, 2004). Existem ainda, várias moléculas de adesão encontradas na superfície das formas filamentosas que não são expressas na superfície de leveduras, e estas podem representar importante papel para o fenótipo de virulência (GALÉ *et al.*, 1998). Além disso, a formação de hifas pode contribuir para o mecanismo de escape do sistema imunológico, por facilitar a evasão do macrófago ou de células epiteliais após a fagocitose (PHAN, BELANGER & FILLER, 2000).

Os fungos se utilizam de uma via conservada comum para regular sua diferenciação fenotípica e sua virulência. Em relação à morfodiferenciação de *C. albicans*, os genes que modulam esta habilidade são co-regulados por genes que codificam fatores de virulência conhecidos desse microrganismo, como a secreção de proteases e a expressão de adesinas (KOBAYASHY & CUTLER, 1998). Conseqüentemente, a capacidade de diferenciação de levedura para hifa, em resposta a fatores ambientais, é considerada inerente à virulência de *Candida* (LANE *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002).

1.3- Enzimas Proteolíticas

A produção de proteases por *C. albicans* também é considerada um importante fator de virulência relacionado à interação do fungo com as células do hospedeiro (NAGLIK *et al.*, 2004). Estas enzimas possibilitam a invasão do epitélio, seja pela degradação de proteínas da matriz extracelular, seja pela inativação do sistema imunológico, através da hidrólise de anticorpos e de proteínas do sistema complemento (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003). Desta forma, a presença de proteases secretadas favorece o desenvolvimento da infecção por *C. albicans*, seja pela degradação de componentes do tecido epitelial, como colágeno, queratina e mucina (MORSCHHAUSER *et al.*, 1997;

KUMAR, KUMAR & MENNON, 2006) ou de proteínas imunológicas como imunoglobulinas G e A e proteínas do complemento (KAMINISHI *et al.*, 1995).

A secreção de proteases por *Candida albicans* é um fator conhecidamente associado ao aumento da virulência desse microrganismo, desta forma, inibidores dessas enzimas, aparentemente, são capazes de reverter ou amenizar esse efeito. Por esse motivo, o uso terapêutico de inibidores de proteases tem sido sugerido como uma alternativa potencial para o controle e o manejo das infecções originadas por este fungo (GAUWERKY, BORELLI & KORTING, 2009). A produção e secreção de proteases não são exclusivas de *C. albicans*. As aspártico proteases secretadas (SAPs), normalmente expressas por *C. albicans*, também foram evidenciadas em *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (HUBE, 2000; PICHOVÄ *et al.*, 2001; YANG, 2003). Através de microscopia eletrônica de transmissão empregando anticorpo anti-Sap 1-3 marcados com ouro coloidal, SCHALLER e colaboradores (1999) identificaram o sítio de contato entre *C. albicans* e células do epitélio, e sugeriram que essa classe de enzimas é responsável ou pelo menos facilitadora da instalação e infecção do fungo no hospedeiro. Assim sendo, a inibição da atividade das proteases secretadas por *Candida* spp. pode ser uma alternativa eficiente no controle e no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. A busca por inibidores endógenos e naturais destas enzimas deve colaborar para a criação de novas terapias para o tratamento e prevenção da candidíase, principalmente por contornar a refratariedade terapêutica e impedir os mecanismos conhecidos de resistência aos agentes antifúngicos existentes (HUBE *et al.*, 2000; CHALLACOMBE *et al.*, 2006).

1.4- Parede Celular

Outro fator determinante para a instalação da infecção fúngica é a capacidade de adesão às células do hospedeiro. Esta interação está diretamente relacionada às proteínas que constituem a parede celular e a adesinas que se apresentam na superfície da célula fúngica (CHAFFIN, 2008).

A parede celular de *C. albicans* é constituída aproximadamente de 80-90% de carboidratos, sendo três os constituintes básicos que representam a

maior parte desses polissacarídeos: os polímeros ramificados de glicose contendo ligações β -1,3 e β -1,6 denominados β -glucanas; os polímeros não ramificados de N-acetilglicosamina contendo ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose ligados covalentemente às proteínas de superfície ou glico[mano]proteínas (CHAFFIN *et al.*, 1998). As características da parede de *C. albicans* são próprias e distintas das demais espécies do gênero, como a estrutura diferenciada da β -1,3 glucana, os mecanismos de biossíntese próprios da β -1,6 glucana, ambas constituintes da parede celular (NIMRICHTER *et al.*, 2005; RUIZ HERRERA *et al.*, 2006).

As proteínas da parede celular se ligam covalentemente aos polímeros microfibrilares de β -glucana de duas formas distintas, e por isso originam duas classes de proteínas associadas à parede celular. Na primeira classe e mais abundante, a qual pertence a maior parte das adesinas, as proteínas se ligam a β -1,6 glucana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) sendo referidas como GPI-CWP (*GPI Cell Wall Protein*). Na segunda classe de proteínas, essas se ligam diretamente a β -1,3 glucana sendo denominadas proteínas Pir (*Protein with Internal Reiterations*) (CHAFFIN *et al.*, 1998, CHAFFIN, 2008).

As adesinas são proteínas dispostas em mosaico com vários domínios com funções distintas. Sua localização na superfície externa da parede celular determina a ordem desses domínios e conseqüentemente a arquitetura da proteína. Os domínios são arranjados em um padrão regular, como se segue: a região N-terminal possui os domínios de ligação; uma porção central com um domínio glicosilado rico em treonina (opcional); suportes N ou O-glicosilados que elevam os sítios de ligação acima da superfície da parede celular e uma região C-terminal que regula as ligações covalentes com a matriz da parede celular através das âncoras de GPI (DRANGINIS *et al.*, 2007). Várias estruturas atuam como ligantes para estas adesinas, inclusive moléculas estruturais do hospedeiro, como proteínas da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno e vitronectina), e também proteínas séricas como fibrinogênio e proteínas do complemento (CHAFFIN, 2008).

A hidrofobicidade da parede celular fúngica é outra característica de extrema importância por aparentemente aumentar a habilidade de interação do microrganismo com o hospedeiro (HAZEN & HAZEN, 1987; HAZEN, 2004).

Alterações nos constituintes da parede celular podem levar a uma transição no padrão da superfície celular de hidrofílico para hidrofóbico e vice versa, resultando em uma drástica mudança na quantidade de energia liberada durante a interação com a célula do hospedeiro. Essa transição de padrões está provavelmente associada a modificações no comprimento e na localização dos polímeros microfibrilares da camada externa da parede celular, que de alguma forma impede ou promove o acesso do ligante ou do substrato às áreas hidrofóbicas da superfície celular (HAZEN & HAZEN, 1992, GLEE, SUNDSTORM & HAZEN, 1995).

1.5- Biofilme

A formação de biofilme por microrganismos sobre superfícies inertes é um fenômeno que tem sido extensivamente estudado na última década por estar diretamente relacionado à patogenicidade desses organismos (VERSTREPEN & KLIS 2006; THEIN *et al.*, 2007). O biofilme formado por *C. albicans* possui muita relevância clínica, por tornar esses microrganismos menos suscetíveis à terapia antimicrobiana tradicional, provavelmente pela dificuldade física de difusão do medicamento através do biofilme (BAILLIE & DOUGLAS, 2000). A resistência a antifúngicos promovida pela formação de biofilmes por espécies de *Candida* é um fenômeno que pode ser originado por vários fatores (HAWSER & DOUGLAS, 1995; TUMBARELLO *et al.*, 2007), tais como: a formação de uma barreira física formada pela matriz polimérica extracelular; a presença de células resistentes, tolerantes ou com baixa atividade metabólica; a existência de diferentes fenótipos celulares dentro do biofilme; a presença de diferentes genes relacionados com os mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos, e a formação de um micro-ambiente com pouca ação do sistema imunológico, o que dificulta a atividade dos agentes antifúngicos.

1.6- HIV/AIDS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a epidemia de AIDS continua sendo o maior desafio global de saúde pública. Atualmente, determinados países, que mantinham seus índices de novas infecções estáveis

ou declinando, vivenciam um aumento na incidência de novas infecções. De acordo com os relatórios publicados no boletim da UNAIDS/WHO (2009), há uma média de 33.4 [30.6 - 36.1] milhões de pessoas infectadas pelo HIV em todo o mundo, tendo havido 2.7 [1.8 - 4.1] milhões de casos apenas em 2008, quando a infecção foi responsável por dois [1.9 – 2.4] milhões de mortes (UNAIDS, 2009). Apesar dos altos números que estimam 7400 novas infecções e 5500 óbitos a cada dia, uma discreta redução no número de novas infecções foi evidenciada em nível global. A prevalência de portadores do vírus se mantém estável nos últimos anos, provavelmente devido ao aumento da sobrevivência dos indivíduos infectados. Isto pode ser explicado pelo advento da Terapia Anti-Retroviral Combinada ou HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), que possui como característica a administração conjunta de agentes antiretrovirais associados a um ou mais medicamentos inibidores de proteases (CHEARSKUL *et al.*, 2006).

No Brasil foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em associação com fontes de informações complementares (Sistema de Informação de Exames Laboratoriais (SISCEL)) e Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) um total de 474.273 casos de AIDS, no período de 1980 até junho de 2007. Apenas em 2005 foram notificadas 35.965 novas infecções, o que representa uma taxa de incidência de 19,5/100.000 habitantes, e até 2006 foram acumulados 192.709 óbitos em decorrência da AIDS demonstrando um coeficiente de mortalidade de 6,0/100.000 habitantes (www.aids.gov.br/SISCEL acesso fev 2008; www.datasus.gov.br/catalogo/sim, acesso mar 2008)

As manifestações orais estão entre os indicadores iniciais mais importantes da infecção pelo HIV. Algumas lesões intra e periorais são comumente identificadas em pacientes infectados, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Entre essas lesões encontram-se a candidíase orofaríngea, a leucoplasia pilosa, o sarcoma de Kaposi, o eritema gengival linear, a gengivite ulcerativa necrosante, a periodontite ulcerativa necrosante e o linfoma não Hodgkin. A leucoplasia pilosa e a candidíase orofaríngea pseudomembranosa possuem uma incidência extremamente alta nesses pacientes, e por isso, freqüentemente são

usadas como fatores classificadores e preditivos da infecção (LASCALA, MOUSSALI & DUARTE 1995; TAPPUNI *et al.*, 2001).

De todas as co-infecções e infecções oportunistas associadas ao HIV, as originadas por *Candida* spp. são as mais estudadas até hoje, tanto em crianças quanto em adultos. Em 2006, a 5ª Reunião sobre Saúde Oral em AIDS, definiu que as lesões orais, particularmente a candidíase orofaríngea estão diretamente ligadas ao aumento da carga viral do paciente, e sugeriu que estudos e pesquisas sobre peptídeos e proteínas endógenos com atividade antifúngica podem colaborar para o desenvolvimento de novas terapias para o controle e tratamento da candidíase em pacientes infectados (CHALLACOMBE *et al.*, 2006).

O uso da HAART fez com que a prevalência de lesões orais em pacientes infectados pelo HIV, principalmente a candidíase oral, a leucoplasia pilosa e a periodontite ulcerativa necrosante aguda fossem bruscamente diminuídas (PATTON *et al.*, 2000; MIGLORATI, BIRMAN & CURY, 2004; WHO, 2005; CEPEDA *et al.*, 2008), provavelmente em consequência da reconstituição do sistema imunológico. Além disso, medicamentos inibidores de protease utilizados na terapia de controle de HIV como Ritonavir e Saquinavir, aparentemente são capazes de inibir a adesão de *C. albicans* às células do endotélio (FALKENSAMMER *et al.*, 2007), bem como alterar a habilidade de dimorfismo desses fungos (MELO *et al.*, 2006).

Muitos inibidores de protease utilizados na terapêutica de controle do HIV possuem atividade antifúngica em altas concentrações. Os alvos desses inibidores são as aspártico proteases (SAPs), que formam uma família de enzimas cujos alguns subtipos são produzidos por *Candida* spp. Apesar da secreção de protease ser considerada um fator de virulência determinante para a infecção em mucosas por *C. albicans*, os inibidores de protease por si só, sem a combinação com outros agentes antiretrovirais aparentemente não são capazes de reduzir a incidência de candidíase orofaríngea (BACCAGLINI *et al.*, 2007).

1.7- Terapia Antifúngica

A limitação no número de agentes antifúngicos disponíveis comercialmente dificulta sobremaneira a erradicação das infecções originadas por essa classe de microrganismos (GULSHAM & MOYE-ROWLEY, 2007). Por muitos anos, os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas foram os poliênicos, contando apenas com o desoxicolato de anfotericina B como “padrão ouro” para os quadros invasivos, apesar da sua alta toxicidade. No início da década de 90, a elaboração da primeira geração dos triazólicos (Fluconazol e Itraconazol) mudou a epidemiologia das infecções por *Candida* spp. por oferecer novas opções de prevenção e de tratamento (HOPE *et al.*, 2008). Entretanto, o uso extensivo desses novos agentes antifúngicos resultou na seleção de espécies resistentes, o que leva a necessidade de elaboração de novas modalidades de tratamento e da combinação empírica de terapias, que conta com o efeito sinérgico entre os agentes existentes administrados em combinação (PETRIKKOS & SKIADA, 2007).

A infecção fúngica por cepas resistentes ao fluconazol ou multiresistentes pode estar associada a condições ambientais permissivas, a pressão antifúngica seletiva e ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos que utilizam antifúngicos derivado de azóis continuamente (SANGLARD & ODDS, 2002). Os mecanismos de resistência aos azóis são distintos e incluem a redução no acúmulo intracelular da droga, o efluxo do medicamento, a diminuição da permeabilidade da membrana e a alteração da lanosterol 14- α -dimetilase e de outras enzimas da via do ergosterol (CANUTO & RODERO 2002; PRASAD, PANWAR & SMRITI, 2002).

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos aumentou em 30% a partir do ano 2000, destacando-se dois triazólicos (voriconazol e posaconazol) e três equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) que tiveram suas licenças liberadas para o uso no tratamento e na profilaxia de infecções fúngicas (THOMPSON *et al.*, 2009). As equinocandinas possuem um mecanismo único de ação, a partir da inibição da β -1,3-D-glucana sintase, impedindo, desta forma, a síntese regular de β -1,3glucana, estrutura específica da parede celular fúngica. Esta seletividade leva a uma diminuição drástica da toxicidade terapêutica, e permite que as equinocandinas sejam administradas

com mais segurança em pacientes com comprometimento da função renal e hepática. Apesar da alta seletividade, as equinocandinas não possuem atividade contra *Zigomicetos* e *Cryptococcus* spp. e sua absorção oral é muito pobre (PLAYFORD, EGGIMANN & CALANDRA, 2008).

A descoberta de novos esquemas terapêuticos e o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos criam uma expectativa promissora para o tratamento das micoses, em particular das originadas por organismos refratários. Dentre os agentes antifúngicos ainda em desenvolvimento, se destacam os novos poliênicos como o SPK-843 e a arylamidina T-2307; os novos triazólicos como o isavuconazol, além do análogo da ambruticina, do beta aminoácido Icofungipen e do inibidor da β -1,6-glucana sintase (Pyridobenzimidazol) (ESPINEL-INGROFF, 2009).

Além dos agentes antifúngicos em desenvolvimento, novas propostas terapêuticas criam grande expectativa pelo imenso potencial para a criação de novos esquemas terapêuticos e profiláticos das infecções fúngicas, dentre elas destacam-se: a terapia com anticorpos monoclonais; a terapia com ácidos graxos; o sinergismo entre drogas convencionais e modificadas; o uso de peptídeos antimicrobianos e o uso de inibidores de proteases (pleofunginas, os inibidores da elastase, da GMP sintase, da poliadenosina polimerase, da quitina sintase e das fosfolipases) (ESPINEL-INGROFF, 2009).

Em geral, os agentes antimicrobianos sintéticos atuam em baixa concentração e são direcionados a proteínas ou alvos específicos do microrganismo. Essas características possibilitam o desenvolvimento rápido de resistência microbiana por selecionar cepas que podem alterar seus alvos específicos de ligação, bem como diminuir o acúmulo intracelular através do efluxo do agente (CANUTO & RODERO, 2002). Substâncias antimicrobianas endógenas são normalmente catiônicas, tendo como alvo a membrana aniônica microbiana, como consequência ocorre a redução do potencial da membrana plasmática microbiana, levando a um distúrbio do balanço osmótico com prejuízo dos processos biológicos, e conseguinte morte celular. Desta forma, a regulação de processos inflamatórios e infecciosos por agentes endógenos pode ser mais eficiente que a elaborada por agentes sintéticos (PESHEL & SAHL, 2006).

Desta forma, o uso de substâncias endógenas como peptídeos antimicrobianos e inibidores enzimáticos pode ser justificado, não só pelo seu amplo espectro de ação, o que diminui virtualmente o desenvolvimento de mecanismos de resistência, mas também pelo fato de serem produzidos constitutivamente, por não ocasionarem efeitos adversos e por serem secretados diretamente sobre os sítios infectados e em grandes quantidades (TJABRINKA *et al.*, 2005). Os estudos de SORENSEN e colaboradores (2006) evidenciaram um aumento na expressão de peptídeos antimicrobianos e de inibidores enzimáticos endógenos, como o inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) em lesões cutâneas estéreis induzidas artificialmente, indicando dessa forma o papel fisiológico desses agentes na resolução dessas lesões.

1.8- Inibidor de Proteases Leucocitárias Secretadas (SLPI)

O inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) é uma proteína de duplo domínio com o poder de inibir a atividade de um grande número de proteases, estável em meio ácido, e presente em diversas secreções mucosas como saliva, leite, sêmen, entre outras (FRANKEN, MEIJER & DIJKMAN, 1989; MOUTSOPOULOS *et al.* 2006). A SLPI é uma proteína catiônica, não glicosilada, formada por 107 aminoácidos, de baixo peso molecular (11,7kDa), composta por dois domínios homólogos com 8 radicais cisteína cada e 4 pontes dissulfeto (Figura 1), e com propriedades inibitórias presentes em ambos os domínios (EINSBERG *et al.*, 1990; TOMPHSON & OHLSSON 1986; BARANGER *et al.*, 2008; MOUREAU *et al.*, 2008). A SLPI ou antileucoprotease (ALK) (TOMEI *et al.*, 1997) ou inibidor de protease de baixo peso molecular (LMI) (KRAMPS *et al.*, 1989) entre outras denominações, é reconhecido como o maior inibidor da elastase secretada por neutrófilos ou elastase leucocitária. Além de secretado, este inibidor se apresenta sob forma inativa no citoplasma de neutrófilos, provavelmente com o objetivo de proteção da célula contra o extravasamento enzimático dos grânulos azurofílicos (SALLENAVE *et al.*, 1997). Os níveis sistêmicos de SLPI são relativamente baixos se comparados aos inibidores de serina proteases séricos como α -1 anti-tripsina e α -2

macroglobulina. Desta forma, acredita-se que sua real ação ocorra em nível local (ASHCROFT *et al.*, 2000).

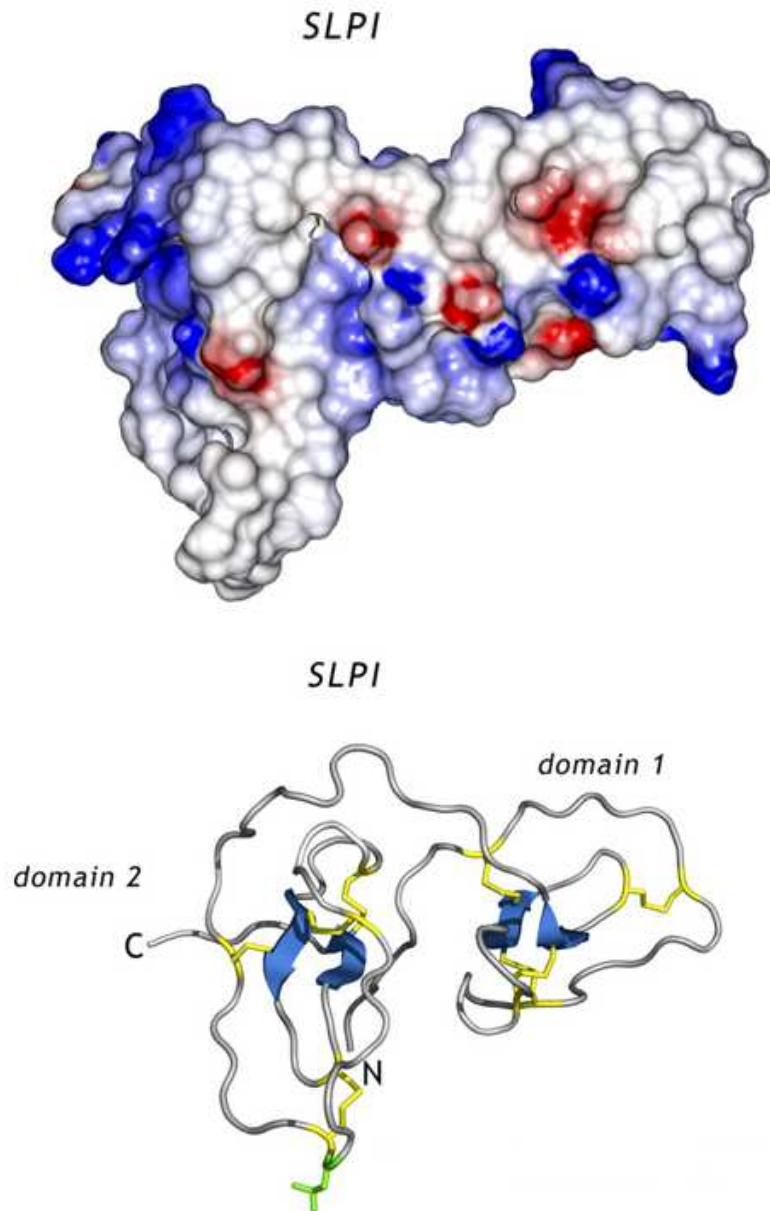


Figura 1: Diagrama esquemático, mostrando as estruturas do Inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) na mesma orientação espacial. Na figura superior, as superfícies moleculares da SLPI estão coloridas de acordo com o seu potencial eletrostático (azul para regiões positivas e vermelho para regiões carregadas negativamente). Na figura abaixo, as estruturas 3D da SLPI são representadas por um diagrama em fita (as pontes dissulfeto de cada domínio estão coloridas em amarelo). Fonte: MOREAU *et al.* (2008).

A SLPI é produzida a partir das células acinares das glândulas submucosas e pelas células epiteliais de revestimento das superfícies mucosas, bem como por neutrófilos, macrófagos (FRANKEN, MAIJER & DIJKMAN, 1989; LAI *et al.*, 2004) e células B (NAKAMURA *et al.*, 2003). A produção dessa proteína pelas células epiteliais é contínua e a sua concentração nas diversas secreções externas se apresenta de forma bastante diversa (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2004; TJABRINGA *et al.*, 2005; JANA, GRAY & SHUGARS, 2005). Os estudos de JIN e colaboradores (1997) demonstraram que a expressão de SLPI em macrófagos é variável e pode ser significativamente inibida pela presença de gama interferon (INF γ) e induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (TOMEI *et al.*, 1998). Os tecidos que estão em contato constante com a proteína SLPI parecem estar protegidos contra a ação lítica tanto da elastase quanto de diversas enzimas proteolíticas (EINBERG *et al.*, 1990), o que demonstra seu papel protetor contra a proteólise tecidual e sua associação direta com o processo de cicatrização epitelial (ASHCROFT *et al.*, 2000, ANGELOV *et al.*, 2004). Assim sendo, atribui-se a proteína SLPI uma função reguladora contra o excesso de serina proteases derivadas de neutrófilos, de células acinares pancreáticas e de mastócitos (HIEMSTRA *et al.* 2002). A alta afinidade deste inibidor com essa classe de enzimas explica sua atuação sobre a ação de elastases, catepsina, tripsina e quimiotripsina (MOUREAU *et al.*, 2008).

As concentrações fisiológicas da SLPI nas diferentes superfícies mucosas é bastante variada (SHUGARS, WATKINS & COWEN, 2001). Na saliva essa concentração pode variar de 0,35 a 2,0 μ M (TJABRINGA *et al.*, 2005), nas secreções nasais de 0,8 a 6,8 μ M (COLE, DEWAN & GANZ, 1999), 8,7 μ M em lavados bronco-alveolares de pacientes não fumantes (MOUREAU *et al.*, 2008), podendo atingir até 80 μ M no líquido seminal (SHUGARS, 1999). Estudos em ratos demonstraram que o tabagismo pode reduzir os níveis de SLPI e gerar um decréscimo de até 50% de sua atividade inibitória no epitélio brônquico (CAVARRA *et al.*, 2001), provavelmente em decorrência da cronicidade da inflamação tecidual.

Além de seu papel de inibidor de serina proteases, a SLPI apresenta uma importante atividade antibacteriana (HIEMSTRA *et al.*, 1996; MOUREAU *et al.*, 2008), antiviral (MCNELLY *et al.*, 1995; SHUGARS *et al.*, 1999

MOUTSOPOULOS *et al.*, 2007), antifúngica (TOMEI *et al.*, 1997) e imunomodulatória (NAKAMURA *et al.*, 2003, XU *et al.*, 2007). A natureza extremamente catiônica dessa proteína sugere que sua ação antimicrobiana seja similar a de estruturas conhecidas, como lisozimas e defensinas, que através dessa característica catiônica, se ligam e desestabilizam a membrana citoplasmática do microrganismo, normalmente carregada negativamente (MOUREAU *et al.*, 2008). A ação de agentes catiônicos sobre blastoconídios de *C. albicans* é composta por fases seqüenciais que evoluem desde a integração à membrana plasmática até sua permeabilização, levando ao extravasamento de constituintes intracelulares essenciais e permitindo a ligação desses agentes a moléculas polianiónicas vitais como RNA e DNA (LEHER *et al.*, 1985).

O potencial terapêutico da proteína SLPI pode ser evidenciado “in vitro” através da aplicação de proteína exógena sobre lesões epidérmicas induzidas e não contaminadas, que resultam na diminuição do tamanho da lesão, do tempo de reparação tecidual e da resposta inflamatória (ASHCROFT *et al.*, 2000, ZHU *et al.*, 2002).

A suposição da atividade de substâncias não imunológicas, dentre eles os inibidores de protease endógenos, sobre a transmissão do HIV por via oral, surgiu ao se observar que a saliva de pacientes não infectados conseguiam inibir a infecção viral “in vitro” (FOX, 1989). A trombospondina e as mucinas de alto peso molecular são conhecidas por sua atividade anti-HIV, provavelmente por agregar o vírus em complexos grandes e insolúveis, entretanto, aparentemente apenas um componente, o inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI), possui essa atividade por meios não agregadores e em concentrações fisiológicas (MCNELLY *et al.* 1995; DOUMAS, KOLOKOTRONIS & STEFANOPOULOS, 2005).

Em 2005, Jana e colaboradores quantificaram a expressão de SLPI na mucosa oral de pacientes infectados pelo HIV e demonstraram um aumento significativo da concentração dessa proteína em relação ao grupo de pacientes saudáveis. O aumento da concentração de SLPI na saliva parece também estar associado ao estado imunológico, como a infecção pelo HIV e a quadros anteriores (clínicos e subclínicos) de infecções fúngicas (BAQUI, MEILLER & FALKLER, 1999; SHUGARS *et al.*, 1999; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2004), e a

infecções virais, como a citomegalovirose (ROCHA *et al.*, 2008). A razão para o aumento na concentração de SLPI na saliva de pacientes infectados pelo HIV ainda não é bem esclarecida. Entretanto, alguns estudos propõem que este aumento se deve à redução característica do fluxo salivar, e não em decorrência de alterações de síntese ou de secreção da proteína (LIN *et al.*, 2004). Outros autores supõem que quadros contínuos de candidíase sub-clínica podem promover a manutenção dos níveis aumentados de SLPI na saliva desses pacientes, e que a alteração imunológica própria causada pela infecção pelo HIV pode manter essa expressão aumentada mesmo depois da resolução da infecção fungica (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2004).

A atividade antiviral da proteína SLPI parece estar ligada à interação com a célula do hospedeiro e não diretamente sobre o vírus. As proteases leucocitárias como a CD26, catepsina e elastase participam da entrada do vírus na célula através da quebra do “loop” V3 da GP 120, componente do envoltório viral. Devido à sua característica primordialmente inibitória, supõe-se que essa proteína atue inibindo a ação dessas proteases e dificultando a instalação do HIV na célula (MCNELLY *et al.*, 1995; SHUGARS *et al.*, 1998).

Desta forma, as características inibitórias e reparadoras dessa proteína, associadas ao amplo espectro de sua atividade antimicrobiana conferem à proteína SLPI um grande potencial na elaboração de novas estratégias terapêuticas e métodos preventivos para doenças infecciosas, principalmente para pacientes com infecções recorrentes ou idiopáticas. Através da inibição da atividade de proteases e de sua ação microbicida pode-se sugerir que essa proteína tenha um papel importante no apoio ao sistema imunológico do hospedeiro frente a desordens infecciosas oportunistas.

2-JUSTIFICATIVA

Considerando que a proteína SLPI é produzida continuamente e em concentrações elevadas em várias superfícies mucosas, incluído a mucosa oro-faríngea (SHUGARS, 1999), e que a atividade antifúngica sobre *Candida albicans* foi estabelecida em concentrações fisiológicas (TOMEÉ *et al.*, 1997), a avaliação do efeito dessa proteína sobre os fatores de virulência associados a patogenicidade deste microrganismo pode ser promissor para a criação de novas metodologias de controle e de tratamento para a candidíase, com o objetivo de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes comumente acometidos por infecções oportunistas, como imunossuprimidos e portadores do HIV.

3-OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) sobre o crescimento e os diferentes processos biológicos de *Candida albicans* "in vitro".

3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima fungicida (MFC) da proteína SLPI contra cepas de *C. albicans* de referência (ATCC24433) e isolada clinicamente (PRI);
- Identificar atividade inibitória sinérgica entre a proteína SLPI e o antifúngico nistatina sobre *C. albicans*;
- Avaliar o efeito da proteína SLPI sobre a atividade proteolítica de serina proteases secretadas por *C. albicans*;
- Avaliar a influência da proteína SLPI sobre a hidrofobicidade da parede celular de *C. albicans*;
- Determinar a presença de ligantes específicos para a proteína SLPI na superfície de *C. albicans*;
- Avaliar possíveis alterações nas adesinas reconhecidas pela lectina concanavalina A em *C. albicans* após tratamento com a SLPI;
- Avaliar possíveis alterações ultraestruturais em *C. albicans* após tratamento com a proteína SLPI;

- Avaliar a influência da proteína SLPI sobre a formação de biofilme de *C. albicans*.

4-MATERIAL E MÉTODOS

Nosso objetivo inicial foi analisar o efeito da SLPI no crescimento celular de duas cepas de *C. albicans* (um isolado clínico da cavidade oral de um paciente portador do HIV e a cepa ATCC 24433), comparando-o com a ação de dois antifúngicos empregados no tratamento convencional da candidíase superficial através da metodologia padronizada pelo CLSI, antigo NCCLS. Pesquisamos também a possível existência de receptores específicos para esta proteína na superfície de *C. albicans*, bem como o efeito dessa proteína sobre a ultraestrutura e sobre diferentes processos biológicos relacionados à sua patogenicidade, como a atividade proteolítica de suas proteases secretadas; a morfodiferenciação, a hidrofobicidade da superfície celular; a expressão de manoproteínas e a formação de biofilme.

4.1-Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas duas cepas distintas de *Candida albicans*. Uma cepa obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC 24433), isolada de onicomicose e sem resistência conhecida ao fluconazol e uma cepa isolada clinicamente da mucosa oral de um paciente pediátrico portador do HIV (cepa PRI), resistente ao fluconazol. As cepas foram mantidas conforme especificações CLSI/NCCLS, refrigeradas em meio Sabouraud-dextrose agar (SDA) no Laboratório de Biologia de Protistas do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.2- Proteína Recombinante

A proteína SLPI humana recombinante e o anticorpo anti-hSLPI foram adquiridos liofilizados da empresa R&D System[®] (Minneapolis, EUA) e reconstituídos em PBS pH 7,4 a 25° C, resultando em uma solução estoque com concentrações finais de 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml, respectivamente.

4.3- Cultivo e Preparo do Inóculo

Os inóculos foram obtidos a partir do cultivo dos isolados de *C. albicans* em meio Sabouraud-dextrose, distribuídos em alíquotas de 20 ml em frascos Erlenmeyer de 50 ml que foram mantidos a 37° C por 48 horas sob agitação (200 rpm).

Para o ensaio de concentração mínima inibitória, 50 µl do inóculo foram semeados em placas de Petri, contendo meio SDA e mantidas por 24 horas a 37° C para a formação de colônias, conforme instruções do documento M 27-A, CLSI/ NCCLS (NCCLS, 2002). O crescimento e a contagem de células foram estimados através de espectrofotometria em 550 nm de comprimento de onda, com referência ao padrão de Mc Farland 0,5, devidamente ajustado para leitura de leveduras.

Para os demais experimentos, as leveduras foram contadas sob microscopia ótica a 400x de aumento com a utilização de uma câmara hematócitolométrica de Neubauer.

4.4- Concentração Mínima Inibitória (MIC) E Concentração Mínima Fungicida (MFC)

A determinação do MIC da proteína SLPI seguiu os métodos e critérios do CLSI/NCCLS, documento M-27A, que relata um método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica.

O ensaio utilizou o método padrão de microdiluição com diferentes concentrações da proteína SLPI e de inóculo devidamente ajustados em meio RPMI-1640, em placas estéreis e descartáveis de 96 poços.

O meio de cultura utilizado no experimento foi o meio sintético RPMI-1640 com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,0 a 25° C com HEPES. O inóculo foi cultivado a partir de 5 colônias de aproximadamente 1 mm cada, adquiridas pelo procedimento inicial de cultivo, que foram ressuspensas em 5 ml de solução salina estéril 0,145mol/l (0,85% NaCl) agitado em vórtex, e ajustado por espectrofotometria para transmitância equivalente a solução padrão de Mc Farland 0,5. Esta suspensão foi considerada a suspensão padrão e forneceu uma quantidade estimada de 1,0

a $5,0 \times 10^6$ cel/ml que foi diluída em meio RPMI-1640 em uma proporção de 1:50 seguida de nova diluição 1:20, fornecendo ao final uma suspensão de trabalho na faixa de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ cel/mL.

A proteína SLPI foi testada nas concentrações de 20 - 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,62 – 0,31 – 0,15 – 0,07 e 0,03 μ M. As diluições foram realizadas de acordo com os critérios do CLSI/NCCLS para o método de microdiluição. A proteína recombinante foi diluída em PBS até atingir uma concentração 10 vezes maior que a utilizada no ensaio. A proteína foi novamente diluída em meio de cultivo RPMI-1640, numa proporção de 1:5, quando 100 μ l dessa solução foram transferidos para as placas de teste onde foi adicionado o mesmo volume do inóculo previamente ajustado. As placas foram, por fim, incubadas por 48 horas a 37° C sem agitação.

Após a incubação as placas foram lidas em espectrofotômetro em 595 nm de comprimento de onda. A partir dos resultados foram calculadas as concentrações mínimas de proteína que inibem 100% e 50% de crescimento ou MIC e IC₅₀, respectivamente, através da equação da reta obtida pela análise de dispersão do Microsoft Excel®.

Para calcular a MFC da proteína SLPI foi utilizada a contagem visual de unidades formadoras de colônias (UFC), realizada da seguinte forma: Após a incubação de 10^4 células em meio Sabouraud dextrose na ausência ou presença de concentrações variadas da proteína SLPI por 24 horas, o sistema controle foi contado em câmara hemocitométrica, e através de diluição em PBS 10 mM, pH 7,2, as células foram ajustadas para 5×10^3 células/ml. A mesma proporção de diluição foi utilizada para todos os sistemas testados nas diferentes concentrações da proteína, e então 100 μ l de cada suspensão foram semeados em placas de Petri com meio SDA em triplicata. As placas foram incubadas em 37° C por 24 horas, e as colônias formadas foram contadas visualmente.

Para o cálculo da atividade antifúngica foi utilizada a fórmula elaborada por TOMEE e colaboradores (1997) como se segue abaixo:

$$\frac{CTRL - EXP}{CTRL} \times 100$$

Onde:

CTRL= número de colônias contadas na placa de controle

EXP= número de colônias contadas nas placas do experimento

Da mesma forma a equação da análise de dispersão do Microsoft Excel[®] foi utilizada para a determinação dos valores de MFC.

4.5- Interação com a Nistatina

Após o cultivo dos isolados, as leveduras foram lavadas em PBS e 10^4 células foram incubados em $18 \mu\text{M}$ da proteína SLPI e em $8 \mu\text{g/ml}$ do antifúngico nistatina isoladamente ou em combinação, por seis horas em 37°C com agitação. A viabilidade foi testada pelo método de exclusão do azul de Tripán. A diferença percentual de células viáveis entre o sistema tratado e o sistema controle foi considerada o percentual de atividade antifúngica das drogas sozinhas ou combinadas (BARBOSA *et al.*, 2009).

4.6- Inibição da Atividade Proteolítica pela proteína SLPI

A identificação do efeito da SLPI como um possível inibidor da atividade proteolítica secretória de *C. albicans* foi observado através da inibição da clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Sigma Aldrich[®] St. Louis, Missouri, EUA). Para isso, as leveduras foram coletadas, na fase logarítmica de crescimento (48 horas de cultivo), através de centrifugação a $7000\times g$ durante 8 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana Millipore $0,22 \mu\text{m}$ e, posteriormente, 3 ml foram submetidos à concentração por ultrafiltração utilizando microconcentradores com membrana de exclusão (“cut-off”) igual a 10 kDa, durante aproximadamente 7 horas a 4°C finalizando uma solução concentrada 30x (PORTELA, 2006).

Alíquotas de $20 \mu\text{l}$ do sobrenadante concentrado foram diluídas em $50 \mu\text{l}$ de um tampão de reação contendo acetato de sódio 0.1 M, pH 5,0 e $2,5 \mu\text{l}$ do substrato Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (solução de estoque a 6mg/ml) e incubados a 37°C por 1 hora. Em alguns sistemas foram adicionadas concentrações distintas de SLPI (concentração fisiológica na saliva humana – $2,0 \mu\text{M}$ e a concentração correspondente ao MIC – $18 \mu\text{M}$) durante a hidrólise.

Ao final do tempo de incubação foram adicionados 150 µl de ácido tricloroacético a 5% aos sistemas, e estes foram submetidos à leitura fluorométrica com comprimentos de onda de 380 e 450 nm para a excitação de fluorescência e emissão, respectivamente (KAMBOJ *et al.*, 1993).

A diferença percentual entre as leituras fluorométricas do sistema controle e dos sistemas com adição da proteína SLPI foi considerada a alteração percentual da atividade proteolítica.

4.7- Influência da Proteína SLPI na Hidrofobicidade da Superfície Celular de *C. albicans*

Após o cultivo dos isolados, as leveduras foram lavadas em PBS e 10^7 células foram incubadas em 80 µM da proteína SLPI por seis horas em 37° C com agitação. As leveduras foram então lavadas em água deionizada gelada e suspensas em tampão fosfato uréia magnésio pH 7,1, também gelado, a densidade ótica do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro para 0,400 em 600 nm. Em tubos de borosilicato, foram misturados 1,2 ml do inóculo e 300µL de ciclohexano. Essa suspensão foi homogeneizada em vórtex por 3 minutos e após a separação das fases a porção aquosa foi novamente medida por espectrofotometria, no mesmo comprimento de onda. A diferença percentual entre as duas leituras foi considerada o grau de hidrofobicidade da superfície celular (CSH) (HAZEN & HAZEN, 1987).

4.8- Influência da proteína SLPI na morfogênese de *C. albicans*

Após o cultivo dos isolados por 48 horas em meio Sabouraud-dextrose, as leveduras foram testadas quanto à diferenciação celular, através de sua incubação em soro fetal bovino (SFB), que agiu como indutor dessa diferenciação. Depois de lavadas, 10^6 células foram incubadas em SFB contendo ou não 9,0 µM proteína SLPI e mantidas em 37° C por 3 horas com agitação (BRAGA-SILVA *et al.*, 2007). Depois da incubação, a viabilidade celular foi testada pelo método de exclusão do azul de Tripán para se evitar resultados superestimados, e os tubos germinativos foram contados diferencialmente em câmara hemocitométrica de Neubauer.

Para desfazer os grumos de células que podem prejudicar a contagem correta dos tubos germinativos, após a incubação as células foram lavadas em PBS e suspensas em uma solução de NaOH 1N contendo EDTA 10mM e 1% de β -mercaptoetanol, homogeneizadas em vórtex por 1 minuto, e novamente lavadas e ressuspensas em PBS 10 mM, pH 7,2 (CASANOVA *et al.*, 1997). As contagens foram realizadas quatro vezes em cada experimento utilizando um mínimo de 400 células.

4.9 - Análise de receptores para a proteína SLPI por citometria de fluxo.

Após o cultivo dos isolados por 48 horas, 10^6 leveduras foram testadas para a identificação de receptores específicos para a proteína SLPI. Para isso, as células foram lavadas duas vezes em PBS 10 mM, pH 7,2 e fixadas em paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 1 hora. Após a fixação, as células foram novamente lavadas em PBS e bloqueadas com BSA 5% por uma hora também em temperatura ambiente. Depois de lavadas em PBS, as células foram incubadas com uma solução de 20 μ g/ml ou 100 μ g/ml da proteína SLPI por 90 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas e incubadas com uma solução de 10 μ g/ml ou 50 μ g/ml do anticorpo (anti-hSLPI hSLPI Affinity Purified Goat IgG) (R&D systems[®]) por 1 hora. As células foram lavadas duas vezes em PBS e então incubadas com anticorpo secundário anti IgG goat conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) em diluição 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente e protegido da luz. As leveduras foram novamente lavadas e 10.000 células ou eventos foram analisados no citômetro de fluxo EPICS ELITE (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) equipado com laser de argônio 15 mW com comprimento de onda de 488 nm. Células controles foram utilizadas para determinação da autofluorescência. Essas células não foram incubadas, apenas lavadas e fixadas pelo paraformaldeído 4% e analisadas.

4.10- Efeito da proteína SLPI na expressão de manoproteínas por citometria de fluxo.

Após o cultivo dos isolados, as leveduras foram lavadas em PBS e 10^7 células foram incubadas em $9\ \mu\text{M}$ e $80\ \mu\text{M}$ da proteína SLPI por seis horas em 37°C com agitação. Depois da incubação, as células foram lavadas em PBS 10mM , $\text{pH}\ 7,2$ fixadas em paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 1 hora. Após a fixação as células foram novamente lavadas em PBS e bloqueadas com BSA 5% por uma hora, também em temperatura ambiente. Depois de lavadas em PBS as células foram incubadas com Concanavalina A-FITC (Sigma Aldrich®) 2mg/ml em diluição 1:500 por 1 hora, em temperatura ambiente e protegido da luz. As leveduras foram novamente lavadas e 10.000 células ou eventos foram analisados em citômetro de fluxo EPICS ELITE (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) equipado com laser de argônio $15\ \text{mW}$ com comprimento de onda de $488\ \text{nm}$. Células controles não incubadas com a lectina foram utilizadas para determinação da autofluorescência.

4.11- Efeito da proteína SLPI na ultraestrutura de *C. albicans*

Após o cultivo dos isolados, as leveduras foram lavadas em PBS e 10^7 células foram incubadas em $9\ \mu\text{M}$ e $80\ \mu\text{M}$ da proteína SLPI por seis horas em 37°C com agitação constante. Após incubação as células foram lavadas em PBS $10\ \text{mM}$, $\text{pH}\ 7,2$ e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio $0,1\ \text{M}$, $\text{pH}\ 7,2$ por 1 hora. Depois de fixadas as amostras foram novamente lavadas e pós-fixadas em 1% de tetroxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio $0,1\ \text{M}$ e $\text{pH}\ 7,2$ contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e $5\ \text{mM}$ de CaCl durante 1 hora em temperatura ambiente e protegido da luz. Após a pós-fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em uma mistura de resina epon e acetona também em concentrações crescentes de resina. Após a inclusão da amostra em resina epon 100%, os blocos foram confeccionados e polimerizados em 60°C por 72 horas. Os cortes foram realizados em ultramicrotomo e colocados em grades de cobre onde foram contrastados em solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão EM 900 (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha).

4.12 - Efeito da proteína SLPI na formação de biofilme por *C. albicans*

A formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia proposta por THEIN, SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE (2007) com pequenas modificações. Após o cultivo dos isolados, as leveduras foram lavadas em PBS e 10^7 células foram incubadas em $80 \mu\text{M}$ da proteína SLPI por seis horas em 37°C com agitação. Depois de incubadas, 10^6 células foram adicionadas em placa de cultura de 96 poços que permaneceu por 90 minutos em 37°C em suave agitação (75 rpm). Após este período, o sobrenadante foi removido, e duas lavagens suaves com PBS estéril foram realizadas, para remoção das células não aderidas. Foram adicionados a cada poço $200\mu\text{l}$ de BHI contendo ou não $2,5 \mu\text{M}$ da proteína SLPI, e as placas foram incubadas em 37°C por 48 horas, sem agitação. Após este período, o sobrenadante foi removido e duas lavagens suaves com PBS estéril foram realizadas para a remoção das células não aderidas ao biofilme formado. A quantificação do biofilme foi realizada pela adição de uma solução de 3 mg/ml de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,2-difeniltetrazolio (MTT) com menadiona $0,4 \text{ mM}$ em diluição 1:20 nos poços. A reação de redução do MTT pelas células ocorreu em 37°C por 3 horas no escuro, e após esse período $100 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492nm .

4.13 – Análise dos resultados

Os ensaios analisados por citometria de fluxo foram realizados em quatro experimentos independentes, sendo demonstrado o resultado final representativo destes. Estes resultados foram apresentados de duas formas distintas, considerando (1) a população celular marcada pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e (2) a intensidade de fluorescência transmitida pela população de células testadas. Os demais experimentos foram realizados no mínimo em duplicata e os resultados foram expressos através da média \pm desvio padrão. A significância dos resultados foi avaliada empregando-se o teste t de Student para os experimentos de MIC e MFC e o teste Qui-Quadrado

corrigido por Yates para os demais experimentos, valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

5– RESULTADOS

5.1 - Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana foi realizada através do teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC), com base na metodologia padrão internacional do CLSI, antigo NCCLS. Os dados relacionados às concentrações mínimas inibitórias estão resumidos na tabela 1. Os valores de MIC e de IC₅₀ para a cepa isolada clinicamente (PRI) e a referencial (ATCC24433) foram de 210,9 e 105,4; e 221,4 e 110,3 µg/ml, respectivamente (equivalente a 18,0 µM e 9,0 µM; e 18,9 µM e 9,4 µM da proteína, respectivamente). O fluconazol e a nistatina foram os antifúngicos convencionais utilizados como controle para o crescimento das leveduras. Um MIC de 98,6 µg/ml da cepa PRI para o fluconazol foi observado classificando-a dessa forma como resistente a esse medicamento segundo os padrões do CLSI.

Tabela 1 – Concentrações Mínimas Inibitórias (MIC) e Concentração de inibição de 50% (IC₅₀) da proteína SLPI, Fluconazol e Nistatina testadas sobre as cepas de *C. albicans* PRI e ATCC 24433. 5x10³ cel/ml foram incubadas em concentrações crescentes dos agentes testados por 48h em 37^o C conforme instruções do protocolo M-27A2 do CLSI, e o crescimento celular foi avaliado por leitura espectrofotométrica. Os valores de MIC e IC₅₀ da proteína SLPI em µM equivalem a 18 e 18,9 e 9,9 e 9,4 para as cepas PRI e ATCC 24433, respectivamente.

<i>C. albicans</i>	SLPI		FLUCONAZOL		NISTATINA	
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀
PRI	210,9 ±30,5	105,4 ±14,5	98,62 ±1,2	24,17±6,7	9,67 ±0,5	4,06 ±0,7
ATCC 24433	221,4 ±6,0	110,3 ±3,0	2,81 ±2,7	1,51 ±1,8	nt	nt

nt= não testado

5.2 – Concentração Mínima Fungicida (MFC)

O gráfico 1 mostra a atividade fungicida da proteína SLPI sobre as duas cepas de *C. albicans* tratadas por um período de 24 horas. Esta atividade fungicida se mostrou dose dependente em ambas as cepas. No entanto, a cepa isolada clinicamente (PRI) apresentou maior resistência à SLPI quando comparada a cepa ATCC 24433. A atividade fungicida mínima da proteína SLPI sobre as leveduras ATCC 24433 foi observada a partir de 1,25 μM (4,0%), e foi significativamente aumentada com o acréscimo da concentração de SLPI para 2,5 μM (10,2%) e 10 μM (47,7%). Já, a atividade fungicida da SLPI sobre o isolado clínico (PRI) só foi observada a partir de 2,8 μM , atingindo 30,9% de atividade antifúngica em 5,0 μM , que foi aumentada para 50,3% em 10 μM , não havendo atividade fungicida detectável nestas células, em concentrações menores. Através da equação da reta obtida pela análise de dispersão do Microsoft Excel[®] os valores de MFC da proteína SLPI foram calculados em 20,0 μM e 20,6 μM para as leveduras PRI e ATCC 24433, respectivamente.

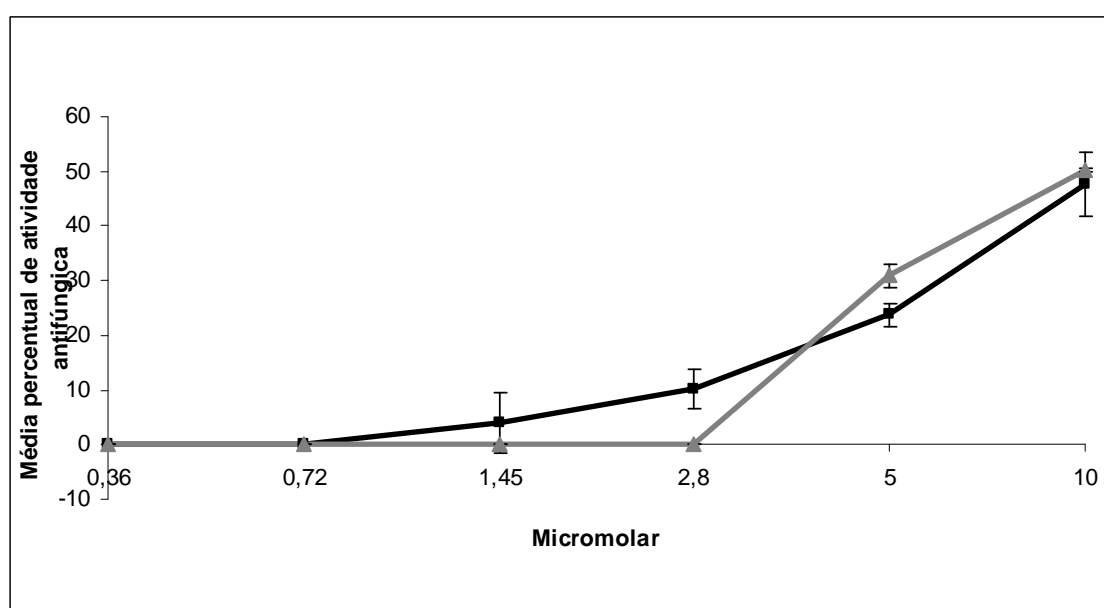


Gráfico 1 - Concentração Mínima Fungicida (MFC) da proteína SLPI testada sobre as cepas de *C. albicans* PRI (▲) e ATCC 24433 (■). 10^4 células foram incubadas em concentrações crescentes da proteína por 24h em 37⁰ C e plaqueadas em SDA que foram incubados em 37⁰ C por mais 24h. A diferença percentual das UFC (contadas visualmente) entre o sistema tratado e o CTRL determinou a atividade fungicida da ($p < 0,001$)

5.3 – Efeito combinado entre a proteína SLPI e o antifúngico Nistatina

O gráfico 2 mostra o efeito da proteína SLPI combinado ou não ao antifúngico nistatina sobre o isolado clínico de *C. albicans* (PRI). Quando 18 μM de SLPI ou 8 $\mu\text{g/ml}$ de nistatina foram utilizados separadamente, o efeito antifúngico sobre as leveduras foi de 25,4% e de 33,7%, respectivamente. Entretanto quando esses agentes foram utilizados em combinação, o efeito inibitório passou a ser de 79,6%, indicando dessa forma um efeito sinérgico para a cepa testada. O efeito sinérgico foi de 20,5% superior ao esperado pela combinação dos agentes.

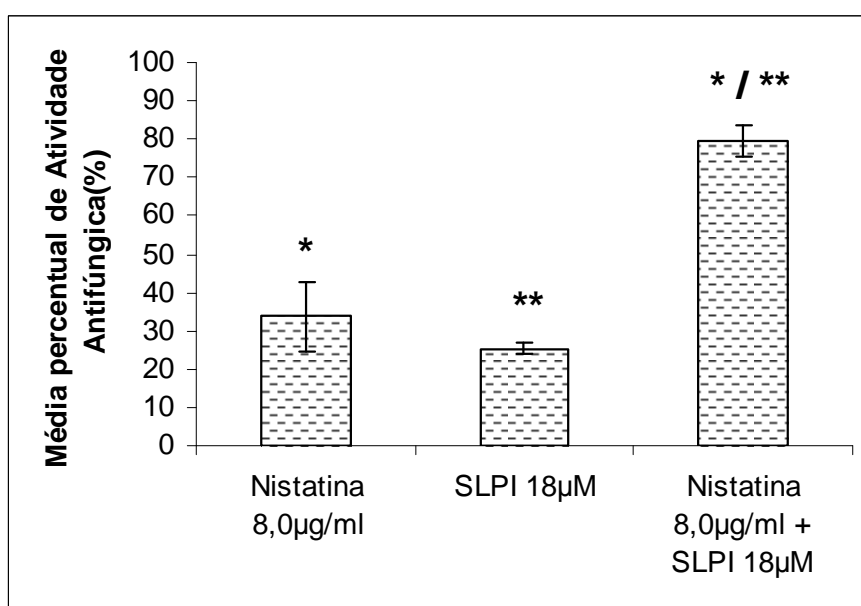


Gráfico 2: Efeito antifúngico combinado entre a proteína SLPI e a nistatina sobre a cepa PRI de *C. albicans*. Para isso, 10^4 células foram incubadas em PBS com 18 μM de SLPI associada ou não a 8 $\mu\text{g/ml}$ de nistatina por 6 horas. $p = 0,01$ (*); $p < 0,001$ (**)

5.4– Efeitos da SLPI na inibição da atividade proteolítica de serina proteases secretadas por *C. albicans*

A atividade proteolítica de serina proteases secretada pelo isolado clínico de *C. albicans* sob influência de concentrações variadas de SLPI foi mensurada pelo método descrito por KAMBOJ e colaboradores (1993). O sobrenadante de cultivo concentrado foi incubado por uma hora com o substrato PHE-ARG4-Methoxy- β -Naphthylamide (específico para serina

proteases) na ausência e presença de 2,0 e 18 μM da proteína SLPI. Após a leitura espectrofotométrica, os resultados obtidos demonstraram que as concentrações de 2,0 e 18 μM de SLPI foram capazes de inibir a atividade proteolítica de serina protease secretada por *C. albicans* em 37,1% e 48,4%, respectivamente (Gráfico 3).

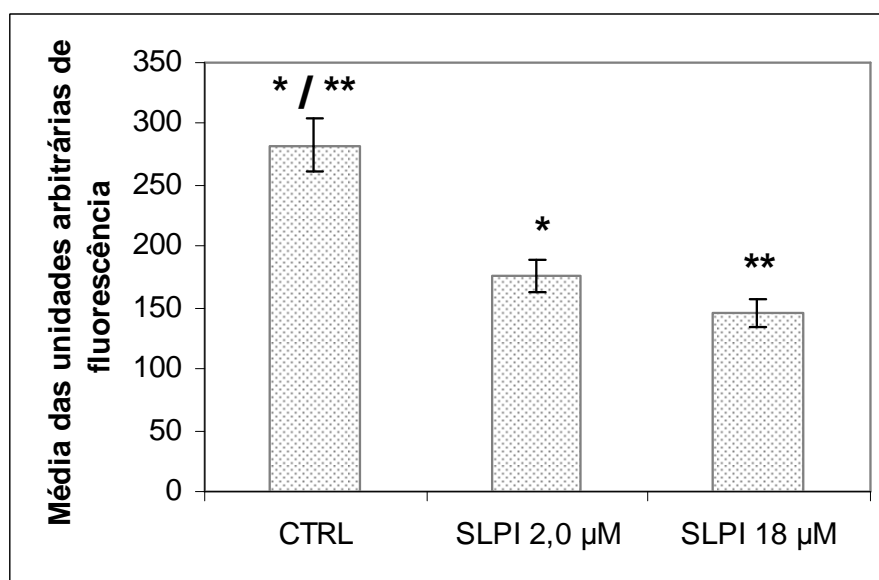


Gráfico 3: Atividade proteolítica de serina proteases secretadas por *C. albicans*. O sobrenadante concentrado foi diluído em tampão contendo o substrato fluorogênico, na ausência (CTRL) e presença de 2,0 e 18 μM de SLPI. A diferença percentual entre as leituras fluorométricas foi considerada a inibição da atividade proteolítica. $p < 0,001$ (*); $p = 0,001$ (**)

5.5 – Efeito da SLPI sobre a morfodiferenciação de *C. albicans*

Para investigar o possível efeito da proteína SLPI sobre a morfodiferenciação da cepa de *C. albicans* (PRI), as leveduras foram incubadas separadamente com soro fetal bovino (SFB) na ausência e na presença de 9,0 μM da proteína SLPI. O percentual de diferenciação em tubo germinativo na ausência da proteína SLPI foi de 78,7%. Na presença de 9,0 μM de SLPI, o percentual de diferenciação foi determinado em 53,5% demonstrando uma inibição de 32% no processo de indução (Gráfico 4). A viabilidade celular foi previamente avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán, que identificou um percentual de 92,1% de células viáveis.

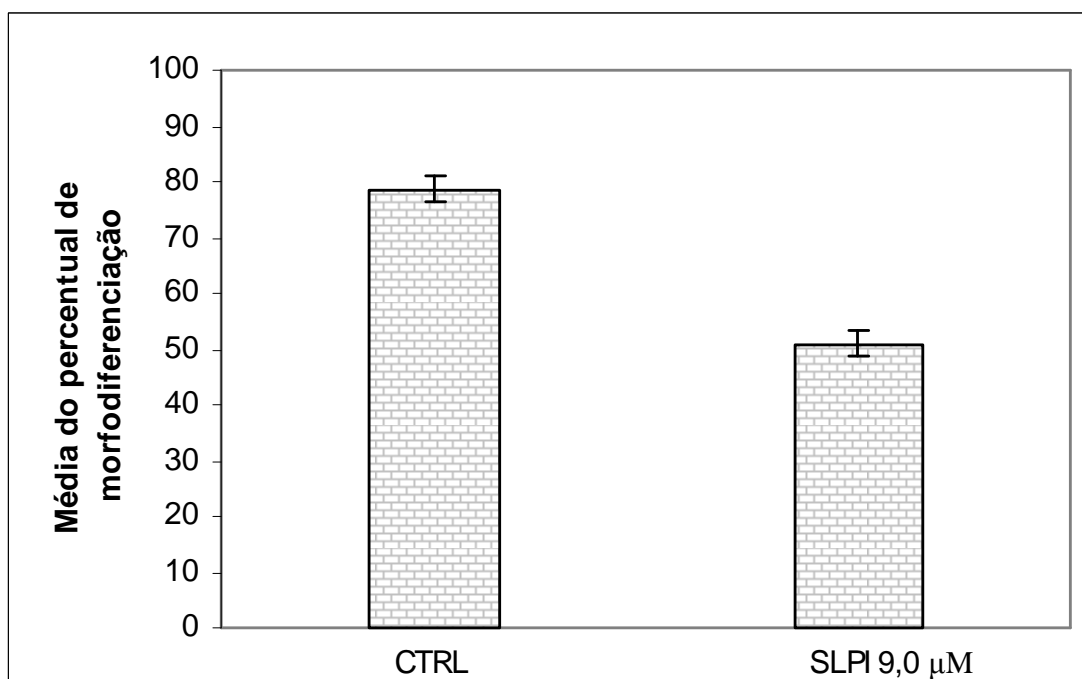


Gráfico 4 – Inibição da morfodiferenciação de *C. albicans* (PRI) em tubo germinativo. Para isso 10^6 células foram incubadas em SFB na presença de $9,0 \mu\text{M}$ da proteína SLPI em 37°C por 3 horas. Os tubos foram contados visualmente e a diferença percentual entre os sistemas foi considerada o percentual de inibição de indução de morfodiferenciação. ($p=0,002$)

5.6 – Efeito da SLPI sobre a hidrofobicidade de *C. albicans*

Para avaliar o possível efeito da proteína SLPI na adesão de *C. albicans* às células epiteliais, as células PRI foram avaliadas quanto ao grau de hidrofobicidade de sua parede celular, visto que este fator de virulência é altamente relacionado com esse processo de adesão. Para isso, utilizou-se o método de separação de fases descrito por HAZEN & HAZEN (1987), após a incubação das células por 6 horas na ausência (controle) e presença de $80 \mu\text{M}$ da proteína SLPI. Observamos que as células controle apresentaram um percentual de hidrofobicidade de 16,1% enquanto as células tratadas com a proteína SLPI mostraram um percentual de 27,2%, revelando, portanto, um aumento de 11,1% no grau de hidrofobicidade, como mostra o gráfico 5.

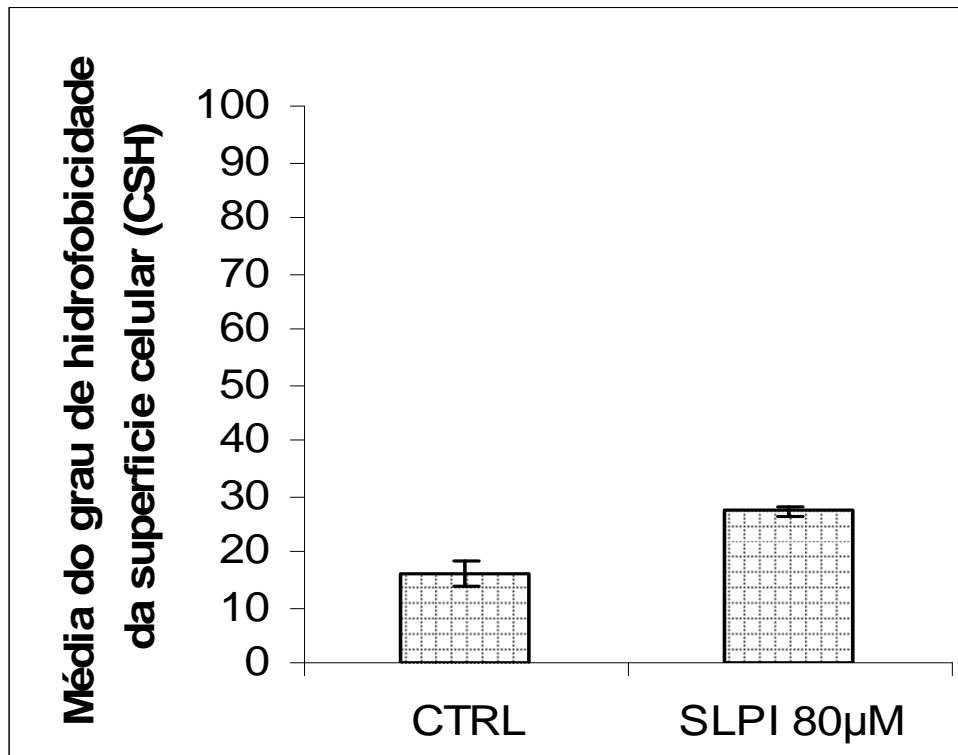


Gráfico 5: Grau de hidrofobicidade da cepa PRI de *C. albicans*. Após o tratamento com 80 µM de SLPI por 6 horas em 37° C, 10⁶ células foram avaliadas quanto seu grau de CSH pela metodologia de separação de fases com ciclohexano. ($p < 0,02$)

5.7 – Efeito da proteína SLPI sobre a formação de biofilme por *C. albicans*

O gráfico 6 demonstra o efeito da proteína SLPI sobre a formação de biofilme por *C. albicans* (PRI) pelo método de THEIN & SAMARANAYAKE (2007). O pré-tratamento das células de *C. albicans* com 80 µM de SLPI por 6 horas não demonstrou atividade significativa sobre a capacidade de formação de biofilme dessas células. Entretanto, a formação de biofilme na presença de 2,5 µM de SLPI, foi significativamente reduzida em 38,1%.

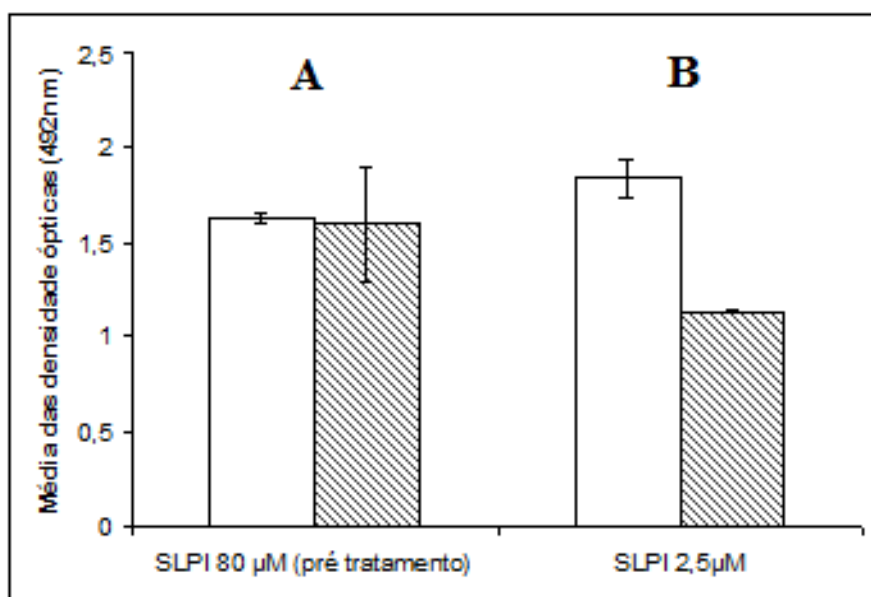


Gráfico 6: Efeito da SLPI sobre a formação de biofilme pela cepa PRI de *C. albicans*. A formação de biofilme foi induzida pela incubação em BHI, por 48 horas em 37° C, em placa de 96 poços. Em (A), as células foram pré-tratadas com 80 µM da proteína e induzidas a formação de biofilme. Em (B) células não tratadas previamente foram induzidas a formação de biofilme na presença de 2,5 µM de SLPI. ($p= 0,04$ (B))
(□) = Controle

5.8 - Avaliação da presença de receptores específicos da proteína SLPI em *C. albicans*

Para evidenciar a presença de receptores na superfície celular de *C. albicans* para a proteína SLPI, as células foram incubadas com 20 e 100 µg/ml da proteína SLPI. A análise por citometria de fluxo mostrou que a proteína SLPI foi capaz de reconhecer moléculas na superfície celular de *C. albicans*. O pico de intensidade de fluorescência mostrou-se mais deslocado para a direita quando as leveduras foram incubadas com a 20 µg/ml SLPI (Gráfico 7A – SLPI) quando comparado com pico correspondente às células controle (não tratadas com SLPI) (Gráfico 7A, autofluorescência). O resultado encontrado após incubação das leveduras com 100 µg/ml de SLPI corroborou com o fato da superfície celular de *C. albicans* possuir moléculas receptoras para essa proteína, visto que o pico de intensidade de fluorescência mostrou-se ainda mais deslocado para direita quando as leveduras foram incubadas com essa concentração de SLPI (Gráfico 7B – SLPI). A quantificação da marcação das células incubadas com 20 e 100 µg/ml revelou um percentual de 21,1% e 70%, respectivamente de células fortemente marcadas.

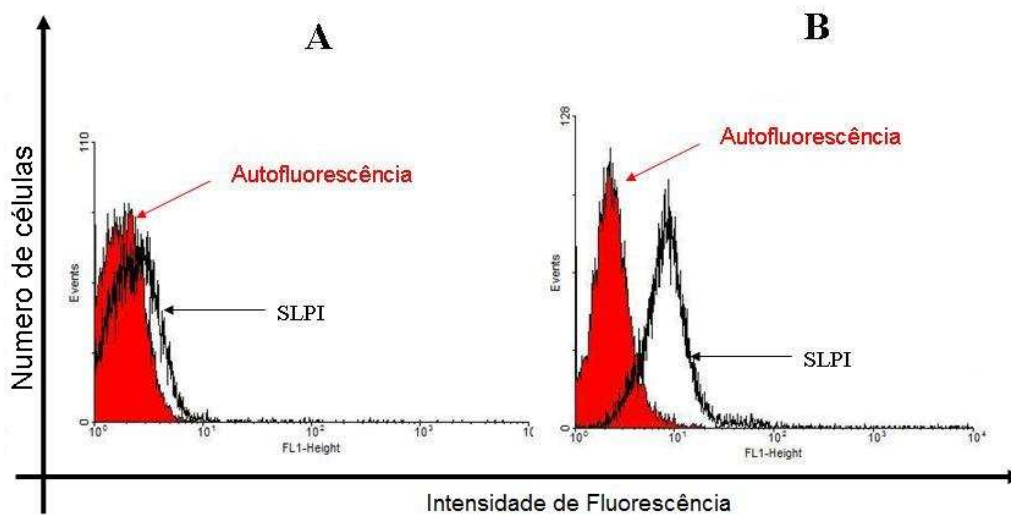


Gráfico 7 – Análise por citometria de fluxo mostrando a ligação da proteína SLPI à superfície de *C. albicans*. As leveduras foram seqüencialmente incubadas na presença de SLPI, anticorpo anti-hSLPI e anticorpo marcado com FITC (linhas vazias). Células controle, que não foram incubadas com SLPI estão representadas pelas linhas preenchidas em vermelho. (A) Leveduras incubadas com 20 µg/ml de SLPI por 90 minutos. (B) leveduras incubadas com 100 µg/ml de SLPI por 90 minutos.

O gráfico 8 considera a intensidade média de fluorescência presente nas células testadas, e revela uma marcação 34% superior ao controle para as células que foram incubadas com 20 µg/mL de SLPI e de 285% para aquelas incubadas com 100 µg/mL da proteína.

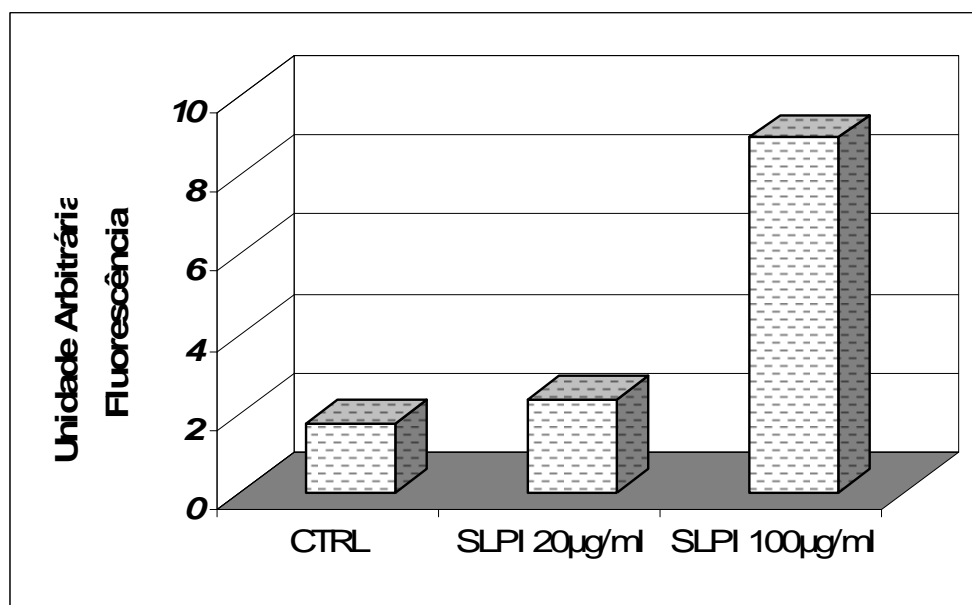


Gráfico 8: Intensidade de fluorescência transmitida pela ligação da proteína SLPI à superfície de *C. albicans* após incubação dessas células com 20 ou 100 µg/ml da proteína SLPI.

5.9 – Efeito da SLPI na expressão de manoproteínas em *C. albicans*

O ensaio teve como objetivo avaliar o efeito da proteína SLPI na expressão de proteínas (manoproteínas) na superfície celular de *C. albicans*. Para isso, as leveduras PRI foram pré-tratadas com 9,0 e 80 µM de SLPI por 6 horas e posteriormente incubadas ou não com Concanavalina-A marcada com isotiocianato de fluoresceína (Con-A FITC) (Gráfico 9). A análise por citometria de fluxo realizada usando a Con-A como marcador para manoproteínas, revelou que o pré-tratamento com 9,0 µM de SLPI não alterou significativamente a expressão de moléculas receptoras para essa lectina na superfície de *C. albicans*, o que foi demonstrado pela ausência de deslocamento do pico de intensidade de fluorescência (Gráfico 9A, SLPI+) quando comparado ao pico correspondente às células controle (sem pré-tratamento com SLPI) (Gráfico 9A, SLPI-). Entretanto, a análise do pré-tratamento da cepa PRI com 80 µM de SLPI mostra o pico de intensidade de fluorescência mais deslocado para esquerda quando comparado ao pico correspondente às leveduras controle (não tratadas com SLPI) (Gráfico 9B, SLPI-, SLPI+). A quantificação demonstra uma redução de 11,1% na marcação dessas células (Gráfico 9).

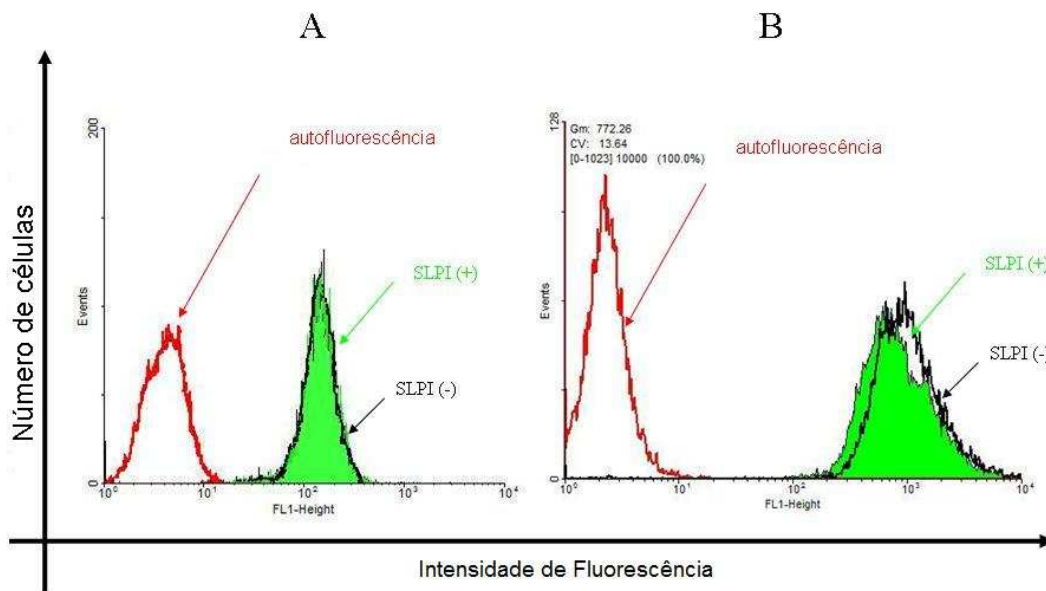


Gráfico 9 – Análise por citometria de fluxo mostrando a ligação da concanavalina-A FITC à superfície de *C. albicans*. Após o tratamento das células com 9,0 μM de SLPI (A) ou 80 μM de SLPI (B) por 6 horas em 37° C, as leveduras foram incubadas com con-A FITC por 1 hora e analisadas por citometria de fluxo. Células para controle de autofluorescência estão representadas pelas linhas vermelhas vazias, células sem o tratamento com a proteína SLPI são representadas pelas linhas pretas vazias e as células tratadas com a SLPI estão representadas pelas linhas preenchidas em verde.

O gráfico 10 considera a intensidade média de fluorescência presente nas células testadas. Nesse contexto, foi observada uma marcação 20,8% menor nas células pré-tratadas com 80 μM de SLPI indicando uma redução significativa na expressão de manoproteínas na superfície dessas células. As células pré-tratadas com 9,0 μM de SLPI não apresentaram alteração significativa na expressão de manoproteínas em sua superfície que pudesse ser detectada por citometria de fluxo.

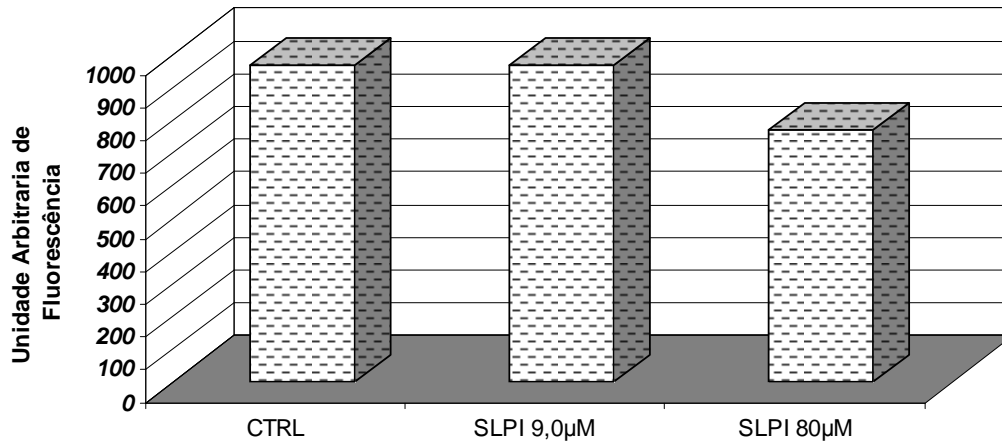


Gráfico 10: Intensidade de fluorescência transmitida pela ligação da concanavalina A FITC à superfície da cepa PRI de *C. albicans* após o tratamento dessas leveduras com 9,0 ou 80 µM da proteína SLPI por 6 horas em 37° C.

5.10 – Efeito da SLPI sobre a Ultraestrutura de *C. albicans*

A análise ultraestrutural das leveduras de *C. albicans* revelou alterações tanto nas células tratadas com 9,0 µM como nas células tratadas com 80 µM da proteína SLPI (Figura 2). No tratamento com 9,0 µM de SLPI, evidenciaram-se células com esvaziamento citoplasmático indicando morte celular mais pronunciada neste grupo em relação às células controle. O tratamento com 80 µM da proteína SLPI também provocou alterações celulares na cepa PRI como a presença de estruturas membranares desorganizadas no interior do citoplasma.

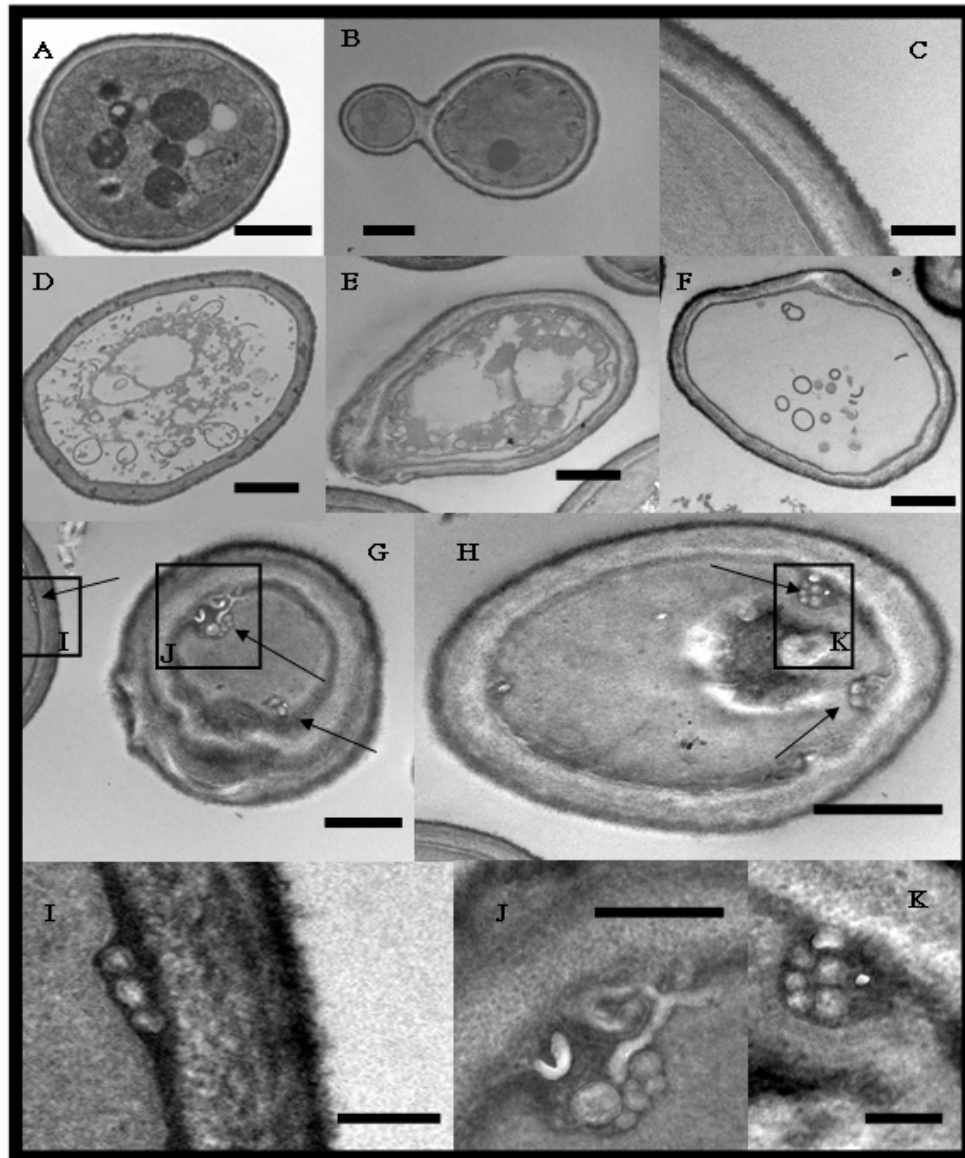


Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão de *C. albicans* (PRI) controle (A-C), tratadas com 9 μM (D) e 80 μM (E-K) de proteína SLPI. As células controle apresentam contorno regular, citoplasma eletrondenso (A-B) e parede celular com diferentes eletrondensidades em camadas (C) característica própria de parede celular fúngica. As células tratadas com SLPI apresentam esvaziamento citoplasmático (D-F), e estruturas membranares irregulares junto a membrana citoplasmática (setas em G e H), que podem ser melhor evidenciadas em maior magnificação (I-K). Barras representam 0,2 μm (C, I, J e K) e 1,0 μm (A, B, D, E, F, G, e H).

6-DISCUSSÃO

As infecções fúngicas ou micoses são responsáveis por um significativo índice de morbidade e mortalidade em humanos, e estão normalmente associadas a indivíduos imunocomprometidos (KARKOWSKA-KULETA RAPALA-KOZIK & ZOKIK, 2009). Dentre as micoses, as originadas por *Candida* representam um problema de importância clínica crescente, pois sua incidência tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas em decorrência dos avanços tecnológicos da terapêutica (como a exigência de imunossupressão induzida para transplantes heterólogos), da epidemia de AIDS (e conseqüente imunossupressão adquirida) e do uso de agentes quimioterápicos e antimicrobianos agressivos (JAHAGIRDAR & MORRISON, 2002; ODDS, GOW & BROWN, 2001). Esse quadro é agravado ainda, pelo aumento na incidência de resistência aos antifúngicos comumente empregados, tornando necessária a descoberta de agentes antifúngicos mais eficazes. (CANUTO & RODERO, 2002).

A conservação das características básicas das células eucarióticas presentes tanto nas células de mamíferos, quanto nas células fúngicas é o principal fator limitador para elaboração de agentes antifúngicos com alvos específicos. O número limitado de drogas antifúngicas dificulta sobremaneira a erradicação quimioterápica das infecções originadas por estes microrganismos, principalmente por fenótipos associados à resistência aos medicamentos disponíveis como fluconazol e anfotericina B (GULSHAN & MOYE-ROWLEY, 2007).

Por muitos anos, os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas foram os poliênicos, como a nistatina e a anfotericina B conhecidos por sua severa nefro, mielo e hepatotoxicidade (PETRIKKOS & SKIADA, 2007). No início da década de 90, o surgimento dos triazólicos possibilitou novas opções de controle e de tratamento para a candidíase (HOPE *et al.*, 2008). Entretanto, o uso extensivo desses novos agentes antifúngicos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, resultou na seleção de espécies resistentes e na mudança da etiologia regular da infecção

para espécies intrinsecamente menos suscetíveis aos medicamentos convencionais. Em estudo recente, MANN e colaboradores (2009) demonstraram que isolados de *C. glabrata* provenientes de pacientes sob profilaxia antifúngica tiveram seus valores de MIC para o fluconazol aumentado em 4 vezes durante a terapia antifúngica. Desta forma, entende-se que a refratariedade no controle convencional da candidíase cria a necessidade de elaboração de novos esquemas terapêuticos (PETRIKKOS & SKIADA, 2007).

Dentre os fatores de virulência conhecidos de *Candida* spp., a atividade proteolítica e a secreção de proteases parecem estar diretamente relacionadas à suscetibilidade desses microrganismos aos antifúngicos convencionais (BERNARDIS *et al.*, 1990; CASSONE *et al.*, 1987). OLLERT e colaboradores (1995) demonstraram que isolados de *C. albicans* com níveis elevados de atividade proteolítica possuíam menor suscetibilidade aos agentes antifúngicos amplamente utilizados, como o cetoconazol e o fluconazol. Desta forma, justifica-se a proposição da utilização de inibidores enzimáticos como agentes antifúngicos potenciais (GAUWERKY, BORELLI & KORTING, 2009).

A proteína SLPI é um potente inibidor enzimático endógeno com o poder de inibir a atividade de um grande número de serina proteases (THOMPSON & OHLSSON, 1986; STETLER, BREWER & THOMPSON, 1986; DIETZE, 1990). Possui baixa massa molecular e está presente em diversas secreções mucosas como saliva, leite e sêmen (FRANKEN *et al.*, 1989; MOUTSOPOLULOS *et al.*, 2006). Essa proteína apresenta ainda uma importante atividade antimicrobiana (MOUREAU *et al.*, 2008; SHUGARS *et al.*, 1999; TOMEE *et al.*, 1997) que pode ser comparada a atividade de lisozimas e defensinas (MOUREAU *et al.*, 2008). Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico da proteína SLPI sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência, o que pode contribuir para a elaboração de novas terapêuticas e métodos preventivos para desordens infecciosas oportunistas, como a candidíase.

Até o presente momento, na literatura consultada, se encontra apenas um trabalho relacionando a atividade da proteína SLPI sobre os aspectos da biologia de *C. albicans* (TOMEI *et al.*, 1997). Deste modo, nossa proposta baseou-se na avaliação dos efeitos dessa proteína sobre os múltiplos

processos biológicos de *C. albicans*, como: (1) o crescimento celular e (2) os aspectos da biologia celular relacionados à virulência do microrganismo.

Apesar da extensa problemática originada pela mudança da etiologia regular da candidíase, de *C. albicans* para espécies intrinsecamente menos suscetíveis aos medicamentos convencionais, a *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente nas candidiases sobre superfícies mucosas (DIOS *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006), cutâneas (HAY, 1999) e nas candidemias nosocomiais (GURCUOGLU *et al.*, 2010). Por este motivo duas cepas de *C. albicans* foram escolhidas para compor este trabalho, uma cepa isolada de um paciente portador do HIV, com conhecida resistência ao fluconazol (PRI) e uma cepa oriunda do “American Type Culture Collection”, isolada de onicomiose e sem resistência conhecida ao fluconazol (ATCC24433).

A inibição do crescimento fúngico pode contribuir substancialmente para o controle de micoses, uma vez que a habilidade de limitar a proliferação de fungos de crescimento rápido como a *C. albicans* pode diminuir a instalação da doença em pacientes suscetíveis (WILLOKS *et al.*, 1991). O fluconazol demonstra uma farmacocinética linear, em dosagens que podem atingir de 50 a 800mg/dia, possui uma biodisponibilidade alta e baixa ligação a proteínas circulantes, o que proporciona uma disseminação facilitada e rápida pelos tecidos do paciente (HOPE *et al.*, 2008). Todos esses fatores associados à relativa segurança na administração desse agente fazem do fluconazol o agente sistêmico de primeira escolha para as infecções fúngicas superficiais, em particular as candidiases (NEVILLE *et al.*, 2004). A nistatina tem sido utilizada, por décadas, como terapia tópica padrão para a candidíase oral. Esse agente é um poliênico, não absorvido pelo trato gastro intestinal e age de forma similar a anfotericina B, se ligando ao ergosterol da membrana fúngica e alterando sua permeabilidade. A segurança em sua administração se baseia em sua não absorção intestinal, e os efeitos colaterais como náusea, vômitos, diarreia e dores abdominais podem ser encontrados apenas em doses excessivas para o tratamento da candidíase intestinal (PALLASH, 2002).

Pelo CLSI, os pontos de corte que determinam a resistência ou suscetibilidade das espécies de *Candida* ao fluconazol já estão bem determinados e estipulam que valores de MIC acima de 64 µg/ml e abaixo de 8

$\mu\text{g/ml}$ identificam uma cepa como resistente e suscetível a esse medicamento, respectivamente (NCCLS, 2002).

No presente estudo, a avaliação das concentrações mínimas inibitórias apresentou valores distintos para o fluconazol nas duas cepas de *C. albicans*, como esperado. Já para a SLPI os valores encontrados foram semelhantes para as duas cepas o que sugere que os mecanismos de resistência ao fluconazol que atuam na cepa PRI foram distintos do mecanismo relacionado à atividade antifúngica da proteína SLPI.

Os mecanismos de resistência de *Candida* spp. a medicamentos convencionais são distintos e incluem a redução no acúmulo intracelular, o efluxo da droga, a diminuição da permeabilidade da membrana e a alteração na ação da lanosterol 14- α -dimetilase e de outras enzimas da síntese do ergosterol (CANUTO & RODERO, 2002; PRASAD *et al.*, 2002). As candidiases originadas por cepas resistentes ao fluconazol ou multirresistentes podem estar associadas a condições ambientais permissivas, a pressão antifúngica seletiva e ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, que utilizam antifúngicos derivado de azóis continuamente (SANGLARD & ODDS, 2002). A maior e mais grave consequência clínica da resistência a antifúngicos, em particular aos azóis é a falha terapêutica, o que pode originar infecções refratárias e recorrentes, normalmente associadas a pacientes infectados pelo HIV (FICHTENBAUM *et al.*, 2000; SANGLARD, COSTE & FERRARI, 2009).

Os valores inibitórios da proteína SLPI, para ambas as cepas foram superiores a $200\mu\text{g/ml}$, entretanto, pelo fato de se tratar de uma proteína endógena e que esse valor de MIC ainda se mantém dentro da faixa de secreção fisiológica (SHUGARS, 1999), seu potencial terapêutico continua relevante. Por se tratar de uma proteína constitutiva, é provável que a administração exógena da SLPI cumpra o seu papel biológico sem nenhum efeito adverso para o paciente (TOMEI, 1998). De fato, a administração de uma forma recombinante da proteína SLPI sobre o epitélio bronco-pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística já foi relatado em estudo anterior (MCELVANEY *et al.*, 1992). Neste estudo, os pacientes realizaram a aspiração da forma recombinante da proteína na dose de 200mg/dia por uma semana, o que reduziu a atividade elástica e a expressão de interleucina 8 (IL-8) no

epitélio bronco-alveolar, proporcionando uma melhora significativa no quadro inflamatório de suas vias aéreas (MCELVANEY *et al.*, 1992).

Desta forma, considera-se que os valores inibitórios obtidos neste estudo, apesar de elevados, parecem bem promissores e reforçam a idéia da utilização da proteína SLPI como possível alternativa terapêutica.

Os valores relacionados à concentração mínima fungicida da SLPI se mostraram significativamente diferentes entre as leveduras testadas. A cepa PRI apresentou uma maior resistência à ação da proteína SLPI, em comparação a cepa ATCC 24433. Porém, esse efeito só pôde ser observado nas concentrações até 2,8 μM , pois a partir dessa concentração a atividade da proteína SLPI foi semelhante para ambas as cepas. Este resultado pode ser explicado pela alta atividade proteolítica encontrada na cepa PRI (PORTELA, 2006), uma vez que a SLPI, por sua característica protéica, pode ser potencialmente inativada pelas proteases secretadas por microrganismos, como foi demonstrado “*in vitro*” por SPOONER e colaboradores (1991), cujo estudo revelou a inativação dessa proteína por proteinases secretadas por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os valores estabelecidos de MIC e de MFC foram relativamente semelhantes, apontando para uma atividade primariamente fungicida da SLPI sobre o isolado PRI de *C. albicans*. Sob o ponto de vista clínico, os agentes antimicrobianos são definidos como microbicidas e microbiostáticos. São considerados microbicidas os agentes que destroem a integridade celular do microrganismo e microbiostáticos aqueles que impedem sua reprodução. Clinicamente, os critérios de seleção de uma droga antimicrobiana são universais, sendo que quando há opção de escolha a droga a ser usada deve ser prioritariamente microbicida (GREGORI *et al.*, 1996). Desta forma reforça-se o potencial medicamentoso da proteína SLPI por apresentar uma característica antimicrobiana primariamente fungicida.

O antifúngico nistatina foi selecionado para a avaliação do efeito combinado da proteína SLPI com medicamentos convencionais sobre o isolado PRI. Este medicamento foi escolhido por ser um antifúngico da classe dos poliênicos e apresentar um efeito primordialmente fungicida. O efeito antifúngico sobre as leveduras após tratamento com 8 $\mu\text{g/ml}$ de nistatina e 18

μM de SLPI foi de 25% e de 33% respectivamente. Quando esses medicamentos nessas concentrações foram administrados em conjunto o efeito antifúngico foi de 79% revelando uma atividade 21% superior ao esperado da ação das drogas combinadas.

Embora a maioria das infecções responda satisfatoriamente a monoterapia antimicrobiana, em determinadas circunstâncias, a combinação de drogas é vantajosa para a terapêutica (BARCHIESI *et al.*, 1999). No caso da candidíase, essas circunstâncias estão quase sempre associadas à resistência do microrganismo aos medicamentos convencionais, em particular ao fluconazol (BARCHIESI *et al.*, 1997). A principal vantagem da combinação de drogas reside na possibilidade de se atingir uma resposta clínica satisfatória com o uso de concentrações menores de cada droga, o que reduz virtualmente a toxicidade dos agentes (MUKHERJEE *et al.*, 2005), além de reduzir potencialmente o surgimento de cepas resistentes (LUPETTI *et al.*, 2003).

É certo que a resistência a antifúngicos é de especial importância quando se considera o número limitado de medicamentos comercialmente disponíveis (GULSHAN & MOYE-ROWLEY, 2007). Desta forma, qualquer nova terapia com o objetivo de contornar essa refratariedade como a utilização combinada de agentes antimicrobianos pode ser de extrema importância para a terapêutica, e conforme os resultados obtidos, a proteína SLPI aparentemente é um forte candidato para essa utilização.

Considerando a importância de inúmeros atributos celulares essenciais na virulência de *C. albicans*, analisamos a habilidade deste microrganismo em modificar sua morfologia de levedura para tubo germinativo (forma filamentosa). O crescimento de *C. albicans* sob a forma filamentosa é essencial para a instalação da doença fúngica nos planos mais profundos do epitélio do hospedeiro (KUMAMOTTO & VINCES, 2005), e tende a acontecer sob certas circunstâncias específicas como variação de temperatura, pH e a disponibilidade de Ca^{+2} (MANEU *et al.*, 2000). Por este motivo, a influência da proteína SLPI sobre o processo de diferenciação em *C. albicans* foi avaliada. Nossos resultados demonstraram que *C. albicans* apresentou 32% de inibição de formação de tubo germinativo na presença de 9,0 μM da proteína SLPI.

Apesar de várias abordagens bioquímicas e genéticas já terem sido aplicadas na investigação do processo de morfogênese de *C. albicans*, as

bases moleculares e os mecanismos envolvidos ainda são pouco entendidos (CASTILLA *et al.*, 1998). Acredita-se que essa transição de levedura para tubo germinativo seja induzida pela ativação da MAP quinase e pela via do AMP cíclico (LEBERER *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2003).

Outro mecanismo que pode estar envolvido na morfodiferenciação de *C. albicans* está relacionado com o processamento de proenzimas específicas (TOGNI *et al.*, 1996). Serina proteinases da superfamília da subtilisina são responsáveis pela ativação de precursores de proteínas secretadas em *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* (NEWPORT *et al.*, 2003). Nestas duas espécies, o protótipo dessas enzimas conversoras é a Kex2, uma serina protease citoplasmática que está envolvida na expressão de dois dos mais característicos fatores de virulência em *C. albicans*, a diferenciação morfológica e a secreção de proteases (NEWPORT *et al.*, 2003). Desta forma acredita-se que esta enzima esteja primordialmente relacionada à patogenicidade deste microrganismo (HUBE, 1998; NEWPORT *et al.*, 2003).

Os estudos de NEWPORT & AGABIAN (1993) mostraram que *C. albicans* nulas para Kex2 não eram capazes de produzir hifas ou tubos germinativos. As células se mantiveram viáveis, porém sem morfologia definida. As bases moleculares, para essas alterações morfológicas, não são totalmente compreendidas, mas acredita-se que alterações na parede celular estejam relacionadas a esse processo, visto que dois componentes dessa estrutura já foram identificados como requerentes da Kex2 em *C. albicans* (β -(1,3) glucanase e Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*)) (CHAMBERS *et al.*, 1993).

Desta forma, uma possível explicação para os resultados obtidos, que mostraram que 9,0 μ M de SLPI reduziram em 32% o processo de diferenciação morfológica de *C. albicans* seria a ação deste inibidor sobre a serina protease citoplasmática Kex 2. De fato, vale ressaltar que os nossos estudos demonstraram que a SLPI em baixas concentrações foi capaz de inibir significativamente a atividade proteolítica de serina proteases secretada por *C. albicans* "in vitro". Estes dados, associados às alterações ultraestruturais encontradas sob microscopia eletrônica de transmissão que sugerem que a SLPI foi capaz de permear o envelope celular das leveduras, corroboram com essa possibilidade.

A hidrofobicidade da superfície celular (CSH) tem sido apontada como um fator relacionado ao aumento da virulência de *C. albicans*, por estar relacionada tanto ao aumento de adesão das células fúngicas aos tecidos do hospedeiro e às proteínas da matriz extracelular (HAZEN & HAZEN, 1998;IMBERT *et al.*, 2002; BLANCO *et al.*, 2008), quanto à resistência dessas células à fagocitose por células polimorfonucleadas (HAZEN, 2004). Acredita-se que a CSH faça parte de um mecanismo específico para a ligação das células fúngicas aos tecidos do hospedeiro, e para a manutenção dessa ligação. Esta situação pode ocorrer através das proteínas hidrofóbicas na superfície do fungo que podem favorecer a ligação das células às proteínas da matriz extracelular. E também é possível que a CSH, facilite as interações específicas entre receptores e seus ligantes na superfície do fungo (SINGLETON *et al.*, 2001). Em 2004, HAZEN descreveu, pela primeira vez, uma proteína de superfície hidrofóbica constitutiva de *C. albicans* denominada CSH1p, expressa independente das condições ambientais, de cultivo e da morfologia celular. Recentemente, foi demonstrado um aumento significativo da CSH de *C. albicans* pela simples exposição à fumaça de cigarro, comprovando dessa forma, a natureza dinâmica da expressão de CSH sob condições variáveis (BALBONI *et al.*, 2009).

Dando continuidade à investigação sobre o efeito da proteína SLPI sobre os aspectos biológicos de *C. albicans*, foi realizada a avaliação da hidrofobicidade da superfície celular das células PRI, com o emprego do ciclohexano. Os resultados obtidos revelaram um aumento de 11,1% na CSH quando comparado ao sistema controle, fato que pode indicar maior adesão das leveduras a célula hospedeira e a proteínas da matriz extracelular. Entretanto, a abordagem metodológica deve ser considerada, pois pode ter contribuído para o resultado final e não representar a atuação dessa proteína sobre as células fúngicas em condições fisiológicas. É importante ponderar que o emprego de hidrocarbonetos na avaliação da adesão microbiana pode interferir na interação entre os ligantes e a superfície celular, por considerar, além das interações hidrofóbicas, outros parâmetros, como a força eletrostática, o que pode mascarar a hidrofobicidade da superfície celular. DOYLE (2000) sugere que o método de ângulo de contato é provavelmente o mais indicado, uma vez que este método fornece uma média do valor da

hidrofobicidade e não contabiliza as variações do ciclo celular ou de contribuições celulares individuais. Entretanto outros autores discordam dessa colocação e apontam para a metodologia da aderência à esferas de látex como o método mais eficiente (HAZEN & HAZEN, 1987)

É conhecido o fato de *C. albicans* possuir uma grande variedade de padrões moleculares associado à patógenos (PAMPs) em sua superfície, como quitina, glicana, manoproteínas e glicolipídeos. Esses PAMPs funcionam como ligantes para os receptores que reconhecem especificamente esses padrões, os PRRs, que normalmente estão presentes na superfície das células do hospedeiro (VILLAR & DONGARI-BAGTZOGLU, 2008; NETEA *et al.*, 2008). Além de moléculas associadas à superfície de células imunológicas, outras moléculas circulantes podem se ligar à superfície de patógenos e contribuir significativamente para o arsenal defensivo do hospedeiro. A lectina de ligação a manose (MBL) é uma proteína plasmática de origem hepática de extrema relevância para o sistema inato. Essa proteína pertence à família das colectinas e tem como característica principal a afinidade com resíduos de manose e de N-acetilglicosamina. O fato de o polissacarídeo manana ser o componente majoritário da parede celular fúngica favorece a ligação da MBL a microrganismos, podendo modular a resposta imunológica antifúngica, seja pela estimulação da opsonização e fagocitose, do “burst oxidativo” ou da síntese do fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelos monócitos (LEE *et al.*, 2003; GADJEVA *et al.*, 2004; ASBECK *et al.*, 2008).

Supondo que *C. albicans* expressem moléculas capazes de se ligar à proteína SLPI, as células PRI foram incubadas com 20 e 100 μ g/ml de SLPI por 90 minutos e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que, de maneira dose dependente, as células testadas foram fortemente reconhecidas pelo anticorpo anti-hSLPI, sugerindo a existência de sítios de ligação para a proteína na superfície de *C. albicans*, o que pode contribuir substancialmente na construção de modelos alternativos para o manejo das infecções originadas por este organismo.

Levando em consideração a relação entre fungo e a célula hospedeira, e que os açúcares presentes em glicoconjugados da parede celular possuem papel importante nessa interação (PIETRELLA *et al.*, 2006), avaliamos o efeito da SLPI sobre a expressão de manoproteínas na superfície celular de *C.*

albicans. Empregamos neste estudo a Concanavalina-A (Con-A) devido a sua habilidade de ligação, principalmente a resíduos de manose. Para isso, as leveduras PRI foram tratadas com 9,0 e 80 μM da proteína SLPI por 6 horas, e os resultados obtidos revelaram que o tratamento com 9,0 μM de SLPI não foi suficiente para alterar a disponibilidade de manoproteínas na parede celular. Entretanto o tratamento com 80 μM reduziu em 20% a ligação da concanavalina A na superfície das células, apontando para uma possível redução na expressão de manoproteínas ou para o bloqueio dos resíduos de manose disponíveis para a ligação com a lectina.

De fato, a Con-A é empregada como marcador viável para avaliar a expressão de mananas e manoproteínas na superfície de microorganismos (d' AVILA-LEVI *et al.*, 2004). Essas estruturas possuem papel essencial não só na manutenção da integridade estrutural da célula, mas também no processo de adesão às células do hospedeiro (WAROLIN *et al.*, 2005; CHAFFIN, 2008). Dessa forma, a possível redução na expressão de manoproteínas em *C. albicans*, como sugerida pelo tratamento com 80 μM de SLPI indica um papel modulador importante dessa proteína na adesão da levedura ao epitélio do hospedeiro.

A formação de biofilmes por microorganismos sobre superfícies inertes é um fenômeno que tem sido extensivamente estudado na última década por estar diretamente relacionado à patogenicidade desses organismos (THEIN *et al.*, 2007). O biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de leveduras, hifas e pseudohifas que apresenta uma camada basal de leveduras ancorando todo essa massa a uma superfície inerte (BAILLIE & DOUGLAS, 2000). A formação de biofilme por espécies de *Candida* acarreta repercussões clínicas de extrema importância devido ao aumento da resistência à terapia antifúngica, provavelmente pela dificuldade física de difusão do medicamento, e também pela habilidade das células do interior do biofilme em resistir aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro (RAMAGE *et al.*, 2005). A formação de biofilme sobre dispositivos médicos pode impactar negativamente a sobrevivência do paciente por causar falha no funcionamento do dispositivo, bem como por servir como reservatório do microorganismo e perpetuando a infecção (KOJIC & DAROUICHE, 2004). Deste modo qualquer nova metodologia para o controle da formação ou manutenção de biofilmes é de grande relevância.

Para avaliar a influência da SLPI sobre a formação de biofilme por *C. albicans*, foram utilizados dois sistemas distintos. As células foram pré tratadas com 80 µM da proteína SLPI por seis horas e então submetidas à formação de biofilme. Após 48 horas de incubação não foi observada alteração significativa na formação de biofilme quando comparado ao controle. Adicionalmente, com o intuito de verificar o efeito da SLPI durante a formação de biofilme, 2,5 µM desta proteína foram adicionados ao sistema. Neste caso, foi observada uma redução de 38% na formação de biofilme por *C. albicans*. Da mesma forma, baseado nos resultados apresentados anteriormente, sugere-se que o perfil inibitório da proteína SLPI, ao agir sobre a serina protease secretada durante o processo de desenvolvimento do biofilme foi capaz de alterar significativamente a formação de biofilme por *C. albicans*. Os resultados apresentados corroboram com os estudos de PORTELA (2006) onde foi determinado que inibidores enzimáticos como o fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e a aprotinina induzem a formação de um biofilme de *C. albicans* com células fracamente aderidas quando comparado ao sistema controle.

Através de microscopia eletrônica de transmissão foi possível avaliar o efeito da proteína SLPI sobre a ultraestrutura de *C. albicans*. As leveduras tratadas com 9,0 µM de SLPI apresentaram esvaziamento citoplasmático e a presença de um número maior de células mortas quando comparado as leveduras controle. O tratamento das leveduras com 80 µM de SLPI revelou, além do esvaziamento citoplasmático, a presença de estruturas desorganizadas, próprias da membrana plasmática no interior do citoplasma. Estes resultados sugerem que a proteína SLPI foi capaz de ultrapassar o envelope celular e interagir com a membrana citoplasmática ou interferir com a síntese de seus componentes. Nossos resultados se assemelham os resultados obtidos por GUERRA (2009) que observaram alterações estruturais na membrana plasmática após o tratamento de *Cryptococcus neoformans* com inibidores da síntese do ergosterol.

Em resumo, os dados obtidos nessa dissertação apontam para a possível administração da proteína SLPI como uma alternativa viável no controle e no tratamento das infecções originadas por *Candida albicans*, uma vez que este inibidor demonstrou significativa atividade sobre alguns dos fatores de virulência essenciais para a patogenicidade deste fungo, como a

morfodiferenciação celular, a atividade das proteases secretadas, a expressão de adesinas e a formação de biofilme. Além disso, os resultados demonstram um efeito fungicida satisfatório em concentrações fisiológicas e uma ação sinérgica à nistatina. Esse sinergismo reforça a idéia da utilização desta proteína como potencial agente antifúngico de baixa toxicidade, uma vez que se trata de uma proteína endógena, virtualmente capaz de amplificar o efeito de antifúngicos convencionais e reduzir sua toxicidade, por possibilitar a utilização desses medicamentos em concentrações menores.

7- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Ambas as cepas de *C. albicans* utilizadas neste estudo são sensíveis ao tratamento com a proteína SLPI;
- A proteína SLPI possui uma atividade antifúngica primariamente fungicida;
- A combinação *in vitro* entre a proteína SLPI e o antifúngico nistatina apresenta importante efeito sinérgico;
- A SLPI inibiu consideravelmente a atividade proteolítica de serina proteinases secretadas por *C. albicans*;
- O tratamento de *C. albicans* com 80 μ M de SLPI aumenta a hidrofobicidade da superfície celular dessas células;
- A proteína SLPI inibe o processo de morfodiferenciação de *C. albicans*;
- A proteína SLPI é capaz de reduzir a formação de biofilme por *C. albicans*;
- A presença de estruturas membranares no citoplasma das células tratadas com SLPI sugere que a proteína foi capaz de permear o envelope celular das leveduras;
- O tratamento com SLPI modula negativamente a expressão de manoproteínas na superfície de *C. albicans*;
- A superfície de *C. albicans* apresenta moléculas ligantes para a proteína SLPI;

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOV, N.; MATSOUPOULOS, N.; JEONG, J.M.; NARES, S.; ASCROFT, G. & WAHL, S.M. **Aberrant Mucosal wound repair in the absense of secretory leucocyte protease inhibitor.** Thromb Haemost., 92, 288-297, 2004.

ASBECK, E.C.V.; HOEPELMAN, A.I.M.; SCHARRINGA, J.; HERPERS, B.L. et al. **Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells.** BMC microbial.,8, 229-239, 2008.

ASHCROFT, G.S.; LEI, K.; JIN, W.; LONGENECKER, G.; KULKARNI, A.B.; GREENWELL-WILD, T.; HALE-DONZE, H.; MCGRADY, G.; SONG, X.Y. & WAHL, S.M. **Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing.** Nat Med., 10(6), 1147-1153, 2000.

BACCAGLINI, L.; ATKINSON, J.C.; PATTON, L.L.; et al. **Management of oral lesions in HIV-positive patients.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., 103(suppl 1), S50.e1-S50.e23, 2007.

BAILLIE, G.S. & DOUGLAS, L.J. **Matrix Polymers of *Candida albicans* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents.** J Antimicro Chemother, 46, 397-403, 2000

BALBONI, F.B.; BARP, D.; IZIDORO, A.C.S.A.; SAMARANAYAKE, L.P. et al. **Enhancement of *Candida albicans* Virulence After Exposition to Cigarette Mainstream Smoke.** Mycopathologia., 168, 227-235, 2009.

BAQUI, A.A.M.A.; MEILLER, T.F. & FALKLER, W.A. **Enhanced Secretory Leucocyte Protease inhibitor in Human Immunodeficiency Virus Type-1 infected patients.** Clin Diagn Lab Immunol., 6(6), 808-811, 1999

BARBOSA, F.M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R.A. et al. **Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole.** FEMS Microbiol Lett., 274, 279–286, 2009.

BARANGER, K.; ZANI, M.L.; CHANDENIER, J.; DALLET-CHOISY, S. & MOREAU, T. **The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pré-elafin) do not depend on its protease inhibitory function.** FEBS., 275, 2008-2020, 2008.

BARCHIESI, F.; FRANCESCO, L. F. & SCALISE, G. **In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles.** Antimicrob Agen Chem, 41(8), 181-1814, 1997.

BARCHIESI, F.; GALLO, D.; CASELLI, F. ; FRANCESCO, L. F.; ARZENI, D. GIACOMETTI, A. & SCALISE G. **In vitro interactions of itraconazole with flucytosina against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*.** J Antimicrob Chem, 44, 65-70, 1999.

BERNARDIS, F.; AGATENSI, L.; ROSS, I.K.; EMERSON, G.W.; LORENZINI, R.; SULLIVAN, P.A. & CASSONE. A. **Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis.** J Infect Dis., 161(6), 1276-1283, 1990.

BLANCO, M.T.; SACRISTAN, B.; BATETA, A.; FERNANDES-CALDERON, M.C. et al. **Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.** Diagn Microbiol Infect Dis., 60, 129-131, 2008.

BRAGA-SILVA, L.A.; SANTOS, A.L.S.; PORTELA, M.B. et al. **Effect of Suramin on the human pathogen *Candida albicans*: implications on the fungal development and virulence.** FEMS Immunol Med Microbiol., 51, 399-406, 2007.

CALDERONE, R. **Taxonomy and biology of *Candida*.** In: Calderone, R. (ed), *Candida and Candidiasis*. 307-325. ASM Press, Washington DC, 2002

CANUTO, M.M. & RODERO, F.G. **Antifungal drug resistance to azole and polyenes.** Lancet Infect Dis., 2, 550-563, 2002.

CASANOVA, M.; CERVERA, A.M.; GOZALBO, D. & MARTÍNEZ, J.P. **Hemin Induces Germ Tube Formation in *Candida albicans*.** Infect Immun., 54(10), 4360-4364, 1997.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T. & AGATENS, I. L. **Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis.** J Infect Dis, 156(5), 777-783, 1987.

CASTILLA, R.; PASSERON, S. & CANTORE, M.L. **N-acetyl-D-glucosamine induces germination in *Candida albicans* through a mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase.** Cell Signal., 10(10), 713-719, 1998

CAVARRA, E.; LUCATTELLI, M.; GAMBELLI, F. et al. **Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 281, 412-417, 2001.

CEPEDA, L.A.G.; SALOBREÑA, A.C.; ORTEGA, K.L.; MORA, N.A; JIMÉNEZ, Y. **Oral lesions and immune reconstitution syndrome in HIV+/AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. Epidemiological evidence.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal.;13(2):E85-93, 2008.

CHAFFIN, W.L.J. ***Candida albicans* Cell Wall Proteins**. Microbiol Mol Biol Rev., 72(3), 495-544, 2008.

CHAFFIN, W.L.J.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M. et al. **Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans* : Identification, Function, and Expression**. Microbiol Mol Biol Rev., 62(1), 130-180, 1998.

CHALLACOMBE, S.; COOGAN, M.; WILLIAN, D. et al. **Overview and Research agenda Arising from the 5 world workshop on oral Health and disease**. Adv Dent Res., 19, 5-9, 2006.

CHAMBERS, R.S.; BROUGHTON, M.J.; CANNON, R.; CARNE, A. et al. **An α -D-(1,3) glucanase of *Candida albicans* : purification of the enzyme and molecular cloning of the gene**. J Gen Microbiol., 139, 325-334, 1993.

CHATTOPADHYAY, A.; GRAY, L.R.; PATTON, L.L. et al. **Salivary Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Persons**. Infect Immun., 72(4), 1956-1963, 2004.

CHEARSKUL, P.; RONGKAVILIT, C., AL-TATARI, H. & ASMAR, B. **New antiretroviral drugs in clinical use**. Indian J Pediatr., 73, 335-341, 2006.

CHEN, Y.C., WU, C.C., CHUNG, W.L. & LEE, F.J. **Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation**. Microbiology. 148, 3743-3754, 2002.

COLE, A.M.; DEWAN, P. & GANZ, T. **Innate Antimicrobial Activity of Nasal Secretions**. Infect Immun., 67(7), 3267-3275, 1999

COSTA, E.M.; SANTOS, A.L.; CARDOSO, A.S.; PORTELA, M.B.; ABREU, C.M.; ALVIANO, C.S.; HAGLER, A.N. & SOARES, R.M. **Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of**

Candida albicans in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol., 38(2), 173-180, 2003

COSTA, C.R.; COHEN, A.J.; FERNANDES, O.F.L.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H. & SILVA, M.R.R. **Asymptomatic Oral Carriage of Candida species in HIV-infected patients in the Highly active antiretroviral therapy era.** Rev Inst Med Trop., 48(5), 257-261, 2006.

CUTLER, J. E. **Putative virulence factors of *Candida albicans*** Annu Rev Microbiol.,45, 187-218, 1991.

d'AVILA-LEVY, C.M.; ARAUJO, F.M.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. et al. **Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanossomatids: taxonomic implications.** FEMS Microbiol Lett., 231, 171-176, 2004.

DIOS, P.D.; OCAMPO, A.; MIRALLES, C.; OTERO, I.; IGLESIAS, I. & RAYO, N. **Frequency of oropharyngeal candidiasis in hiv-infected patients on protease inhibitor therapy.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., 87, 437-441, 1999.

DOUMAS, S.; KOLOKOTRONIS, A. & STEFANOPOULOS, P. **Anti-Inflammatory and Antimicrobial Roles of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor.** Infect Immun., 73(3), 1271-1274, 2005.

DOYLE, R.J. **Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection.** Microbes Infect., 2, 391–400, 2000

DRANGINIS, A.M.; RAUCEU, J.M.; CORONADO, J.E. & LIPKE, P.N. **A biochemical guide to yeast adhesins: Glycoproteins for social and antisocial occasions.** Microbiol Mol Biol Rev., 71(2), 282-294, 2007.

EINSBERG, S.P.; HALE, K.K.; HEIMFAL, P. & THOMPSON, R.C. **Location of Protease Inhibitory region of Secretory leucocyte Protease Inhibitor.** J Biol Chem., 256(14), 7976-7981, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. **Novel Antifungal Agents, Targets or Therapeutic Strategies for the Treatment of Invasive Fungal Diseases: A Review of the Literature (2005-2009).** Rev Iberoam Micol., 26(1), 15-22, 2009.

FALKENSAMMER, B.; PILZ, G.; BEKTIC, J.; IMWIDHAYA, P.; JÖHRER, K.; SPETH, C.; LASS-FLÖRL, C.; DIERICH, M.P. & WÜRZNER, R. **Absent reduction by HIV protease inhibitors of *Candida albicans* adhesion to endothelial cells.** Mycoses., 50, 172–177, 2007.

FICHTENBAUM, C.J.; KOLETAR, S.; YIANNOUTSOS, C.; HOLLAND, F. et al. **Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection.** Clin Infect Dis., 30(5), 749-56, 2000.

FIDEL, P.L. **Candida-Host Interactions in HIV Disease: Relationships in Oropharyngeal Candidiasis.** Adv Dent Res., 19, 80-84, 2006.

FOX, P.C.; WOLF, F. A., YEH, K. et al. **Salivary inhibition of HIV 1 infectivity: Functional properties and distribution in men women and children.** J Am Dent Assoc., 118, 709-711, 1989.

FRANKEN, C.; MEIJER, C.J.L.M. & DIJKMAN, J.H. **Tissue distribution of Antileukoprotease and Lysozyme in Humans.** J Histochem Cytochem., 37(4), 493-498, 1989.

GALE, C.A., BENDEL, C.M., MCCLELLAN, M., HAUSER, M., BECKER, J.M., BERMAN, J. & HOSTETTER, M.K. **Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1.** Science., 279(5355), 1355-8. 1998.

GADJEVA, M.; TAKAHASHI, K. & THHIEL, S. **Mannan-binding lectin – a soluble pattern recognition molecule.** Mol Immunol., 41, 113-121, 2004.

GAUWERKY, K., BORELLI, C. & KORTING, H.C. **Targeting virulence: a new paradigm for antifungals.** Drug Discov Today., 14(3-4), 214-222, 2009.

GLEE, P.M.; SUNDSTORM, P. & HAZEN, K . **Expression of Surface Hydrophobic Proteins by *Candida albicans* in vivo.** Infect Immun., 63(4), 1373-1379, 1995.

GREGORI, C.; CAMPOS, A.C.; HOMEM, N.G.M. & DEBONI, M.C.Z. **Suporte medicamentoso em cirurgia buco dento alveolar** In: Cirurgia buco-dento-alveolar, 33-60. Sarvier, São Paulo, Brasil, 1996

GUARRO, J. **Comments on recent human infectyions caused by ascomycetes.** Med Mycol., 36(5), 349-350, 1998.

GUERRA, Caroline Rezende. **Avaliação da atividade de inibidores da síntese do ergosterol em isolados de *Cryptococcus neoformans*.** Orientador: Sonia Rozental. Rio de Janeiro: UFRJ, 2009. 71p. Dissertação (Mestrado em Biofísica).

GULSHAM, K. & MOYE-ROWLEY, W.S. **Multidrug Resistance in Fungi.**Eucaryotic Cell 2007., 6(11), 1933-1942, 2007.

GÜRCÜOĞLU, E.; ENER, B.; AKALIN, H.; SINIRTAS, M. et al. **Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study.** Epidemiol Infect., 8, 1-8, 2010.

HAWSER, S.P. & DOUGLAS, L.J. **Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro.** Antimicrob Agents Chemother, 39:2128-2131, 1995.

HAY, R.J. **The management of superficial candidiasis.** J Am Acad Dermatol., 40, S35-42, 1999.

HAZEN, K.C. & HAZEN, B.W. **A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations.** J Microbiol Methods., 6, 289-299, 1987.

HAZEN, K.C. & HAZEN, B.W. **Temperature-Modulated Physiological Characteristics of *Candida albicans*.** Microbiol Immunol., 31(6), 497-508, 1987.

HAZEN, K.C. & HAZEN, B.W. **Dynamic Expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*.** Infect Immun., 56(9), 2521-2525, 1998.

HAZEN, K.C. & HAZEN, B.W. **Hydrophobic Surface Protein Masking by the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*.** Infect Immun., 60(4), 1499-1508, 1992.

HAZEN KC. **Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (CSH1p) and Surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*.** Curr Microbiol., 48, 447-451, 2004.

HIEMSTRA, P.S.; MAASSEN, R.J.; STOLK, J.; HEINZEL-WIELAND, R.; STEFFENS, G.J. & DIJKMAN, J.H. **Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation.** Biochem Soc Trans., 30(2), 116-120, 2002.

HIEMSTRA, P.S.; MAASSEN, R.J.; STOLK, J. et al. **Antibacterial Activity of Antileukoprotease.** Infect Immun., 64 (11), 4520-4524, 1996.

HOPE, W.W.; BILLAUD, E.M.; LESTNER, J. & DENNING, D.W. **Therapeutic Drug Monitoring for Triazoles.** Curr Opin Infect Dis., 21, 580-586, 2008.

HUBE B. **Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections.** Rev Iberoam Micol., 15, 65-68, 1998.

HUBE, B. **Extracellular Proteases of Human Pathogenic Fungi.** Contrib Microbiol., 5, 126-137, 2000.

IMBERT-BERNARD, C., VALENTIN, A., REYNES, J., MALLIÉ, M. & BASTIDE, J.M. **Relationship between fluconazole sensitivity of *Candida albicans* isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and CD4+ lymphocyte count.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 13(9), 711-716, 1994.

IMBERT, C.; RODIER, M.H.; DANIAULT, G. et al. **Influence of sub-inhibitory concentrations of conventional antifungals on metabolism of *Candida albicans* and on its adherence to polystyrene and extracellularmatrix proteins.** Med Mycol., 123–12, 2002.

JAHAGIRDAR, B.N. & MORRISON, V.A. **Emerging fungal pathogens in patients with haematologic malignancies and marrow/stem cell transplant recipients.** Semin Respir Infect., 17(2), 113-120, 2002.

JAIN, P.; AKULA, I. & EDLIND, T. **Cyclic AMP signaling pathways modulates susceptibility of *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae* to antifungal azoles and other sterol biosynthesis inhibitors.** Antimicrob Agents Chemother., 47(10), 3195-31201, 2003.

JANA, N.K.; GRAY, R.L. & SHUGARS, D.C. **Human Immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in Innate Mucosal Immunity.** J Virol., 79(10), 6432-6440, 2005.

JIN, F.Y.; NATHAN, C.; RADZIOCH, D. & DING, A. **Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Macrophage product induced by and antagonistic to bacterial Lipopolysaccharide.** Cell., 88, 417-426, 1997.

KAMBOJ, R.C.; PAL, S.; RAGHAV, N. & SINGH, H. **A selective colorimetric assay for cathepsin L using Z-Phe-Arg-4-methoxy-beta-naphthylamide.** Biochimie., 75(10), 873-878, 1993.

KAMINISHI, H.; MIHASHI, H.; TAMAKI, T. et al. **Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* protease.** Infect Immun., 63(3), 984-988, 1995.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*.** Acta Biochim Pol., 56(2), 211-224. 2009.

KLINE, M. W. Pediatrics. **Oral Manifestations of Pediatric Human Immunodeficiency Virus Infection: A Review of the Literature,** 97(3), 380-388, 1996.

KOBAYASHI, S.D. & CUTLER, J.E. ***Candida albicans* Hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role?** Trends Microbiol., 6, 92-94, 1998.

KOJIC, E.M. & DAROUICHE, R.O. 2004. ***Candida* infections of medical devices.** Clin. Microbiol. Rev., 17, 255–267, 2004.

KRAMPS, J.A.; FRAKEN, C.; MEIJER, C.J.L.M. & DIJKMAN, J.H. **Tissue ditribution of Antileukoprotease and lysozyme in humans.** J Histochem Cytochem., 37(4), 493-498, 1989.

KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T; SANGLARD, D.; MERKER, R.; SCHRÖDER, M.; HOF, H. & NICHTERLEIN, T. **Germ Tubes and Proteinase Activity Contribute to Virulence of *Candida albicans* in Murine Peritonitis.** Infect Immun., 67(12), 6637-6642, 1999.

KUMAMOTO, C.A. & VINCES, M.D. **Contributions of hiphae and hiphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence.** Cell Microbiol., 7(11), 1546-1554, 2005.

KUMAR, C.P.G.; KUMAR, S.S.J. & MENNON, T. **Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients.** Mycopathologia., 161, 213–218, 2006.

LAI, J.Y.; BORSON, N.D.; STRAUSBAUCH, A. & PITTELKOW, M.R. **Mitosis increases levels of secretory leucocyte protease inhibitor in keratinocytes.** Biochem Biophys Res Commun., 316, 407-410, 2004.

LANE, S., ZHOU, S., PAN, T., DAÍ, Q. & LIU, H. **The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1.** Mol Cell Biol., 21(19), 6418-6428 2001.

LASCALA, N.T.; MOUSSALLI, N.H. & DUARTE, C.S. **Acute alteration: necrotizing ulcerative gingivitis herpes: gingivo stomatitis: gingival and periodontal abscess: AIDS;** In: Lascala & Moussalli. *Compêndio terapêutico periodontal.* São Paulo, Artes Médicas, 1995. p.135-55.

LEBERER, E.; HARCUS, D.; DIGNARD, D.; JOHNSON, L.; et al. **RAS links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signaling pathways in pathogenic fungi *Candida albicans*.** Mol Microbiol., 42(3), 673-687, 2001.

LEE, S.N.; ZHENG, N.Y.; CLAVIJO, M. & NUSSENZWEIG, C. **Normal Host Defense during Systemic Candidiasis in Mannose Receptor-Deficient Mice.** Infect Immun., 71(1), 437-445, 2003.

LEHRER, R.L.; SZKLAREK, D.; GANZ, T. & SELSTED, M.E. **Correlation of Binding of Rabbit Granulocyte Peptides to *Candida albicans* with Candidacidal Activity.** Infect Immun., 49(1), 207-211, 1985.

LIN, A.L.; JOHNSON, D.A.; STEPHAN, K.T. & YEH, C.K. **Salivary Secretory Leucocyte protease Inhibitor Increases in HIV infection.** J Oral Pathol Med., 33, 410-416, 2004.

LUPETTI, A.; NIBBERING, P.H.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M. & DANESI, R. **Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations.** Trends Mol Med., 9(6), 269-276, 2003

MANN, P.A.; MCNICHOLAS, P.M.; CHAU, A.S.; PATEL, R.; MENDRICK, C. et al. **Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species.** Antimicrob Agents Chemother., 53(12), 5026-5034, 2009.

MANEU, V.; ROING, P. & GOZALBO, D. **Complementation of *Sacharomyces cerevisiae* mutations in genes involved in translation and protein folding (EFBI and SSB1) with *Candida albicans* cloned genes.** Res Microb., 151(9) 739-746, 2000.

MASUR, H., ROSEN, P.P. & ARMSTRONG, D. **Pulmonary disease caused by *Candida* species.** Am J Med., 63(6), 914-925, 1977.

MCELVANEY, NG.; NAKAMURA, H.; BIRRER, P.; HEBERT, C.A.; WONG, W.L.; ALPHONSO, M.; BAKER, J.B.; CATALANO, M.A. & CRYSTAL, R.G. **Modulation of airway inflammation in Cystic Fibrosis.** J Clin Invest., 90, 1296-1301, 1992.

MCNEELY, T.B.; DEALY, M.; DRIPPS, D.J.; ORENSTEIN, J.M.; EISENBERG, S.P. & WAHL, S.M. **Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Human Saliva Protein Exhibiting Anti-Human Immunodeficiency Virus 1 Activity In Vitro.** J Clin Invest., 96, 456-464, 1995.

MELO, N.R.; VILELLA, M.M.S.; JUNIOR, J.J.; et al. **Hiv-1 Anti-Retroviral Drug Effect On The *C. albicans* Hyphal Growth Rate By A Bio-Cell Tracer System.** Braz J Microbiol., 37, 225-229, 2006.

MELO, N.R.; TAGUCHI, H.; JORGE, J.; PEDRO, R.J.; ALMEIDA, O.P.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. **Oral *Candida* Flora from**

Brazilian Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. Mem Inst Oswaldo Cruz., 99(4), 425-431, 2004.

MIGLIORATI, C.A.; BIRMAN, E.G. & CURY, A.E. **Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., 98(3), 301-310, 2004.

MORSCHHAUSER, J.; VIRKOLA, R.; KORHINENTK, et al. **Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*.** FEMS Microbiol., 153(2), 349-355, 1997.

MOUREAU, T.; BARANGER, K.; DADÉ, S.; DALLET-CHOISY, S.; GUYOT, N. & ZANI, M.L. **Multifaceted roles of human elafin and secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family.** Biochimie., (90), 284-295, 2008.

MOUTSOPOULOS, N.M.; GREENWHEEL-WILD, T. & WALH, S.M. **Differential Mucosal Suscetibility in HIV-1 Transmission and Infection.** Adv Dent Res., 19, 52-56, 2006.

MOUTSOPOULOS, N.M.; NARES, S.; NIKITAKIS, N.; RANGEL, Z.; WEN, J.; MUNSON, P.; SAUK, J. & WAHL, S.M. **Tonsil Epithelial factors may influence oropharyngeal Human Immunodeficiency Virus Transmission.** Am J Pathol., 171, 571-579, 2007.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A. & GHANNOUM, M. **A Combination Treatment of Invasive Fungal Infections.** Clin Microbiol rev, 18(1), 163-194, 2005.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J. & HUBE, B. ***Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis.** Microbiol Mol Biol Rev., 67(3), 400-428, 2003.

NAKAMURA, A.; MORI, Y.; HAGIWARA, K.; SUZUKI, T.; SAKAKIBARA, T.; KIKUSHI, T.; IGARASHI, T.; EBINA, M.; ABE, T.; MIYAZAKI, J.; TAKAI, T. & NUKIWA, T. **Increased Susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in Secretary Leukoprotease Inhibitor (SLPI)-deficient mice.** J Exp Med., 197(5), 669-674, 2003.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras;** Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J. et al. **An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system.** Natur Rev Microbiol., 6, 67-78, 2008.

NEVILLE BW, DAMN DD & ALLEN CM. **Doenças fúngicas e Protozoárias** In: Patologia Oral e Maxilofacial. Guanabara Koogan., Rio de Janeiro, 183-191, 2004.

NEWPORT, G. & AGABIAN, N. **KEX2 Influences *Candida albicans* Proteinase Secretion and Hyphal Formation.** J Biol Chem., 272(46), 28954-28961, 1997.

NEWPORT, G.; KUO, A.; FLATTERY, A.; GILL, C. et al. **Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*.** J Biol Chem., 278(3), 1713-1720, 2003.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L.; RODRIGUES, E.G. & TRAVASSOS, L.R. **The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall.** Microbes Infec., 7, 789-798, 2005.

ODDS, F.C.; GOW, N.A.; BROWN, A.J. **Fungal virulence studies come of age.** Genome Biol., 2(3), 1009. 2001

ODDS, F.C. **Should resistance to azole antifungals in vitro be interpreted as predicting clinical non-response?** Drug Resist Updat.,1(1), 11-15, 1998

ODDS, F.C. **Pathogenesis of Candida Infections.** J Am Acad Dermatol., 31(3), s2-s5, 1994.

OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GORLICH, M.; KORTING, H.C. et al. **Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients.** J Clin Microbiol., 33(10), 2543-2549, 1995.

PALLASH, T. P. **Antifungal and Antiviral Chemotherapy.** Periodontology.2000, 28, 240-255, 2002

PATTON, L.L.; MCKAIG, R.; STRAUSS, R.; ROGERS, D. & ERON JR, J.J. **Changing prevalence of oral manifestation of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol., 89(3), 299-304, 2000.

PESHEL, A.; & SAHL, H.G. **The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance.** Nat Rev Microbiol., 4, 529-536, 2006.

PETRIKKOS, G. & SKIADA, A. **Recent Advances in Antifungal Chemoterapy.** Int J Antimicrob Agen., 30, 107-108, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** Clin Microbiol Rev. 20(1), 133-163, 2007.

PHAN, Q.T., BELANGER, P.H. & FILLER, S.G. Infect Immun., 68)6(, 3485-3490, 2000.

PICHOVÁ, I., PAVLÍCKOVÁ, L., DOSTÁL, J., DOLEJSÍ, E., HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O., WEBER, J., RUML, T. & SOUCEK, M. **Secreted**

aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem., 268(9), 2669-2677, 2001.

PIETRELLA, D.; BISTONI, G.; CORBUCCI, C.; PERITO, S. & VECCHIARELLI A. ***Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells.** Cell Microbiol, 8(4), 602-612, 2006.

PLAYFORD, E.G.; EGGIMANN, P. & CALANDRA, T. **Antifungals in the ICU.** Curr Opin Infect Dis., 21, 610-619, 2008.

PORTELA, M. B.; SOUZA, I. P. R.; COSTA, E. M. M. B. et al. **Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil.** J Clin Microbiol., 42(12), 5925-7, 2004.

PORTELA, Maristela Barbosa. **Estudo de proteínas funcionais de *Cândida* spp. Isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.** Orientadores: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza e Rosângela Maria de Araújo Soares. Rio de Janeiro: UFRJ, 2006. 176p. Tese (Doutorado em Microbiologia).

PRASAD, R.; PANWAR, S.L.; SMRITI, I. **Drug Resistance in Yeast: An Emerging Scenario.** Adv Microb Physiol., 46, 155-201, 2002.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P. & LOPES-RIBOT, J.L. ***Candida* biofilms: an Update.** Eukariotic Cell., 4(4), 633-638, 2005.

RAMOS-GOMEZ, F. J.; PETRU, A.; HILTON, J. F. et al. **Oral manifestations and dental status in paediatric HIV infection.** Int J Paediatr Dent., 10(1), 3-11, 2000.

ROCHA, L.A.; VARGAS, .PA.; SILVA, L.F.F. et al. **Expression of secretory leukocyte proteinase inhibitor in the submandibular glands of AIDS patients.** Oral Dis., 14, 82-88, 2008.

RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M.V.; VALENTIN, E. & SENTANDREU, R.; **Molecular Organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity.** FEMS Yeast Res., 6, 14-29, 2006.

SALLENAVE, J.M.; TA HAR, M.; COX, G.; CHIGNARD, M. & GAULDIE, J. **Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils.** J Leukoc Biol., 61, 695-702, 1997.

SANGLARD, D. & ODDS, F.C. **Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences.** Lancet Infect Dis., 2, 73-85, 2002.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. **Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation.** FEMS Yeast Res., 9(7), 1029-1050, 2009

SCHALLER, M.; HUBE, B.; OLLERT, W. et al. **In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients.** J Invest Dermatol., 112 (3), 383-386, 1999.

SHUGARS, D.C.; ALEXANDER, A.L.; FU, K. & FREEL, S.A. **Endogenous Salivary Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus.** Arch Oral Biol., 44, 445-453, 1998.

SHUGARS, D.C. **Endogenous Mucosal Antiviral factors of Oral Cavity.** J Infect Dis., 179(s3), S431-435, 1999.

SHUGARS, D.C.; WATKINS, C.A.; & COWEN, H.J. **Salivary Concentration of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, an Antimicrobial Protein, Is Decreased with Advanced Age.** *Gerontol.*, 47, 246–253, 2001.

SINGLETON, D.R.; MASUOKA, J. & HAZEN, K.C. **Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity.** *J Bacteriol.*, 183(12), 3582-3588, 2001.

SOLL, D.R. ***Candida* comensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity.** *Acta trop.*, 81(2), 101-110, 2002.

SORENSEN, O.E.; THAPA, D.R.; ROUPÉ, K.M. VALORE, E.V.; SJÖBRING, U.; ROBERTS, A.A.; SCHMIDTCHEN, A. & GANZ, T. **Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor.** *J Clin Invest.*, 116, 1878-1885, 2006.

SPOONER, M.; NICK, H.P. & SCHNEBLU, H.P. **Different susceptibility of elastase inhibitors to inactivation by proteinases from *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Biol Chem Hoppe-Seyler.*, 372, 963-970, 1991.

STETLER, G.; BREWER, M.T. & THOMPSON, R.C. **Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases.** *Nucleic Acids Res.*, 14(20), 7883-7896, 1986.

SUDBERY, P.; GOW, N. & BERMAN, J. **The distinct morphogenic states of *Candida albicans*.** *Trends Microbiol.*, 12(7), 317-324, 2004.

TAPPUNI, A.R.; GARRY, J. P. & FLEMING, G.J.P. **The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIV-infected patients: A UK study.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 92, 623-628, 2001.

THEIN, Z.M., YUTHIKA, H., SAMARANAYAKE, L. & SAMARANAYAKE, P. **In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions.** Arch Oral Biol., 52, 761-767, 2007.

THOMPSON, G.R.; CADENA, J. & PATTERSON, T.F. **Overview of Antifungal Agents.** Clin Chest Med., 30, 203-215, 2009.

THOMPSON, R.C. & OHLSSON, K. **Isolation, properties, and complete aminoacid sequence of human secretory leucocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leucocyte elastase.** Proc Natl Acad Sci., 83, 6692-6696, 1986.

TJABRINGA, G.S.; VOS, J.B.; OLTHUIS, D.; NINABER, D.K.; RABE, F.K.; SCHALKWIJK, J.; HIEMSTRA, P.S. & ZEEUWEN P.L.J.M. **Host defense effector molecules in mucosal secretions.** FEMS Immunol Med Microbiol., 45, 151–158, 2005.

TOGNI, G.; SANGLARD, D.; QUADRONI, M.; FOUNDLING S et al. **Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of proregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*** Mivobiology., 142, 493-503, 1996.

TOMEE, J.F.; HIEMSTRA, O.S.; HEINZEL-WIELAND, R. et al. **Antileukoprotease: An Endogenous Protein in the innate Mucosal Defense against Fungi.** J Infect Dis., 176, 740-747, 1997.

TOMEE, J.F.; KOETER, G.H.; HIEMSTRA, O.S. et al. **Secretory Leucoprotease Inhibitor: a native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option?** Thorax., 53, 114-116, 1998.

TUMBARELLO, M., POSTERATO, B., TRECARCHI, E.M., FIORI, B., ROSSI, M., PORTA, R., DE GAETANO, D.K., LA, S.M., SPANU, T., FADDA, G., CAUDA, R., SANGUINETTI, M. **Biofilm production by *Candida* species and**

inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J. Clin. Microbiol., 45, 1843-1850, 2007

UNAIDS. **AIDS epidemic update** : December 2009. In: Global summary of the AIDS epidemic December 2009; United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2009.

VERSTREPEN, K.J. & KLIS, F.M. **Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts.** Mol Microbiol., 60(1), 5-15, 2006.

VILLAR, C.C. & DONGARI-BAGTZOGLOU, A. **Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis.** Expert Rev Mol Med., 13(10), e29, 2008.

WAROLIN, J., ESSMANN, M., & LARSEN, B. **Flow Cytometry of *Candida albicans* for investigations of Surface Marker Expression and Phagocytosis.** Ann Clin Lab Sci., 35(3), 302-311, 2005.

WHO 2005/ **AIDS/epidemic update of 2005.** Available in: <http://www.who.int/hiv/epiupdates/en/index.html>. Acesso em 20 jul 2008.

WILLIAMS., D.W., LEWIS, M.A. **Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity.** Oral Dis., 6(1), 3-11, 2000.

WILLOCKS, L.; LEEN, C.L. BRETTLE, R.P. et al. **Fluconazole resistance in AIDS patients.** J Antimicrob Chemother., 28., 937-939, 1991.

XU, W.; HE, B.; CHIU, A.; CHADBURN, A.; SHAN, M.; BULDYS, M.; DING, A.; KNOWLES, D.M.; SANTINI, P.A. & CERUTTI, A. **Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI.** Nat Immunol., 8(3), 294-303, 2007.

YANG, Y.L. **Virulence factors of *Candida* species.**J Microbiol Immunol Infect., 36(4), 223-228.2003.

ZHU, J.; NATHAN, C.; JIN, W.; SIM, D.; ASHCROFT, G.S.; WAHL, S.M.; LACOMIS, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WRIGHT, C.D. & DING, A. Conversion of Proepithelin to Epithelins: **Roles of SLPI and Elastase in Host Defense and Wound Repair**. *Cell.*, 111, 867-878, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)