



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA FLÁVIA LEAL SPECIAN

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ISOLADOS CLÍNICOS
DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* EM PRESENÇA DE
SUBSTRATOS QUERATÍNICOS**

Londrina
2011

ANA FLÁVIA LEAL SPECIAN

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ISOLADOS CLÍNICOS
DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* EM PRESENÇA DE
SUBSTRATOS QUERATÍNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dra. Márcia Cristina
Furlaneto

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

S741p Specian, Ana Flávia Leal.
Produção de proteases por isolados clínicos de *Candida parapsilosis* em presença de substratos queratínicos / Ana Flávia Leal Specian. – Londrina, 2011.
81 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Candida – Teses. 2. Enzimas proteolíticas – Teses. 3. Virulência (Microbiologia) – Teses. 4. Candidíase – Teses. 5. Micoses fungóides – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579:582.28

ANA FLÁVIA LEAL SPECIAN

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
CANDIDA PARAPSILOSIS EM PRESENÇA DE SUBSTRATOS
QUERATÍNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
UTFPR – Curitiba - PR

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas
UEL – Londrina - PR

Londrina, 24 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor incomensurável, pela excelente educação, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo incentivo e, por acreditarem que sempre serei capaz de tornar possíveis todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Desde que me foi possível trabalhar no laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, há 5 anos atrás, tenho crescido e evoluído como ser humano e pesquisador. Nele, além de conhecer o extenso universo da pesquisa científica, também convivi com pessoas ímpares, que levaram muito de mim e deixaram muito de si em mim, das quais eu jamais esquecerei. Desta forma, é com imenso afeto que expresso meus sinceros agradecimentos:

À professora Dra. Marcia Cristina Furlaneto, a quem sou extremamente grata pela oportunidade concedida para realização deste trabalho sob sua orientação, por ter me ensinado valores morais e de ética na pesquisa, por transmitir seu vasto conhecimento com humildade e paciência, pela sua dedicação e disponibilidade de tempo para me orientar a desenvolver este trabalho, e principalmente pelo enorme carinho e admiração que adquiri por ela aos longos destes anos.

À professora Dra. Luciana Furlaneto-Maia sem a qual eu não teria feito parte deste laboratório, por ter acreditado na minha capacidade desde a primeira vez que conversamos, por ter nos ajudado a escolher o tema desta dissertação, me instigando sempre a obter mais conhecimento sobre o assunto. Professora, eu quero por assim dizer a imensa gratidão e admiração que tenho por sua pessoa.

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pelo envolvimento e grande colaboração na realização deste trabalho, por disponibilizar equipamentos e recursos de seu laboratório e, por ter me recebido sempre com muita simpatia e carisma.

Aos professores Dra. Maria Angélica E. Watanabe, Dra Maria Helena P. Fungaro Dr. Galdino Andrade Filho e Dr. Marco Antônio Nogueira pela disponibilização de recursos e equipamentos de seus laboratórios.

À professora Dra. Tiemi Matsuo membro do departamento de estatística desta universidade, pela solicitude, e por ter disponibilizado seu precioso tempo a fim de realizar as análises estatísticas deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, os quais auxiliam na excelente formação de recursos humanos.

A todos os amigos e companheiros de trabalho que passaram pelo laboratório, os quais deixaram saudades.

Aos companheiros de laboratório da geração presente: Alane Morales, Daniel Favero, Emanuele França, Helena Peggau, Henrique Scremin, Kátia Real, Luís Ferreira, Márcia Terra, Marcelo Tempesta, Rosana Serpa, Thaís Rosa e Viviane Costa, pelo auxílio prático, pela convivência, paciência nos momentos difíceis, por terem me transmitido muita sabedoria e me ajudado a evoluir como indivíduo e profissional.

Em especial a companheira de laboratório, colega de turma e, grande amiga Rosana Serpa por todos os momentos que passamos juntas, pelo companheirismo e incentivo, por ter se aberto a uma grande amizade. Espero tê-la sempre por perto ao longo de minha vida.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, em especial a querida Julie, pela sua simpatia e amizade, por ter me ensinado a realizar alguns testes estatísticos com muita paciência e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao Osvaldo pela grande ajuda com a realização das microscopias, pela atenção, envolvimento, descontração nos momentos de pausa e simpatia.

Aos técnicos de laboratório: João, Osvaldo, Jussevania e, a todos os membros do inter-laboratório pela imensa ajuda no dia a dia, por propiciarem melhores e fundamentais condições de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana pelo auxílio com a utilização dos equipamentos, sempre com presteza e atenção, em especial a

querida amiga Viviana Torres por tantas vezes ter me recebido e disponibilizado seu tempo para realização das minhas leituras espectrofotométricas. Vivi, tenho você como um exemplo de vida e determinação.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos da Turma de Mestrado em Microbiologia de 2009: "César", Eik, Fabi, Gil, Jake, Kristie, Lilian, Luciana, Lucilene, Nagomi, Rosana e Viviana pelas experiências únicas que passamos juntos, das quais eu jamais esquecerei, irei levá-los pra sempre em minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

À todas as amizades estabelecidas no período deste trabalho.

Às amigas de faculdade Amanda Pitz, Carolina Takamoto e Mariana Cerezini com as quais aproveitei a melhor época da vida e, a todos meus antigos amigos, pessoas essenciais em minha vida.

Ao Guilherme Wollmersheiser pelo carinho e atenção, compreensão nos momentos que estive ausente, e pela grande alegria que sua companhia me traz.

Aos meus amados pais, irmãs e familiares pelo amor incondicional, por serem a base que me sustenta, meu refúgio e por toda felicidade que me trazem.

Por fim, à Deus, por tê-lo tão perto de mim em todos momentos de minha vida, pela vida abençoada que me foi concedida e, por ter me agraciado com pessoas mais que especiais em minha vida...

Muito obrigada a todos vocês que fazem parte desta conquista!

SPECIAN, Ana Flávia Leal. **Produção de proteases por isolados clínicos de *Candida parapsilosis* em presença de substratos queratínicos**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A produção de enzimas hidrolíticas por espécies do gênero *Candida* é de fundamental importância, uma vez que são responsáveis pela aquisição de nutrientes, adaptação e invasão a vários tecidos do hospedeiro. Devido à escassez de estudos relativos a produção de proteases por isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, neste trabalho foi avaliado a cinética de crescimento, produção de proteases ácidas, produção de proteases queratinolíticas e análise da interação de isolados clínicos de *C. parapsilosis* (lesão ungueal e de pele e secreção traqueal) em presença de substratos queratínicos. Os isolados foram cultivados por 10 dias em Meio de Sais (MS) e MS acrescido de cabelo, pele e unha (pH 5,0 e 8,0). Os isolados apresentaram cinéticas de crescimento similares tanto em pH 5,0 quanto no 8,0, no entanto, no pH 5,0 pode ser observado diferenças entre as taxas de crescimento nos diferentes cultivos (MSP>MSU≥MSC>MS). Para detecção da atividade proteolítica foram utilizados os sobrenadantes de cultivo provenientes dos cultivos em pH 5,0 e no ensaio enzimático foi utilizado hemoglobina e BSA. Já para análise da atividade queratinolítica foram utilizados os sobrenadantes provenientes dos cultivos em pH 5,0 e 8,0 e os substratos para os ensaios foram queratina azure e estrato córneo. Os resultados mostraram, pela primeira vez na literatura, que todos os isolados produziram proteases ácidas e proteases queratinolíticas quando cultivados nos diferentes meios de cultivo. A suplementação dos meios de cultivo com substratos queratínicos induziu tanto a produção de proteases ácidas quanto de proteases queratinolíticas pelos isolados de lesão de pele e unha (P<0,05). No caso das proteases queratinolíticas o pH de cultivo e os substratos utilizados nos ensaios enzimáticos também interferiram nas atividades dos isolados de lesões, sendo que o isolado de lesão de unha foi significativamente mais produtor de proteases que os demais isolados analisados (P<0,05). Em relação ao isolado de secreção traqueal não foram observadas diferenças entre as atividades proteolíticas e queratinolíticas (P>0,05). As eletromicrografias revelaram que todos os isolados apresentaram interação celular aos substratos queratínicos. Os resultados obtidos indicam que os isolados de *C. parapsilosis* de lesão de pele e unha, em presença de substratos queratínicos, são induzidos de forma diferenciada a expressarem proteases ácidas e queratinolíticas e, que tecidos queratinizados podem ser colonizados por isolados de *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: Proteases ácidas. Proteases queratinolíticas. Atividade proteolítica. Atividade queratinolítica. *Candida parapsilosis*. Substratos queratínicos.

SPECIAN, Ana Flávia Leal. **Protease production by clinical isolates of *Candida parapsilosis* in presence of keratin substrates.** 2011. 81 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The production of hydrolytic enzymes by *Candida* species is of fundamental importance, since they are responsible for nutrient acquisition, adaptation and invasion of various host tissues. Because of the paucity of studies on protease production by clinical isolates of *Candida parapsilosis*, this study evaluated the kinetics of growth, production of acid proteases, production of keratinolytic protease and analysis the interaction of clinical isolates of *C. parapsilosis* (nail and skin lesions and tracheal secretion) in presence of keratin substrates. The isolates were cultured for 10 days in medium salts (MS) and MS supplemented with hair, skin and nail (pH 5.0 and 8.0). The isolates showed similar growth kinetics in both pH 5.0 and in 8.0, however, at pH 5.0 can be observed differences in growth rates in different cultures (MSP > MSU ≥ MSC > MS). For detection of proteolytic activity were used for culture supernatants from the cultures at pH 5.0 and in enzyme assay was used hemoglobin and BSA. As for keratinolytic activity analysis were used supernatants from the cultures at pH 5.0 and 8.0 and substrates for the assays were keratin azure and stratum corneum. The results showed for the first time in literature, that all isolates produced acid proteases and keratinolytic proteases when grown in different culture media. Supplementation of media with keratin substrates induced the production of acid proteases and keratinolytic proteases for isolates from skin and nail lesions ($P > 0.05$). In the case of keratinolytic proteases of cultivation pH and substrates used in enzymatic assays also affected the activities of isolated lesions ($P > 0.05$). In the case of keratinolytic proteases of cultivation pH and substrates used in enzymatic assays also affected the activities of isolated lesions, and the isolated lesion of nail was significantly more protease producer than the other strains tested ($P < 0.05$). In relation of isolated tracheal secretion no differences were observed between proteolytic and keratinolytic activities ($P > 0.05$). The electron micrographs revealed that all isolates showed cell interaction with substrates keratin. The results indicate that the isolates of *C. parapsilosis* skin lesions and nail, in presence of substrates keratin, are induced to differentially express acidic and keratinolytic protease, and keratinized tissues can be colonized by isolates of *C. parapsilosis*.

Keywords: Acid proteases. Keratinolytic proteases. Proteolytic activity. Keratinolytic activity. *Candida parapsilosis*. Substrates keratin.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

- Figura 1** – Curva de crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* em meio de sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU), e cabelo (MSC). (A) 150.06, (B) 220.07 e (C) 205.0621
- Figura 2** – Atividade proteolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06 de *C. parapsilosis* após crescimento em meio de sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) hemoglobina bovina, (B) BSA. Os valores são expressos em U/mL. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *P<0,05 para MSU vs MS (isolado 150.06) e MSP vs MS (isolado 220.07). **P<0,05 para isolado 150.06 vs 205.06 (meio MSU)21

PARTE II

- Figura 1** – Curva de crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* em Meio de Sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) isolado 150.06 cultivo pH 5,0; (B) isolado 150.06 cultivo pH 8,0; (C) isolado 220.07 cultivo pH 5,0; (D) isolado 220.07 cultivo pH 8,0; (E) isolado 205.06 cultivo pH 5,0; (F) isolado 205.06 cultivo pH 8,0.....66
- Figura 2** – Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após crescimento em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) cultivo em pH 5,0 e ensaio com queratina azure; (B) cultivo em pH 8,0 e ensaio com queratina azure; (C) cultivo em pH 5,0 e ensaio com estrato córneo; (D) cultivo em pH 8,0 ensaio e com estrato córneo. *P<0,05 para MS vs demais meios, para cada isolado individualmente; ** P<0,05 para MSP vs demais meios, para cada isolado individualmente68

- Figura 3** – Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após crescimento em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC), pH 5,0 e 8,0. (A) ensaio enzimático com queratina azure; (B) ensaio enzimático com estrato córneo. * Diferença significativa entre os pHs de cultivo para cada isolado em cada meio de cultivo (P<0,05)..... 70
- Figura 4** – Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após crescimento em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). Ensaio enzimático com queratina azure e estrato córneo, (A) cultivo pH 5,0; (B) cultivo pH 8,0. * Diferença significativa entre os substratos queratina azure e estrato córneo para isolado em cada meio de cultivo (P<0,05)..... 72
- Figura 5** – Eletromicrografia de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado com pele; (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06, 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X, 3- aumento de 12000X..... 75
- Figura 6** – Eletromicrografia de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado unha; (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06; 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X..... 75
- Figura 7** – Eletromicrografia de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado com cabelo; (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06; 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X..... 76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i> E CANDIDÍASE.....	14
2.2	<i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	18
2.3	TECIDOS QUERATINIZADOS E INFECÇÃO POR <i>CANDIDA SPP</i>	20
2.4	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	22
2.4.1	Proteases	23
	REFERÊNCIAS	27
	PARTE I – Proteases ácidas produzidas por isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> em presença de substratos queratínicos.....	41
	PARTE II – Proteases queratinolíticas secretadas por isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i>	58
	CONCLUSÕES	78

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* estão adaptadas a serem comensais do hospedeiro humano, podendo fazer parte das microbiota de mucosas e de epitélios queratinizados.

Os processos infecciosos estabelecidos por *Candida* spp. ocorrem devido aos fatores relacionados ao patógeno, como a expressão de genes relacionados à virulência, associados ao estado fisiológico/imunológico do hospedeiro.

O gênero *Candida* apresenta uma diversidade de determinantes de virulência. Dentre os principais destacam-se às enzimas hidrolíticas extracelulares, como as aspartil proteases (Saps), fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção.

Atualmente, diversos estudos apontam mudanças no perfil epidemiológico das infecções causadas por *Candida* spp. Além de *C. albicans*, outras quatro espécies têm ocorrido em altas frequências, entre elas, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Estas espécies apresentam características particulares de infecção, suscetibilidade a antifúngicos, e de expressão de fatores de virulência, sendo de grande importância o estudo da patogenia ocasionada por cada uma delas.

São poucos micro-organismos capazes de desenvolver micoses de pele e unha. Este fato é decorrente das estruturas epidérmicas queratinizadas conferirem resistência e proteção em defesa à patógenos. Portanto, espécies de *Candida* e dermatófitos estão entre os poucos micro-organismos capazes de causarem infecções nestes sítios. As dermatomicoses têm grande importância clínica, não podendo ser tratada apenas como um problema cosmetológico, já que debilita e causa transtorno ao indivíduo acometido.

Dentre as infecções superficiais de pele e unha causadas por *Candida* spp., *C. parapsilosis* é a mais relacionada à infecção.

Até o momento, são escassos os estudos relativos aos fatores de virulência em *C. parapsilosis*. A produção de Saps por esta espécie tem sido demonstrada, embora o papel destas proteases na patogenicidade, nos diferentes sítios de infecção, ainda não seja esclarecido.

Tendo em vista a elevada incidência de *C. parapsilosis* como agente de micoses superficiais de pele e unha, e a escassez de dados relativos à produção de proteases por esta espécie, estudos relativos a estes fatores são de suma importância para a elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese de infecções superficiais.

1.1 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação de isolados clínicos de *C. parapsilosis*, obtidos de sítios anatômicos distintos, quanto a: cinética de crescimento, produção de proteases ácidas, produção de proteases com atividade queratinolítica e a interação com substratos queratínicos ao nível ultra-estrutural após cultivo em ausência e presença de substratos queratínicos (cabelo, pele e unha).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *CANDIDA* E CANDIDÍASE

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são encontradas na forma comensal em aproximadamente 50% da população (revisado por HUBE, 2009). Em hospedeiros humanos, espécies de *Candida* são capazes de colonizar os mais variados micro-ambientes, podendo fazer parte da microbiota de mucosas oral, vaginal, gastrointestinal, urogenital, do trato-respiratório e de epitélios queratinizados (revisado por HUBE, 2004; revisado por HUBE, 2009).

Contudo, determinados fatores predisponentes que levam a alterações do estado fisiológico ou imune do hospedeiro, em conjunto com a modulação e expressão de genes relacionados a patogenicidade nestas leveduras, podem favorecer a mudança do estado comensal para um estado de patogenia, tornando-as capazes de causar um amplo espectro de infecções (revisado por HUBE, 2004; revisado por KOJIC e DAROUICHE, 2004; revisado por NUCCI, 2010).

Os fatores de risco que causam desequilíbrio ao sistema imune do hospedeiro, tornando-o vulnerável a infecções oportunistas, compreendem desde aqueles considerados moderados, tais como má higiene e alimentação (dieta rica em carboidratos e açúcares), deficiência de ferro e vitaminas, uso de contraceptivos orais e fumo, quanto aqueles que causam seu comprometimento, a exemplo de indivíduos portadores do vírus HIV, com diabetes *mellitus* e com câncer. Além disso, têm-se os fatores iatrogênicos (uso de antibióticos por período prolongado, quimioterápicos, imunossupressores, dispositivos médicos invasivos e nutrição parenteral) (revisado por KOJIC, 2004; CHENG et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006, revisado por NUCCI, 2010).

No estado de patogenia *Candida* spp. pode causar desde infecções superficiais (cutâneo-mucosas), em tecidos nos quais eram colonizadores, até infecções sangüíneas disseminadas (revisado por HAYNES, 2001; CALDERONE e FONZI, 2001; ROMANI, et al., 2003; revisado por HUBE, 2004; KUMAMOTO et al., 2008).

Candídiase oral está entre as infecções superficiais mais comuns, podendo acometer desde indivíduos saudáveis, principalmente crianças e idosos, à imunocomprometidos, destacando-se os portadores de HIV, os quais 90% apresentam pelo menos um episódio da infecção durante a progressão da doença (revisado por AKAPAN e MORGAN, 2002; VARGAS e JOLY, 2002; revisado por REPENTIGNY et al., 2004; WINGETER et al., 2007; MELO et al., 2009). Outra infecção freqüente de mucosa é a candidíase vulvovaginal, a qual afeta mulheres imunocompetentes e imunossuprimidas, sendo que aproximadamente 75% das mulheres sadias podem apresentar pelo menos um episódio desta infecção durante a idade fértil (RICHTER, et al., 2005). A colonização do trato respiratório por *Candida* spp. em pacientes criticamente doentes, submetidos a ventilação mecânica, é extremamente comum. No entanto, pneumonia primária e abscessos pulmonares causados por espécies deste gênero são raros, e devem ser confirmados por análise histopatológica (EL-EBIARY et al., 1997; DELISLE et al., 2008; revisado por PAPPAS et al., 2009).

As leveduras do gênero *Candida* têm sido os principais micro-organismos diagnosticados em casos de infecções cutâneas e onicomicoses (DEL ROSSO et al., 1998; VEER et al., 2007).

Candídiase cutânea ou intertriginosa acomete desde recém-nascidos até indivíduos adultos, os quais apresentam fatores predisponentes, tais como, diabetes, obesidade, infecção primária por vulvovaginite ou balanopostite, atividades ocupacionais nas quais a exposição à água é freqüente, comprometimento do sistema imune, entre outros (revisado por WAGNE e SOHNLE, 1995; SIDRIM et al., 2004). As lesões provocadas por este tipo de infecção são encontradas em pregas cutâneas como regiões inframamárias, axilares, inguinocrurais, pregas suprapúbicas e nas regiões interdigitais palmares e plantares (SIDRIM et al., 2004). *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* são as espécies prevalentes isoladas de tais infecções (DANING et al., 1998; KASZUBA et al., 1998; KWOK et al., 1998; ABU-ELTEEN, 1999; RUDY, 1999; JAUTOVÁ et al., 2001; MIRANDA et al., 2005).

A participação de *Candida* spp. como agente de onicomicose vem sendo amplamente relatada (DORKO et al., 2002; GUPTA et al., 2003; BRILHANTE et al., 2005; MARTINS et al., 2005; JAYATILAKE et al., 2009; GODOY-MARTINEZ et al., 2009). *Candida* spp. apresenta-se como agente primário em casos de

imunossupressão crônica e na candidíase muco-cutânea crônica (CMC) (revisado por JAYATILAKE et al., 2009). Já em pacientes imunocompetentes, freqüentemente apresentam-se como patógenos secundários, invadindo a unha previamente alterada por trauma, hiper-hidratação ou irritação por contato com substâncias químicas, também em casos de unhas acometidas por psoríase, líquen plano e por outras dermatoses (DANIEL et al., 1998).

Muito mais que um simples problema da cosmetologia, a unha infectada serve como um reservatório crônico de infecções, podendo ocasionar micoses muco-cutâneas recorrentes (revisado por JAYATILAKE et al., 2009). Infecções ungueais acometem principalmente o sexo feminino e, preferencialmente as unhas das mãos, devido à maior exposição destas aos agentes químicos e físicos. Por apresentar manifestações clínicas distintas, micoses ungueais causadas por *Candida* spp. são classificadas em paroníquia (tumefação inflamatória na região da pele que circunda a unha, a qual cresce ondulada e com alterações na superfície), onicólise (modificações na própria lamina ungueal, com hiperqueratose subungueal distal) e granuloma (infecção por toda espessura da unha podendo ocasionar deformidades digitais) (revisado por JAYATILAKE et al., 2009).

Um tipo de infecção superficial raramente diagnosticada é a candidíase muco-cutânea crônica. Trata-se de uma imunodeficiência de células T em decorrência a uma disgenesia tímica. A maioria dos casos tem início na infância, ocasionando infecções persistentes em vários sítios anatômicos concomitantemente, como em mucosas, pele, couro cabeludo e unhas. O quadro clínico pode evoluir para um granuloma candidósico, representado por lesões cutâneas granulomatosas localizadas preferencialmente na face, couro cabeludo, levando a perda definitiva de cabelo, e membros, com evidente hiperqueratose (KIRKPATRICK, 1989; revisado por WAGNE e SOHNLE, 1995; LACAZ, 2002; LIU e LEI, 2003; BHOWATE e A DUBEY, 2004; SIDRIM, 2004; LÓPEZ-MARTINEZ, 2010).

Entre as infecções invasivas provocadas por espécies do gênero *Candida*, candidemia é a quarta causa mais comum de infecções na corrente sanguínea em hospitais terciários. Estas infecções apresentam altos índices de incidência em quase todas as regiões demográficas, e implicações relevantes quanto aos custos, dificuldades de tratamento e, principalmente elevados índices de morbidade e mortalidade em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (GUDLAUGSSON et al., 2003; OLAECHEA et al., 2004; SHORR et al., 2009).

Atualmente, diversos estudos apontam mudança epidemiológica das infecções causadas por *Candida* spp. com expressivo aumento de espécies de *Candida* não-*albicans* (COLOMBO et al., 1999; COLOMBO, 2000; COLOMBO et al., 2006; BASSETTI et al., 2007; CHOW et al., 2008; DIMOPOLUS et al., 2008). No geral, aproximadamente 12 das 200 espécies de *Candida* conhecidas são capazes de desencadear processos infecciosos (LÓPEZ-MARTINEZ, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das espécies de *Candida* relativa as manifestações clínicas

Espécies de <i>Candida</i>	Sítios de infecção						
	oral	vaginal	cutânea	ungueal	GI*	sistêmica	candidemia
<i>C. albicans</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. glabrata</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. tropicalis</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. krusei</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. guilliermondii</i>	X	X		X			
<i>C. parapsilosis</i>	X		X	X	X	X	X
<i>C. kefyr</i>	X	X					X
<i>C. dubliniensis</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. famata</i>			X	X		X	X
<i>C. lipolytica</i>							X
<i>C. norvegensis</i>					X	X	X
<i>C. lusitaniae</i>						X	X

*GI - gastrointestinal

Além de *C. albicans*, outras quatro espécies têm ocorrido em altas freqüências, sendo elas, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Estas espécies apresentam características particulares de infecção, susceptibilidade a antifúngicos, e expressão de determinantes de virulência, sendo de suma importância o estudo específico da patogenia ocasionada por cada uma delas (revisado por PFALLER e DIEKEMA, 2007).

As razões para a emergência das espécies não-*albicans* não são completamente entendidas, mas sabe-se que algumas condições podem aumentar o risco de desenvolvimento de candidemia por estas espécies. Por exemplo, fungemia por *C. parapsilosis* tem sido associada a cateteres vasculares, nutrição parenteral e prematuridade, enquanto câncer e neutropenia estão associados à candidemia por *C. tropicalis*. Por outro lado, fungemias por *C. glabrata* e *C. krusei* estão associadas à exposição prévia aos antifúngicos da classe dos azoles (WINGARD, 1995; GIRMENIA et al., 1996; MARR et al., 1999; TRICK et al., 2002; CLARK et al., 2004).

A epidemiologia das infecções por *Candida* spp. varia conforme a região demográfica (ABI-SAID et al., 1997; TRICK et al., 2002; EGGIMANN et al., 2003; PFALLER et al., 2004; COLOMBO et al., 2006). Estudos recentes demonstram um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata* principalmente nos EUA (TRICK et al., 2002; HAJJEH et al., 2004; PFALLER et al., 2006; HACHEM et al., 2008). Já no Brasil, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido as espécies não-*albicans* mais frequentemente isoladas (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PEREIRA et al., 2010).

2.2 *Candida Parapsilosis*

A espécie *C. parapsilosis* encontra-se amplamente distribuída na natureza. Além do hospedeiro humano, esta espécie pode ser encontrada em animais domésticos, insetos e microambientes do solo e aquático (revisado por TROFA et al., 2008).

Até recentemente, os isolados de *C. parapsilosis* eram subdivididos em três grupos genotípicos, denominados grupos I, II e III (LEHMANN et al., 1992; LIN et al., 1995; ROY e MEYER, 1998). No entanto, Tavanti e colaboradores (2005) demonstraram que o grau de variação genotípica destes grupos justificava separá-los em espécies distintas, dando origem a duas novas espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, substituindo as designações *C. parapsilosis* grupo II e III, respectivamente. A denominação *C. parapsilosis* foi mantida para os isolados do grupo I (TAVANTI et al., 2005).

Dentre estas três espécies, *C. parapsilosis* é responsável pela maioria das manifestações clínicas, pelo fato de ser mais distribuída geograficamente, melhor adaptada ao hospedeiro humano e mais transmissível comparativamente as outras duas espécies. *C. orthopsilosis* é capaz de colonizar e causar infecções em diferentes regiões anatômicas, já a incidência de *C. metapsilosis* é rara em isolados clínicos (TAVANTI et al., 2007; THIERRY et al., 2010).

C. parapsilosis é comensal da pele e espaço ungueal do homem, tendo sua patogenicidade limitada à integridade dos mesmos (revisado por TROFA

et al., 2008). Distintamente ao que ocorre em infecções nosocomiais causadas por *C. albicans* e *C. tropicalis*, nas quais a infecção é precedida por colonização, e a transmissão é vertical, para *C. parapsilosis* a transmissão é horizontal, devido sua propriedade de colonizar mãos de indivíduos saudáveis (profissionais da área de saúde), de reproduzir-se em soluções de nutrição parenteral e formar biofilme em cateteres e em outros dispositivos médicos (revisado por TROFA et al., 2008; VAN ASBECK et al., 2009). Desta forma, *C. parapsilosis* vem sendo cada vez mais relacionada a surtos hospitalares, principalmente em neonatos prematuros (DE BERNARDIS et al., 1999; SHIN et al., 2002; KUHN et al., 2004; ALMIRANTE, et al., 2005; BONASSOLI et al., 2005; VAN ASBECK et al., 2007; PFALLER et al., 2008; VAN ASBECK et al., 2009).

Nos últimos anos, a frequência de infecções por *C. parapsilosis* aumentou significativamente, sendo reportada como a segunda espécie mais isolada de hemoculturas (revisado por TROFA et al., 2008). Segundo alguns autores *C. parapsilosis* tem ocorrido em maior frequência comparativamente a *C. albicans* em hospitais da Europa (PFALLER et al., 2001), da Ásia (NAKAMURA e TAKAHASHI, 2006; NG et al., 2001) e da América do Sul (MEDRANO et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). O aumento na frequência de infecções invasivas por *C. parapsilosis* tem sido atribuído a sua capacidade de crescimento em soluções parenterais com alta concentração de glicose e de aderir a dispositivos intravasculares. Pacientes portadores do vírus HIV e submetidos a procedimentos cirurgicos, particularmente cirurgia gastrointestinal, que fazem uso prolongado de cateter venoso central e, pacientes com câncer estão mais susceptíveis a infecção por *C. parapsilosis*. A faixa etária mais propensa a este tipo de enfermidade compreende neonatos e prematuros uma vez que as microbiotas de pele e gastrointestinal não estão estabelecidas (revisado por TROFA et al., 2008).

Quanto a infecções superficiais (pele e unha) também tem sido relatado um aumento na frequência de *C. parapsilosis* em diversas regiões demográficas (NG et al, 1999; GAUTRET et al., 2000; SEGAL et al., 2000; GUPTA et al., 2003; MUJICA et al., 2004; BRILHANTE et al., 2005; MUGGE et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MANZANO et al., 2008; ROTA, 2008).

Apesar de sua importância clínica, até o momento, ainda são escassos os estudos relativos a determinantes de virulência em *C. parapsilosis*. A

habilidade de adesão a células do hospedeiro tem sido relatada (KUHN et al., 2002; KUHN et al., 2004). Recentemente, Oliveira e colaboradores (2010) evidenciaram adesão celular e formação de biofilme por isolados clínicos de *C. parapsilosis* em superfícies de cabelo e unha. A capacidade de isolados de *C. parapsilosis* causarem infecção em vários tecidos do hospedeiro está relacionada à formação de biofilme, uma vez que a estrutura do biofilme confere resistência a antifúngicos e proteção contra células do sistema imune do hospedeiro. Segundo a literatura, isolados de *C. parapsilosis* formadores de biofilme *in vitro* estão associados a taxa de mortalidade 71,4% superior aos indivíduos acometidos, comparativamente ao de isolados não formadores de biofilme. Embora o papel exercido por enzimas extracelulares como determinante de virulência nos diversos sítios de infecção, seja pouco esclarecido, sabe-se que existe uma tendência dos isolados de mucosa vaginal e pele produzirem mais proteases aspárticas (Saps) em relação aos isolados de sangue (revisado por TROFA et al., 2008). Tal evidência sugere diferenças na produção de proteases aspárticas por isolados clínicos de *C. parapsilosis* (TAVANTI et al., 2010).

2.3 TECIDOS QUERATINIZADOS E INFECÇÃO POR *CANDIDA* SPP.

A composição dos tecidos queratinizados é dada pela produção de queratina no interior das células da epiderme (ADDOR, 2007). A queratina é uma proteína estrutural insolúvel, rica em enxofre, encontrada nas superfícies de tecidos de vertebrados superiores (penas, cascos, pele, cabelo, unhas e outras estruturas epidérmicas de proteção) (VIGNARDET et al., 1999). Esta proteína apresenta alta estabilidade mecânica devido à composição e configuração molecular dos seus aminoácidos (Figura 1). As características mencionadas devem-se ao fato da molécula de queratina ser composta por grande quantidade de unidades do aminoácido cisteína, formando pontes dissulfeto intra- e inter-cadeia. A formação destas pontes ocorre pela oxidação dos grupos SH de duas moléculas do aminoácido cisteína, conferindo maior rigidez e estabilidade estrutural à molécula de queratina (Figura 2) (SCHROOYEN et al., 2000).

A estrutura da queratina é dividida em rígida e leve de acordo com o teor de cisteína. A queratina do tipo rígida contém muitos resíduos de cisteína,

incluem-se neste grupo penas, pelos e unhas (HOOD et al.,1994, PARRY, 1998; SCHROOYEN et al., 2001). Por outro lado, a queratina do tipo leve apresenta poucos resíduos de cisteína na constituição e, é encontrada na pele (VOET e VOET, 1995; SCHROOYEN et al., 2001).

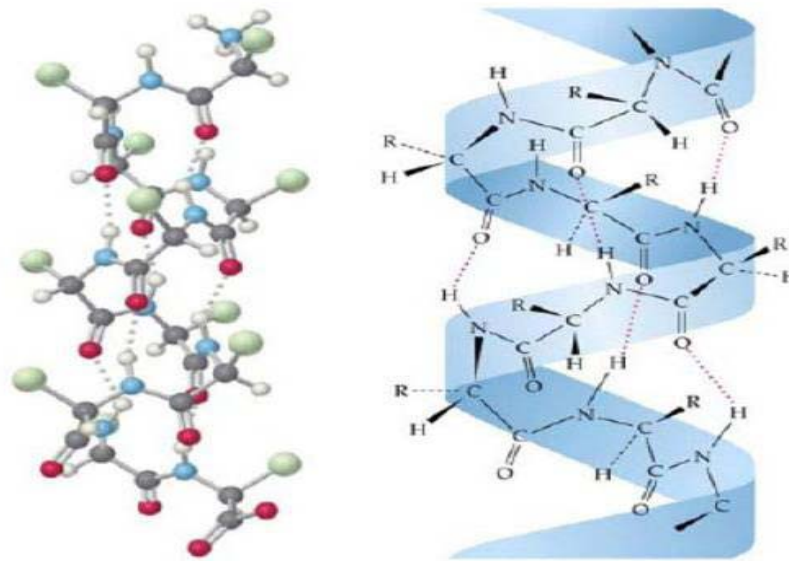


Figura 1 – Estrutura em hélice da α – queratina

Fonte: Dissertação de Mestrado Thalita Rodrigues Duarte, 2010.

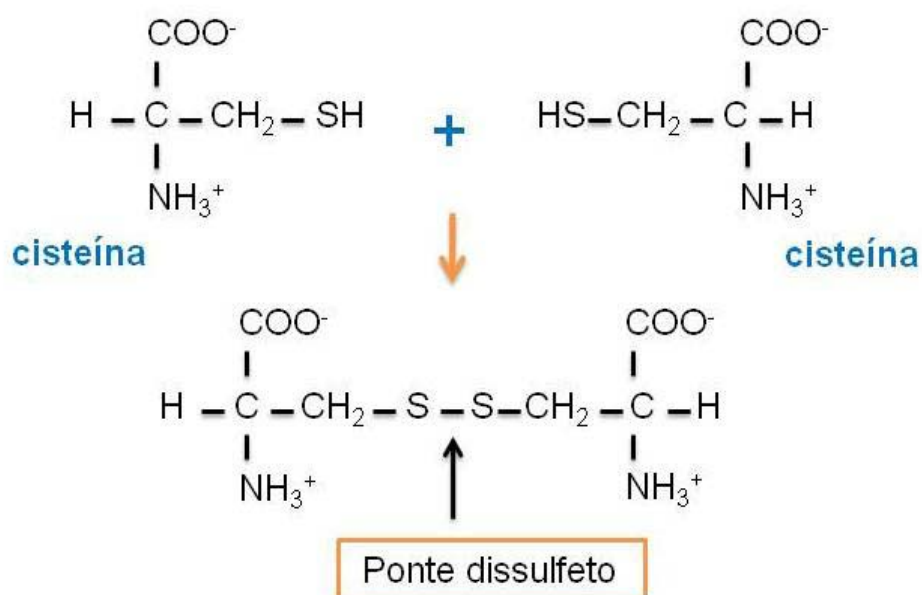


Figura 2 – Duas unidades de cisteína formando ponte dissulfeto.

As estruturas queratinizadas presentes em tecidos epidérmicos humanos são: pelo, unha e pele. Os pelos e as unhas são apêndices cutâneos cuja função é proteger e garantir maior resistência às agressões ambientais. A pele recobre a superfície do corpo oferecendo um revestimento protetor e impermeável à água. A espessura e estrutura da epiderme da pele variam de acordo com a superfície corpórea, sendo mais espessa e complexa na palma da mão e superfície do pé. A renovação das células queratinizadas da epiderme representa uma barreira contra a infecção por micro-organismos, no entanto além de barreira física, esta camada da pele também é constituída de células de defesa como as células de Langerhans e os queratinócitos que medeiam à resposta imune formando um complexo e eficiente mecanismo de defesa (Wagne e Sohnle 1995).

Desta forma, são poucos os micro-organismos capazes de colonizar e desenvolver infecção em tecidos queratinizados. O grupo de microrganismos mais conhecido por desencadear micoses cutâneas compreende os dermatófitos. No entanto, estudos têm relatado alta incidência de espécies de *Candida* em caso de micoses de pele e unha (WAGNE e SOHNLE, 1995; KAUR et al., 2008), como descrito no item 2.1.

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogenicidade de um micro-organismo é definida como a capacidade de causar doença. No caso de patógenos oportunistas, a ocorrência da infecção é determinada pelo estado fisiológico do hospedeiro aliado a capacidade de expressão de fatores de virulência, de acordo com o tipo, estágio e sítio anatômico da infecção (GHANNOUM e ABU-ELTEEN, 1990; HAYNES, 2001; YANG, 2003). Para o estabelecimento da infecção, fatores de virulência expressos por *Candida* spp. estão envolvidos na adaptação do microrganismo às alterações nutricionais ocorrida por variações fisiológicas, na capacidade de sobrepujar o sistema imune e de invasão dos diferentes tecidos do hospedeiro.

A maioria das pesquisas referentes aos fatores de virulência em micro-organismos pertencentes ao gênero *Candida* se baseia em *C. albicans*. Entretanto, vários estudos constataam diferenças significativas quanto à presença de genes relacionados a esses determinantes entre as demais espécies bem como,

quanto à expressão dos mesmos, a qual é dependente da interação fungo-hospedeiro e de necessidades nutricionais e fisiológicas do fungo no curso da infecção (HAYNES, 2001; TAVANTI et al., 2004; DAGDEVIREN et al., 2005; OKSUZ et al., 2007).

Dentre os principais fatores de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida*, tem-se a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares, a capacidade de variação da morfologia celular (formação de hifas, pseudo-hifas e variação fenotípica) e a expressão de fatores de adesão, como moléculas reconhecedoras de superfícies propiciando a formação de biofilme (GHANNOUN, 2000; HAYNES, 2001; YANG, 2003; GOKCE et al., 2007; NAGLIK et al., 2008). O mecanismo de *switching* fenotípico que possibilita melhor adaptação do micro-organismo ao ambiente (revisado CALDERONE e FONZI, 2001; HAYNES, 2001; YANG, 2003; BROCKERT et al., 2003; AVERY et al., 2006) e a produção de fator hemolítico que está relacionado à capacidade do patógeno em adquirir íons ferro a partir da hemoglobina (MANNS et al., 1994; WATANABE et al., 1997; LUO et al., 2001) também têm sido reconhecidos como possíveis atributos de virulência nas espécies de *Candida*.

2.4.1 Proteases

As enzimas hidrolíticas extracelulares estão entre os principais fatores de virulência do gênero *Candida*, sendo fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção (revisado por NAGLIK et al., 2003).

A produção de proteases por *C. albicans* foi descrita pela primeira vez em 1965 (STAIB, 1965). E desde então, estas proteases vêm sendo intensivamente estudadas, por serem consideradas como importante fator de patogenicidade nas espécies de *Candida* (MACDONALD e ODDS, 1983; GHANNOUM e ABU-ELTEEN, 1986; revisado por NAGLIK et al., 2003).

As principais e mais estudadas dentre as classes de proteases produzidas por espécies de *Candida*, são as proteases aspárticas (Saps). Em *C. albicans* já está descrito uma família de aspartil proteases, sendo algumas destas secretadas (Sap1-Sap8) e, outras ancoradas à parede celular (Sap9 e Sap10),

apresentando funções distintas. Proteases Saps1-6 são conhecidas por hidrolisar proteínas do hospedeiro, e conseqüentemente, causar danos em tecidos. Em contraste, tem sido demonstrado que Sap9 e Sap10 são relacionadas à integridade da parede celular (MONOD et al., 1994; MONOD et al., 1998; KRETSCHMAR et al., 2002; ALBRECHT et al., 2006).

Embora o papel primário das Saps produzidas por *C. albicans* seja a digestão de proteínas (albumina, hemoglobina, queratina e imonoglobulinas A) (revisado por YANG, 2003) estas proteases facilitam a adesão a muitos tipos celulares e tecidos do hospedeiro, como mucosas do trato oral e vaginal. Além disso, estas proteases podem contribuir para a invasão de órgãos profundos causando distúrbios em células e substâncias intercelulares, além de destruição de células e moléculas do sistema imune (KAMINISHI et al., 1995; revisado por HUBE, 1998; DE BERNARDIS et al., 1997; FALLON et al., 1997), ou ainda degradação de queratina dos tecidos cutâneos facilitando a infecção nestes sítios (NEGI et al., 1984; TSUBOI et al., 1985; TSUBOI et al., 1989 RAY e PAYNE, 1990; SCHALLER et al., 2000).

Pepstatina A é um inibidor específico de proteases aspárticas, o qual é utilizado na classificação de proteases desta classe, tem sido empregado para prevenir a invasão e danos à mucosa oral, vaginal e pele em modelos experimentais (DE BERNARDIS et al., 1997; FALLON et al., 1997).

Diversos estudos relatam a expressão diferencial de genes *SAPs* de *C. albicans* sob uma variedade de condições laboratoriais, como em modelos experimentais de reconstrução da pele, mucosa oral e vaginal, e *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em tecidos de mucosa oral infectados (HUBE et al., 1994; SCHALLER et al., 2005; STAIB et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram que a produção de Saps em espécies patogênicas do gênero *Candida* é induzida por proteína exógena (normalmente albumina, soro albumina bovina – BSA e hemoglobina) (DOSTÁL et al., 2003; DAGDEVIREN et al., 2005; FURLANETO-MAIA et al., 2008; COSTA et al., 2009). A intensidade desta produção é diferenciada entre as espécies do gênero e pode estar relacionada à patogenicidade de cada espécie (KUMAR et al., 2006).

A produção de Saps por outras espécies do gênero, a exemplo de *C. parapsilosis*, também tem sido demonstrada, embora o papel destas proteases na patogenicidade ainda não seja esclarecido (revisado por TROFA et al., 2008).

Rüchel e colaboradores (1986) foram os primeiros autores a descrever a produção de protease aspártica por *C. parapsilosis*, apesar de não ter encontrado correlação com a virulência.

A produção de proteases aspárticas *in vitro* por isolados clínicos de *C. parapsilosis* tem sido demonstrada após cultivo em presença substratos protéicos (DE BERNARDIS et al., 1989; RAY e PAYNE, 1990; CHAKRABARTI et al., 1991; FUSEK et al., 1993; CASSONE et al., 1995; DE BERNARDIS et al., 1999; WU e SAMARANAYAKE, 1999; KANTARCIOGLU et al., 2002; KUHN et al., 2004; HAMAL et al., 2004; BRAMONO et al., 2006; GOKCE et al., 2007; SILVA et al., 2007; MOHAN e BALLAL, 2008; FRANÇA et al., 2009; HRUSOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ et al., 2009), os quais reforçam a importância de novos estudos visando o esclarecimento do papel destas proteases na virulência de *C. parapsilosis* nos variados sítios anatómicos de infecção.

Até o momento, já foram descritas três isoenzimas de Sapp secretadas por *C. parapsilosis* (Sapp1p, Sapp2p, Sapp3p) (revisado por TROFA et al., 2008). De Viragh e colaboradores (1993) identificaram dois genes que codificam estas proteases em *C. parapsilosis* (*SAPP1P* e *SAPP2P*), sendo que *SAPP2P* foi inicialmente classificado como pseudo-gene. No entanto, estudos posteriores demonstraram que o gene *SAPP2P* codifica a isoenzima Sapp2p, a qual constitui cerca de 20% das Saps secretadas. Além disso, a sua atividade tem mecanismo de ação distinto ao da enzima codificada pelo gene *SAPP1P* (FUSEK et al., 1993; MERKEROVÁ et al., 2006). Recentemente, Hrušková-Heidingsfeldová e colaboradores (2009) evidenciaram que a expressão e secreção de Sapp1p é extensivamente induzida pela presença de diversas proteínas exógenas, diferentemente da Sapp2p a qual apresenta restrição e especificidade pelo substrato protéico, sendo secretada em baixa quantidade. A regulação de Sapp3p ainda é desconhecida (revisado por TROFA et al., 2008).

Até o momento, ainda são poucos os estudos relativos à expressão e ao mecanismo de ação de outras classes de proteases produzidas por *Candida* spp. Segundo a literatura, serino e metalo proteases também são produzidas por *Candida* (RODIER et al., 1999; COSTA et al., 2003; SANTOS e SOARES, 2004; SANTOS et al., 2006; VERMELHO et al., 2009). Santos e colaboradores (2006) descreveram a produção de metalo e serino proteases por *C. albicans*, capazes de degradar componentes de matriz extracelular, porém a função que estas enzimas

desenvolvem durante a infecção, ainda não está definida. Mais recentemente, Vermelho e colaboradores (2009) identificaram pela primeira vez a produção de uma serino protease com atividade queratinolítica em *C. parapsilosis*.

REFERÊNCIAS

ADDOR, F. Bases Dermatológicas. **Dossiê Científico**, 2007.

ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZON, O. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p.1122-1128, 1997.

ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICJOVA, I.; NAGLIK, J.R.; SCALLER, M.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F.; SCHAFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular process and host pathogen interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 688-694, 2006.

ABU-ELTEEN, K.H. Incidence and distribution of *Candida* species isolated from human skin in Jordan. **Mycoses**, v. 42, p.311-317, 1999.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Medical Journal**, v. 78, p. 455–459, 2002.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; AILONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1681–1685, 2006.

AVERY, S.V. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 577– 587, 2006.

BASSETTI M.; TRECARCHIB, E.M.; RIGHIA, E.; SANGUINETTIC, M.; BISIOA, F.; POSTERAROC, B.; SOROD, O.; CAUDAB, R.; VISCOLIA, C.; TUMBARELLOB, M. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p.325–331, 2007.

BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 59, p. 73-76, 2006.

BHOWATE, R.; DUBEY, A. Chronic Mucocutaneous Candidiasis: A Case Report. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 22, p. 21-23, 2004.

BONASSOLI, I.A.; BERTOLI, M.; SVINDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infections**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.A.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S.P.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J.C.

Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.5, p.100-131, 2005.

BROCKERT, P.J.; LACHKE, S.A.; SRIKANTHA, T.; PUJOL, C.; GALASK, R.; SOLL, D.R. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 7109–7118, 2003.

BRUDER-NASCIMENTO, A; CAMARGO, C.H.; SUGIZAKI, M.F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, C.A.; MONDELLI, A.L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-335, 2001.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; PONTIERI, E.; CARRUBA G.; GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; FERNÁND-RODRÍGUEZ, M.; QUINDÓS, G.; PONTÓN, J. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 967-75, 1995.

CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. In vitro proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 114, p. 163-168, 1991.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, p. 1-5, 2005.

CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.A.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.A. HADLEY, S. Risk factors for *Candida albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 1993-1998, 2008.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRINDKIN, S.K.; HAJJEN, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4468-4472, 2004.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnosis and Microbiology Infectious Diseases**, v. 34, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 4, p.113-118, 2000.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in

Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

COSTA, E.M.M.B.; SANTOS, A.L.S.; CARDOSO, A.S.; PORTELA, M.B.; ABREU, C.M.; ALVIANO C.S.; SOARES, R.M.A. Heterogeneity of metallo and serine extracellular peptidases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 173–180, 2003.

COSTA, K.R.C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M.C.; CANDIDO, R.C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Oral Candidosis: Quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, p.73–79, 2009.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. **Mycoses**, v. 48, p. 321-326, 2005.

DANIEL, C.R.I.; GUPTA, A.K.; Daniel, M.PI. *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. **Dermatology**, v. 37, p. 904-907, 1998.

DANING, I.; DINGUO, Z. WI-NWEI, S.; PEINONG, J. Extensive skin candidosis in an adult: effective treatment with itraconazole. **Mycoses**, v. 41, p. 219-221, 1998.

DE BERNARDIS, F.; LORENZINI, R.; VERTICCHIO, R.; AGATENSI, L.; CASSONE, A. Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2598-2603, 1989.

DE BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M., ADRIANI, D.; SPREGHINI, E.; SANTONI, G.; CASSONE, A. Protective role of antimannan and anti-aspartic proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3399-3405, 1997.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLÀN, R.; PONTÒN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 3481-3486, 1999.

DELISLE, M.S.; WILLIAMSON, D.R.; MARC, B.C.; PERREAULTC, M.; ALBERTB D. M.; JIANGE, C. X.; HEYLANDE, D.K. The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients **Journal of Critical Care**, v. 23, p. 11–17, 2008.

DE VIRAGH, P.A.; SANGLARD, D.; TOGNI, G.; FALCHETTO, R.; MONOD, M. Cloning and sequencing of *two Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 335-342, 1993.

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIoTIS, G. ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Critical Care and Trauma**, v. 106, p. 523-529, 2008.

DEL ROSSO, J.Q.; ZELLIS, S.; GUPTA, A.K. Itraconazole in the treatment of superficial cutaneous and mucosal *Candida* infections. **Journal of American Osteopathology Association**, v.98, p. 497-502, 1998.

DORKO, E.; JAUTOVA, J.; TKACIKOVA, L.; WANTRUBOVA, A. The frequency of *Candida* species in onychomycosis. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 727-731, 2002.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍCKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUMIL, T.; PICHOVÁ, I.; HEIDINGSFELDOVÁ, O.H. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712–716, 2003.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685–702, 2003.

EL-EBIARY, M.; TORRES, A.; FÀBREGAS, N.; BELLACASA, J.P.; GONZÁLEZ, J.; RAMIREZ, J.; DEL BAÑO, D.; HERNÁNDEZ, C.; JIMÉNEZ de ANTA, M. T. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients: an immediate postmortem histologic study. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 156, p. 583–590, 1997.

FALLON, K.; BAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E; TAMBURINI, P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 551-556, 1997.

FIGUEIREDO, V.T.; SANTOS, D.A.; RESENDE, M.A.; HAMDAN, J.S. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v.164, p. 27-33, 2007.

FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R.M.B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, 2010. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 66, p. 209-217, 2008.

FUSEK, M.; SMITH, E. A.; MONODB, M.; FOUNDLING, S.I. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 327, p. 108-112, 1993.

GAUTRET, P.; RODIER, M.H.; LACROIX, K.C.; JACQUEMIN, J.L. Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, v. 43, p. 433-435, 2000.

GHANNOUM, M.; ABU-ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J. Med. Veterinary Mycology*, v. 24, p. 407–413, 1986.

GHANNOUM, M.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants in *Candida*: a review. *Journal of Mycology Medicine*, v. 33, p. 265–282, 1990.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p. 122–143, 2000.

GIRMÊNIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNARDIS, F.; GENTILE, G.; BOCCANERA, M.; MONACO, M.; ANTONUCCI, G.; CASSONE, A. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. *Clinical Infectious Diseases*, v. 23, p. 506-514, 1996.

GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F.G.; TOMIMORI-YAMASHITA, F.G.; URRUTIA, M.; ZAROR, Z.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, v. 168, p. 111–116, 2009.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, v. 164, p. 265-269, 2007.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; BERG, J.V.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clinical Infectious Disease*, v. 37, p. 1172–1177, 2003.

GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; BARAN, R.; SUMMERBELL, RC. Non-dermatophyte onychomycosis. *Dermatology Clinical*, v. 21, p. 257–68, 2003.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer*, v. 112, p. 2493-99, 2008.

HAIJEN, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1519–1527, 2004.

HAMAL, P.; DOSTÁL, J.; RACLAVSKÝ, V.; KRYLOVÁ, M.; PICOVÁ, I.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: Occurrence among clinical isolates. *Folia Microbiologica*, v. 49, p. 491-496, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, v. 9, p. 591-595, 2001.

- HINRICHSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÉGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p.394-398, 2008.
- HOOD, C.M.; HEALY, M.G. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 11, p. 179-188, 1994.
- HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; DOSTÁL, J.; MAJER, F.; HAVLÍKOVÁ, J.; HRADILEK, M.; PICHOVÁ, I. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 259–268, 2009.
- HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Revista Ibero-Americana de Micologia**, v.15, p. 68- 71, 1998.
- HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 336-34, 2004.
- HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 347–349, 2009.
- JAYTTILAKE, J.A.M. S.; TILAKARAYNE, W.M.; PANAGODA, G.J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 168, p.165–173, 2009.
- JAUTOVÁ, J.; VIRAGOVÁ, S.; ONDRASOVIC, M.; HOLODA, E. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. **Folia Microbiologica**, v. 46, p. 333-337, 2001.
- KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 984-988, 1995.
- KASZUBA, A.; SENECZKO, F.; LIPOWCZAN, G.; BIENIAS, L.; KOSTUSIAK, M.; LUPA, S. Fungal flora in human skin and skin appendages infections in the region of Poland. **Mycoses**, v. 41, p. 249-253, 1998.
- KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, p. 108-116, 2008.
- KIRKPATRICK, C.H. Chronic Mucocutaneous Candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, p. 448-456, 1989.
- KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255–267, 2004.
- KRETSCHMAR, M.; FELK, A.; STAIB, P.; SCHALLER, M.; HESS, D.; CALLAPINA, M.; MORSCHHAUSER, J.; SCHAFFER, W.; KORTING, H.C.; HOF, H.; HUBE, B.; NICHTERLEIN, T. Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1–6 of *Candida*

albicans are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 32, p.61–70, 2002.

KUHN, D.M.; CHANNDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 878-88, 2002.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; JYTSONA, C.; HAJJEH, R.A.; WARNOCK, D.R.S.; GHANNOUM, M.A. *Candida parapsilosis* characterization in a outbreak setting. **Past Issue**, v.10, p. 1074- 1081, 2004.

KUMAMOTO, C.A. Niche-Specific gene expression during *Candida albicans* infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 325-330, 2008.

KUMAR, C.P.G, KUMAR, S.S.J; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v.161, p. 213-218, 2006.

KWOK Y, K.C.; FAY, Y.K.; GOBL, C.L.; KAMARUDIN, A.; KOH, M.T.; SEOW, C.S. Epidemiology and *vitro* activity of antimycotics against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. **International Journal of Dermatology**, v.3, p.145-149, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEIS-VACCARI, E.M.; MELO,N.T. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Savier, 2002.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.M.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 3249–3254,1992.

LIN, D.M.; WU, L.C.; RINALDI, M.G.; LEHMANN, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1815–1821, 1995.

LIU, J.; LEI, P. Histopathologic and scanning electron microscope examination of the nail and hair in chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 49, p. 154-156, 2003.

LÓPEZ-MARTINEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 178–184, 2010.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971-2974, 2001.

MANNS, J.A.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5154-5156, 1994.

- MACDONALD, F.; ODDS, F.C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 431–438, 1983.
- MANZANO, P.; HERNÁNDEZ, F.; MÉNDEZ, T.L.J.; PALACIOS, M.Y.; CÓRDOVA, M.E.; BAZÁN, M.E. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v. 166, p. 41-5, 2008.
- MARR, K.A.; SEIDEL, K.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A. Candidemia in allogenic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 309-316, 1999.
- MARTINS, E.A.; GUERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; SOARES, M.M.C.; Almeida, M.T.G. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 596-598, 2007.
- MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO RDE, A.; ROCHA, M.F.; RABENHORST, S.H.; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 17–20, 2006.
- MELO, N.R.; TAGUCHI, H.; CULHARI, V.P.; KAMEI, K.; MIKAMI, Y.; SMITH, S.N.; VILELA, M.S. Oral candidiasis of HIV-infected children undergoing sequential HIV therapies. **Medical Micology**, v. 47, p.149-156, 2009.
- MERKEROVÁ, M.; DOSTÁL, J.; HRADILEK, M.; PICHOVÁ, I.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 1018–1026, 2006.
- MIRANDA, K.C.; ARAUJO, C.R.; KHRAIS, A.C.H.; LEMOS, J.A.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.H.; PASSOS, X.S.; FERNANDES, O.F. L.; SILVA, M.R.R. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p.123-128, 2005.
- MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 208-210, 2008.
- MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; SANGLARD, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357–368, 1994.
- MONOD, M.; HUBE, B.; HESS, D.; SANGLARD, D. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 144, p. 2731– 2737, 1998.

- MUGGE, C.; HAUSTEIN, U.F.; NENOFF, P. Causative agents of onychomycosis - a retrospective study. **Journal der Deutschen Dermatologischen. Gesellschaft**, v. 4, p. 218–228, 2006.
- MUJICA, M.T.; FINQUELIEVICH, J.L.; JEWTOUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 36, p. 107–112, 2004.
- NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.
- NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.R.; RODGERS, C.A.; WOODMAN, A.J.; CHALLACOMBE, S.J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, p. 3266–3280, 2008.
- NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. **Journal of Infection Chemotherapy**, v. 12, p. 132–138, 2006.
- NEGI, M.; TSUBOI, R.; MATSUI, T.; OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, p. 32–36, 1984.
- NG, K.P.; MADASAMY, M.; SAW, T.L.; BAKI A, H.E.J.; SOO-HOO, T.S. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 144, p.135–140, 1999.
- NG, K.P.; SAW, T. L.S.; NA, L.; SOO-HOO, T. S. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997–1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia**, v. 149, p. 141–146, 2001.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. 561–570, 2010.
- OKZUS, S.; SAHIN, I.; MUSTAFA, Y.; GULCAN, A.; YANUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.P. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Journal of Infections Diseases**, v. 60, p. 280–283, 2007.
- OLAECHEA, P. M.; PALOMAR, M.; LEON-GIL, C.; ALVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; OLLA-SALAS, J.; LEON-REGIDOR, M.A.; EPCAN Study Group . Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 323–30, 2004.

OLIVEIRA, M.T.; SPECIAN, A.F.L.; ANDRADE, C.G.T.J.; FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C.F. Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. **Micron**, v. 41, p. 604-608, 2010.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.Jr.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J.E.Jr.; FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBE, J.D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 503–535, 2009.

PARRY, D. A. D. Hard α -keratin intermediate filament chains: substructure of the n- and c-terminal domains and the predicted structure and function of the c-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, v. 122, p. 67-75, 1998.

PEREIRA, G.H.; MULLES, P.R.; SZESZS, M.W.; LEVIN, A.S.; MELHEM, M.S.C. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, p. 839-42, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N. ; SADER, H. S.; FLUIT, A. C. ; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3254–3259, 2001.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D.J.; International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 11–23, 2004.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 760–763, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NG, K.P.; COLOMBO, A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 842-849, 2008.

RAY, L.T.; PAYNE, D.C. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infection and Immunity**, v.58, p.508-514, 1990.

REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 729–759, 2004.

RICHTER, S.S.; GALASK, R.P.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2155-2162, 2005.

RODIER, M.H.; MOUDNI, B.E.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; DANIAULT, G.; JACQUEMIN, J.L. A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 205–210, 1999.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUCETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.

ROY, B.; MEYER, S.A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 216–218, 1998.

ROTA, J.F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.

RÜCHEL, R.; BONING, B.; BORG, M. Characterization of a Secretory Proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. **Infection and Immunity**, v. 53, p. 411-4119, 1986.

RUDY, S.J. Superficial fungal infections in children and adolescents. **Nurse Practice Forum**, v. 10, p. 56-66, 1999.

SANTOS, A.L.S.; SOARES, R.M.A. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine peptidase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 13–20, 2004.

SANTOS, A. L. S.; CARVALHO, I. M.; SILVA, B. A.; PORTELA, M. B.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 209-220, 2006.

SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H.; JANUSCHKE, E.; HUBE, B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during Experimental Infection of Human Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, p. 712-717, 2000.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C., BORELLI, C., HAMM, G.; HUBE, B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an

in vitro model of vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2758–2765, 2005.

SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. properties in aqueous systems. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 48, p. 4326-4334, 2000.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHUR, R.C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 221-230, 2001.

SEGAL, R.; KIMCHI, A.; KRITZMAN, A.; INBAR, R.; SEGAL, Z. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. **Mycoses**, v. 43, p. 349–353, 2000.

SHORR, A.F.; TABAK, Y.P.; JOHANNES, R.S.; SUN, X.; SPALDING, J. KOLLEF, M. H. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v.13, 2009. doi:10.1186/cc8110.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2004.

SILVA, E.H.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; AULER, M.E.; GIUDICE, M.C.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C.R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): Characteristics of the yeast isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, p. 349-353, 2007.

SHIN, J.H., F.S. NOLTE, C.J. MORRISON. Rapid identification of *Candida* species in blood culture by a clinically useful polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1454–1459, 1997.

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

STAIB, P.; LERMANN, U.; WARMUTH, J. B.; DEGEL, B.; WU`RZNER, R.; MONOD, M; SCHIRMEISTER, T. MORSCHHA`USER, J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 146–156, 2008.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*SAP1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726–4734, 2004.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.; GHELARDI E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1455–1462, 2007.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.M.; MOGAVERO, S.; MAJOROS, L.; SENESI, S.; CAMPA, M. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 2-11, 2010.

THIERRY, G.; MORIO, F.; LE PAPE, P.; GAY-ANDRIEU, F.; BARRE, O.; MIEGEVILLE, M. Prevalence of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in candidemia over a 5-year period at Nantes hospital and in vitro susceptibility to three echinocandins by E-test. **Pathologie Biologie**, doi: 10.1016/j.patbio.2010.07.019.

TRICK, W.E.; FRIDKIN, S.K.; EDWARDS, J.R.; HAJJEN, R.A.; GAYNES, R.P.; Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 35, p. 627-630, 2002.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUNK, J.D. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TSUBOI, R.; KURITA, R.; NEGI, M; OGAWA, H. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *Candida albicans*. The **Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, p. 438-440, 1985.

TSUBOI, R.; MATSUDA, K.; KO, I.J.; OGAWA, H. Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in insoluble stratum corneum-supplemented media. **Archive for Dermatology Research**, v. 281, p. 342-345, 1989.

VAN ASBECK, E.C.; HUANG, Y.C.; MARKHAM, A.N.; CLEMONS, K.; DAVID, A. Stevens *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, p. 287–293, 2007.

VAN ASBECK, E.C.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 283-309, 2009.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 341–350, 2002.

VEER, P.; PATWARDHAN, N.S.; DAMLE, A.S. Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 53–56, 2007.

VERMELHO, A.B.; MAZOTTO, A.M.; MELLO, A.C.N.; SILVA, F.; DUARTE, T. R.; MACRAE, A.; NISHIKAWA, M.M.; BON, E.P.S. Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity.

Mycopathologia, v. 169, p. 57-65, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. Three-dimensional structure of proteins. **Stiefel Journal Biochemistry**, 2^o ed. Wiley, New York, 1995.

WAGNER, D.K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 317–335, 1995.

WATANABE, T.H.; TANAKA, N.; NAKAO, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 350-353, 1997.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients, **Clinical and Infectious Diseases**, v. 20, p. 115-125, 1995.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p.272-276, 2007.

WU, T.; SAMARANAYAKE, L.P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 48, p. 711-720, (1999).

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

PARTE I

PROTEASES ÁCIDAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* EM
PRESENÇA DE SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

PROTEASES ÁCIDAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* EM PRESENÇA DE SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

1 INTRODUÇÃO

Espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* apresentam características que as permitem tanto colonizar quanto parasitar o hospedeiro humano. Determinados fatores predisponentes que levam a alteração do estado fisiológico ou imune do hospedeiro podem favorecer a mudança do estado comensal para um estado de patogenia, tornando-as capazes de causar um amplo espectro de infecções. Nestas condições, alguns isolados de *Candida* spp. têm a propriedade de expressar genes relacionados a patogenicidade propiciando o estabelecimento de infecções (revisado por HUBE, 2004; revisado por KOJIC, 2004; revisado por NUCCI, 2010).

Candida parapsilosis tem sido alvo de estudos devido sua alta incidência em infecções superficiais e invasivas. Apresenta-se como comensal de pele e espaço ungueal, podendo desenvolver infecção nestes locais, ou via porta de acesso, propagar-se a outros sítios anatômicos (revisado por TROFA et al., 2008). Entre as infecções superficiais, *C. parapsilosis* tem destaque nas dermatomicoses (NG et al., 1999; GAUTRET et al., 2000; SEGAL et al., 2000; GUPTA et al., 2003; MUJICA et al., 2004; BRILHANTE et al., 2005; MUGGE et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MANZANO et al., 2008; ROTA, 2008), apresentando-se como o segundo agente mais isolado em casos de onicomicose (revisado por TROFA et al., 2008).

As enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *Candida* spp. desempenham papel importante no estabelecimento da infecção. Dentre estas, destaca-se as aspartil proteases (Sap), as quais vêm sendo alvo de muitos estudos. Estas proteases podem degradar diversas proteínas do hospedeiro (RAY e PAYNE, 1990; revisado por YANG, 2003), disponibilizando nitrogênio para as células, além de desempenhar funções relacionadas à virulência. As Saps são responsáveis pela promoção de adesão a diversos tipos celulares e tecidos do hospedeiro, como mucosas dos tratos oral e vaginal e, tecidos epiteliais queratinizados. Estas proteases são capazes ainda de degradar queratina presente em tecidos cutâneos

facilitando a infecção nestes sítios (NEGI et al., 1984; TSUBOI et al., 1985; TSUBOI et al., 1989 RAY e PAYNE, 1990; SCHALLER et al., 2000).

Além disso, estas proteases causam destruição de células e moléculas do sistema imune (KAMINISHI et al., 1995; revisado por HUBE, 1998; DE BERNARDIS et al., 1997; FALLON et al., 1997).

Apesar do aumento da frequência de *C. parapsilosis* como agente de infecções, o papel das enzimas hidrolíticas na patogenicidade desta espécie ainda permanece obscuro (revisado por TROFA et al., 2008), particularmente em casos de micoses superficiais de pele e unha.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de proteases ácidas por isolados de *C. parapsilosis*, obtidos de lesão de pele, lesão de unha e secreção traqueal, na ausência e presença de substratos queratínicos (cabelo, pele e unha).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS

Neste estudo foram utilizados três isolados clínicos de *C. parapsilosis*, obtidos de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Tais isolados foram selecionados com base no sítio de isolamento: raspado de lesão de unha (isolado 150.06), secreção traqueal (isolado 205.06) e lesão de pele (isolado 220.07), os quais fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina.

A identificação da espécie dos isolados foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores para o gene *URA3* específico para a espécie *C. parapsilosis* (classificada anteriormente como grupo I de *C. parapsilosis*), o qual possibilita diferenciá-la das demais, *C. ortopsilosis* e *C. metapsilosis* (grupo II e III de *C. parapsilosis*, respectivamente), conforme descrito por Tavanti e colaboradores (2005).

2.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS E MEIOS DE CULTIVO

Os isolados de *C. parapsilosis* foram mantidos em meio Sabouraud Dextrose Líquido à 80C, sendo repicados a cada três meses para conservação e manutenção da viabilidade celular. Para a análise da produção de proteases foi utilizado o Meio de Sais (MS) descrito por El - Naghy e colaboradores (1998), com modificações, com as seguintes concentrações (g/L): K₂HPO₄ 1,5; MgSO₄.7H₂O 0,025; CaCl₂ 0,025; FeSO₄ 0,015; ZnSO₄ 0,005 e 1% de glicose, com e sem suplementação de substratos queratínicos 0,5% (cabelo - MSC, pele - MSP e unha - MSU). O pH do Meio de Sais foi ajustado para 5,0 com tampão citrato (1M) acrescido em 10% do volume final do meio de cultura.

2.3 OBTENÇÃO E PREPARO DOS SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

Os substratos queratínicos (cabelo, pele e unha) foram gentilmente cedidos por indivíduos saudáveis e processados para retirada de restos celulares e moléculas indesejáveis, tornando-se apenas fonte de queratina.

A pele (estrato córneo) foi processada como descrito por Gradisar e colaboradores (2000), com modificações. Primeiramente, as porções de pele foram retiradas da região plantar, e mergulhadas em etanol absoluto por 4 dias, com trocas diárias do solvente. Posteriormente o solvente foi retirado, as porções de pele foram lavadas com água destilada para retirada dos resíduos do etanol, os fragmentos foram secos a 50°C por 3 dias, e triturados em presença de nitrogênio líquido até obtenção de pó. O material foi novamente seco a 50°C, e por fim autoclavado a vapor fluente por 30 minutos, para então ser adicionado aos meios de cultura.

Os substratos queratínicos obtidos de unha e cabelo foram preparados como descrito por Friedrich e colaboradores (1999), com modificações. Inicialmente foi realizada a remoção de lipídeos empregando uma solução de clorofórmio-metanol (1:1) durante 4 dias, com trocas do solvente a cada 24 h. Posteriormente o solvente foi retirado, os fragmentos de unha e cabelo foram lavados com água destilada para retirada de resíduos e secos a 50°C por 3 dias. Em seguida, os pedaços de unha foram triturados em nitrogênio líquido até a obtenção de pó. O material foi novamente seco a 50°C. O cabelo foi cortado com auxílio de tesoura em pedaços menores. Por fim, os dois substratos foram autoclavados a vapor fluente por 30 minutos, para então serem adicionados aos meios de culturas.

2.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

O crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* foi avaliado pelo aumento da massa total de células inoculadas em Meio de Sais tamponado com tampão citrato (pH 5,0), na presença e ausência dos substratos queratínicos. Primeiramente foi realizado o pré-inóculo, obtido por sincronismo do cultivo (três crescimentos consecutivos em meio Sabouraud, por 18 horas, a 37°C, sob agitação de 180 rpm). A partir destas culturas, alíquotas de cada isolado foram inoculadas nos Meio de Sais com ausência e presença dos substratos queratínicos na concentração final de 10^4 células/mL. A avaliação do crescimento foi realizada diariamente durante 10 dias de incubação a 37°C/180rpm. Alíquotas de 200 μ L

foram retiradas para monitoramento por contagem celular em câmara de Neubauer. Os dados foram expressos em log do número de células/mL.

2.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEASES

2.5.1 Obtenção do Sobrenadante de Cultivo

Para a análise da produção de proteases primeiramente foi realizado o sincronismo do cultivo como descrito no item 2.4 Os inóculos foram ajustados, e adicionados aos de Meio de Sais tamponado com tampão citrato (pH 5,0) na concentração final de 10^4 células/mL na ausência e presença de substratos queratínicos, e incubados por 10 dias a $37^\circ\text{C}/180$ rpm. Após a incubação, os cultivos foram centrifugados a $4^\circ\text{C}/20.000$ rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram então separados dos sedimentos celulares e congelados para serem utilizados na determinação das atividades proteolíticas.

2.5.2 Ensaio da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi realizada conforme Braga-Silva e colaboradores (2009), com modificações. Dois substratos protéicos foram testados: hemoglobina bovina e o BSA (soro albumina bovino) ($0,5\text{mg/mL}$) adicionados em tampão citrato pH 3,5. O ensaio enzimático constituiu de $200\ \mu\text{L}$ da solução tampão-substrato e $50\ \mu\text{L}$ dos sobrenadantes de cultivo e incubação por 2 horas a 37°C . Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de $250\ \mu\text{L}$ de ácido tricloracético (TCA) $0,1\text{M}$ seguido de incubação por 1 hora a 4°C . A mistura de reação foi centrifugada a 10.000 rpm/10 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada em microplacas de poliestireno. Para tal, $150\ \mu\text{L}$ dos sobrenadantes de reação foram adicionados a $100\ \mu\text{L}$ de solução de Coomassie ($0,025\%$ Coomassie brilliant blue G-250, $11,75\%$ etanol, e $21,25\%$ ácido fosfórico). Após 10 minutos, tempo suficiente para a ligação do corante aos aminoácidos derivados da quebra da proteína (hemoglobina ou BSA), as leituras foram realizadas em $595\ \text{nm}$ (Asys HiTech UVM 340). O controle foi obtido nas mesmas condições, diferindo na ordem dos reagentes, primeiramente, adicionado $50\ \mu\text{L}$ do sobrenadante de reação

juntamente com 250 μL de TCA, somente após as 2 horas de incubação a 37°C foi adicionado 200 μL de solução tampão-substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que, em cada ensaio houve duplicata do teste e do controle para cada um dos 3 isolados de *C. parapsilosis*.

Uma unidade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância (595) em 0,001 unidades, nas condições descritas (BRAGA-SILVA et al., 2009). Os resultados das atividades proteolíticas foram expressos em U/mL.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

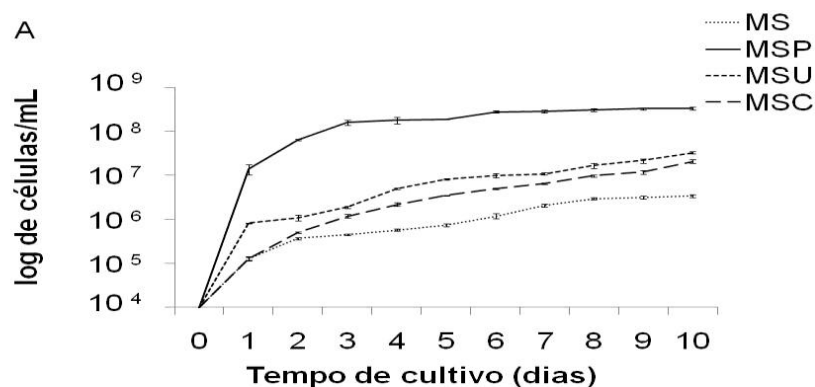
Para as análises estatísticas foi aplicado o teste t de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

No presente trabalho foi avaliada a cinética de crescimento dos isolados 150.06 (lesão de unha), 220.07 (lesão de pele) e 205.06 (secreção traqueal) de *C. parapsilosis* em MS (meio de sais), MS suplementado com pele (MSP), MS suplementado com unha (MSU) e MS suplementado com cabelo (MSC) como descrito no item 2.4.

Como demonstrado na Figura 1, os isolados apresentaram cinéticas de crescimento similares, sendo que em meio suplementado com estrato córneo (MSP) foi observado o maior valor de densidade celular (10^8 células/mL). Em presença de unha e cabelo a densidade celular foi inferior (10^7 células/mL), no entanto, o crescimento dos isolados foi relativamente superior em meio suplementado com unha em relação ao observado em meio suplementado com cabelo. Os menores valores de densidade celular (10^6 células/mL) foram observados em meio de sais (ausência de substrato protéico). Neste estudo, foi também verificado a formação de pseudo-hifas pelos três isolados analisados quando cultivados nos Meios de Sais suplementados com substratos queratínicos (dados não mostrados).



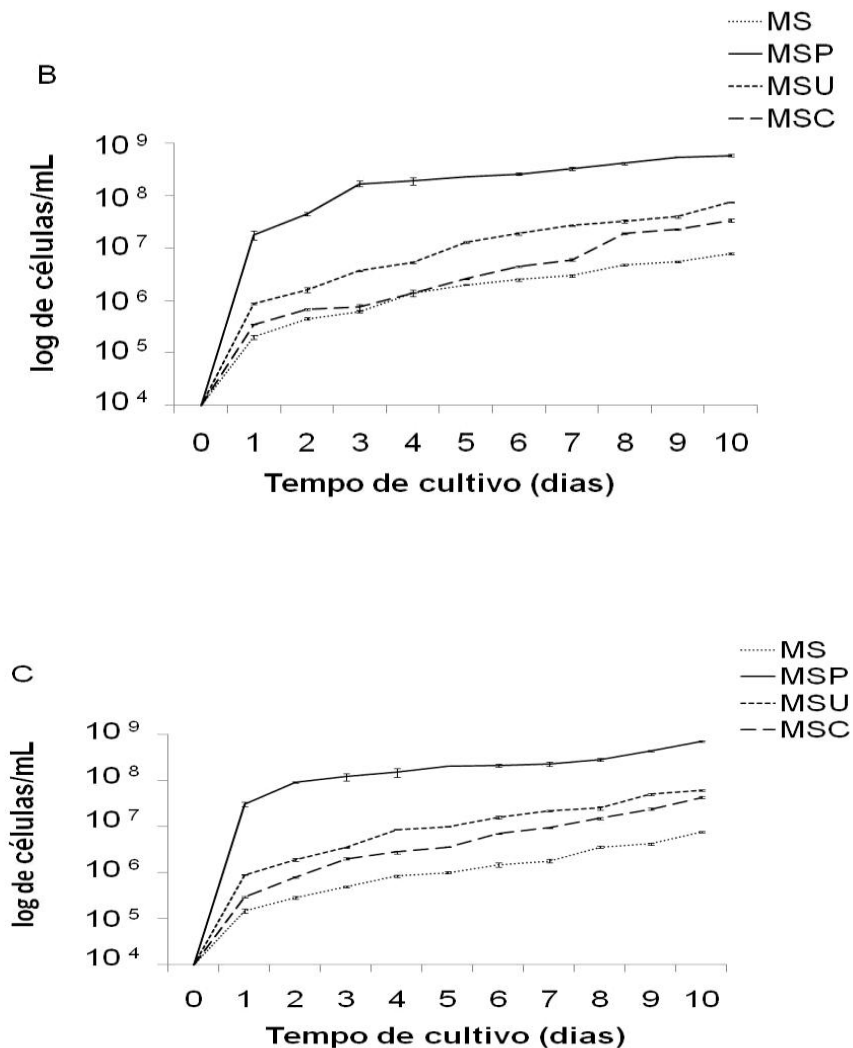


Figura 1 – Curva de crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* em meio de sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU), e cabelo (MSC). (A) 150.06, (B) 220.07 e (C) 205.06.

Estes resultados indicam que a fonte de substrato queratínico teve influência no crescimento populacional, uma vez que os três substratos apresentam diferenças quanto à composição da molécula de queratina. Os isolados de *C. parapsilosis* foram capazes de obter nutrientes (nitrogênio) mais facilmente pela quebra do estrato córneo, já que este é composto por queratina leve, comparativamente ao obtido pela quebra da queratina rígida componente da unha e do cabelo, sendo a queratina do cabelo ainda mais rígida devido ao maior número de resíduos de cisteína. No cultivo em MS ocorre estresse químico, resultando em crescimento populacional inferior ao observado em meios suplementados com substratos queratínicos. Observa-se ainda, que as maiores densidades celulares

ocorreram em tempos prolongados de cultivo, provavelmente devido à quebra da queratina ser um processo dispendioso, dependente da secreção de proteases e, por conseguinte absorção do nitrogênio pelas células viabilizando o crescimento populacional.

Até o momento, não há informações na literatura relativas à cinética de crescimento de isolados clínicos de *C. parapsilosis* cultivados em presença de substratos queratínicos de origem humana.

3.2 PRODUÇÃO DE PROTEASES ÁCIDAS EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SUBSTRATO QUERATÍNICO

Neste trabalho, a atividade proteolítica a partir de cultivo líquido dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06 de *C. parapsilosis* foi analisada após 10 dias de incubação em MS (meio de sais) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado hemoglobina bovina e BSA, como descrito no item 2.5.2.

A maioria dos trabalhos relativos a produção de proteases ácidas por *C. parapsilosis* se baseia em halo de degradação do substrato, normalmente BSA, em meio solidificado (WU e SAMARANAYAKE, 1999; KANTARCIOGLU et al., 2002; KUHN et al., 2004; HAMAL et al., 2004; BRAMONO et al., 2006; GOKCE et al., 2007; SILVA et al., 2007; MOHAN e BALLAL, 2008; FRANÇA et al., 2009; TAVANTI et al., 2010).

Neste trabalho, a produção de proteases ácidas foi avaliada por método quantitativo, sendo que a atividade proteolítica foi quantificada a partir de sobrenadantes de cultivo, mantidos em pH 5,0, empregando os substratos hemoglobina e BSA. O emprego de dois substratos para ação enzimática foi realizado a fim de avaliar se há uma atividade enzimática mais eficiente sobre determinado substrato.

Com base nos dados da curva de crescimento, levando-se em consideração a densidade celular, a produção de proteases foi primeiramente avaliada em tempos de cultivo distintos (3, 5, 7 e 10 dias), sendo que as maiores atividades foram obtidas em cultivos de 10 dias (dados não mostrados). Desta forma, a avaliação da produção de proteases ácidas pelos isolados de *C. parapsilosis* foi realizada neste tempo de cultivo.

Como observado na Figura 2, atividade proteolítica foi detectada em todas as condições de cultivos testadas (MS, MSP, MSU e MSC), com perfil enzimático semelhante em ambos substratos empregados no ensaio enzimático (hemoglobina e BSA).

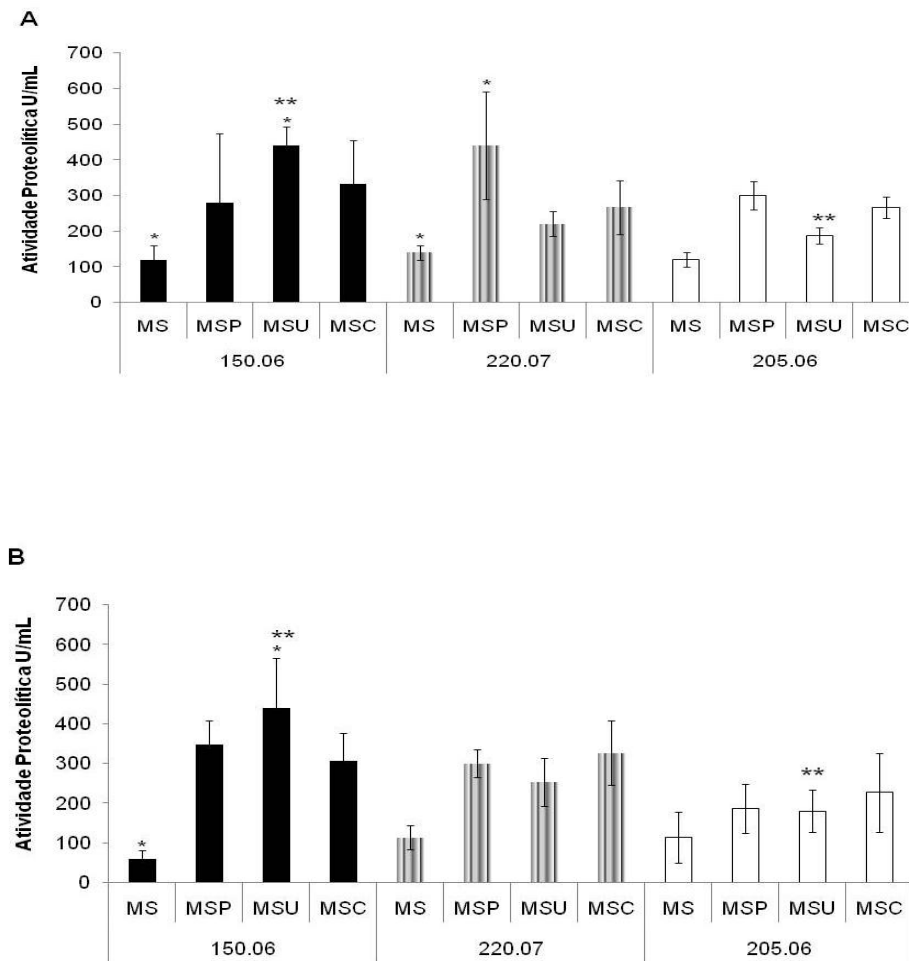


Figura 2 – Atividade proteolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06 de *C. parapsilosis* após crescimento em meio de sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) hemoglobina bovina, (B) BSA. Os valores são expressos em U/mL. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ para MSU vs MS (isolado 150.06) e MSP vs MS (isolado 220.07). ** $P < 0,05$ para isolado 150.06 vs 205.06 (meio MSU)

Os menores valores de atividade foram observados em meio MS (meio de sais), comparativamente aos dos cultivos suplementados com substratos queratínicos, sugerindo a produção destas proteases em níveis basais nesta condição de cultivo.

A produção de proteases pelo isolado de unha (150.06) (440 U/mL) após cultivo em MSU foi significativamente superior ao observado em MS (120 U/mL em hemoglobina e 60 U/mL em BSA) ($P < 0,05$), em ambos substratos testados (Figura 2A,B). Já a produção de proteases pelo isolado de lesão de pele (220.07) foi significativamente superior em meio suplementado com pele (MSP) (440 U/mL) comparativamente ao observado em meio de sais (140 U/mL) ($P < 0,05$) no substrato hemoglobina (Figura 2A). O isolado de secreção traqueal (205.06) não apresentou diferenças significativas na produção de proteases em função dos meios de cultivo testados (ausência e presença de substratos queratínicos) (Figura 2A,B).

Como observado na Figura 2, os isolados diferiram quanto à produção de proteases, sendo que os isolados de lesão de unha e de pele (150.06 e 220.07) apresentaram maiores atividades, para algumas condições de cultivo, comparativamente ao isolado de secreção traqueal (205.06).

Em meio suplementado com unha (MSU), a produção de proteases ácidas pelo isolado 150.06 foi significativamente superior a do isolado 205.06 ($P < 0,05$), em ambos substratos (hemoglobina e BSA) (Figura 2A,B).

Os dados obtidos indicam uma possível relação entre a produção de proteases ácidas e o sítio de isolamento das amostras clínicas de *C. parapsilosis*, pois em meios suplementados com unha e pele ocorreu produção aumentada de proteases ácidas pelos isolados de lesão de unha e pele, respectivamente.

O isolado de secreção traqueal (205.06) não apresentou diferença significativa na produção de proteases em relação ao meio de cultivo (ausência e presença de substratos queratínicos). Vale ressaltar que este isolado foi obtido de um sítio de colonização do trato respiratório. Segundo PAPPAS et al. (2009) a colonização por *Candida* spp é comum em pacientes internados submetidos à ventilação mecânica, sendo o quadro de infecção extremamente raro.

Os resultados obtidos demonstram diferentes perfis de produção de proteases entre isolados de *C. parapsilosis* obtidos de infecção (unha e pele) e de colonização.

Neste trabalho os resultados indicam, pela primeira vez, que isolados de *C. parapsilosis* expressam proteases ácidas quando cultivados na presença da queratina constituinte do cabelo, como única fonte de nitrogênio. Este dado faz-se interessante, já que isolados de *Candida* spp. não são identificados como agentes causais de infecções em cabelo, uma vez que a queratina rígida que

o compõe é uma barreira na defesa contra a grande maioria dos microrganismos. Exceto em casos de candidíase muco-cutânea crônica, a qual atinge, além de outros sítios anatômicos, o couro cabeludo, levando a perda definitiva de cabelo (KIRKPATRICK, 1989; revisado por WAGNE e SOHNLE, 1995; LACAZ, 2002; LIU e LEI, 2003; BHOWATE e A DUBEY, 2004; SIDRIM, 2004; LÓPEZ-MARTINEZ, 2010).

Ray e Payne (1990) avaliaram a produção de proteases ácida por seis espécies de *Candida* isoladas de infecção cutânea, entre elas *C. parapsilosis*. Além disso, eles avaliaram a secreção destas proteases ácidas por um isolado de *C. albicans* em meio de cultivo suplementado com diferentes fontes protéicas (BSA, albumina, hemoglobina, colágeno e queratina bovina), obtendo os maiores níveis de produção em meio suplementado com queratina. Estes autores sugerem que a produção de protease ácida por espécies de *Candida* isoladas de infecção cutânea, seja um potencial fator de virulência, o qual facilita a colonização e invasão da pele.

De Bernardis e colaboradores (1999) identificaram um perfil diferenciado na secreção de proteases aspárticas (Saps) por isolados clínicos de *C. parapsilosis*, em função do sítio de isolamento. Segundo os autores, os isolados de pele produziram quatro vezes mais Saps comparativamente aos isolados obtidos de sangue. Desta forma, os autores sugerem que o potencial apresentado por esta espécie em causar infecção superficial esta fortemente relacionada com a produção de Sap, diferentemente da infecção sistêmica, na qual a produção de Sap não é essencial para o estabelecimento da infecção.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a origem dos isolados de *C. parapsilosis*, sendo de colonização e infecção, a ausência e presença de substratos queratínicos e, a estrutura de queratina que os compõem, refletem diferenças na produção de proteases. Desta maneira, pode-se postular que a expressão de proteases ácidas por *C. parapsilosis* possa ser aumentada em processos infecciosos de pele e unha.

REFERÊNCIAS

- BHOWATE, R.; DUBEY, A. Chronic Mucocutaneous Candidiasis: A Case Report. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 22, p. 21-23, 2004.
- BRAGA-SILVA, L.A.; MESQUITA, D.G.A.; RIBEIRO, M.D.; CARVALHO, S.M.F.; FRACALANZZA, S.E.L.; SANTAS, A.L.S. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 765-770, 2009.
- BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 59, p. 73-76, 2006.
- BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.A.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S.P.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J.C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.5, p.100-131, 2005.
- DE BERNARDIS, F.; LORENZINI, R.; VERTICCHIO, R.; AGATENSI, L.; CASSONE, A. Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2598-2603, 1989.
- DE BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M., ADRIANI, D.; SPREGHINI, E.; SANTONI, G.; CASSONE, A. Protective role of antimannan and anti-aspartic proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3399-3405, 1997.
- DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLÀN, R.; PONTÒN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, 3481-3486, 1999.
- EI-NAGHY, M.A.; EI-KTATNY, M.S.; FADL-ALLAH, E.M.; NAZEER, W. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. **Mycopathologia**, v.143, p. 77-84, 1998.
- FALLON, K.; BAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E; TAMBURINI, P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 551-556, 1997.
- FIGUEIREDO, V.T.; SANTOS, D.A.; RESENDE, M.A.; HAMDAN, J.S. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v.164, p. 27-33, 2007.
- FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R.M.B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, DOI:10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x, 2010.
- FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p. 127-130, 1999.

- FUSEK, M.; SMITH, E. A.; MONODB, M.; FOUNDLING, S.I. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 327, p. 108-112, 1993.
- GAUTRET, P.; RODIER, M.H.; LACROIX, K.C.; JACQUEMIN, J.L. Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, v.43, p.433-435, 2000.
- GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p.265-269, 2007.
- GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p.196-200, 2000.
- GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; BARAN, R.; SUMMERBELL, RC. Non-dermatophyte onychomycosis. **Dermatology Clinical**, v. 21, p. 257–68, 2000.
- HAMAL, P.; DOSTÁL, J.; RACLAVSKÝ, V.; KRYLOVÁ, M.; PICHOVÁ, I.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: Occurrence among clinical isolates. **Folia Microbiologica**, v. 49, p. 491-496, 2004.
- HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; DOSTÁL, J.; MAJER, F.; HAVLÍKOVÁ, J.; HRADILEK, M.; PICHOVÁ, I. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 259–268, 2009.
- HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Revista Ibero-Americana de Micologia**, v.15, p. 68- 71, 1998.
- HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 336-34, 2004.
- KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 984-988, 1995.
- KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p. 160-165, 2002.
- KHAN, Z.K.; GIANCHANDANI, A. Candidiasis – a review. **PINSA**, v. 64, p. 1-34, 1998.
- KIRKPATRICK, C.H. Chronic Mucocutaneous Candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** , v. 8, p. 448-456, 1989.
- KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255–267, 2004.
- KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; JYTSONA, C.; HAJJEH, R.A.; WARNOCK, D.R.S.; GHANNOUM, M.A. *Candida parapsilosis* characterization in a outbreak setting. **Past Issue**, v.10, p. 1074- 1081, 2004.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEIS-VACCARI, E.M.; MELO,N.T. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Savier, 2002.

- LIU, J.; LEI, P. Histopathologic and scanning electron microscope examination of the nail and hair in chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 49, p. 154-156, 2003.
- LÓPEZ-MARTINEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 178–184, 2010.
- MANZANO, P.; HERNÁNDEZ, F.; MÉNDEZ, T.L.J.; PALACIOS, M.Y.; CÓRDOVA, M.E.; BAZÁN, M.E. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v. 166, p.41-5, 2008.
- MARTINS, E.A.; GUERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; SOARES, M.M.C.; Almeida, M.T.G. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 596-598, 2007.
- MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 208-210, 2008.
- MUGGE, C.; HAUSTEIN, U.F.; NENOFF, P. Causative agents of onychomycosis - a retrospective study. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, p. 218–228, 2006.
- MUJICA, M.T.; FINQUELIEVICH, J.L.; JEWUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 36, p. 107–112, 2004.
- NEGI, M.; TSUBOI, R.; MATSUI, T.; OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. **Journal Investigative Dermatology**, v. 83, p. 32-36, 1984.
- NG, K.P.; MADASAMY, M.; SAW, T.L.; BAKI A, H.E.J.; SOO-HOO, T.S. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 144, p.135-140, 1999.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. 561–570, 2010.
- PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.Jr.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J.E.Jr.; FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBE, J.D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 503–535, 2009.
- RAY, L.T.; PAYNE, D.C. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 508-514, 1990.
- ROTA, J.F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.
- SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H.; JANUSCHKE, E.; HUBE, B. Invasion of *Candida albicans* Correlates with Expression of Secreted Aspartic

- Proteinases during Experimental Infection of Human Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, p. 712-717, 2000.
- SEGAL, R.; KIMCHI, A.; KRITZMAN, A.; INBAR, R.; SEGAL, Z. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. **Mycoses**, v. 43, p.349–353, 2000.
- SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2004.
- SILVA, E.H.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; AULER, M.E.; GIUDICE, M.C.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C.R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): Characteristics of the yeast isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, p. 349-353, 2007.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.
- TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.M.; MOGAVERO, S.; MAJOROS, L.; SENESI, S.; CAMPA, M. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology**, v. 10, 2-11, 2010.
- TROFA, D.; GÁCSEER, A.; NOSANCHUNK, J.D. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, p. 606-625, 2008.
- TSUBOI, R.; KURITA, R.; NEGI, M; OGAWA, H. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *Candida albicans*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, p. 438-440, 1985.
- TSUBOI, R.; MATSUDA, K.; KO, I.J.; OGAWA, H. Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in insoluble stratum corneum-supplemented media. **Archive for Dermatology Research**, v. 281, p. 342-345, 1989.
- WAGNER, D.K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 317–335, 1995.
- WU, T.; SAMARANAYAKE, L.P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 48, p. 711-720, (1999).
- YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 223-228, 2003.

PARTE II

PROTEASES QUERATINOLÍTICA SECRETADAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA*
PARAPSILOSIS

PROTEASES QUERATINOLÍTICA SECRETADAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*

1 INTRODUÇÃO

Dermatófitos e leveduras do gênero *Candida* são os principais patógenos causadores de micoses superficiais de pele e unha (WAGNER e SOHNLE, 1995).

Dentre as leveduras, *Candida parapsilosis* é a espécie mais freqüentemente isolada destes sítios (DANING et al., 1998; KASZUBA et al., 1998; KWOK et al., 1998; ABU-ELTEEN, 1999; NG et al., 1999; RUDY, 1999; GAUTRET et al., 2000 ; SEGAL et al., 2000; JAUTOVÁ et al., 2001; DORKO et al., 2002; GUPTA et al., 2003; MUJICA et al., 2004; BRILHANTE et al., 2005; MUGGE et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MANZANO et al., 2008; ROTA, 2008; JAYATILAKE et al., 2009; GODOY-MARTINEZ et al., 2009).

Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* apresenta acentuada capacidade de adesão e de formação biofilme em superfícies abióticas, características estas que têm sido correlacionadas com a emergência desta espécie em processos infecciosos (revisado por TROFA et al., 2008). Recentemente, Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram pela primeira vez em *C. parapsilosis* a ocorrência de adesão e formação de biofilme em apêndices cutâneos (unha e cabelo).

A queratina é uma proteína estrutural, que confere impermeabilidade e resistência às enzimas hidrolíticas e aos agentes físicos e químicos. Portanto é o principal constituinte dos tecidos que revestem a superfície corpórea. Desta forma, epitélios queratinizados são hostis à colonização por grande parte dos micro-organismos, e ainda, menor é a parcela de patógenos capazes de causar infecções nestes sítios (WAGNER e SOHNLE, 1995).

Segundo revisado por Wagner e Sohnle (1995), fungos dermatófitos e *Candida* spp. têm sucesso como agentes de dermatomicoses pelo fato de produzirem enzimas queratinolíticas (queratinases), as quais hidrolisam a queratina, propiciando a invasão do tecido e estabelecimento da infecção, além de disponibilizar aminoácidos para serem utilizados como nutriente.

Diversas queratinases produzidas por dermatófitos já foram purificadas e caracterizadas, sendo a grande maioria destas, proteases alcalinas pertencentes às classes serino e metalo-proteases (MONOD, 2008). Entretanto, até o momento são poucos os dados relativos à produção de proteases com atividade queratinolítica por espécies do gênero *Candida*, sendo a maioria relacionada a isolados de *C. albicans*.

Nos primeiros trabalhos realizados, estas enzimas foram caracterizadas como proteases ácidas, cuja produção foi induzida pela presença de queratina no meio de cultivo (NEGI et al., 1984; TSUBOI et al., 1985; TSUBOI et al., 1989). Trabalhos subseqüentes classificaram-nas como pertencentes à classe das aspartil proteases, e correlacionaram a produção dessas proteases com a virulência, as quais facilitam a colonização e, invasão dos tecidos cutâneos para estabelecimento da infecção (RAY e PAYNE 1990, SCHAELLER et al., 2000).

Schaeffer e colaboradores (2000) analisaram a expressão de genes SAPs por *C. albicans* em modelo de reconstituição da epiderme. Segundo estes autores, as proteases aspárticas (Saps) estão intimamente relacionadas com o processo de colonização e infecção cutânea, sendo que as isoenzimas Sap1 e Sap2 preferencialmente, contribuem para atividade queratinolítica.

Mais recentemente, Vermelho e colaboradores (2009) identificaram uma protease com atividade queratinolítica pertencente à classe das serino proteases produzida por um isolado de *C. parapsilosis*, coletado de resíduos de pena. No entanto, como o isolado é de origem ambiental, estudos com isolados clínicos são de suma importância para avaliar uma possível correlação entre a produção destas proteases e o processo de patogênese.

O presente trabalho teve como objetivos analisar a produção de proteases queratinolíticas por isolados clínicos de *C. parapsilosis*, coletados de sítios anatômicos distintos, e avaliar o perfil de interação dos isolados com substratos queratínicos de origem humana.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizados três isolados clínicos de *C. parapsilosis*, obtidos de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Tais isolados foram selecionados com base no sítio de isolamento: raspado de lesão de unha da mão (isolado 150.06), secreção traqueal (isolado 205.06) e lesão de pele (isolado 220.07), os quais fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina.

A identificação da espécie dos isolados foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores para o gene *URA3* específico para a espécie *C. parapsilosis* (classificada anteriormente como grupo I de *C. parapsilosis*), o qual possibilita diferenciá-la das demais, *C. ortopsilosis* e *C. metapsilosis* (grupo II e III de *C. parapsilosis*, respectivamente), conforme descrito por Tavanti e colaboradores (2005).

2.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS E MEIOS DE CULTIVO

Os isolados de *C. parapsilosis* foram mantidos meio Sabouraud Dextrose Líquido à 8°C, sendo repicados a cada três meses para conservação e manutenção da viabilidade celular. Para a análise das atividades enzimáticas foi utilizado o Meio de Sais (MS) descrito por El - Naghy e colaboradores (1998) modificado, com as seguintes concentrações (g/L): K₂HPO₄ 1,5; MgSO₄.7H₂O 0,025; CaCl₂ 0,025; FeSO₄ 0,015; ZnSO₄ 0,005 e 1% de glicose, com e sem suplementação de substratos queratínicos 0,5% (cabelo - MSC, pele - MSP e unha - MSU). Os pHs dos Meios de Sais foram ajustados para 8,0 e 5,0 com tampão fosfato pH 8,0 (1M) acrescido como solvente do meio de cultura, e com tampão citrato pH 5,0 (1M) acrescido em 10% do volume final do meio de cultura.

2.3 OBTENÇÃO E PREPARO DOS SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

Os substratos queratínicos (cabelo, pele e unha) foram gentilmente cedidos por indivíduos saudáveis e processados para retirada de restos celulares e moléculas indesejáveis, tornando-se apenas fonte de queratina.

A pele (estrato córneo) foi processada como descrito por Gradisar e colaboradores (2000), com modificações. Primeiramente, as porções de pele foram retiradas da região plantar, e mergulhadas em etanol absoluto por 4 dias, com trocas diárias do solvente. Posteriormente o solvente foi retirado, as porções de pele foram lavadas com água destilada para retirada dos resíduos do etanol, os fragmentos foram secos a 50°C por 3 dias, e triturados em presença de nitrogênio líquido até obtenção de pó. O material foi novamente seco a 50°C, e por fim autoclavado a vapor fluente por 30 minutos, para então ser adicionado aos meios de cultura.

Os substratos queratínicos obtidos de unha e o cabelo foram preparados como descrito por Friedrich e colaboradores (1999), com modificações. Inicialmente foi realizada a remoção de lipídeos empregando uma solução de clorofórmio-metanol (1:1) durante 4 dias, com trocas do solvente a cada 24 h. Posteriormente o solvente foi retirado, os fragmentos de unha e cabelo foram lavados com água destilada para retirada de resíduos e secos a 50°C por 3 dias. Em seguida, os pedaços de unha foram triturados em nitrogênio líquido até a obtenção de pó. O material foi novamente seco a 50°C. O cabelo foi cortado com auxílio de tesoura em pedaços menores. Por fim, os dois substratos foram autoclavados a vapor fluente por 30 minutos, para então serem adicionados aos meios de culturas.

2.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

O crescimento dos isolados de *C. parapsilosis* foi avaliado pelo aumento da massa total de células inoculadas em Meio de Sais como descrito no item 2.2, na presença e ausência dos substratos queratínicos. Primeiramente foi realizado o pré-inóculo, obtido por sincronismo do cultivo (três crescimentos consecutivos em meio Sabouraud, por 18 horas, a 37°C, sob agitação de 180 rpm). A partir destas culturas, alíquotas de cada isolado foram inoculadas em Meio de Sais tamponado com Tampão Citrato (pH 5,0) e com Tampão Fosfato (pH 8,0) na concentração final de 10⁴ células/mL. A avaliação do crescimento foi realizada diariamente durante 10 dias de incubação a 37°C/180rpm. Alíquotas de 200 µL foram retiradas para monitoramento por contagem celular em câmara de Neubauer. Os dados foram expressos em log do número de células/mL.

2.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEASES

2.5.1 Obtenção do Sobrenadante de Cultivo

Para a análise da produção de proteases primeiramente foi realizado o sincronismo do cultivo descrito como no item 2.4. Os inóculos foram ajustados, e adicionados aos de Meio de Sais tamponado com tampão citrato (pH 5,0), e com Tampão Fosfato (pH 8,0) na concentração final de 10^4 células/mL, na ausência e presença de substratos queratínicos, e incubados por 10 dias a 37°C/180 rpm. Após a incubação, os cultivos foram centrifugados a 4°C/20.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram então separados dos sedimentos celulares e congelados para serem utilizados na determinação das atividades queratinolíticas.

2.5.2 Ensaio da Atividade Queratinolítica

A atividade queratinolítica foi determinada como descrito pela literatura (BRESSOLIER et al.,1999; GRADISAR et al.,2000; BRAGA-SILVA et al., 2009), com modificações.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em dois pHs distintos (5,0 e 8,0) empregando-se dois substratos queratínicos: queratina-azure (0,4mg/mL) (Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, France), e o estrato córneo (0,4mg/mL). O ensaio enzimático constituiu de 350 µL de cada tampão-substrato: tampão citrato 0,1M pH 5,0 e tampão fosfato pH 8,0 e 350 µL dos sobrenadantes de cultivo, e incubação por 24h a 37°C/180 rpm. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido tricloracético (TCA) 0,1M seguido de incubação por 30 min a 4°C. A mistura de reação foi centrifugada a 10.000 rpm/10 minutos.

A leitura espectrofotométrica foi realizada em microplacas de poliestireno. Para tal, 150 µL dos sobrenadantes de reação foram adicionados a 100 µL de solução de Coomassie (0.025% Coomassie brilliant blue G-250, 11.75% etanol, e 21.25% ácido fosfórico). Após 10 minutos, tempo suficiente para a ligação do corante aos aminoácidos derivados da quebra protéica, as leituras foram realizadas em 595 nm (Asys HiTech UVM 340). Como a queratina-azure é proveniente da ligação entre queratina extraída de lã de carneiro com corante azul de bromofenol, a etapa acima não foi necessária, os sobrenadantes de reação

providos desta fonte de queratina puderam, diretamente, ser lidos em 595 nm (Asys HiTech UVM 340).

O controle foi obtido nas mesmas condições, diferindo na ordem dos reagentes, primeiramente, adicionado 350 µL do sobrenadante de reação juntamente com 300 µL de TCA, somente após 24 horas de incubação a 37°C foi adicionado 350 µL de solução de cada tampão-substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que, em cada ensaio houve duplicata do teste e do controle para cada um dos 3 isolados de *C. parapsilosis*.

Uma unidade queratinolítica (U), foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância (595) em 0,001 unidades nas condições testadas. Os resultados das atividades queratinolíticas foram expressos em U/mL.

2.6 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* COM OS SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

Com a finalidade de observar o perfil de interação dos isolados de *C. parapsilosis* com os substratos queratínicos (cabelo, extrato córneo e unha) foi empregada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para tal, células/substratos resultantes de cultivos (pH 5,0) de 10 dias foram fixados com glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 18 horas a 4°C. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, foi realizada pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 1 hora. Os materiais foram novamente lavados com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e, desidratados por série alcoólica de concentração crescente (etanol 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto). Na sequência, os materiais foram secos ao ponto crítico (BALTEC SDC 030 Critical Point Dryer), recobertos com uma camada de ouro 25 nm de espessura (BALTEC SCD 050 Sputter Coater), e observados no Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas empregando-se o teste t de Tukey com auxílio do programa SPSS versão 17.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

No presente trabalho foi avaliada a cinética de crescimento dos isolados 150.06 (lesão de unha), 220.07 (lesão de pele) e 205.06 (secreção traqueal) de *C. parapsilosis* em MS (meio de sais), MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC) em dois pHs (5,0 e 8,0), como descrito no item 2.4.

Como observado na Figura 1, os isolados apresentaram cinéticas de crescimento similares nos diferentes meios testados, no entanto, o crescimento populacional variou em função do pH do cultivo.

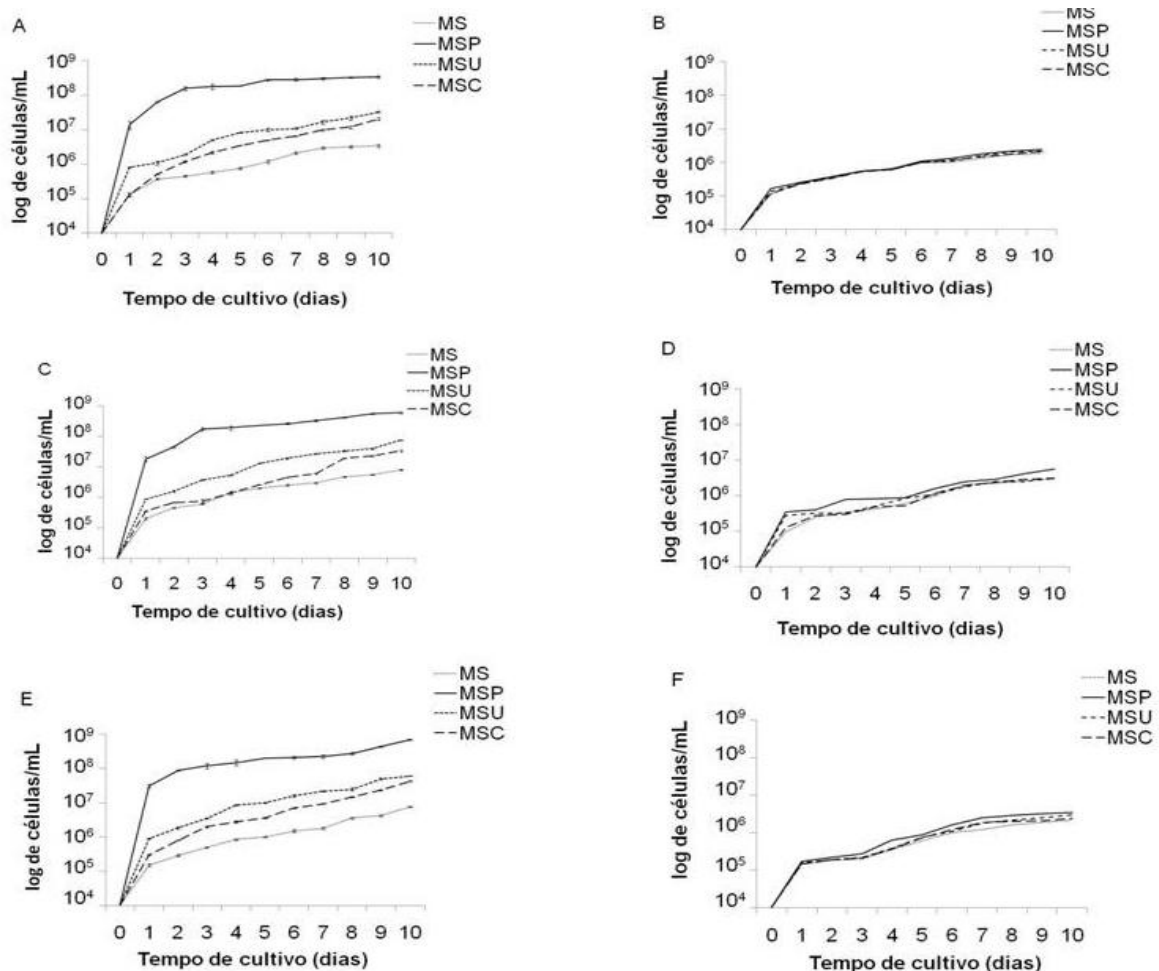


Figura 1 – Curva de crescimento dos isolados de *Candida parapsilosis* em Meio de Sais (MS) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) isolado 150.06 cultivo pH 5,0; (B) isolado 150.06 cultivo pH 8,0; (C) isolado 220.07 cultivo pH 5,0; (D) isolado 220.07 cultivo pH 8,0; (E) isolado 205.06 cultivo pH 5,0; (F) isolado 205.06 cultivo pH 8,0.

As maiores densidades celulares foram observadas nos cultivos em pH 5,0, para os três isolados, comparativamente ao observado nos cultivos em pH 8,0 (Figura 1A,C,E). Além disso, nos cultivos em que o pH foi ajustado para 8,0 as células apresentaram-se de tamanho reduzido, e predominantemente no formato de blastoconídeos (dados não mostrados). Já o cultivo em pH 5,0 as células não apresentaram alteração de tamanho e se diferenciaram em pseudo-hifas nos meios suplementados com substratos queratínicos (MSP, MSU e MSP). No meio sem suplementação (MS) também não foi observada diferenciação em pseudo-hifas (dados não mostrados).

Nos cultivos em pH 5,0 ocorreu diferenças quanto a cinética de crescimento em função da fonte de substrato queratínico (Figura 1A,C,E). Em meio suplementado com pele (MSP), a qual é constituída de queratina do tipo leve, foi observada densidade celular de até 108 células/mL. Em presença de unha e cabelo, constituídos de queratina do tipo rígida, a densidade celular foi inferior (107 células/mL), sendo superior em meio suplementado com unha. Os menores valores de densidade celular foram observados em meio sem suplementação (106 células/mL). Estes resultados demonstram diferenças no crescimento populacional dos três isolados analisados em função dos constituintes do meio de cultivo, particularmente em função da constituição dos substratos queratínicos.

Já para os cultivos em pH 8,0, a densidade celular não variou em função dos meios de cultivo (MS, MSP, MSU e MSC) a qual foi de 106 células/mL (Figura 1B,D,F).

Esses dados demonstram que o pH do meio de cultivo foi determinante para o crescimento populacional e diferenciação morfológica, sendo o pH 5,0 ideal para o cultivo dos isolados analisados, nas condições testadas. Vermelho e colaboradores (2009) também relataram a ocorrência de maiores taxa de crescimento de um isolado ambiental de *C. parapsilosis* em pH ácido (5,5) em presença de pena como substrato queratínico.

A determinação do pH 5,0 como ótimo para crescimento foi confirmada nas primeiras experimentações deste trabalho. Inicialmente, o pH dos meios de cultivo foi ajustado para pH 8,0, sem tamponamento, sendo que após 10 dias de cultivo, havia ocorrido acidificação do meio (pH entre 5,0 e 6,0). Em vista disto, as cinéticas de crescimento foram repetidas, com tamponamento dos meios de cultivo na faixa de pH desejada como descrito no item 2.4.

3.2 ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA

A atividade queratinolítica foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultivos provenientes dos meios MS (meio de sais) e MS suplementado com pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC) nos pHs 5,0 e 8,0, dos isolados de *C. parapsilosis* 150.06 (lesão de unha), 220.07 (lesão de pele) e 205.06 (secreção traqueal). Para os ensaios enzimáticos foram utilizados dois substratos, a queratina azure e o estrato córneo, como descrito no item 2.5.2.

Em todos sobrenadantes avaliados foi detectada atividade queratinolítica. Entretanto, os valores das atividades variaram entre os isolados, em relação ausência e presença de substratos queratínicos e pH de cultivo (Figura 2).

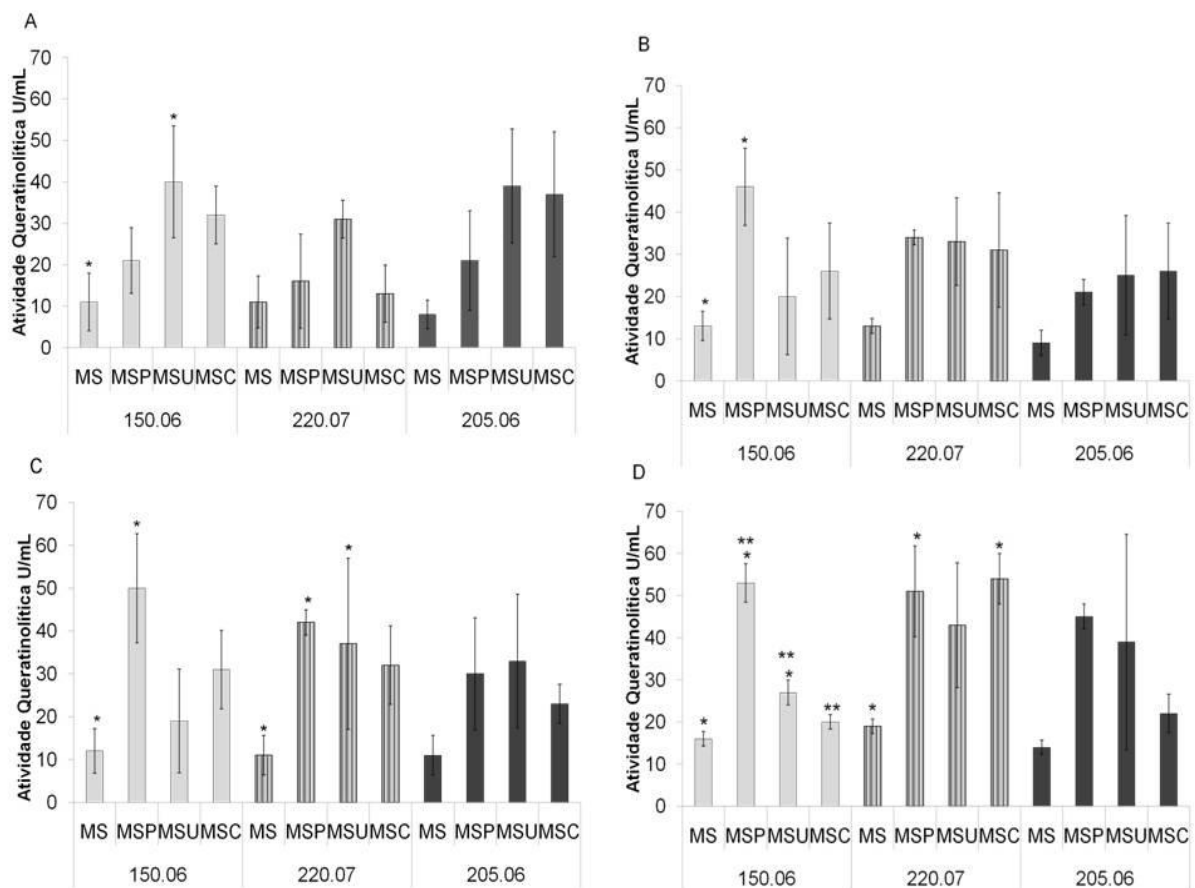


Figura 2 - Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após cultivo em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). (A) cultivo em pH 5,0 e ensaio com queratina azure; (B) cultivo em pH 8,0 e ensaio com queratina azure; (C) cultivo em pH 5,0 e ensaio com estrato córneo; (D) cultivo em pH 8,0 ensaio e com estrato córneo. *P < 0,05 para MS vs demais meios, para cada isolado individualmente; ** P < 0,05 para MSP vs demais meios, para cada isolado individualmente.

Os menores valores de atividade foram observados em meio MS (meio de sais), comparativamente aos dos cultivos suplementados com substratos queratínicos, sugerindo a produção de queratinases em níveis basais nesta condição de cultivo (Figura 2).

Considerando as variáveis utilizadas nos experimentos, a produção diferencial de proteases com atividade queratinolítica, foi mais expressiva para o isolado de lesão de unha (150.06).

A produção destas proteases, avaliada no substrato queratina azure, pelo isolado de unha (150.06) após cultivo em MSU tamponado em pH 5,0 foi significativamente superior ao observado em MS ($P < 0,05$) (Figura 2A). Já no meio suplementado com pele (MSP) em pH 8,0, a produção destas proteases, avaliada em queratina azure, foi significativamente superior ao observado em MS ($P < 0,05$) (Figura 2B). Este mesmo perfil de expressão aumentada foi observado em MSP, em pH 5,0, avaliada em estrato córneo ($P < 0,05$) (Figura 2C). Um perfil distinto de expressão foi observado em cultivos conduzidos em pH 8,0 e atividade avaliada em estrato córneo. Nesta condição de cultivo, as maiores atividades queratinolíticas foram observadas em meios MSP, comparativamente ao observado em MS, MSU e MSC ($P < 0,05$) (Figura 2 D). Estes dados evidenciam que, a indução da produção de proteases queratinolíticas no isolado de lesão de unha ocorreu em presença dos substratos queratínicos unha e pele. Além disso, sugere-se que esta indução seja dependente do pH de cultivo.

O isolado de lesão de pele (220.07) apresentou um perfil distinto de regulação (Figura 2). Diferenças significativas na produção de queratinases, em função do meio de cultivo, foram observadas somente quando a atividade enzimática foi avaliada em estrato córneo. Nesta condição, a produção destas proteases após cultivo em MSP e MSU tamponados em pH 5,0 foi significativamente superior ao observado em MS ($P < 0,05$) (Figura 2C). Já a produção destas proteases em meios tamponados em pH 8,0, valores significativo de produção foram observados em meios MSP e MSC (Figura 2D).

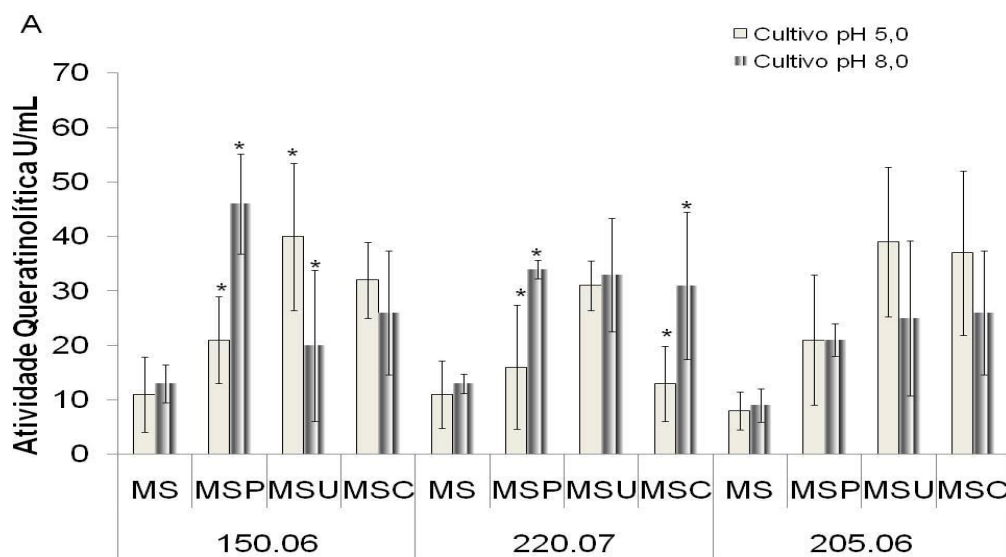
Estes resultados indicam que a produção de queratinases pelo isolado de lesão de pele é induzida pelos três substratos queratínicos presentes no meio de cultivo (pele, unha e cabelo), sendo esta produção também dependente do pH do meio. Além disso, observa-se que as enzimas produzidas por este isolado não

têm afinidade por queratina azure, uma vez que as atividades significativas foram detectadas somente quando do emprego de estrato córneo.

Já o isolado de secreção traqueal (205.06) não apresentou produção diferencial de queratinases, independente da presença ou ausência de substrato queratínico no meio de cultivo, do pH de cultivo e do substrato empregado na avaliação da atividade enzimática ($P>0,05$) (Figura 2).

Interessante destacar que a indução da produção de proteases queratinolíticas foi observada somente em isolados de infecção (unha e pele), não ocorrendo no isolado de colonização (colonização do trato respiratório).

A Figura 3 mostra a produção diferencial de proteases em função dos pHs de cultivo. A atividade queratinolítica, avaliada no substrato queratina azure, no cultivo do isolado 150.06 em meio MSP, foi significativamente superior ($P<0,05$) ao do cultivo em pH 8,0 (Figura 3A). Já o meio suplementado com unha (MSU) a atividade foi superior no cultivo em pH 5,0 ($P<0,05$).



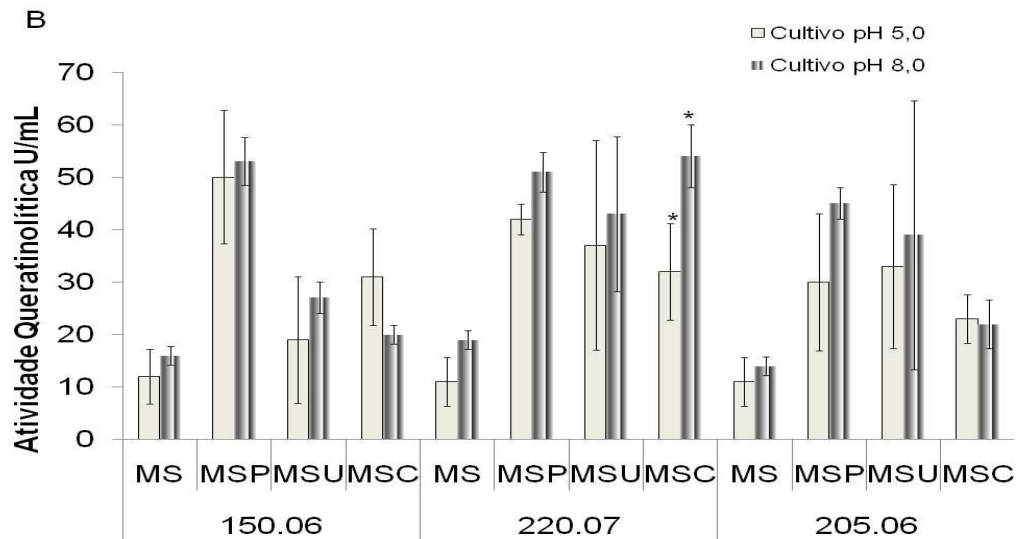


Figura 3 – Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após cultivo em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC), pH 5,0 e 8,0. (A) ensaio enzimático com queratina azure; (B) ensaio enzimático com estrato córneo. * Diferença significativa entre os pHs de cultivo para determinado isolado e meio de cultivo ($P < 0,05$).

Para o isolado 220.07 os maiores valores de atividade queratinolítica ($P < 0,05$), avaliada em ambos substratos, foram observados em cultivos em pH 8,0 MSP e MSC (Figura 3A,B). Como já mencionado, para o isolado 205.06 o pH de cultivo não parece interferir na produção de proteases com atividade queratinolítica.

Vale ressaltar que embora o pH 8,0 não pareça ser o mais adequado para o crescimento nas condições testadas, os cultivos em pH 8,0 resultaram em produção aumentada de proteases queratinolíticas pelos isolados de infecção, em determinados meios de cultivo, comparativamente aos cultivos em pH 5,0. Assim como observado por De Bernardis e colaboradores (1998), os resultados deste trabalho indicam que o pH parece interferir na expressão de genes essenciais para a sobrevivência e estabelecimento da infecção.

O emprego de dois substratos, queratina azure e estrato córneo, propiciou a verificação de que queratinases produzidas pelos diferentes isolados, em determinadas condições de cultivo, apresentam afinidade distinta por estes substratos (Figura 4).

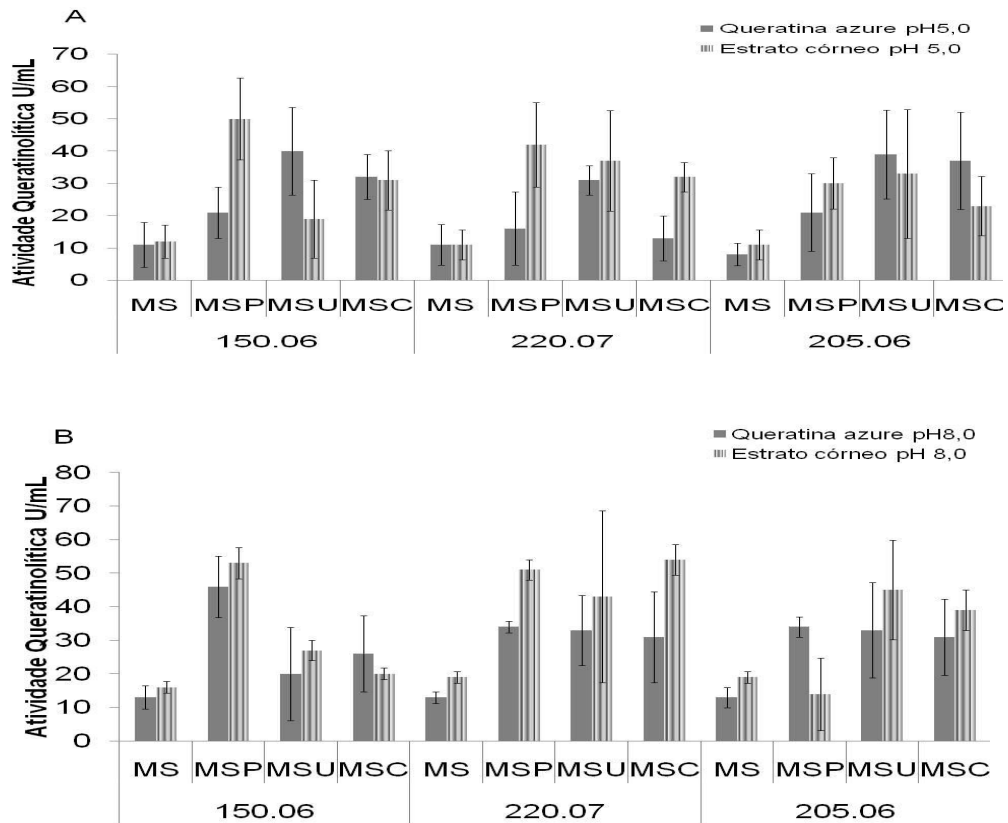


Figura 4 – Atividade queratinolítica dos isolados 150.06, 220.07 e 205.06, após cultivo em meio de sais (MS), e meio de sais acrescido de pele (MSP), unha (MSU) e cabelo (MSC). Ensaio enzimático com queratina azure e estrato córneo, (A) cultivo pH 5,0; (B) cultivo pH 8,0. * Diferença significativa entre os substratos queratina azure e estrato córneo para isolado em cada meio de cultivo ($P < 0,05$).

Para o isolado de unha (150.06) os maiores valores de atividade queratinolítica, no cultivo em MSU, foram obtidos quando do emprego de queratina azure ($P < 0,05$) (Figura 4A). Já, os maiores valores de atividade queratinolítica, no cultivo em MSP, foram obtidos quando do emprego de estrato córneo ($P < 0,05$) (Figura 4A).

Para o isolado de pele (220.07) os maiores valores de atividade queratinolítica foram obtidos quando do emprego de estrato córneo, nos cultivos em MSP e MSC em ambos pHs ($P < 0,05$) (Figura 4A e B).

Estes dados sugerem que as queratinases produzidas em meio suplementado com unha sejam mais aptas a degradar queratina do tipo rígida (queratina azure), a qual é extraída de lã de carneiro e semelhante à queratina presente em cabelo e a unha. Da mesma forma, as queratinases produzidas em presença de pele parecem ser mais aptas a degradar queratina presente no estrato

córneo (composto por queratina leve). Observa-se ainda que as queratinases produzidas pelo isolado de secreção traqueal (colonizante) não apresentaram especificidade pelos substratos utilizados nos ensaios enzimáticos.

Negi e colaboradores (1984) e Ray e Payne (1990), não encontraram atividade enzimática sobre queratina do tipo rígida como a do cabelo e queratina azure, por enzimas secretadas por isolados de *C. albicans*. Entretanto, estes dados não corroboram com os encontrados neste trabalho, uma vez que, os dados aqui apresentados comprovaram ação de proteases queratinolíticas sobre o substrato queratina azure.

Ainda neste estudo, com o objetivo de avaliar o pH ótimo para ação das proteases presentes nos sobrenadantes de cultivos, os ensaios enzimáticos foram realizados em pHs distintos (5,0 e 8,0). Os resultados demonstraram que para a maioria dos sobrenadantes de cultivo avaliados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as atividades queratinolíticas nos diferentes pHs empregados para os ensaios enzimáticos (dados não mostrados).

Dados da literatura relativos a proteases com atividade queratinolítica produzidas por *Candida* revelaram que as maiores atividades ocorreram em pH ácido (TSUBOI et al., 1985; TSUBOI et al., 1989; RAY e PAYNES, 1990, VERMELHO et al., 2009). No presente trabalho, os resultados indicam que as proteases presentes nos sobrenadantes de cultivo, produzidas pelos isolados analisados, são ativas tanto em pH ácido (5,0) quanto em pH básico (8,0).

Até o momento não há dados relativos à produção de proteases queratinolíticas por isolados clínicos de *C. parapsilosis*. Vermelho et al. (2009) avaliaram a produção de queratinase por um isolado ambiental de *C. parapsilosis*. Neste trabalho a atividade enzimática foi avaliada empregando queratina extraída de pena de galinha. Sabe-se que a conformação molecular desta queratina é do tipo β , estruturalmente muito diferente da queratina presente em epitélios humanos que tem a conformação α . Portanto, apesar da relevância do trabalho realizado por estes autores, estudos relativos à produção de proteases queratinolíticas produzidas por isolados clínicos são de suma importância para avaliar uma possível correlação entre a produção destas proteases e o estabelecimento do processo infeccioso nos casos de micoses superficiais causadas por *C. parapsilosis*.

3.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* COM OS SUBSTRATOS QUERATÍNICOS

No presente trabalho foi avaliado o perfil de interação dos isolados 150.06 (lesão de unha), 220.07 (lesão de pele) e 205.06 (secreção traqueal) com substratos queratínicos de origem humana (cabelo, pele e unha), empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrito no item 2.6.

A análise de MEV revelou a ocorrência de adesão celular nos diferentes substratos queratínicos (Figuras 5, 6 e 7). A adesão a tecidos epiteliais é o primeiro passo para colonização e invasão tecidual, a qual é dependente de expressão de moléculas a exemplo das adesinas, as quais viabilizam a interação das células de *Candida* às células dos tecidos adjacentes (SUNDSTROM, 2002). Desta forma, pode-se sugerir que o presente trabalho demonstra, *in vitro*, a ocorrência de colonização dos substratos queratínicos pelos isolados clínicos de *C. parapsilosis*, assim como observado por alguns autores para algumas espécies de dermatófitos (revisado por RICHARDSON e EDWARD, 2000).

A colonização de tecidos e apêndices cutâneos é viabilizada por espécies de dermatófitos e de *Candida* devido a algumas condições que favorecem o crescimento destes micro-organismos como: estes sítios serem constituídos por células mortas, não sofrem forte influência do sistema imune, temperatura e pH (5-6,7) propícios ao desenvolvimento destes fungos, além de apresentarem algumas fontes nutricionais disponíveis (proteínas, lipídeos, carboidratos, etc) (revisado por RICHARDSON e EDWARD, 2000).

A magnitude das eletromicrografias apresentadas referentes a interação com os substratos pele e unha (Figura 5 e 6) não possibilitam a demonstração do perfil de adesão dos isolados a estes substratos. No entanto, foi evidenciado que o isolado de lesão de unha apresentou maior interação celular (número de células aderidas) ao substrato unha comparativamente aos demais isolados. Da mesma forma, o isolado de lesão de pele apresentou maior interação celular ao substrato pele comparativamente aos demais isolados e substratos (dados não mostrados).

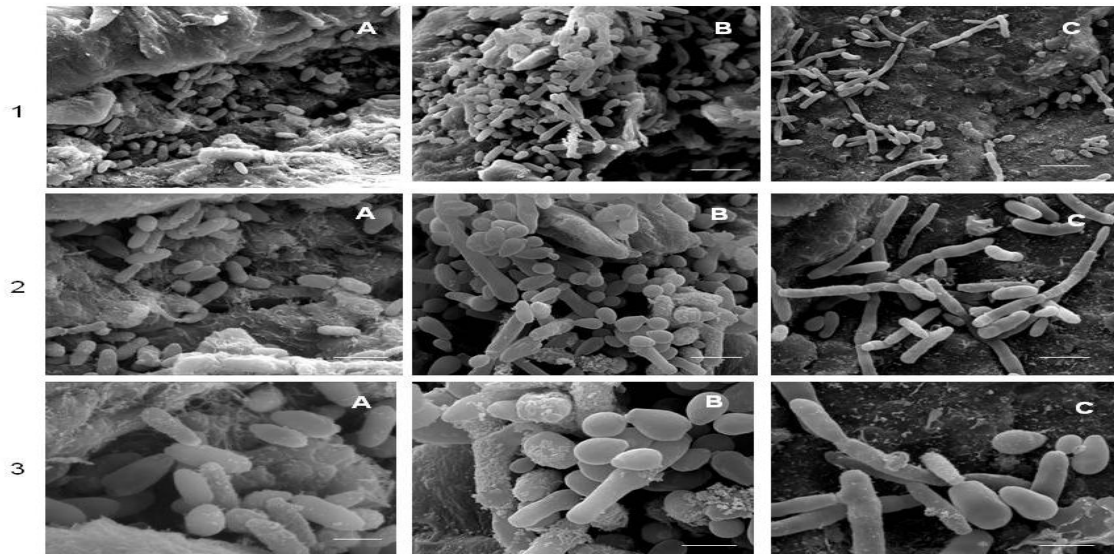


Figura 5 – Eletromicrografias de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado com pele; (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06, 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X, 3- aumento de 12000X.

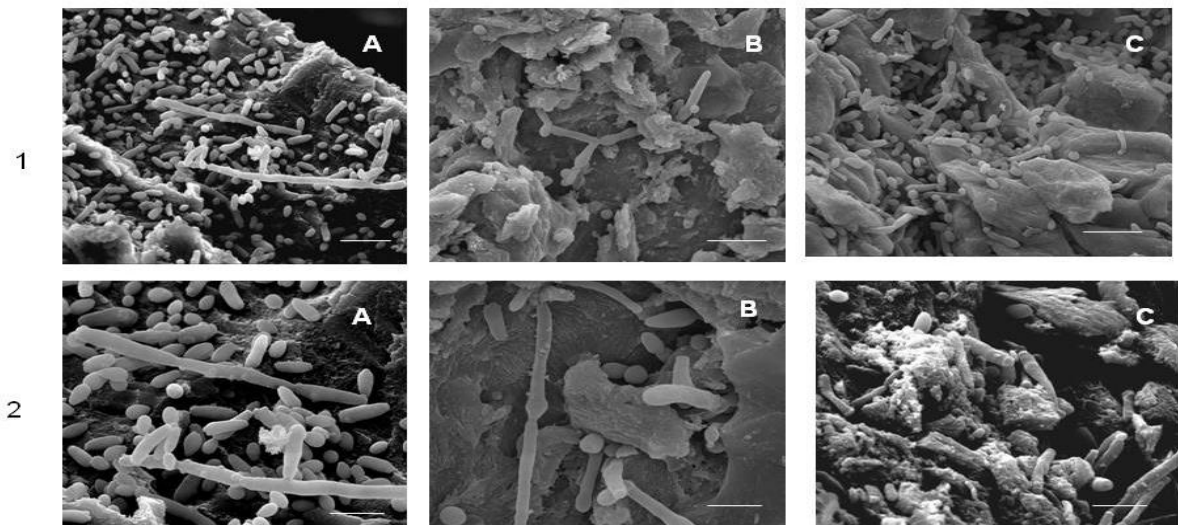


Figura 6 – Eletromicrografia de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado com unha; (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06, 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X.

Em relação as eletromicrografias do cabelo (Figura 7) o córtex da estrutura folicular está totalmente evidenciado nas magnitudes demonstradas, podendo-se observar a ocorrência de maior número de células aderidas a este substrato pelo isolado de lesão de unha (Figura 7A linha1) em relação aos outros isolados. Um fato interessante é que as células dos isolados aderiram

predominantemente ao córtex do folículo (Figura 7), o qual é o principal componente do cabelo, formado por um conjunto de células cilíndricas denominado de matriz, local onde fica situada a queratina e outras proteínas e, é envolto por uma camada denominada de cutícula, originando assim a estrutura folicular do cabelo (ROBBINS, 1994). Alguns trabalhos relativos à invasão do folículo capilar por dermatófitos demonstram destruição da cutícula para o acesso das células ao córtex do cabelo, estabelecendo o processo infeccioso denominado *tinea capitis* (revisado por RICHARDSON e MICHAEL, 2000).

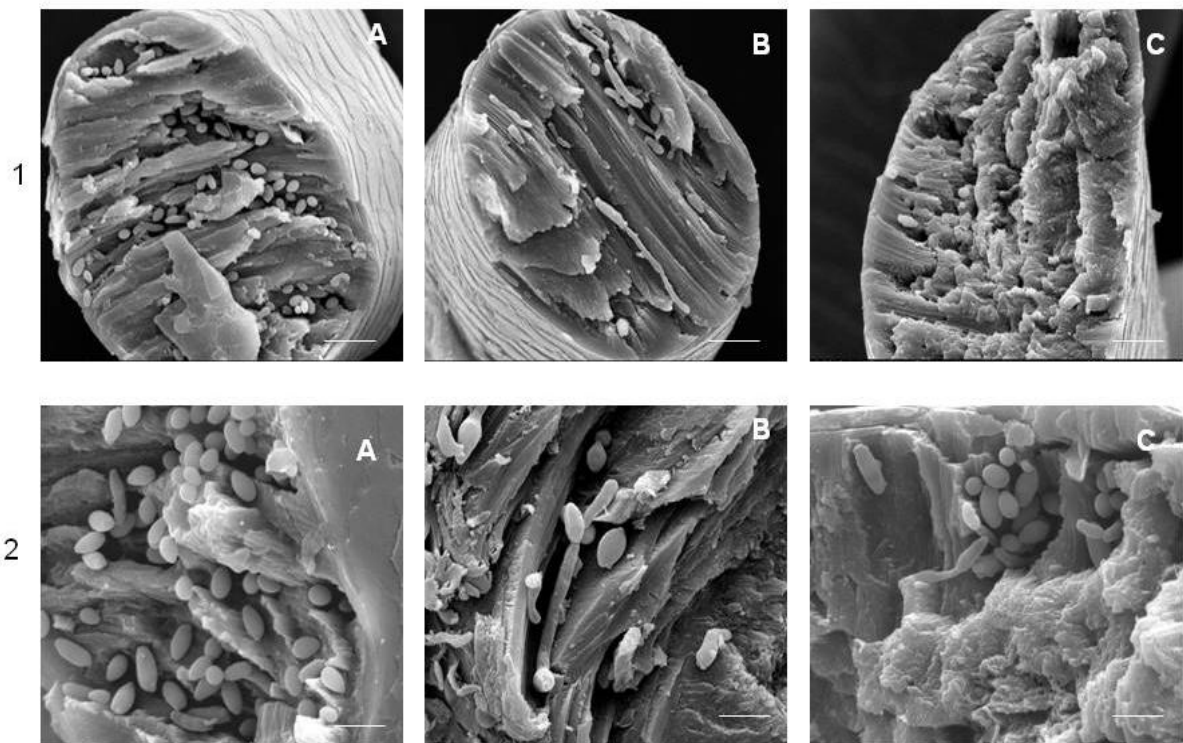


Figura 7 – Eletromicrografia de varredura dos isolados de *C. parapsilosis* cultivados em Meio de Sais (pH 5,0) suplementado com cabelo, (A) isolado 150.06; (B) isolado 220.07; (C) isolado 205.06; 1- aumento de 3000X; 2- aumento de 6000X.

A diferenciação celular em leveduras do gênero *Candida*, da forma de blastoconídios para formas alongadas como as hifas e pseudo-hifas, está associada com melhor adaptação e invasão tecidual. Todos os isolados apresentaram variação da morfologia celular, coexistindo simultaneamente as formas blastoconidiais e pseudo-hifas. Porém, o isolado de lesão de unha apresentou pseudo-hifas apenas no substrato unha (Figura 6A). Já os isolados de

lesão de pele e secreção traqueal apresentaram formação de pseudo-hifas na interação com os três substratos queratínicos (Figura 5, 6 e 7B e C).

Além disso, na interação dos isolados de lesão de pele e unha (150.06 e 220.07) com o substrato pele foi observada a presença de matriz extracelular (Figura 5 A e B linha 3). Já para o isolado de secreção traqueal (205.06) não foi observada matriz em nenhum dos substratos analisados.

CONCLUSÕES

- Os três isolados de *C. parapsilosis* apresentaram cinéticas de crescimento similares, no entanto, as taxas de crescimento variaram com meio de cultivo e pH de cultivo;

- A expressão de proteases ácidas foi induzida pela presença de substratos queratínicos por isolados de lesão de pele e unha;

- Os substratos queratínicos e pHs de cultivo regularam de forma diferenciada a produção de proteases queratinolíticas por isolados de lesão de pele e unha;

- Considerando as variáveis utilizadas nos experimentos, a atividade diferencial de proteases com atividade queratinolítica, foi mais expressiva para o isolado de lesão de unha;

- As proteases queratinolíticas presentes nos sobrenadantes de cultivo dos isolados de pele e unha apresentaram especificidade pelos substratos utilizados no ensaio enzimático (queratina azure e estrato córneo);

- Pelo fato do isolado de secreção traqueal ser um colonizador do trato respiratório, pode-se postular que este seja o motivo da presença dos substratos queratínicos não terem induzido significativamente a produção de proteases ácidas e queratinolíticas, as quais também não apresentaram especificidade pelos substratos utilizados nos ensaios enzimáticos;

- Independentemente do sítio de isolamento, os três isolados analisados apresentaram adesão celular aos substratos queratínicos, simulando o processo de colonização de tecido epitelial queratinizado por *C. parapsilosis*.

REFERÊNCIAS

- ABU-ELTEEN, K.H. Incidence and distribution of *Candida* species isolated from human skin in Jordan. **Mycoses**, v. 42, p.311-317, 1999.
- BRAGA-SILVA, L.A.; MESQUITA, D.G.A.; RIBEIRO, M.D.; CARVALHO, S.M.F.; FRACALANZZA, S.E.L.; SANTAS, A.L.S. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 765-770, 2009.
- BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2570-2576, 1999.
- BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.A.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S.P.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J.C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.5, p.100-131, 2005.
- DANING, I.; DINGUO, Z. WI-NWEI, S.; PEINONG, J. Extensive skin candidosis in an adult: effective treatment with itraconazole. **Mycoses**, v. 41, p. 219-221, 1998.
- DE BERNARDIS, F.; HLSCHLEGEL, F. M.; CASSONE, F. M.; FONZI, W. A. The pH of the host niche controls gene expression and virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3317–3325, 1998.
- DORKO, E.; JAUTOVA, J.; TKACIKOVA, L.; WANTRUBOVA, A. The frequency of *Candida* species in onychomycosis. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 727-731, 2002.
- EI-NAGHY, M.A.; EI-KTATNY, M.S.; FADL-ALLAH, E.M.; NAZEER, W. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. **Mycopathologia**, v.143, p. 77–84, 1998.
- FIGUEIREDO, V.T.; SANTOS, D.A.; RESENDE, M.A.; HAMDAN, J.S. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v.164, p. 27-33, 2007.
- FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 127-130, 1999.
- GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p.196-200, 2000.
- GAUTRET, P.; RODIER, M.H.; LACROIX, K.C.; JACQUEMIN, J.L. Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, v. 43, p.433-435, 2000.
- GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F.G.; TOMIMORI-YAMASHITA, F.G.; URRUTIA, M.; ZAROR, Z.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.168, p. 111–116, 2009.
- GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; BARAN, R.; SUMMERBELL, RC. Non-dermatophyte onychomycosis. **Dermatology Clinical**, v. 21, p. 257–68, 2003.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 20-33, 2006.

- JAYTTILAKE, J.A.M. S.; TILAKARAYNE, W.M.; PANAGODA, G.J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v.168, p.165–173, 2009.
- JAUTOVÁ, J.; VIRAGOVÁ, S.; ONDRASOVIC, M.; HOLODA, E. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. **Folia Microbiologica**, v. 46, p. 333-337, 2001.
- KASZUBA, A.; SENEZKO, F.; LIPOWCZAN, G.; BIENIAS, L.; KOSTUSIAK, M.; LUPA, S. Fungal flora in human skin and skin appendages infections in the region of Poland. **Mycoses**, v. 41, p. 249-253, 1998.
- KWOK Y, K.C.; FAY, Y.K.; GOBL, C.L.; KAMARUDIN, A.; KOH, M.T.; SEOW, C.S. Epidemiology and *in vitro* activity of antimycotics against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. **International Journal of Dermatology**, v. 3, p.145-149, 1998.
- MANZANO, P.; HERNÁNDEZ, F.; MÉNDEZ, T.L.J.; PALACIOS, M.Y.; CÓRDOVA, M.E.; BAZÁN, M.E. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v. 166, p. 41-45, 2008.
- MARTINS, E.A.; GUERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; SOARES, M.M.C.; Almeida, M.T.G. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 596-598, 2007.
- MONOD, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 285–294, 2008.
- MUGGE, C.; HAUSTEIN, U.F.; NENOFF, P. Causative agents of onychomycosis - a retrospective study. **Journal der Deutschen Dermatologischen. Gesellschaft**, v. 4, p. 218–228, 2006.
- MUJICA, M.T.; FINQUELIEVICH, J.L.; JEWUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 36, p. 107–112, 2004.
- NEGI, M.; TSUBOI, R.; MATSUI, T.; OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, p. 32-36, 1984.
- NG, K.P.; SAW, T. L.S.; NA, L.; SOO-HOO, T. S. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997–1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia**, v. 149, p. 141–146, 2001.
- OLIVEIRA, M.T.; SPECIAN, A.F.L.; ANDRADE, C.G.T.J.; FRANÇA, E.J.G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. **Micron**, v. 41, p. 604-608, 2010.
- RAY, L.T.; PAYNE, D.C. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infection and Immunity**, p.508-514, 1990.
- RICHARDSON, M.; EDWARD, M. Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. **Revista Iberoamericana de Micología**, p. 115-121, 2000.

- ROBBINS, C. R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair, **Springer-Verlag**. New York, 1994.
- ROTA, J.F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.
- RUDY, S.J. Superficial fungal infections in children and adolescents. **Nurse Practitioner Forum**, v. 10, p. 56-66, 1999.
- SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H.; JANUSCHKE, E.; HUBE, B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, p. 712-717, 2000.
- SEGAL, R.; KIMCHI, A.; KRITZMAN, A.; INBAR, R.; SEGAL, Z. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. **Mycoses**, v. 43, p.349–353, 2000.
- SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v. 4, p. 461-469, 2002.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.
- TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHUNK, J.D. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.
- TSUBOI, R.; KURITA, R.; NEGI, M; OGAWA, H. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *Candida albicans*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, p. 438-440, 1985.
- TSUBOI, R.; MATSUDA, K.; KO, I.J.; OGAWA, H. Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in insoluble stratum corneum-supplemented media. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, p. 342-345, 1989.
- VERMELHO, A.B.; MAZOTTO, A.M.; MELLO, A.C.N.; SILVA, F.; DUARTE, T. R.; MACRAE, A.; NISHIKAWA, M.M.; BON, E.P.S. Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity. **Mycopathologia**, v. 169, p. 57-65, 2009.
- VOET, D.; VOET, J.G. Three-dimensional structure of proteins. **Stiefel Journal Biochemistry**, 2º ed. Wiley, New York, 1995.
- WAGNER, D.K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 317–335, 1995.