



**Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**DÉBORAH BRAGA RESENDE**

**ENVOLVIMENTO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE FUNGOS NA  
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

**Alfenas/MG**

**2014**

**DÉBORAH BRAGA RESENDE**

**ENVOLVIMENTO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE FUNGOS NA  
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientadora: Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão. Co-Orientadora: Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias.

**Alfenas/MG**

**2014**

Resende, Déborah Braga.

Envolvimento da defesa antioxidante de fungos na formação de biofilme / Déborah Braga Resende. - 2014.

71 f. -

Orientadora: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. *Candida albicans*. 3. NADPH oxidase.  
4. Antioxidantes. 5. Enzimas. 6. Leveduras. I. Brigagão, Maísa  
Ribeiro Pereira Lima. II. Título.

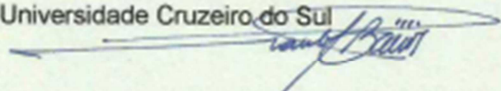
CDD: 579

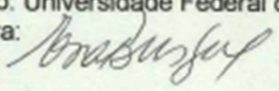
**DÉBORAH BRAGA RESENDE**


**ENVOLVIMENTO DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE FUNGOS NA  
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

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

Aprovada em: 17/02/2014

Profº. Dr. Marcelo Paes de Barros  
Instituição: Universidade Cruzeiro do Sul  
Assinatura: 

Profº. Dra. Eva Burger  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
Assinatura: 

Profº. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
Assinatura: 



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que guiou meus passos e me conduziu a este caminho, sempre me indicando e mostrando o que seria melhor para mim. ELE me deu forças para enfrentar todos os percalços e acreditar que a vitória seria merecida.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Pilar, por estarem sempre incondicionalmente ao meu lado. Agradeço por terem me dado a oportunidade de concretizar esse trabalho, por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Agradeço imensamente por sempre confiarem em mim, por terem certeza da minha capacidade. Amo muito vocês dois.

Agradeço ao Ítalo, meu amigo, companheiro, namorado, noivo, marido, tudo! Agradeço por ter me encorajado a seguir em frente, por ter me ajudado em tudo, desde sempre, por todo apoio, compreensão, carinho, confiança e por fazer cada minuto dessa jornada valer a pena. Te amo!

Agradeço às minhas irmãs Aline e Livia, que sempre tiveram orgulho do que sou, que sempre me deram força e palavras de incentivo. Pela amizade e amor incondicionais.

Agradeço à minha orientadora Máisa, pela paciência nos momentos de desespero, pela compreensão nos momentos em que chorei, pelo incentivo e confiança sempre!! Por todo o aprendizado e crescimento que me proporcionou.

Agradeço à minha co-orientadora Amanda que me acolheu desde antes do mestrado e sempre esteve disponível quando precisei.

Agradeço ao Gabriel pelas conversas, conselhos, ajuda e milhares de favores que foram extremamente essenciais para esta conquista.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho. Às alunas e companheiras Naiara Chaves, Joyce Nery, Giulia Bani, Ana Carolina Mendes por toda ajuda e apoio.

**OBRIGADA A TODOS POR TODO APOIO E CARINHO!**

## RESUMO

As espécies reativas de oxigênio/nitrogênio são produzidas por fagócitos, inicialmente, pela formação do ânion superóxido do qual se derivam outros potentes microbicidas. Em resposta ao estresse oxidativo/nitrosativo, todas as células apresentam capacidade de defesa antioxidante endógena. Fungos são capazes de modular sua defesa antioxidante aumentando sua patogenicidade frente às defesas do organismo hospedeiro. Vários dados experimentais levantam a hipótese de que *Candida albicans* são fungos que aumentam sua defesa antioxidante para formação de biofilmes. Os nitróxidos são antioxidantes sintéticos que modulam a atividade do complexo NADPH oxidase (Nox2) de fagócitos, reduzindo a produção de ânions superóxido. Esse efeito dos nitróxidos diminui as ações deletérias de oxidantes durante um processo inflamatório, mas poderia comprometer a capacidade microbicida dos fagócitos. O objetivo deste trabalho foi o estudo da interação entre neutrófilos humanos e *C. albicans* na forma planctônica e biofilme, enfocando a defesa antioxidante enzimática como mecanismo de patogenicidade do fungo. O efeito de adição do nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) foi testado, com o intuito de verificar se este composto altera a resistência destes microrganismos ao ataque de oxidantes produzidos por fagócitos. Foi realizado o doseamento das enzimas antioxidantes superóxido dismutases (SOD) e catalase (CAT) das leveduras e dos neutrófilos na presença e ausência do Tempol. O monitoramento do *burst* respiratório foi utilizado para determinar os efeitos do nitróxido sobre a atividade de Nox2 dos neutrófilos. O ensaio de *killing* de *C. albicans* por neutrófilos foi realizado cultivando-se a levedura na presença de neutrófilos previamente tratados com Tempol ou apenas com o veículo e avaliado através de contagem de unidades formadoras de colônias. Os resultados revelaram uma alta atividade das enzimas SOD e CAT no fungo, sendo maior quando em biofilme. Além disso, a levedura diminuiu a atividade enzimática antioxidante dos neutrófilos humanos, quando os mesmos foram expostos. O Tempol foi capaz de reduzir essa atividade tanto na levedura quanto nos neutrófilos. A levedura em suas formas estudadas estimulou alta atividade de Nox2 dos neutrófilos e o Tempol inibiu a mesma. Através do ensaio de *killing* foi detectado um crescimento menor do fungo quando na presença dos neutrófilos e um maior crescimento microbiano quando adicionado o Tempol, sugerindo um comprometimento da ação fungicida dos neutrófilos. Os resultados mostraram que, na forma de biofilme, *C. albicans* tem uma maior defesa frente ao sistema imune do hospedeiro, decorrente, ao menos em parte, da alta atividade das enzimas SOD e CAT, o que exige uma demanda mais elevada de espécies oxidantes para controlar o foco infeccioso. A presença de um antioxidante sintético provocou diminuição da concentração destas espécies oxidantes, o que pode ser deletério no controle da infecção.

Palavras-chave: Biofilme. Nitróxido. *C. albicans*. NADPH oxidase. Enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

The early reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) produced by phagocytes are superoxide anions, from which are derived other oxidant compounds that are potent microbicides. In response to oxidative/nitrosative stress, all cells present endogenous antioxidant defense capacity. Some fungi are able to modulate their antioxidant defense, increasing their pathogenicity forward to the oxidant host organism attack. Attention has been given to the ability of *Candida albicans* biofilms modulate their antioxidant defense, associated to the increase of morbidity and mortality of infected patients. Nitroxides are synthetic antioxidants that modulate the activity of Nox2 in phagocytes, reducing the production of superoxide anions. This effect of nitroxides decreases the harmful effects of ROS/RNS during an inflammatory process, but could compromise the microbicidal capacity of phagocytes. The aim of this work was to study the interaction between human phagocytes and *C. albicans* in both, planktonic and biofilm, forms. Also, the effect of nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol) was tested in order to verify the hypothesis of interference of this antioxidant in the host immune defense. The antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutases (SOD) were evaluated in yeasts and neutrophils, either in presence or absence of Tempol. Neutrophil respiratory burst was monitored to determine the effects of the nitroxide on superoxide anion production. Killing assay of *C. albicans* was performed by cultivating yeast in the presence of human neutrophils with or without Tempol addition, followed by colony forming units counting. The results showed a high activity of SOD and CAT in the fungus, which was stronger when biofilm form was established than that planktonic one. In addition, the exposure to yeast caused a decrease on antioxidant enzymes activities of human neutrophils. Tempol addition caused a significant impairment on both antioxidant enzymatic activities, as in neutrophil suspensions as in cultured fungi. Exposure to *C. albicans* biofilms stimulated a larger neutrophil superoxide anion formation than correspondent planktonic form, an event that was inhibited by Tempol. Nitroxide addition partially deleted neutrophil fungicide capability, suggesting a deleterious action on phagocytic fulfillment on host defence.

Keywords: Biofilm. Nitroxide. *C. albicans*. NADPH oxidase. Antioxidant enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: diferenciação <i>C.albicans</i> na forma planctônica e na forma de biofilme por microscopia eletrônica de varredura. ....	23
Figura 2: estrutura química geral dos compostos da classe dos nitróxidos. ....	26
Figura 3: Reação de catálise realizada pelas enzimas SOD. ....	33
Figura 4: ilustração do crescimento de colônias de <i>C.albicans</i> na forma planctônica nos tratamentos estudados em placas de Petri. ....	54
Figura 5: ilustração do crescimento de colônias de <i>C.albicans</i> na forma biofilme nos tratamentos estudados em placas de Petri .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento experimental para determinação do efeito de Tempol sobre a atividade de Nox2 em neutrófilos humanos.....	37
Tabela 2: Delineamento experimental para determinação do efeito de Tempol sobre as atividades de SOD e CAT de neutrófilos humanos estimulados com <i>C. albicans</i> .....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do Tempol sobre o teor proteico total de <i>C. albicans</i> nas formas planctônica e biofilme .....	41
Gráfico 2: Ação do Tempol na atividade total de SOD detectada na levedura <i>C. albicans</i> nas formas planctônica e biofilme .....	42
Gráfico 3: Efeito do Tempol sobre a atividade de MnSOD encontrada em <i>C. albicans</i> planctônica e biofilme .....	43
Gráfico 4: Verificação da ação do Tempol sobre a isoforma Cu,ZnSOD detectada em <i>C. albicans</i> nas formas planctônica e biofilme .....	44
Gráfico 5: Atuação do Tempol na atividade de catalase da levedura <i>C. albicans</i> nas formas planctônica e biofilme .....	45
Gráfico 6: Efeito do Tempol no teor proteico total de neutrófilos humanos tratados ou não com <i>C. albicans</i> .....	46
Gráfico 7: Efeito do tratamento com Tempol na atividade total de SOD detectada em neutrófilos humanos na presença e ausência de leveduras .....	47
Gráfico 8: Ação do Tempol na atividade de MnSOD detectada em neutrófilos humanos na presença ou não de <i>C. albicans</i> .....	48
Gráfico 9: Efeito do tratamento com Tempol sobre a atividade de Cu,ZnSOD verificada em neutrófilos humanos tratados ou não com leveduras .....	49
Gráfico 10: Tratamento com Tempol e seu efeito sobre a atividade de catalase detectada em neutrófilos humanos tratados ou não com leveduras .....	50
Gráfico 11: Efeito do Tempol no <i>burst</i> respiratório de neutrófilos humanos na presença de <i>C. albicans</i> planctônica e biofilme .....	51
Gráfico 12: Efeito do Tempol no crescimento de <i>C. albicans</i> nas formas planctônica e biofilme em meio ágar Sabouraud .....	54

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Representação do papel das espécies reativas e dos antioxidantes na função celular. ....	18
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
ATP – Adenosina Trifosfato  
CAT – Catalase  
SOD – Superóxido dismutase  
ATCC – American Type Culture Collection  
PBS – Tampão Fosfato (Phosphate Buffered Saline)  
MnSOD – Manganês Superóxido dismutase  
Cu,ZnSOD – Cobre e Zinco Superóxido dismutase  
PMN – Polimorfonucleares  
PMA – Forbol-12-miristato-13-acetato  
DPI – Difeniliodônio (Diphenyliodonium)  
BSA – Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)  
ABS – Absorbância  
*g* – gravidade  
Tempol – 4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil  
MPO – Mieloperoxidase  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 O PROCESSO OXIDANTE FAGOCITÁRIO .....	16
2.2 ESPÉCIES REATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENAS.....	17
2.3 <i>Candida albicans</i> COMO LEVEDURA CAUSADORA DE INFECÇÕES.....	20
2.4 BIOFILME DE <i>C.albicans</i> E A RESISTÊNCIA ANTIOXIDANTE DO FUNGO..	22
2.5 ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS .....	24
2.6 ANTIOXIDANTES COMO MODULADORES DA DEFESA FÚNGICA CONTRA O MECANISMO OXIDANTE FAGOCITÁRIO .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>Candida albicans</i> E METODOLOGIA DE RUPTURA CELULAR .....	31
<b>4.1.1 <i>Candida albicans</i> planctônica</b> .....	31
<b>4.1.2 <i>Candida albicans</i> biofilme</b> .....	32
4.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE SUPERÓXIDOS DISMUTASES .....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE CATALASE .....	34
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA TOTAL .....	34
4.5 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS PARA TESTES <i>EX VIVO</i> E RUPTURA CELULAR PARA DOSEAMENTO ENZIMÁTICO .....	34
4.6 ATIVAÇÃO DE Nox2 DE NEUTRÓFILOS .....	35
<b>4.6.1 Quantificação da redução do citocromo c associado à atividade de Nox2</b> .....	36
<b>4.6.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes produzidas por neutrófilos</b> .....	37
4.7 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR .....	38
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
4.9 ENSAIO DE <i>KILLING</i> DE <i>Candida albicans</i> por neutrófilos humanos .....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1 TEOR PROTEICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS TRATADAS OU NÃO COM TEMPOL .....	40

<b>5.1.1 Doseamento de proteínas totais pelo método de Bradford</b> .....	40
<b>5.1.2 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutases e respectivas isoformas</b> .....	41
<b>5.1.3 Determinação da atividade de catalase</b> .....	45
<b>5.2 TEOR PROTEICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS TRATADOS OU NÃO COM <i>C.albicans</i> PLANCTÔNICA E EM BIOFILME E COM TEMPOL</b> .....	46
<b>5.2.1 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford</b> .....	46
<b>5.2.2 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutases e isoformas</b> .....	47
<b>5.2.3 Determinação da atividade da enzima catalase</b> .....	49
<b>5.3 BURST RESPIRATÓRIO EM NEUTRÓFILOS HUMANOS ISOLADOS TRATADOS COM <i>C.albicans</i> NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE TEMPOL</b> .....	51
<b>5.4 ENSAIO DE <i>KILLING</i> DE <i>Candida albicans</i> POR NEUTRÓFILOS HUMANOS</b> .....	53
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>ANEXO</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Em um processo inflamatório e/ou infeccioso, os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do organismo, eliminando microrganismos invasores. São atraídos quimiotaxicamente por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e outros corpos estranhos para áreas de inflamação. Nestes sítios, os neutrófilos fagocitam os microrganismos, recobertos ou não com componentes da via do complemento ou anticorpos específicos, os quais são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por espécies oxidantes de oxigênio e/ou nitrogênio, tais como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). A geração de  $O_2^{\bullet-}$  é o evento inicial para a produção de outros agentes oxidantes, inclusive aqueles produzidos pela mieloperoxidase (MPO). Após a fagocitose e a produção de oxidantes, com a eliminação dos patógenos, os neutrófilos morrem por apoptose (LAGRANHA et al., 2005).

Em resposta à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) /nitrogênio (ERN), todas as células apresentam capacidade de defesa antioxidante endógena. Tal situação pode ser benéfica nos casos de infecção, quando ocorre produção de ERO/ERN, dentre eles vários radicais livres, por células fagocitárias para matar microrganismos invasores. Entretanto, estes microrganismos invasores são capazes de modular sua defesa antioxidante de forma extremamente eficiente, o que aumenta sua patogenicidade frente às defesas do organismo hospedeiro. Os fungos estão entre os microrganismos capazes de elicitar esta defesa antioxidante de forma rápida e eficaz, através de mecanismos bioquímicos de neutralização de ERO/ERN e/ou de reparo de suas moléculas já oxidadas.

Candidíase é uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais, especialmente pela capacidade de formação de biofilme por diferentes espécies de *Candida*. Com as crescentes pesquisas na busca da elucidação de novos alvos bioquímicos visando minimizar as ocorrências de infecções decorrentes de formação de biofilmes, atenção especial tem sido dada à capacidade de biofilmes de *C. albicans* modularem sua defesa antioxidante. Entretanto, pouco se conhece sobre a capacidade deste fungo aumentar sua defesa enzimática contra ataque de ERO/ERN produzidos por fagócitos quando a forma planctônica se estrutura em biofilmes. Além disso, não existem informações na literatura que relatem se a

presença de antioxidantes exógenos é um fator cooperativo para a defesa no fungo, nestas condições.

Os biofilmes são formados por comunidades heterogêneas de microrganismos, que se acumulam em superfícies, envolvidas por uma matriz extracelular de polímeros (MARSH, 2004). Os biofilmes apresentam características de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos quando comparados com as mesmas células crescidas em culturas planctônicas (formas microbianas livres e circulantes), o que os tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (DAVEY E O'TOOLE, 2000).

O biofilme formado pelas espécies de *Candida* está associado a um aumento drástico da resistência contra a maioria dos antifúngicos, o que pode permitir a persistência da infecção fúngica apesar do tratamento medicamentoso. Alguns autores sugerem que o biofilme de *Candida* exibe resistência à maioria dos antifúngicos com exceção das equinocandinas e formulações lipídicas da anfotericina B (CHANDRA et al., 2005).

Se a defesa antioxidante de microrganismos constitui um fator de aumento de patogenicidade dos mesmos, além de incremento de sua resistência a fármacos específicos, levanta-se, então, a hipótese de que o uso de antioxidantes exógenos, amplamente disseminado e estimulado por vasta propaganda, possa contribuir para o agravamento de infecções microbianas.

Durante os últimos anos, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, que vem se mostrando capaz de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por oxidantes (HAHN et al., 1997; ISRAELI et al., 2005; SOULE et al., 2007; LAIGNIER et al., 2008; TIMONER et al., 2008). Em geral, os nitróxidos apresentam grandes perspectivas em relação ao seu uso. No entanto, ainda existe a necessidade de que mais pesquisas sejam realizadas, a fim de que as propriedades mais adequadas de cada composto dessa classe sejam aplicadas de modo conveniente e seguro.

Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente o efeito de diferentes nitróxidos, como 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) e seus análogos estruturais 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempo) e 4-(9-acridinecarbonyl)-amino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Ac-Tempo), como moduladores da migração fagocitária induzida por LPS ou por caseinato de sódio (LIMA et al., 2010), além da atividade modulatória sobre Nox2 fagocitária, tanto de

macrófagos quanto de neutrófilos (LAIGNIER et al., 2008; CHAVASCO et al., 2009). Esses dados colocam os nitróxidos como compostos que atuam diminuindo a liberação de  $O_2^{\bullet-}$  através da regulação da atividade de proteínas quinases e fosfatases (RIBEIRO et al., 2010) e pela inibição da ação da chaperona proteína dissulfeto molecular (BITENCOURT-SANTOS et al., 2010) em neutrófilos e macrófagos.

Entretanto, poucas pesquisas foram conduzidas para esclarecer o efeito de nitróxidos em processos infecciosos. Recentemente, Linares e colaboradores (2009) descreveram que o Tempol aumentou a sobrevivência de *Leishmania braziliensis* em modelos animais, quando esse nitróxido foi administrado por via oral através de regulação da iNOS (óxido nítrico sintase induzida) fagocitária. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente (LIMA et al., 2011) que o nitróxido Tempo é capaz de diminuir a resposta oxidante de neutrófilos frente a *C. albicans* na forma planctônica, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Permanece, portanto, a polêmica do uso desse antioxidante sintético como modulador de processos inflamatórios quando esses ocorrem associados a infecções.

Neste trabalho é proposto o estudo da interação entre neutrófilos humanos e *C. albicans* na forma planctônica em comparação à formação de biofilme, com o intento de relatar se as enzimas antioxidantes do fungo são alteradas quando ocorre a segunda condição. Adicionalmente, o efeito de antioxidante exógeno sintético Tempol será testado com o intuito de verificar se o mesmo provoca aumento de resistência destes microrganismos ao ataque de oxidantes fagocitários e comprometimento da resposta imune do hospedeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O PROCESSO OXIDANTE FAGOCITÁRIO

Em um processo inflamatório e/ou infeccioso, os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do organismo junto com os macrófagos. Apresentam a função de eliminar microrganismos invasores e em seguida morrem espontaneamente. São atraídos quimiotaxicamente por células secretoras, bactérias e outros corpos estranhos para áreas de inflamação. Neste sítio, os neutrófilos fagocitam os microrganismos, recobertos ou não com componentes do complemento ou anticorpos específicos, os quais são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por ERO/ERN, tais como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  e oxigênio singlete ( $1O_2$ ). A produção de  $O_2^{\bullet-}$  é o ponto inicial para a produção de outros agentes oxidantes inclusive aqueles derivados da MPO, como  $ONOO^-$ , formado a partir da reação de  $O_2^{\bullet-}$  e óxido nítrico ( $\bullet NO$ ). Após a fagocitose e a produção de oxidantes com a eliminação dos patógenos, os neutrófilos morrem por apoptose (LAGRANHA et al., 2005).

Na inflamação, a produção de ERO/ERN é um processo vital na defesa do organismo, e se inicia quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento do microrganismo, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, as quais geram um aumento abrupto do consumo de oxigênio aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no neutrófilo um abrupto aumento da taxa metabólica, referido, na literatura, como *burst* oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica e geração de oxidantes derivados do oxigênio e do nitrogênio (BABIOR, 2004).

Durante a resposta inicial à invasão de um patógeno, a resposta imune é ativada. Essa ativação caracteriza-se, entre outros eventos, pela geração de espécies reativas pelas células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, que é um evento crítico para o início da fagocitose e subsequente destruição do microrganismo (DROGE, 2002).

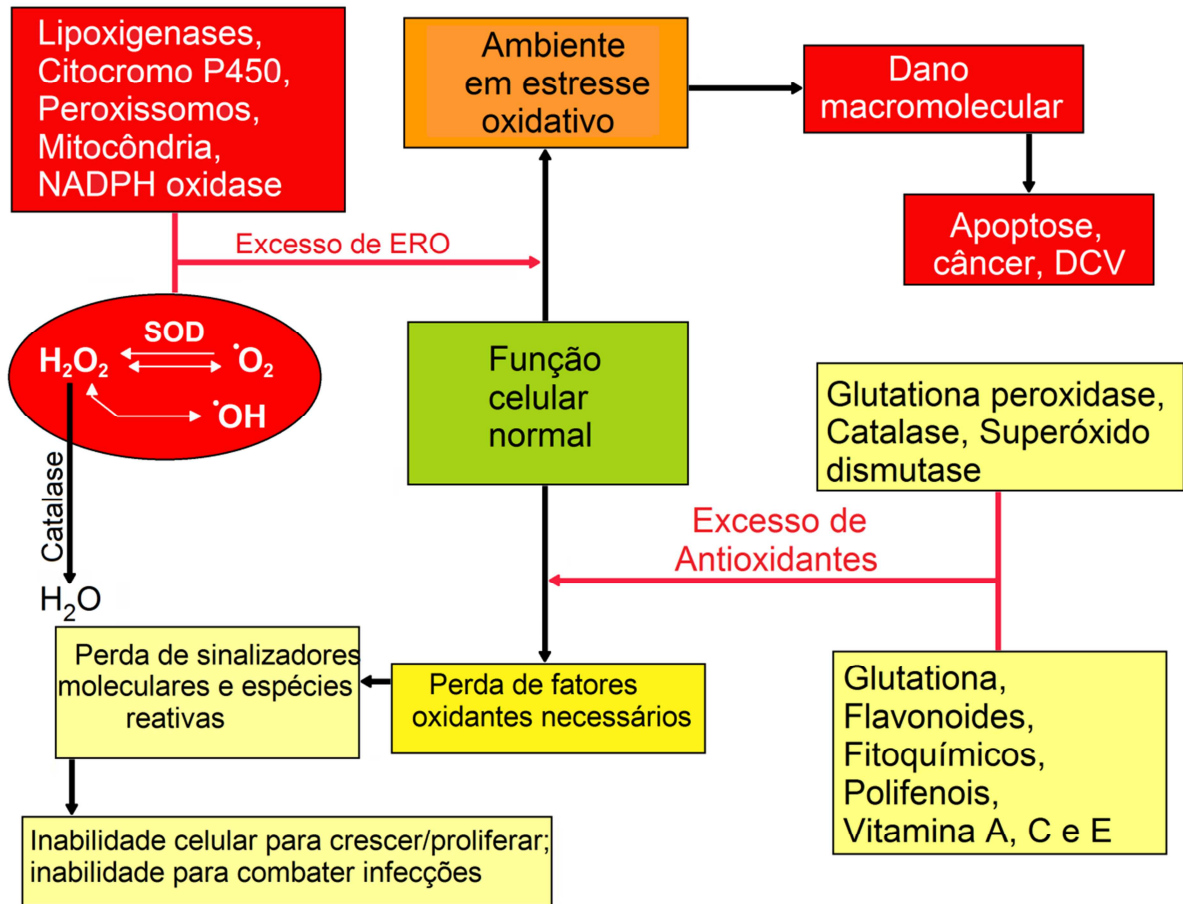
O *burst* respiratório é o evento central da fagocitose. Este mecanismo microbicida oxidante dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, associado à sua membrana citoplasmática e à membrana dos grânulos específicos,

chamado NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) oxidase, hoje redenominada sistema Nox2 (BROWN; HAYNES; QUINN, 2009). Em células não estimuladas, o sistema Nox2 está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citosol quanto na membrana de grânulos secretórios, podendo ser rapidamente ativado quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados. A ativação do *burst* respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividades de diferentes componentes deste complexo enzimático (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008).

A importância deste sistema enzimático é claramente mostrada nos pacientes portadores de doença granulomatosa crônica (CGD), que, devido a mutações autossômicas ou ligadas ao cromossomo X, não possuem capacidade de produzir quantidades normais de  $O_2^{\bullet-}$  pelos fagócitos, estando, então, sujeitos a infecções recorrentes durante toda a vida (SEGAL, 2008).

## 2.2 ESPÉCIES REATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENAS

A respiração mitocondrial gera, naturalmente ERO. Na membrana interna da mitocôndria está a cadeia transportadora de elétrons, fonte primária de  $O_2^{\bullet-}$ . Estas espécies radicalares são altamente reativas e podem provocar uma série de danos celulares como oxidação proteica, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e mutações no DNA (GRANT, 2001). No entanto, estas ERO apresentam um paradoxo quanto às suas funções biológicas. Por um lado, podem danificar macromoléculas celulares além de terem papel na carcinogênese e doenças cardiovasculares. Mas por outro lado, previnem doenças por ser parte essencial do sistema de defesa imune, por mediarem sinalização celular e exercerem papel fundamental na apoptose (SEIFRIED et al., 2007). Dessa forma, estudos mostraram que a geração de ERO é um processo fisiológico normal para conferir imunocompetência e ativar numerosos caminhos de transdução de sinais (HOLBROOK & IKEYAMA, 2002). Estes diferentes papéis de ERO estão sumarizados no Esquema 1.



Esquema 1: Representação do papel de ERO e de antioxidantes em diferentes funções celulares. Adaptado de Seifried e cols, 2007.

Para evitar ou minimizar os danos provocados pelas ERO, as células recorrem, em condições normais, à ação de enzimas antioxidantes, como por exemplo superóxido dismutases (E.C. 1.15.1.1, SOD), catalase (E.C. 1.11.1.6, CAT), glutaciona peroxidase (E.C. 1.11.1.9, GPx) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004).

A homeostase redox celular, ou seja, o balanço entre oxidantes e antioxidantes, é mantida por reações de oxidação-redução envolvendo a transferência de elétrons entre duas espécies químicas: compostos que perdem elétrons (oxidado) e aqueles que ganham elétrons (reduzido) (SOHAL & WEINDRUCH, 1996).

Porém, quando a célula está exposta a condições de estresse como metais pesados e xenobióticos, sua resposta antioxidante protetiva pode estar alterada. Esta exposição leva à produção excessiva de espécies oxidantes, determinando que a célula reaja para controlar a concentração de oxidantes (FRANCA et al., 2005). O



quadro de estresse oxidativo se instala no ambiente celular quando a homeostase entre oxidantes/antioxidantes não é mantida.

Dentre as enzimas de grande importância nesse processo, as diferentes isoformas de SOD são essenciais, pois são capazes de catalisar a conversão de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ . Para isso, inicialmente o  $O_2^{\bullet-}$  reage com o grupo prostético da enzima na sua forma oxidada. Ocorre então a aquisição de um próton e liberação de oxigênio molecular. A forma reduzida da enzima liga um segundo  $O_2^{\bullet-}$  e próton para liberar  $H_2O_2$ , voltando, então, à sua forma oxidada (JOHNSON & GIULIVI, 2005).

Existem descritas atualmente quatro isoformas de SOD: ferro (FeSOD), manganês (MnSOD), cobre e zinco (CuZnSOD) e níquel (NiSOD) (MARTCHENKO et al., 2004). Em *Candida albicans*, bem como nos demais eucariontes, foram descritos MnSOD e CuZnSOD. A isoforma CuZnSOD é uma enzima citosólica e a MnSOD é localizada na mitocôndria (LAMARRE et al., 2001). Ambas as isoformas desempenham um importante papel de proteger microrganismos fagocitados contra o ataque fungicida de macrófagos e neutrófilos produtores de ERO (VAZQUEZ et al., 1998).

CAT é uma enzima que apresenta um grupamento prostético heme, responsável pela atividade catalítica da enzima, convertendo  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular. A reação ocorre quando o peróxido entra no centro ativo da enzima interagindo com aminoácidos, L-histidina e L-asparagina. Um hidrogênio, sob a forma de próton, é transferido de um oxigênio para outro e então a ligação entre os oxigênios sofre quebra heterolítica e os elétrons da ligação química O-O deslocam-se para a molécula de água formada. O oxigênio restante liga-se ao ferro formando a espécie  $Fe(IV)=O$  e liberando uma molécula de água. Esta espécie formada tem alto poder oxidante e reage com uma segunda molécula de  $H_2O_2$ . Durante essa reação, um oxigênio do peróxido é removido formando-se o  $O_2$  que é liberado do íon ferro concomitante com a formação de uma segunda molécula de água. Os íons ferro retornam ao seu primeiro estado de oxidação, prontos para outro ciclo catalítico (CHELIKANI et al., 2004).

A ação de CAT ocorre sequencialmente àquela das SOD no sistema de detoxificação de ERO, sendo que ambas as enzimas podem ser reguladas por indução de atividade e/ou síntese quando há um quadro de estresse oxidativo. Em microrganismos, CAT também atua como defesa frente às espécies oxidantes liberadas pelos fagócitos, participa no processo de formação de hifas em *Candida*

*albicans* e atua no mecanismo de resistência à antifúngicos poliênicos (NAKAGAWA, 2008).

### 2.3 *Candida albicans* COMO LEVEDURA CAUSADORA DE INFECÇÕES

Com o aumento da população de pacientes com imunodeficiência ou em terapias imunossupressoras, as infecções fúngicas tem se tornado um problema crescente na saúde pública. Problemas envolvendo o diagnóstico destas doenças aliados a alta resistência aos poucos medicamentos disponíveis quando comparado com doenças bacterianas tornam ainda mais complicada a terapia (MICELI & LEE, 2011). Os principais fungos envolvidos em infecções sistêmicas podem ser contraídos pelo ambiente, como é o caso de *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Penicillium mameffeii* ou podem também ser oportunistas, presentes na flora normal do hospedeiro, como por exemplo *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (PFALLER, PAPPAS & WINGARD, 2006).

Leveduras são fungos unicelulares e as espécies de *Candida* representam um grupo de leveduras de especial importância na saúde humana. *Candida* faz parte da flora normal de indivíduos saudáveis e está normalmente presente na pele e mucosas da cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal e urogenital. Essas leveduras são encontradas comumente nas populações humanas e residem em equilíbrio com a microbiota comensal de hospedeiros (HANNULA et al., 2000). No entanto, algumas espécies de *Candida* podem causar uma variedade de infecções em algumas situações, sendo que os exemplos mais comuns são infecções orofaríngeas e vulvovaginal (CALDERONE & CLANCY, 2012).

Sendo assim, a candidíase é uma infecção de espectro bastante extenso, que acomete, principalmente, pacientes imunocomprometidos e apresenta como agente etiológico leveduras do gênero *Candida* (URIZAR, 2002; LIMA, 2003; AVRELLA & GOULART, 2008). *Candida albicans* é a espécie mais frequente em tais infecções, sendo considerada o patógeno oportunista mais comum na espécie humana (WHITE et al., 2004; AVRELLA & GOULART, 2008). Dentre os fatores predisponentes para candidíase, destacam-se: *diabetes mellitus*, uso prolongado de antibióticos e corticoides, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), leucemia,

queimaduras, transplantes e tratamento quimioterápico (URIZAR, 2002; LIMA, 2003; AVRELLA & GOULART, 2008).

Algumas espécies podem causar infecções sistêmicas, conhecidas como candidemia, que ocorre quando a levedura penetra e atravessa a barreira epitelial atingindo a corrente sanguínea (LIM et al., 2012). Uma vez no sangue, o microrganismo é capaz de disseminar para infectar quase todos os órgãos. Estima-se que *C. albicans* seja responsável por 50-60% dos casos de candidemia (PERLROTH, CHOI & SPELLBERG, 2007).

A incidência de candidíase aumentou significativamente nas últimas duas décadas e infecções por corrente sanguínea junto com *Candida spp.* estão se tornando a causa primária de morbidade/mortalidade em pacientes imunocomprometidos (PFALLER et al., 2001). Hospedeiros imunossuprimidos e a alta virulência de *C. albicans* são uma combinação ideal que favorece o seu surgimento como importante agente de doenças em humanos (ANGIOLELLA et al., 2008).

Espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes fúngicos mais frequentemente isolados em infecções hospitalares, correspondendo a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e são a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia (TAMURA et al., 2007; MIRANDA et al., 2009).

A incidência de candidemia varia muito ao longo do globo terrestre, oscilando de 0,19 a 2,5 casos a cada 1000 pacientes (CHEN et al., 2006; COLOMBO et al., 2006). Comparando-se a incidência no mundo todo, verificou-se que esta é 10 vezes maior em pacientes menores que 1 ano de idade e 5 vezes maior em pacientes acima de 65 anos (ARENDRUP et al., 2008; HAJJEH et al., 2004).

Um estudo realizado no hospital universitário da Universidade Federal Do Mato Grosso do Sul em 2006 mostrou uma taxa de incidência de 53,4% de infecção hospitalar. Dentre os microrganismos isolados, 48,1% corresponde a fungos, dentre eles diferentes espécies de *Candida* (OLIVEIRA et al., 2009).

Um estudo realizado em ambiente hospitalar de terapia intensiva durante os anos de 2005 a 2008 mostrou uma taxa de 20% de infecção hospitalar. Os microrganismos não resistentes responsáveis por infecções hospitalares mais comuns foram *Candida albicans* (18,5%), *Escherichia coli* (15,1%), *Pseudomonas*

*aeruginosa* (8,9%), *Enterobacter cloacae* (8,2%) e *Enterococcus faecalis* (8,2%) (OLIVEIRA et al, 2010).

O controle farmacológico de candidíase é feito principalmente com o uso do fungicida anfotericina B. Este é um antifúngico macrolídico poliênico, derivado do ascomiceto *Streptomyces nodosus* (DISMUKES, 2006). Este fármaco se fixa avidamente nos esteróis das células eucariotas, sendo que sua afinidade é maior pelo ergosterol dos fungos do que pelo colesterol das células de mamíferos (CATALÁN & MONTEJO, 2006). Dessa forma, a anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteroide constituinte exclusivo da parede celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas. A alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* sp. O seu mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno. Dentre estes, os fatores mais comuns são imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica. Outros fatores facilitam a entrada do microrganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de cateteres, queimaduras e cirurgias extensas (MALUCHE & SANTOS, 2008).

#### 2.4 BIOFILME DE *C. albicans* E A RESISTÊNCIA ANTIOXIDANTE DO FUNGO

Biofilmes de *C. albicans* são ultraestruturas complexas, bem organizadas, que se constituem como uma densa rede de leveduras, hifas e pseudohifas imersas em uma matriz de polissacarídeos, proteínas e outros componentes orgânicos, cuja principal característica é sua resistência aumentada à grande maioria de antifúngicos conhecidos, quando comparados com a forma planctônica do mesmo fungo.

Os biofilmes são formados por comunidades heterogêneas de microrganismos, que se acumulam em superfícies, envolvidas por uma matriz extracelular de polímeros (MARSH, 2004). Os biofilmes apresentam características de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos quando comparados com as

mesmas células crescidas em culturas planctônicas (formas microbianas livres e circulantes), o que os tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (DAVEY E O'TOOLE, 2000).

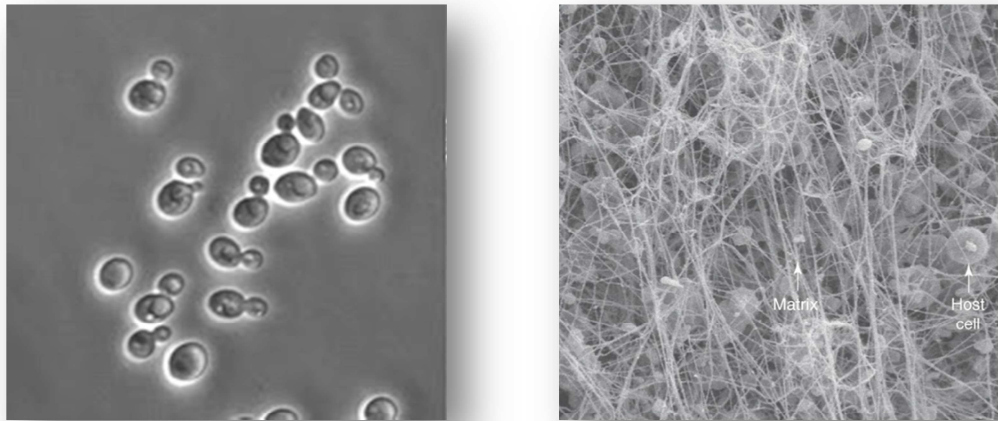


Figura 1: diferenciação *C.albicans* na forma planctônica e na forma de biofilme por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Andes e cols (2004).

O biofilme formado pelas espécies de *Candida* está associado a um aumento drástico da resistência contra a maioria dos antifúngicos, o que pode permitir a persistência da infecção fúngica apesar do tratamento medicamentoso. Alguns autores sugerem que o biofilme da *Candida* exibe resistência a maioria dos antifúngicos com exceção das equinocandinas e formulações lipídicas da anfotericina B (CHANDRA et al., 2005).

O biofilme de *Candida* possui importante repercussão clínica devido ao aumento da resistência a drogas, pela sua habilidade de resistir ao sistema imune do hospedeiro e aderir a dispositivos médicos de implantes e odontológicos. Dispositivos implantados, como cateteres, válvulas protéticas do coração, assim como dispositivos relacionados e próteses dentais, permitem a este patógeno aderir à superfície, formando biofilme (PAVARINA et al., 2003).

A formação do biofilme de *Candida* ocorre em diferentes fases, que incluem a aderência inicial e a colonização, seguida da divisão celular, proliferação e maturação do biofilme. Esta inclui formas leveduriformes e filamentosas, adequadas para a colonização de superfícies inertes. Durante a fase de adesão, forma-se uma camada de células leveduriformes flutuantes a uma superfície e, sobre estas, uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos. O

material extracelular produzido pela espécie *C. albicans* contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos, sendo esta composição diferente das células não aderidas (planctônicas) (BAILLIE & DOUGLAS, 1999).

O biofilme maduro de *C. albicans* mostra uma complexa arquitetura tridimensional e extensiva heterogeneidade espacial, que representa uma otimização do espaço para facilitar o afluxo de nutrientes entre os microrganismos (ANDES et al., 2004; RAMAGE et al., 2004).

Há tempos que estudos com *C. albicans* elucidaram que a resposta antioxidante desse microrganismo é específica e diferenciada daquela de outros fungos. Por exemplo, *C. albicans* responde com adaptação rápida a tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menadiona, ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae* (JAMIELSON, 1996). A comparação de vias bioquímicas diferenciadas de diversas espécies de *Candida* e de *Aspergillus fumigatus* fundamentou que esses organismos precisam, necessariamente, de resposta antioxidante para a sobrevivência no organismo do hospedeiro (CHAUHAN et al., 2006). Outros fungos, como *Candida glabrata*, responde ao estresse oxidativo desencadeado por fagócitos através de mediação da enzima CAT, cujo controle ocorre na transcrição, sob regulação de fatores específicos (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2008).

## 2.5 ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS

Antioxidante é definido como qualquer substância que retarda, previne ou remove danos oxidativos de uma molécula alvo (HALLIWELL, 2007).

Durante a evolução humana, as defesas endógenas se aperfeiçoaram para manter um balanço entre espécies oxidantes e antioxidantes. Para isso, a atividade antioxidante pode ser eficaz através de alguns métodos: como inibidores de reações de oxidação inibindo a formação de radicais livres lipídicos; interrompendo a reação em cadeia de autooxidação; como supressores de oxigênio singlete; através de sinergismo com outros antioxidantes; como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis; como quelantes de metais que convertem metais pró-oxidantes em compostos estáveis e como inibidores de enzimas pro-oxidantes (KANCHEVA, 2009).

O sistema antioxidante celular se divide em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Com relação aos antioxidantes enzimáticos, temos a presença das

enzimas que previnem a formação ou neutralizam espécies reativas RAHMAN, 2007). Além de SOD, CAT e GPx, temos uma defesa antioxidante enzimática secundária, que não neutraliza diretamente espécies reativas, mas apresentam papel de suporte para as outras enzimas antioxidantes. Esta defesa secundária é formada, principalmente, pela glutatona redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Entre os antioxidantes não enzimáticos endógenos temos vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos de nitrogênio e peptídeos (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Apesar de eficiente, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente e os humanos dependem de antioxidantes presentes na dieta para manter a concentração de ERO/ERN em níveis controlados (PIETTA, 2000). Importantes exemplos de antioxidantes naturais presentes na dieta humana são as vitaminas C e E, nomes genéricos para ácido ascórbico e tocoferóis, respectivamente. O ácido ascórbico é um eficaz sequestrante de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ ,  $1O_2$  e  $\bullet NO$  (BARROS et al., 2011). O tocoferol é eficaz na reversão de peroxidação lipídica e atua sinergicamente com o ácido ascórbico (HALPNER et al., 1998). Outros importantes antioxidantes naturais incluem a vitamina K, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides e alguns minerais (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Ainda segundo Carochó e Ferreira (2013), os antioxidantes sintéticos foram desenvolvidos com o objetivo de serem incorporados aos alimentos, dispensando alguns tipos de tratamentos e prolongando a vida de prateleira dos mesmos. O objetivo inicial destes antioxidantes sintéticos foi prevenir a oxidação dos alimentos especialmente por ácidos graxos. No entanto ao passar dos anos, os antioxidantes sintéticos tiveram ampliadas suas aplicações, sendo atualmente alvo principalmente da indústria de cosméticos.

Dentre os antioxidantes sintéticos extremamente eficientes, os nitróxidos cíclicos, quimicamente denominados aminóxils ou nitroxils, podendo ser definidos como radicais estáveis. Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco ou seis átomos, sendo que um desses é de nitrogênio e os demais de carbono. Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui um par de elétrons livres, fornecendo natureza radicalar a tais compostos. Ligados à posição  $\alpha$  do anel existem grupamentos metil, os quais conferem estabilidade ao prevenir a dismutação radical-radical e limitar o acesso de substâncias reativas. O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos

substituintes que podem estar presentes no anel (SAMUNI & BARENHOLZ, 2003; GOLDSTEIN et al., 2003; ISRAELI et al., 2005; SOULE et al., 2007).

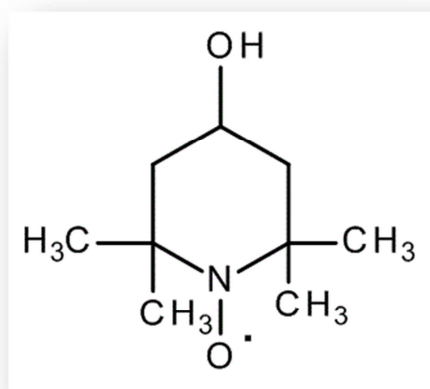


Figura 2: Estrutura química geral dos compostos da classe dos nitróxidos.

Fonte: Google imagens

Durante os últimos anos, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, e se mostram capazes de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por radicais livres. (HAHN et al., 1997; ISRAELI et al., 2005; SOULE et al., 2007; LAIGNIER et al., 2008; TIMONER et al., 2008). Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar como os nitróxidos são capazes de atenuar danos oxidativos, o que os difere consideravelmente dos antioxidantes monofuncionais, que desempenham a sua atividade através de uma única maneira de atuação. Esses mecanismos incluem (i) a dismutação de radicais superóxido, através de uma atividade mimética à da SOD, (ii) aumento da atividade semelhante à da CAT e de outras hemeproteínas, (iii) a detoxificação de espécies reativas formadas por xenobióticos, (iv) a capacidade de interagir com radicais inativando-os e (v) a modulação da sinalização redox da célula. (KRISHNA et al, 1994; ZHANG et al.,1999; SAMUNI et al., 2002; LAIGNIER et al., 2008; TIMONER et al., 2008).

Em geral, os nitróxidos apresentam grandes perspectivas em relação ao seu uso. No entanto, ainda existe a necessidade de que mais pesquisas sejam realizadas, a fim de que as propriedades mais adequadas de cada composto dessa classe sejam aplicadas de modo conveniente e seguro. Portanto, a compreensão das relações entre estrutura e atividade, metabolismo, modo com que eles



efetivamente atuam e demais impactos do uso desses, se torna prioridade a partir do momento em que auxiliam grandemente na compreensão da sinalização redox da célula e despontam como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente o efeito de diferentes nitróxidos, como 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-óxido (Tempol) e seu análogo lipossolúvel 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-óxido (Tempo), bem como 4-(9-acridinecarbonyl)-amino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-óxido (Ac-Tempo), como moduladores da migração fagocitária induzida por LPS ou por caseinato de sódio (LIMA et al., 2010), além da atividade modulatória sobre Nox2 fagocitária, tanto de macrófagos quanto de neutrófilos (LAIGNIER et al., 2008; CHAVASCO et al., 2009). Esses dados colocam os nitróxidos como compostos que atuam diminuindo a liberação de  $O_2^{\bullet-}$  através da regulação da atividade de proteínas quinases e fosfatases (RIBEIRO et al., 2010) e pela inibição da atividade chaperona da proteína dissulfeto molecular (BITENCOURT-SANTOS et al., 2010) em neutrófilos e macrófagos.

Entretanto, poucas pesquisas foram conduzidas para esclarecer o efeito de nitróxidos em processos infecciosos. Recentemente, Linares e colaboradores (2009) descreveram que o Tempol aumentou a sobrevivência de *Leishmania braziliensis* em modelos animais, quando esse nitróxido foi administrado por via oral através de regulação da iNOS fagocitária. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente (LIMA et al., 2011) que o nitróxido Tempo é capaz de diminuir a resposta oxidante de neutrófilos frente a *C. albicans* na forma planctônica, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Assim permanece a polêmica do uso desse antioxidante sintético como modulador de processos inflamatórios quando esses ocorrem associados a infecções.

## 2.6 ANTIOXIDANTES COMO MODULADORES DA DEFESA FÚNGICA CONTRA O MECANISMO OXIDANTE FAGOCITÁRIO

Microrganismos apresentam uma diversidade grande de proteção contra mecanismos microbicidas dos fagócitos, seja o mecanismo decorrente da produção de ERO/ERN, denominado mecanismo oxidante, seja o mecanismo não-oxidante, composto por enzimas específicas que são liberadas por neutrófilos contra organismos invasores. Por outro lado, microrganismos específicos tem se mostrado

susceptíveis à produção de ERO pelo sistema Nox2, mas resistentes a ERN resultante da ativação de iNOS fagocitária (SEGAL et al., 2003).

Essas defesas de microrganismos são coordenadas, incluindo reparo de DNA, produção de substratos *scavengers* e atividade de enzimas antioxidantes. *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* permitiram o estudo e demonstração de uma ampla gama de genes codificadores para essa defesa, destacando-se o sistema de regulon *oxyR*. Nas condições complexas do fagossoma, o decréscimo de glicose disponível e o aumento da concentração de lactato também provocam aumento da resistência a ERO/ERN por indução de produção de CAT pelos microrganismos (HASSET & COHEN, 1989). Da mesma forma, *Pseudomonas aeruginosa* responde a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com ativação de genes específicos (IYAMA et al., 2007) e do regulon *oxyR* (HEO et al., 2010).

A resposta antioxidante de microrganismos tem implicações também na resistência a drogas. *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de modular a expressão dos seus sistemas enzimáticos de defesa antioxidante quando exposto a determinados compostos. O sistema catalase-peroxidase, por exemplo, está diretamente envolvido na resistência deste microrganismo à isoniazida (ROSSETTI et al., 2002). Kohanski e colaboradores (2010) relataram recentemente esse conjunto de eventos, enfatizando que baixas doses de antibióticos bactericidas podem induzir resistência multidrogas através de aumento no índice de mutação determinado pela formação de ERO.

Estudos anteriores já demonstraram que o mecanismo oxidante microbicida, decorrente do acionamento do sistema Nox2 fagocitário, é mais importante na defesa do hospedeiro que o acionamento da enzima MPO (ARATANI et al., 2002).

A hipótese de que antioxidantes possam atuar como antagonistas de bactericidas ou fungicidas permanece polêmica na literatura. Orth e colaboradores (1993) mostraram que a adição de concentrações micromolares de alfa-tocoferol foram capazes de suprimir 50% do efeito de fungicidas com estrutura de hidrocarboneto aromático sobre o crescimento de *Ustilago maydis*. Entretanto, esse efeito não foi atribuído à atividade antioxidante desse lipídeo terpenóide, mas sim à sua capacidade de inserção e modificação das propriedades físicas de membranas.

Estudos que comparam a toxicidade de ERO/ERN, especialmente radicais livres, contra *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram claramente essa diferença. King e colaboradores (2006) descreveram que o radical  $\cdot\text{OH}$  é um

potente fungicida, mas não tem capacidade microbicida significativa contra *E. coli*. Os mesmos autores descrevem que o radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) é tóxico para ambos os microrganismos, enquanto que  $\text{NO}$  atua como bactericida, mas não como fungicida. Esses resultados foram parcialmente confirmados em trabalhos com o fungo *Trichophyton spp.*, que mostrou-se susceptível à ação oxidante do radical hidroxila (IWASAWA et al., 2009) e com os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

Por outro lado, diferentes trabalhos mostraram que antioxidantes podem atuar como fungicidas. Substâncias *scavengers* de radical  $\text{OH}$  mostraram-se capazes de atuar como inibidoras da etapa de diferenciação de dois fungos em baixa concentração. Em alta concentração, as mesmas substâncias atuaram como inibidoras do ciclo de vida celular de ambos os fungos (Georgiou et al., 2000).

Essas diferenças podem ser atribuídas, ao menos parcialmente, às peculiaridades do metabolismo de cada microrganismo. A indução de expressão e atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT foi relatada em *Botrytis cinérea*, quando esse fungo foi exposto à vinclozolina, um fungicida da classe de dicarboximidas (CHOI et al., 1997).

Se a defesa antioxidante de microrganismos constitui um fator de aumento de patogenicidade dos mesmos, além de incremento de sua resistência a fármacos específicos, levanta-se, então, a hipótese de que o uso de antioxidantes exógenos, amplamente disseminado e estimulado por vasta propaganda, pode contribuir para o agravamento de infecções microbianas.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a importância da defesa antioxidante de *C. albicans* na resistência à fagocitose por neutrófilos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram testados, especificamente:

- A ativação do sistema Nox2 de neutrófilos estimulados com *C. albicans* na forma planctônica e na forma de biofilme;
- A atividade das enzimas SOD e CAT de *C. albicans* em ambas as formas na ausência e presença do nitróxido Tempol;
- A atividade das enzimas SOD e CAT de neutrófilos humanos tratados ou não com *C. albicans* em ambas as formas na ausência e presença do nitróxido Tempol;
- O efeito do tratamento prévio dos neutrófilos com o nitróxido Tempol sobre a capacidade fungicida dos mesmos sobre *C. albicans*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Houve colaboração do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, sendo a Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias, docente da disciplina de Microbiologia Básica, co-orientadora do trabalho e responsável pela parte específica de manipulação dos microrganismos utilizados.

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE *Candida albicans* E METODOLOGIA DE RUPTURA CELULAR

*Candida albicans* ATCC 10231, que foi utilizada nesse trabalho, produz D-arabinolactona oxidase, DNA topoisomerase, proteinases aspárticas, aspartil proteinases, proteína ligadora de estrógeno, lanosterol sintase, 2,3-oxidosqualeno lanosterol-ciclase, álcool fenetil, poliamina oxidase, triptofol e ácido farnesóico (ATCC, 2010).

#### 4.1.1 *Candida albicans* planctônica

As culturas de *C. albicans* foram mantidas em condições padrões no laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Unifal-MG. As mesmas foram utilizadas após 24 horas de inoculação em meio Sabouraud-dextrose, mantido a 25°C.

Para doseamento de proteínas totais e da atividade das enzimas antioxidantes intracelulares das leveduras, foi feita a ruptura das células fúngicas utilizando-se o reagente Cellytic Y da Sigma-Aldrich, seguindo o procedimento sugerido no boletim do produto, como descrito brevemente a seguir. Para crescimento das células planctônicas, foi feito o repique em caldo Sabouraud após o crescimento por 24h em meio ágar Sabouraud. Alíquotas da cultura foram inoculadas em triplicata, nas seguintes condições: células; células mais solução de nitróxido Tempol em uma concentração final de 100 µM; células mais solução de Tempol em uma concentração final de 300 µM. O cultivo no caldo foi feito por mais 24 horas a 25°C. O caldo sobrenadante foi desprezado e as culturas transferidas

para microtubos de plástico previamente tarados. Foi feita uma centrifugação a 12.000 xg por 5 minutos para remoção do restante de caldo presente.

Pesou-se 0,09 g de células (pellet de células), lavou-se com PBS centrifugando a 12.000 xg por 5 minutos para remoção dos resquícios de meio de cultura. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 225 µL do reagente Cellytic Y. Foram feitas então duas centrifugações, uma a velocidade mínima (250 xg) por 20 min a 4°C para homogeneização e outra a 12.000 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as dosagens e o pellet foi utilizado para verificar a eficácia da ruptura.

#### **4.1.2 *Candida albicans* biofilme**

A formação de biofilme foi induzida em placas de poliestireno de 24 poços, adaptado de metodologia descrita em placas de 96 poços (KATRAGKOU et al., 2010). Para tal, as leveduras foram repicadas em dois momentos em ágar Sabouraud por 24h a 37°C. Posteriormente, o repique foi feito em caldo YNB-glicose, ficando em estufa por mais 24h a 37°C. As placas de 24 poços a serem utilizadas foram previamente sensibilizadas com soro fetal bovino em cada poço, durante 24 horas a 37°C em agitador umidificado a 0,9 xg. O número de células no caldo YNB-glicose foi ajustado para 10<sup>6</sup> células/mL utilizando-se escala 0,5 de Mac Farland e esta suspensão foi inoculada em cada poço para a etapa de adesão, durante a qual a placa permaneceu durante 1 hora e 30 minutos em agitação a 0,9 xg e 37°C. Em seguida, aspirou-se a suspensão de cada poço e foi feita a lavagem por duas vezes com PBS. Adicionou-se meio de cultura YNB-glicose e a placa foi mantida em agitação por 48 horas a 37°C e 0,9 xg. No último dia, aspirou-se a suspensão de cada poço e realizou-se duas lavagens com PBS.

Em uma placa houve o cultivo apenas da levedura e em outra placa a levedura foi cultivada na presença do Tempol em uma concentração de 300 µM em cada poço. Após o cultivo, os biofilmes foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL previamente tarados e centrifugados a 12.000 xg por 5min. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* de células foi pesado e procedeu-se a ruptura com o Cellytic Y como descrito anteriormente.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE SUPERÓXIDOS DISMUTASES

A atividade das enzimas SOD foi determinada utilizando-se o sistema xantina/xantina oxidase como gerador de  $O_2^{\bullet-}$ , onde o citocromo *c* atua como sonda química estequiométrica, sendo reduzido por esse radical. A redução contínua do  $Fe^{3+}$  do citocromo *c* a  $Fe^{2+}$ , indicador da reação, foi monitorada no comprimento de onda de máxima absorção do grupo heme- $Fe^{2+}$  (550nm) em espectrofotômetro de microplaca, como ilustrado na Figura 3.



Figura 3: Sistema enzimático para detecção de atividade de SOD

A reação foi realizada em placas de 96 poços onde em cada poço adicionou-se hipoxantina ( $3 \times 10^{-4}$  M), citocromo *c* (0,0075 mM), PBS (0,1 M) e amostra, sendo esta uma suspensão de leveduras planctônicas ou obtidos de biofilme numa primeira fase do trabalho. Na segunda fase, a amostra foi constituída de neutrófilos humanos na presença e ausência de levedura em ambas as formas e também na presença e ausência do Tempol. Procedeu-se a leitura após a adição de xantina oxidase (5 U). Para verificar a variação da absorbância, a leitura foi anotada antes e após a adição da enzima.

Nesse sistema, uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima capaz de dismutar 50% do  $O_2^{\bullet-}$  produzido. Os testes foram validados com SOD padrão (sigma Aldrich) e os resultados expressos em unidades específicas (U) pela razão U/concentração proteica da amostra (MCCORD e FRIDOVICH, 1968).

Para determinação da isoformas MnSOD, foi seguido o mesmo procedimento com adição de KCN 5 mM. O KCN inibe a isoforma Cu-ZnSOD, permitindo, então, determinar o valor da atividade de MnSOD diretamente. O valor total da atividade de SOD subtraído aquele correspondente à atividade da isoforma MnSOD forneceu a atividade específica da isoforma Cu-ZnSOD.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE CATALASE

O procedimento analítico da atividade de CAT se baseou na comparação das velocidades de decomposição de uma solução 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS pH 7,4 na presença ou ausência (controle) de alíquotas dos homogeneizados fúngicos. Para isso, foi feita a leitura da absorbância em cubetas de quartzo contendo a amostra e a solução a 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A cinética de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM foi acompanhada por espectrofotometria a 240nm a 25°C ( $\epsilon = 71 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), comparado com CAT padrão (sigma Aldrich) e expressa em U em relação à concentração proteica total (AEBI, 1984). Foi feita a leitura em triplicata de cada amostra e também do branco. A atividade da CAT foi calculada utilizando-se a fórmula a seguir e os resultados expressos em U/mg de proteína.

$$\text{Atividade} = (1000 \times \Delta\text{abs}) / 43,6 \times \text{mg proteína}$$

A variação de absorbância foi obtida pela subtração da leitura antes e após a adição do peróxido e obteve-se as médias das triplicatas.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA TOTAL

As concentrações proteicas foram determinadas em todas as amostras pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão da curva de calibração. Foi realizado o microensaio em microplaca, no qual a curva de calibração foi feita com uma solução-mãe de BSA 25 µg/mL em 5 pontos de concentração proteica diferentes, sendo estes 2,5; 5,0; 10; 15 e 20 µg/mL. As leituras de absorbâncias foram feitas a 595nm.

### 4.5 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS PARA TESTES *EX VIVO* E RUPTURA CELULAR PARA DOSEAMENTO ENZIMÁTICO

O isolamento dos neutrófilos humanos foi realizado conforme metodologia descrita por Pereira (2005), após aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unifal-MG, número CAAE 17064713.0.0000.5142.

Foram coletados 20 mL de sangue de voluntários sadios em tubos Vacutainer contendo anticoagulante (heparina ou EDTA). O tubo foi centrifugado a 168 xg



durante 10 minutos para separação do plasma. Este foi retirado e substituído por NaCl 0,9% estéril. A suspensão foi homogeneizada suavemente por inversão do tubo.

Em seguida, transferiu-se a suspensão delicadamente para tubos cônicos estéreis de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-paque. Foi feita a centrifugação a 543 xg por 30 min em temperatura ambiente. O anel de mononucleares formado foi retirado e substituído em igual volume por PBS.

Foi adicionado ao tubo contendo as células, Dextrana 2% em NaCl 0,9% (1 dextrana: 2 células, v/v). O tubo foi homogeneizado e deixado em repouso com tampa semi-aberta durante 40 min para sedimentação dos eritrócitos.

A camada superior, contendo os PMN (predominantemente neutrófilos) foi transferida para outro tubo e o volume completado com PBS. Este tubo foi então centrifugado a 543 xg por 10 min a 4°C.

Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi removido e desprezado. Adicionou-se ao *pellet* formado água Mili-Q gelada para lise dos eritrócitos restantes. Homogeneizou-se com pipeta plástica por 1min. Adicionou-se NaCl 2,7% e PBS e centrifugou-se a 543 xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi novamente removido e desprezado e os PMN foram ressuspensos em PBS glicosilado para contagem celular em Câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan.

Para a determinação das atividades das enzimas intracelulares dos neutrófilos humanos, foi feita sua ruptura através do uso do ultrassom. As células isoladas foram suspensas em PBS glicosilado e esta suspensão foi colocada em ultrassom em banho de gelo.

#### 4.6 ATIVAÇÃO DE Nox2 DE NEUTRÓFILOS

Para se testar a capacidade de neutrófilos, tratados ou não com o Tempol, de produzirem microbicidas oxidantes contra *C. albicans*, foram utilizadas as seguintes metodologias: quantificação da atividade de Nox2 e determinação de atividade das enzimas antioxidantes de neutrófilos ativados pela exposição ao fungo na forma planctônica ou como biofilme, descritas a seguir.

#### 4.6.1 Quantificação da redução do citocromo c associado à atividade de Nox2

O monitoramento espectrofotométrico do *burst* respiratório, através da redução contínua do  $\text{Fe}^{3+}$  do citocromo *c*, tal como descrito por Cohen e Chovaniec (1978), foi utilizado para se determinar os efeitos do nitróxido sobre a atividade de Nox2 dos neutrófilos. A quantificação foi feita pelo monitoramento da variação da densidade óptica decorrente da redução do citocromo *c* (550 nm) e calculada utilizando-se  $\epsilon_{\text{citocromo } c} = 19.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Amostras de culturas de *C. albicans* nas formas planctônica e em biofilme foram opsonizadas com 1 mL de soro humano saudável e agitação em shaker durante 1h a 37°C e utilizadas como estímulo da atividade Nox2 fagocitária na proporção 1000:1 (células de *C. albicans*: neutrófilos).

Para verificar a ação do nitróxido Tempol como moduladores da atividade fagocitária, o efeito do tratamento celular com esse composto sobre a redução do citocromo *c*, em condições associadas ao *burst* respiratório ativado por populações definidas de *C. albicans*, foi calculado por comparação com células incubadas apenas com veículo e submetidas de forma idêntica a todas as etapas experimentais (HATANAKA et al., 2003). Os resultados foram comparados ainda com aqueles obtidos com suspensões de neutrófilos estimulados com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 100 ng/mL), um agente estimulador de Nox2 através da ativação direta da proteína quinase *c*. A validação dos testes foi realizada com adição de difeniliodônio (DPI, 100 ng/mL) nos ensaios, uma vez que este composto é um inibidor irreversível de flavoproteínas e amplamente usado como inibidor de Nox2.

Tabela 1: Delineamento experimental para determinação do efeito de Tempol sobre a atividade de Nox2 em neutrófilos humanos.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neutrófilos (10 <sup>4</sup> células)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citocromo c (0,0075 mM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PMA (100 ng)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DPI (100 ng)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> (10 <sup>7</sup> células) planctônica	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> (10 <sup>7</sup> células) biofilme	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Tempol (100 µM)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Tempol (300 µM)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

+Indica adição do componente; - indica ausência do componente.

#### 4.6.2 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes produzidas por neutrófilos

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT dos neutrófilos foram utilizados os mesmos procedimentos metodológicos descritos anteriormente nos itens 4.2 e 4.3 . Os fagócitos foram rompidos previamente por ultrassom e as atividades enzimáticas foram doseadas nos respectivos sobrenadantes obtidos.

Os experimentos conduzidos em triplicatas independentes nos grupos experimentais sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Delineamento experimental para determinação do efeito de Tempol sobre as atividades de SOD e CAT de neutrófilos humanos estimulados com *C. albicans*.

Teste	1	2	3	4	5	6
<b>Componentes</b>						
<b>Neutrófilos (10<sup>4</sup> células)</b>	+	+	+	+	+	+
<b><i>C. albicans</i> (10<sup>7</sup> células) planctônica</b>	-	-	+	+	-	-
<b><i>C. albicans</i> (10<sup>7</sup> células) biofilme</b>	-	-	-	-	+	+
<b>Tempol (300 µM)</b>	-	+		+	-	+

+Indica adição do componente; - indica ausência do componente.

#### 4.7 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular dos fagócitos e dos fungos foi determinada pela exclusão com azul de Trypan, antes e após cada experimento, sendo contadas em média, 200 células por amostra (SIEDLE et al., 2003). A análise por microscopia óptica das células viáveis, através de método de determinação de viabilidade celular morfológico, permitiu determinar se as condições do estudo alteram este parâmetro. Este método consiste em observar em microscópio óptico a coloração das células em lâminas após serem coradas pelo corante azul de Trypan. Este corante entra na célula que está rompida, corando-a de azul.

#### 4.8 ENSAIO DE *KILLING* DE *Candida albicans* POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Foi realizado o isolamento de neutrófilos conforme descrito anteriormente obtendo-se 10<sup>4</sup> células/mL. Foram obtidas as culturas de *Candida albicans* planctônica e biofilme e o volume de células foi ajustado para 10<sup>7</sup> células/mL para serem então opsonizadas com soro humano.

Para o ensaio de *killing*, seguiu-se o protocolo padronizado por Meloni-Bruneri e colaboradores (1996), com algumas modificações. As suspensões de células foram pipetadas em placa de 96 poços em triplicata, na qual estabeleceu-se como grupo controle positivo a presença apenas das células leveduriformes e controle negativo a presença das células leveduriformes tratadas com anfotericina B a 0,5µg/mL, antifúngico padrão. Foram feitos outros três grupos, sendo eles: células

leveduriformes na presença de neutrófilos humanos e Tempol; células leveduriformes na presença de neutrófilos humanos e células leveduriformes na presença de Tempol 300  $\mu\text{M}$ . As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, as suspensões de cada 3 poços foram transferidas para microtubos de plástico e cada poço foi lavado com PBS. Cada amostra, formada pela suspensão obtida das triplicatas, teve seu volume completado com PBS. Utilizando-se swab estéril, as amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e mantidas em estufa a 37°C por 24h. Os resultados foram expressos em UFC (unidades formadoras de colônias).

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey para comparações múltiplas das médias (ZARR, 1996). Valores de  $p$  iguais ou menores que 0,05 indicadores do nível de significância de pelo menos 5% entre as diferenças encontradas, foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEOR PROTEICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS TRATADAS OU NÃO COM TEMPOL

Após cultivo e ruptura das células de *C. albicans* na forma planctônica e em biofilme, foi feita a verificação da ruptura através da avaliação da viabilidade celular, o doseamento de proteínas totais, atividade de SOD e CAT. As amostras utilizadas foram *C. albicans*, *C. albicans* tratada com Tempol (100  $\mu$ M) e *C. albicans* tratada com Tempol (300  $\mu$ M) para a levedura na forma planctônica e *C. albicans*, *C. albicans* tratada com Tempol (300  $\mu$ M) para a levedura em biofilme.

Dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram a concentração de 300  $\mu$ M de Tempol como a dose máxima efetiva para os ensaios que determinaram efeito deste nitróxido sobre NOX2 de neutrófilos inflamatórios extraídos de camundongos e sobre outras espécies de *Candida*. No presente trabalho, foram feitos primeiramente os experimentos com *C. albicans* na forma planctônica e para estes foi introduzido um novo valor de concentração de Tempol, 100  $\mu$ M. Como os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas em relação à levedura sem tratamento, este valor de concentração foi excluído nos testes com o biofilme, admitindo-se apenas o Tempol na concentração padronizada de 300  $\mu$ M.

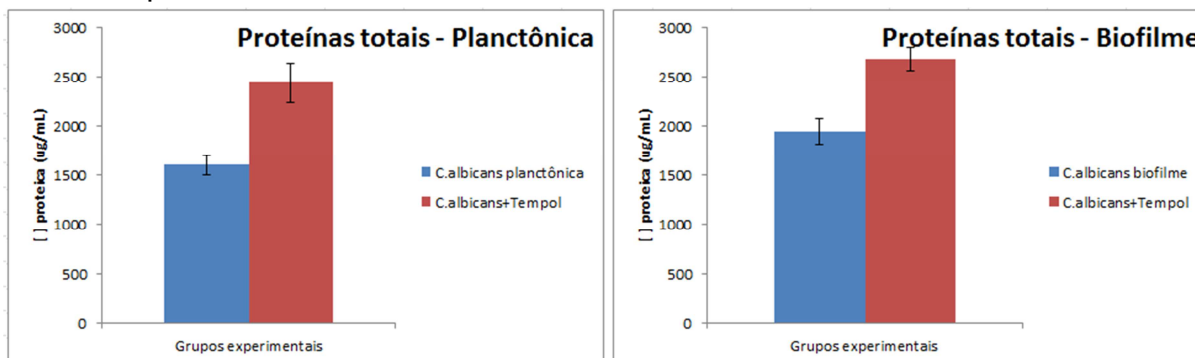
Cabe ressaltar que, embora houvesse número maior de células para a forma de biofilme, a quantidade utilizada para ruptura e doseamento foi a mesma, cabendo assim, a comparação entre elas.

Para todas as amostras, obtivemos uma incidência de cerca de 80 a 90% de células inviáveis, o que confirma que os procedimentos de ruptura foram eficientes.

#### 5.1.1 Doseamento de proteínas totais pelo método de Bradford

Obtivemos os seguintes resultados de concentração proteica para os grupos testados:

Gráfico 1: Efeito do Tempol sobre o teor proteico total de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão dos teores proteicos de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\* Teste de Tukey indicou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e entre os grupos estudados

Com base nos resultados obtidos, podemos observar que o grupo experimental *C. albicans* se difere estatisticamente do grupo *C. albicans* tratada com Tempol (300 µM), quando analisada a forma planctônica.

Houve diferença significativa também entre a concentração de proteínas do biofilme e deste tratado com o nitróxido Tempol a 300 µM.

Em ambos os casos, pode-se perceber que o tratamento com o Tempol levou a um aumento na concentração proteica, elevando em 52% na levedura planctônica e 38% na forma de biofilme. Este fato sugere que o Tempol induziu a síntese proteica sem, no entanto, induzir a proliferação celular.

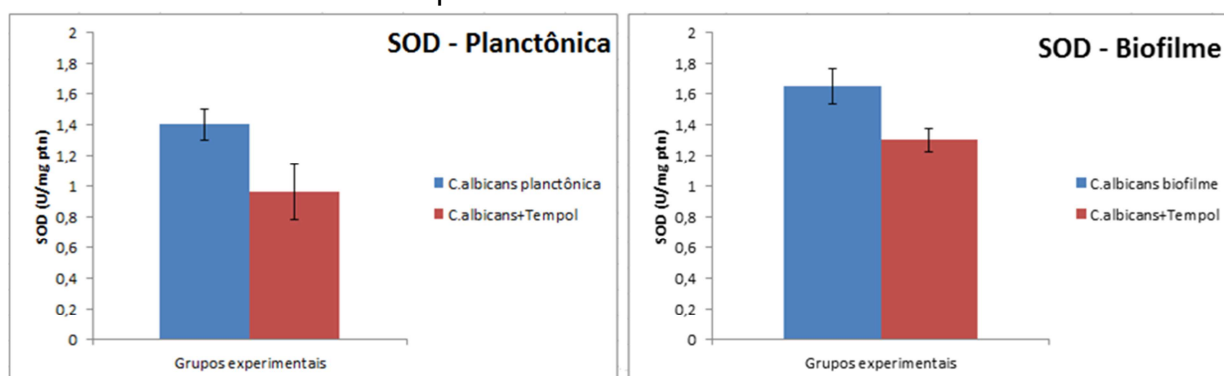
Nos ensaios de determinação da concentração proteica foi possível perceber que na presença do Tempol a concentração proteica intracelular de *C. albicans* foi maior nas suas duas formas estudadas. Verificamos ainda que na forma de biofilme a concentração proteica média foi de 2.688 µ/mL, mais elevada que na forma planctônica, com média de 1.946 µ/mL.

### 5.1.2 Determinação da atividade total das enzimas superóxido dismutases e respectivas isoformas

Para a determinação da atividade total das enzimas SOD e da isoforma MnSOD nas amostras, foi feita leitura da absorbância em triplicata de cada tratamento. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para o cálculo da atividade enzimática, onde foi considerado que 50% do valor de absorbância obtido

no teste antes da adição da enzima xantina oxidase seria referente a 1 unidade de SOD e de MnSOD. Foi feito, então, cálculo para se obter o número de unidades que se referem às absorbâncias obtidas nas amostras. Este número obtido foi dividido pela concentração de proteínas de cada repetição, expressa em mg/mL e o resultado da atividade foi expresso em U/mg de proteína. Obteve-se as seguintes médias referentes às triplicatas de cada grupo experimental:

Gráfico 2: Ação do Tempol na atividade total de SOD detectada na levedura *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão da atividade total de SOD de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\*  $p < 0,05$ , Teste de Tukey em triplicatas independentes para os tratamentos e grupos estudados

Primeiramente, nota-se que a atividade enzimática é mais elevada na forma de biofilme, com média de 1,65 U/mg de proteína, do que na forma planctônica, com média de 1,40 U/mg de proteína. Isto demonstra a maior defesa antioxidante da levedura quando na forma de biofilme, o que pode justificar sua maior resistência.

Em ambas as formas de crescimento da levedura, pode-se verificar que o Tempol levou a uma diminuição na atividade da enzima SOD sendo que, para a forma de biofilme, a atividade da enzima é mais elevada seja na presença ou ausência do antioxidante. Na forma planctônica da levedura, o Tempol levou a uma queda de 30% na atividade de SOD sendo que na forma de biofilme, a queda foi de 22%.

Esta diminuição na atividade de SOD condiz com o fato de que a presença de um antioxidante sintético substitua ou iniba a atividade de um antioxidante fisiológico.

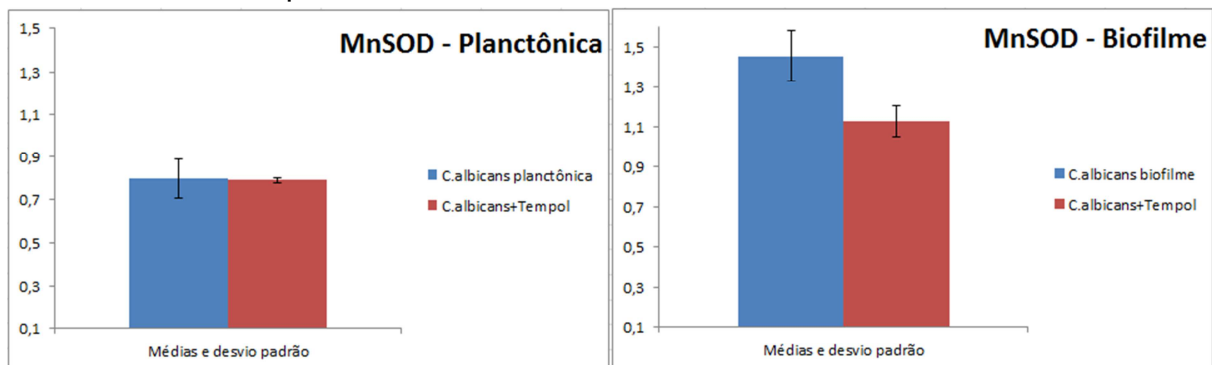
Estes resultados condizem com trabalho publicado por Villegas e colaboradores (2009). Estes pesquisadores mostraram um aumento na atividade de SOD em *Candida fukuyamaensis* após o tratamento com cobre, o qual atuou como



um pró-oxidante levando à elevação na geração de espécies oxidantes, o que estimulou um aumento na atividade da enzima. Dessa forma, infere-se que o tratamento com um antioxidante exerça o efeito oposto, diminuindo a atividade da enzima.

Para os experimentos de determinação da atividade de MnSOD. Obtivemos as seguintes médias:

Gráfico 3: Efeito do Tempol sobre a atividade de MnSOD encontrada em *C. albicans* planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão da atividade de MnSOD de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

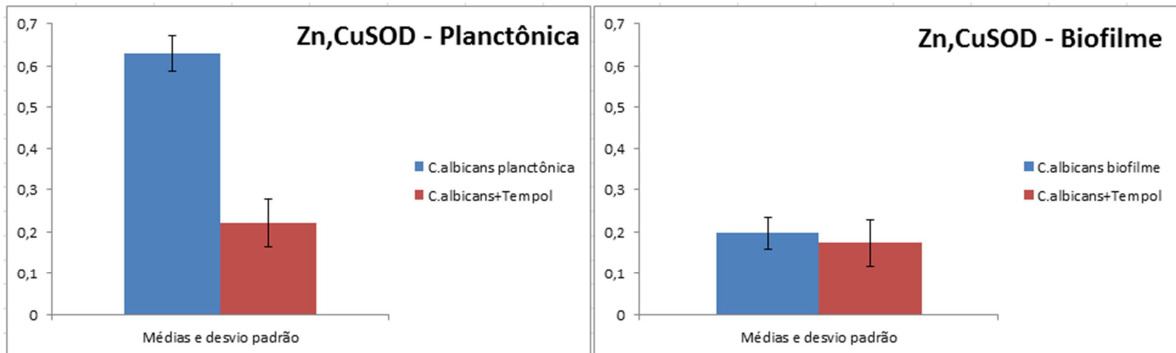
\*  $p < 0,05$ , Teste de Tukey indica diferença entre os grupos estudados e entre os tratamentos na forma biofilme

Os resultados apresentados mostram que, para a isoforma MnSOD na levedura na forma planctônica, não houve diferença estatisticamente significativa, sugerindo que o Tempol não afetou a isoforma em questão.

Já para a forma de biofilme, houve diferença entre os tratamentos e o Tempol diminuiu a atividade da isoforma MnSOD.

Para valores das atividades da isoformas Cu,ZnSOD, foi feita a subtração entre SOD total e MnSOD, levando às seguintes médias:

Gráfico 4: Verificação da ação do Tempol sobre a isoforma Cu,ZnSOD detectada em *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão da atividade de Cu,ZnSOD de *C.albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\*  $p < 0,05$ , Teste de Tukey indica diferença entre os grupos estudados e entre os tratamentos na forma planctônica

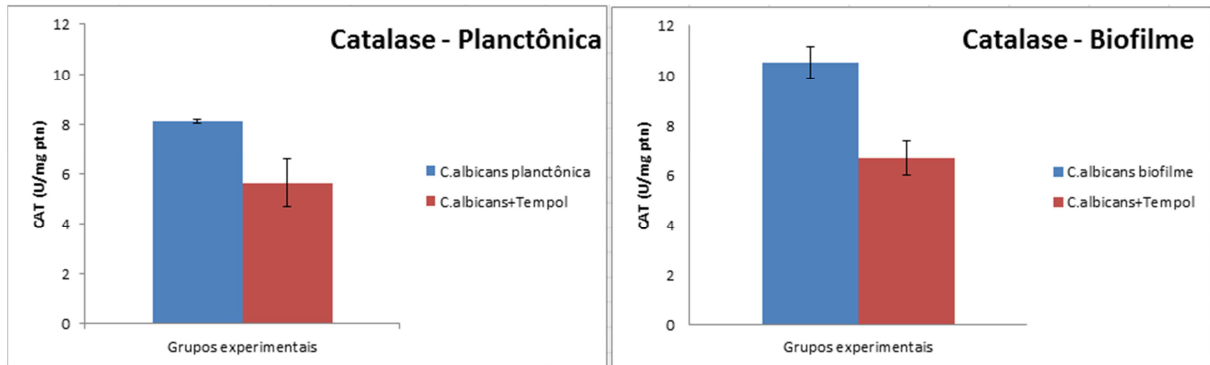
Estes valores mostram que, mais uma vez, o tratamento com Tempol a 300  $\mu\text{M}$  levou à redução na atividade enzimática.

Para a forma planctônica, podemos inferir que o Tempol permeia membrana celular e exerce seu efeito antioxidante restritamente ao citoplasma celular. Dessa forma, seu efeito foi exercido sobre a forma Cu,ZnSOD por se tratar de uma isoforma citosólica enquanto que a forma MnSOD é mitocondrial. Na forma de biofilme, observa-se que o Tempol modulou a atividade da enzima mitocondrial de *C. albicans*. Verifica-se que esta isoforma está mais elevada para a forma de biofilme enquanto que a isoforma citosólica está mais elevada na planctônica. Isto se deve ao fato de que a enzima mitocondrial se eleva no biofilme por haver um estímulo de cadeia respiratória para a formação do biofilme.

### 5.1.3 Determinação da atividade de catalase

O doseamento da atividade de catalase forneceu os seguintes resultados.

Gráfico 5: Atuação do Tempol na atividade de catalase da levedura *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão da atividade de catalase de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\* Teste de Tukey em triplicatas independentes indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos e tratamentos realizados

Através dos resultados apresentados, podemos perceber que o grupo *C. albicans* foi diferente do tratamento com Tempol a 300  $\mu\text{M}$  tanto na forma planctônica como na forma de biofilme. Observa-se também que a atividade da enzima é maior na forma de biofilme (média de 10 U/mg de proteína) quando comparada com a forma planctônica (média de 8 U/mg de proteína), mostrando a defesa mais forte do biofilme.

Pode-se observar que mais uma vez o tratamento com Tempol a 300  $\mu\text{M}$  reduziu a atividade da enzima antioxidante, neste caso, a CAT, sendo esta redução de 31% na forma planctônica e 36% na forma de biofilme.

Um trabalho realizado por Lee e colaboradores (2001) mostrou um aumento na atividade de CAT quando leveduras foram tratadas com radiação ionizante, um procedimento que induz a atividade de produção de ERO, e, de forma coerente, estimulou a atividade da enzima para tentar conter o estresse oxidativo instalado. Dessa forma, é esperado que o Tempol, um antioxidante sintético, atue diminuindo a atividade da enzima CAT uma vez que o mesmo é capaz de atuar diminuindo o nível celular de ERO.

## 5.2 TEOR PROTEICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS TRATADOS OU NÃO COM *C.albicans* PLANCTÔNICA E EM BIOFILME E COM TEMPOL

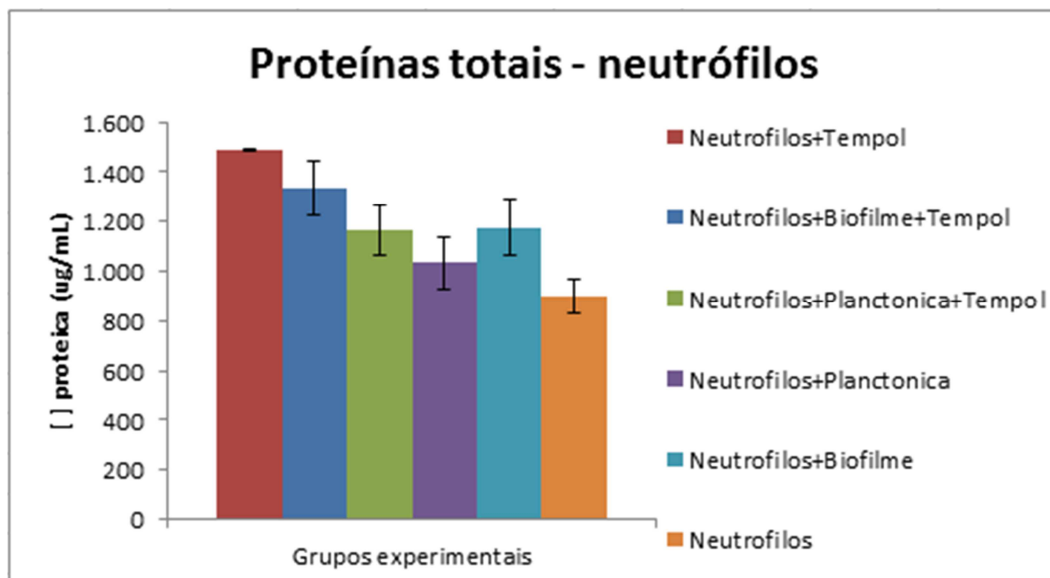
Após isolamento e ruptura dos neutrófilos humanos foi feita a verificação da ruptura através da avaliação da viabilidade celular, o doseamento de proteínas totais, atividade de SOD e CAT na presença e ausência das leveduras e do antioxidante Tempol.

A ruptura das células foi posteriormente verificada novamente pela exclusão por Azul de Trypan, obtendo-se uma média de 90% de células rompidas.

### 5.2.1 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados quanto à concentração de proteínas dos neutrófilos. Nota-se, portanto, que os tratamentos realizados não estimularam uma produção proteica significativa por parte dos neutrófilos.

Gráfico 6: Efeito do Tempol no teor proteico total de neutrófilos humanos tratados ou não com *C. albicans*



Nota: médias e desvios padrão dos teores proteicos de neutrófilos humanos tratados ou não com *C.albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

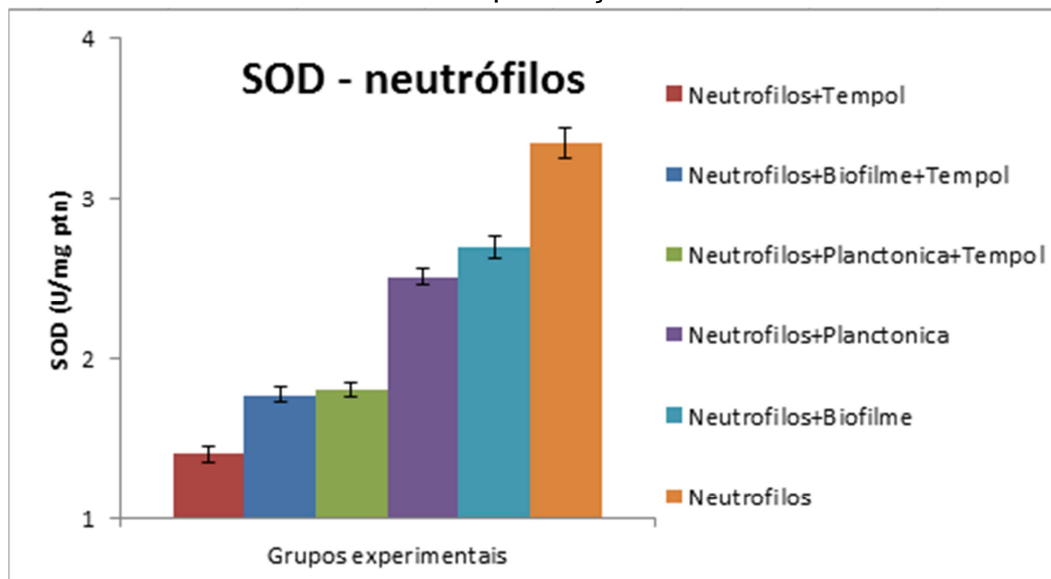
\* Teste de Tukey em triplicatas independentes não indicou diferença significativa ( $p > 0,05$ )

### 5.2.2 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase e isoformas

A avaliação da atividade de SOD bem como de sua isoforma MnSOD foi realizada pelos métodos já descritos. A isoforma Cu,ZnSOD foi calculada com base nos resultados das leituras de SOD e MnSOD. Para este ensaio foram utilizados os mesmos grupos supracitados.

Para a determinação de SOD, obtivemos as seguintes médias a partir das triplicatas realizadas para cada grupo experimental:

Gráfico 7: Efeito do tratamento com Tempol na atividade total de SOD detectada em neutrófilos humanos na presença e ausência de leveduras



Nota: médias e desvios padrão da atividade total de SOD de neutrófilos humanos tratados ou não com *C.albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\* Teste de Tukey em triplicatas independentes indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os neutrófilos isentos de tratamento e os demais grupos

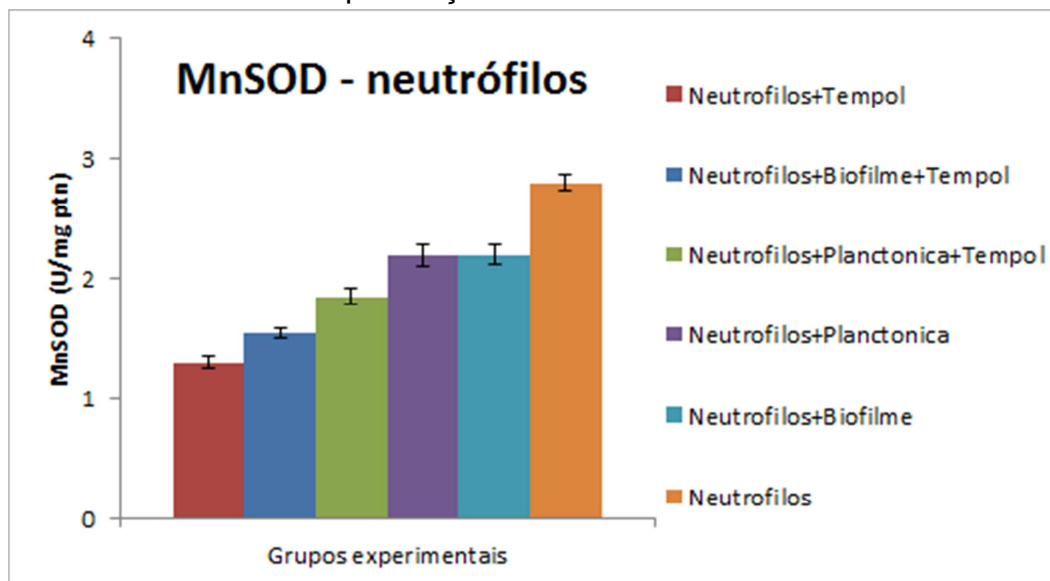
O estudo dos resultados obtidos nos mostra que o tratamento com Tempol reduziu a atividade de SOD dos neutrófilos em todos os casos, sendo estes isolados ou na presença de *C. albicans* tanto na forma planctônica como em biofilme. Todos os grupos em que se utilizou o Tempol foram semelhantes, sendo que este reduziu a atividade enzimática em 59% e quando na presença concomitante da levedura planctônica e em biofilme a queda foi de 46% e 48% respectivamente.

Em um segundo momento, podemos verificar que a presença de *C. albicans* em suas duas formas reduziu a atividade de SOD quando comparado com o grupo onde os neutrófilos não foram tratados, sendo que a presença da levedura na forma planctônica reduziu em 25% a atividade da enzima e o biofilme reduziu em 21%. No

entanto, as leveduras não reduziram de forma estatisticamente semelhante ao Tempol. A redução da atividade de SOD quando na presença do microrganismo, mostra a importância da atividade antioxidante deste frente a linha de defesa composta pelos neutrófilos.

Para a determinação da atividade da isoforma MnSOD, obtivemos as seguintes médias:

Gráfico 8: Ação do Tempol na atividade de MnSOD detectada em neutrófilos humanos na presença ou não de *C. albicans*

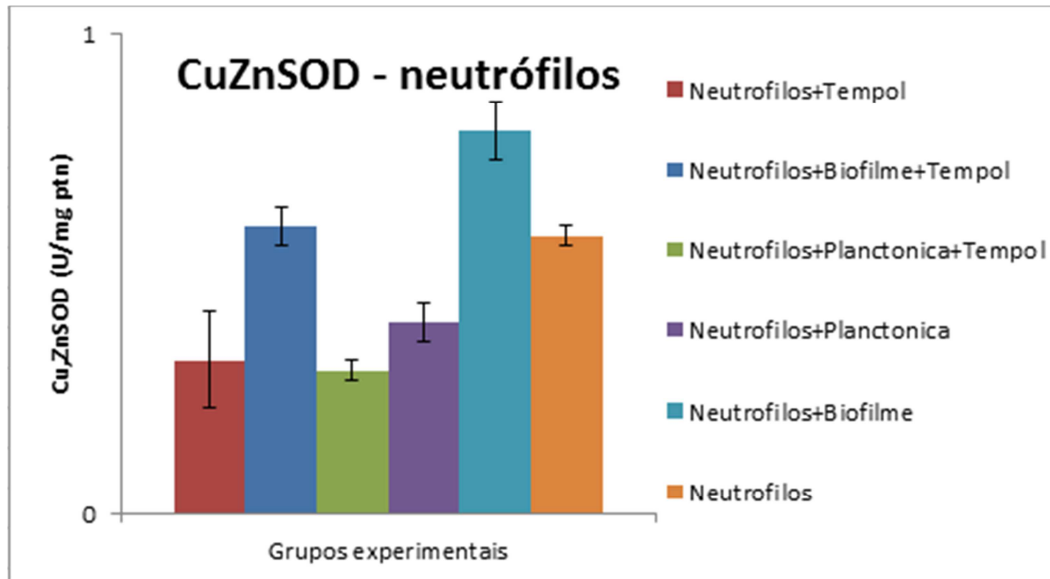


Nota: médias e desvios padrão da atividade de MnSOD de neutrófilos humanos na presença ou não de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol  
\*  $p < 0,05$ , Teste de Tukey em triplicatas independentes

Em relação à isoforma MnSOD, verificamos resultado semelhante à de SOD total. Mais uma vez o tratamento com o Tempol inibiu a atividade da enzima, neste caso em sua isoforma MnSOD. As leveduras, por sua vez, diminuíram a atividade enzimática dos neutrófilos quando comparado com o grupo onde as células não foram tratadas. Isto nos mostra que a isoforma MnSOD é afetada tanto pelo Tempol quanto pelo microrganismo.

Com base nestes resultados, obtivemos as médias dos valores da isoforma Cu,ZnSOD:

Gráfico 9: Efeito do tratamento com Tempol sobre a atividade de Cu,ZnSOD verificada em neutrófilos humanos tratados ou não com leveduras



Nota: médias e desvios padrão da atividade de Cu,ZnSOD de neutrófilos humanos tratados ou não com *C.albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

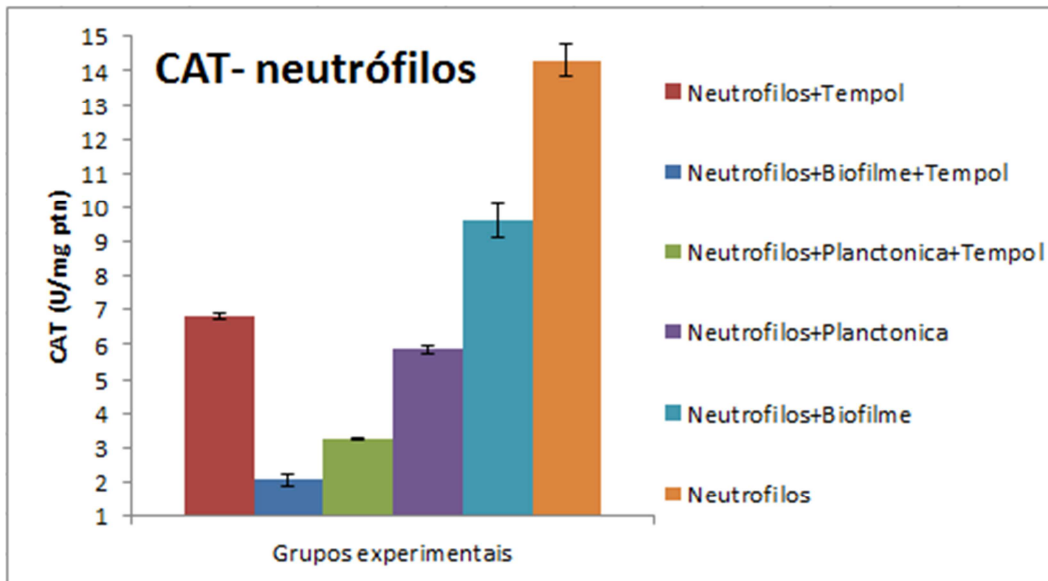
\*  $p < 0,05$ , Teste de Tukey em triplicatas independentes

Observa-se, portanto, que o Tempol atuou inibindo também a isoforma Cu,ZnSOD dos neutrófilos humanos, tanto na presença quanto ausência do microrganismo estudado.

### 5.2.3 Determinação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima CAT foi calculada para os 6 grupos estudados e seus resultados foram analisados a partir das médias obtidas nos experimentos:

Gráfico 10: Tratamento com Tempol e seu efeito sobre a atividade de catalase detectada em neutrófilos humanos tratados ou não com leveduras



Nota: médias e desvios padrão da atividade de catalase de neutrófilos humanos tratados ou não com *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme na presença e ausência de Tempol

\* Teste de Tukey em triplicatas independentes indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo neutrófilos e os demais grupos analisados

A análise de variância realizada nos mostra que o tratamento com o Tempol, na presença de *C. albicans* em ambas as formas planctônica e biofilme, inibiu a atividade da enzima CAT nos neutrófilos humanos em 77% e 85% respectivamente, sendo os tratamentos com o nitróxido, na presença das leveduras, semelhantes estatisticamente e diferentes dos demais.

Observamos que a maior atividade da enzima nos neutrófilos se dá quando este não recebe nenhum tipo de tratamento. A presença de *C. albicans* reduz sua atividade sendo que, no caso da CAT, as formas de vida da levedura se distinguiram estatisticamente, levando a queda de 60% na atividade quando na presença da forma planctônica e 33% quando na presença do biofilme. A forma planctônica se assemelhou ao tratamento dos neutrófilos apenas com o nitróxido, cuja queda na atividade foi de 52% e estes grupos foram diferentes do tratamento com a forma biofilme.

A queda de atividade enzimática na presença de leveduras, em todos os casos estudados, indica o início da apoptose dos neutrófilos, processo que se inicia após a fagocitose exercida pelos mesmos. Dessa forma, há uma queda da defesa antioxidante dos neutrófilos para que o mesmo sofra apoptose pelos danos causados pelas espécies por ele mesmo geradas.

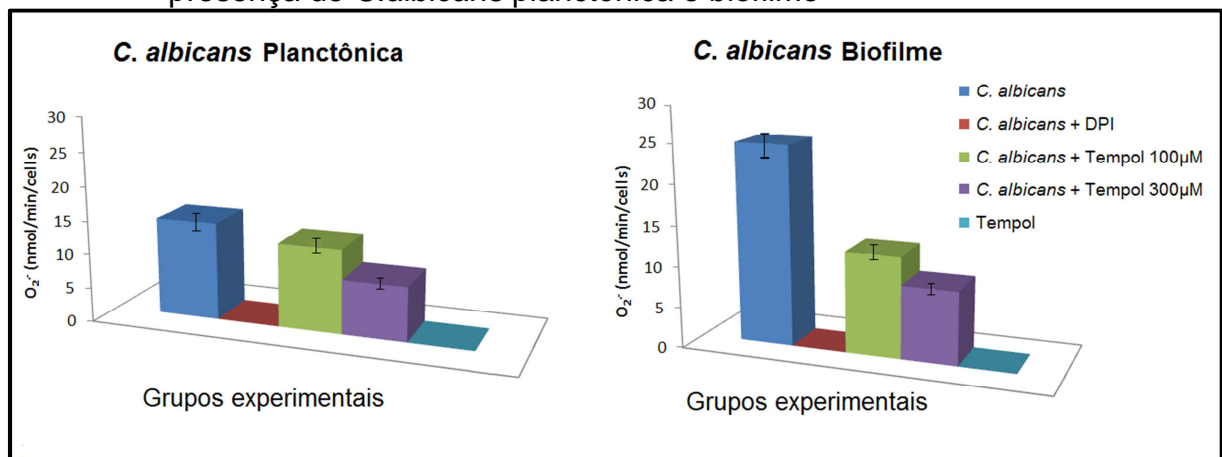


### 5.3 BURST RESPIRATÓRIO EM NEUTRÓFILOS HUMANOS ISOLADOS TRATADOS COM *C.albicans* NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE TEMPOL

Para os experimentos de *burst* respiratório foi utilizada a metodologia que quantifica a redução do citocromo *c* pelo estímulo adicionado às células.

Em todos os experimentos foram feitas leituras de um controle positivo, PMA e um controle negativo, PMA + DPI. Os resultados foram úteis para validação do teste.

Gráfico 11: Efeito do Tempol no *burst* respiratório de neutrófilos humanos na presença de *C.albicans* planctônica e biofilme



Nota: médias e desvios padrão da emissão de  $O_2^{\bullet-}$  por neutrófilos humanos estimulados com *C.albicans* na forma planctônica e de biofilme

\* Teste de Tukey em triplicatas independentes indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento com a levedura e os demais realizados

Através destes resultados foi possível verificar que a emissão de  $O_2^{\bullet-}$  é elevada quando os neutrófilos são estimulados com a levedura, o que leva os fagócitos à emissão de espécies reativas para conter a infecção. Estudos já mostraram que os neutrófilos, frente a uma agressão, iniciam o processo de fagocitose dos microrganismos (HENDERSON; CHAPPELL, 1996), fato que ocorre com intensa atividade metabólica e grande consumo de oxigênio, conhecido como *burst* respiratório. Durante este processo ocorre a ativação do complexo enzimático Nox2 e, conseqüentemente, a formação de diferentes espécies reativas como, por exemplo, o  $O_2^{\bullet-}$  e seus derivados (BABIOR, 2000).

Podemos perceber que o tratamento da levedura com o DPI inibiu a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , uma vez que o DPI atua na inibição de Nox2. A produção também não

ocorre quando os neutrófilos são tratados somente com o Tempol, indicando que este não atua estimulando a liberação de espécies reativas. Os resultados onde os neutrófilos foram tratados com a levedura na presença de Tempol mostram que este inibiu a liberação de  $O_2^{\bullet-}$  por parte dos neutrófilos em 45% quando o estímulo foi a forma planctônica e 64% quando foi o biofilme, o que pode ser uma questão negativa no uso de um antioxidante sintético uma vez que estes radicais são os primeiros liberados para controle da infecção.

A comparação entre os gráficos nos permite perceber que a exposição a *C.albicans* na forma de biofilme leva a um estímulo muito maior na produção de espécies reativas, no caso,  $O_2^{\bullet-}$ . Com base nos resultados obtidos ao longo do trabalho, podemos atribuir este fato à maior ação antioxidante exercida pelo biofilme. Foi possível constatar que, quando em biofilme, as leveduras possuem uma atividade mais elevada das enzimas antioxidantes. Dessa forma, percebemos que na presença de biofilme, a defesa fagocitária humana está mais sobrecarregada uma vez que a defesa antioxidante da levedura é mais elevada levando os fagócitos a uma maior emissão de radicais superóxido na tentativa de conter a infecção.

Estes fatos nos levam a concluir que, na forma de biofilme, *C. albicans* tem um poder maior de defesa frente ao nosso sistema imune, pois suas enzimas antioxidantes estão em alta atividade o que exige uma demanda mais elevada de espécies reativas para tentar eliminar o foco infeccioso. No entanto, na presença de um antioxidante sintético temos uma diminuição da emissão destas espécies, o que pode ser maléfico no controle da infecção.

Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a modulação do *burst* respiratório de neutrófilos pelos nitróxidos estaria associada à capacidade destes compostos em inibir indiretamente a atividade da enzima PKC e modular processos pós-traducionais impedindo a fosforilação de determinadas proteínas (RIBEIRO, 2009).

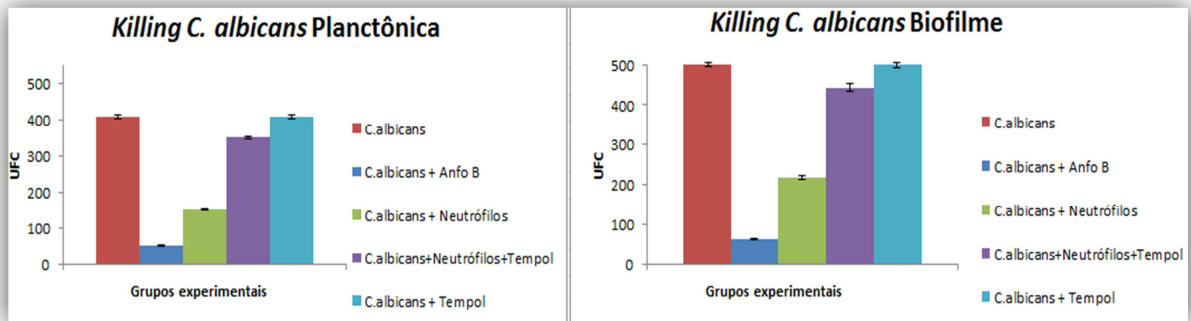
Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com o que foi obtido por CHAVASCO (2009), onde observou-se que a incubação prévia das suspensões celulares de neutrófilos com o nitróxido Tempo em diferentes concentrações, determinou uma inibição no *burst* respiratório com uma correlação direta entre a dose do nitróxido e a quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  liberada pelos fagócitos.

#### 5.4 ENSAIO DE *KILLING* DE *Candida albicans* POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Os ensaios de *killing* foram realizados com o objetivo de confirmar o que foi sugerido no experimento do *burst* respiratório. Uma vez que, no *burst*, verificou-se que o Tempol reduz a emissão de  $O_2^{\bullet-}$  pelos neutrófilos humanos, sugere-se que este antioxidante comprometa então, a ação fungicida das células humanas, uma vez que os  $O_2^{\bullet-}$  são os primeiros gerados para o controle de uma infecção. Através do ensaio de *killing* foi possível confirmar esta questão. Os experimentos mostraram um crescimento padrão do fungo como controle positivo e crescimento semelhante na presença apenas do Tempol, o que mostra que este composto não interfere nem compromete o desenvolvimento da levedura. Quando fez-se o cultivo das leveduras com as células humanas, foi possível verificar um crescimento menor do fungo, mostrando que os neutrófilos humanos exerceram a função de controlar a disseminação do microrganismo. No entanto, quando ainda na presença dos neutrófilos humanos, adicionamos o Tempol, verifica-se que o crescimento microbiano volta a ocorrer em maior escala, sugerindo então um comprometimento da ação fungicida dos neutrófilos quando na presença do antioxidante sintético.

Os resultados podem ser observados no gráfico, onde foram expressos em UFC. É possível verificar que o crescimento na forma de biofilme é mais acentuado que na forma planctônica em condições idênticas de cultivo. Verifica-se também que o Tempol é capaz de atuar comprometendo a ação fungicida em ambos os casos, tanto quando o neutrófilo tenta conter o microrganismo na forma planctônica quanto na forma de biofilme. Ainda é possível avaliar que a forma de biofilme é mais resistente frente aos neutrófilos uma vez que, na forma planctônica, a presença dos neutrófilos fez com que o microrganismo conseguisse crescer apenas 37% do que foi capaz na ausência do fagócito. Já na forma de biofilme, o microrganismo cresceu, na presença dos neutrófilos, 44% em relação ao controle positivo. Este fato nos mostra que a defesa fagocitária humana é mais fraca em relação à forma de biofilme para conseguir conter a infecção.

Gráfico 12: Efeito do Tempol no crescimento de *C. albicans* nas formas planctônica e biofilme em meio ágar Sabouraud



Nota: 1) média  $\pm$  desvio padrão  $\times 10^2$  da contagem em UFC de *C. albicans* na presença e ausência de neutrófilos humanos e Tempol

2) Concentração de anfotericina B 0,5 $\mu$ g/mL e Tempol 300 $\mu$ M

\* $p < 0,05$ , Teste de Tukey indica diferença estatística em relação ao grupo *C. albicans*

É possível observar nas ilustrações a seguir a diferença no crescimento das colônias diante dos diferentes tratamentos aplicados:

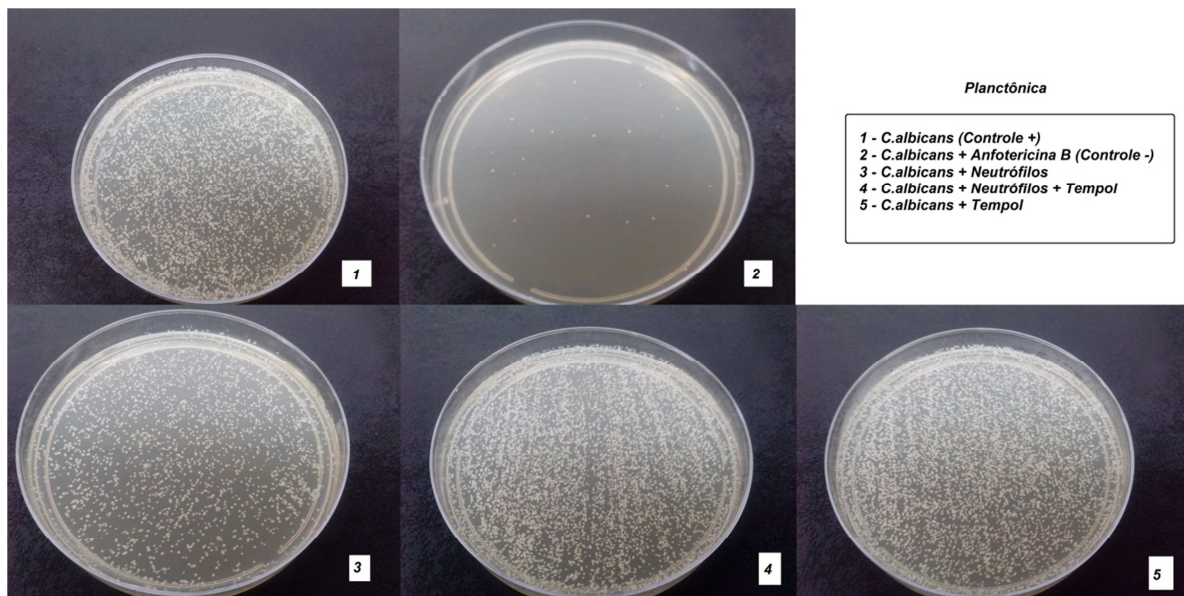


Figura 4: ilustração do crescimento de colônias de *C. albicans* na forma planctônica nos tratamentos estudados em placas de Petri

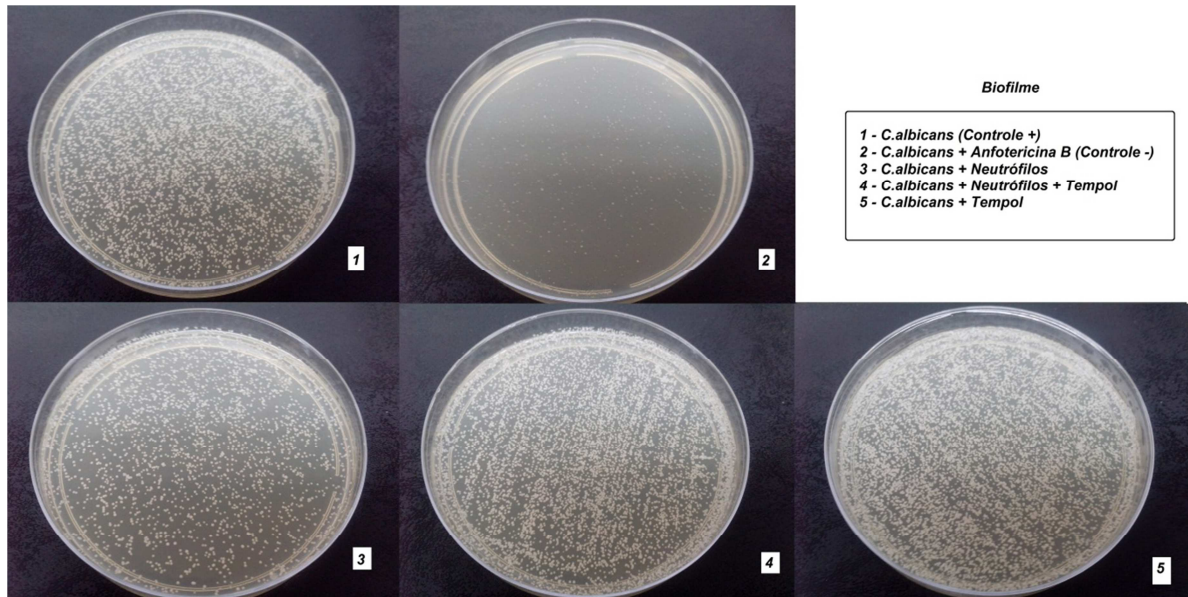


Figura 5: ilustração do crescimento de colônias de *C.albicans* na forma biofilme nos tratamentos estudados em placas de Petri

Podemos perceber que, para a forma de biofilme, o crescimento foi mais acentuado em todos os grupos avaliados, mostrando que, sob as mesmas condições de cultivo, o biofilme de *C. albicans* apresenta uma maior resistência e capacidade de multiplicação. Com relação à atividade fungicida dos neutrófilos, percebe-se que esta é nitidamente comprometida pela adição do Tempol, que diminui a emissão de espécies reativas responsáveis pela morte do microrganismo.

Os resultados obtidos apoiam um estudo realizado por Pesarico e colaboradores (2013) no qual avaliou-se o efeito antimicrobiano de 2,2 ditiênil diselenido (DTDS). Este pró-oxidante avaliado demonstrou efeito microbicida contra bactérias Gram positivas e contra *Candida albicans*. Os autores demonstraram claramente que a adição dos antioxidantes glutatona e ácido ascórbico determinou maior resistência dos microrganismos ao DTDS, levando a uma retomada do crescimento microbiano. Especificamente nos ensaios realizados com *C. albicans*, a adição de quaisquer dos dois compostos antioxidantes provocou uma queda de aproximadamente 50% no halo de inibição de crescimento fúngico determinado pelo DTDS.

Em estudo similar realizado por Culakova e colaboradores (2013), foi mostrado o efeito antimicrobiano de outro oxidante, uma triazina (CTBT). A capacidade deste composto produzir ERO foi testada com a sonda diacetato de 2,7 diclorodifluoresceína, e o ambiente oxidado levou ao menor crescimento de

bactérias Gram positivas e Gram negativas. No entanto, a adição dos antioxidantes exógenos glutathione, cisteína e ascorbato reduziu significativamente a toxicidade do oxidante frente às células microbianas, permitindo uma sobrevivência dos microrganismos testados.

Em conjunto, nossos resultados corroboram que o uso do antioxidante Tempol provocou diminuição considerável na concentração de  $O_2^{\bullet-}$  através da modulação do sistema Nox2 e/ou do efeito de dismutação característico deste nitróxido. Estes dados implicam diretamente no comprometimento da ação fungicida dos neutrófilos, levando a uma situação na qual o organismo hospedeiro passa a apresentar maior dificuldade para controlar a disseminação do microrganismo.

## 6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram verificar a atividade enzimática antioxidante elevada de *C. albicans*, principalmente na forma de biofilme, que é um fator de risco elevado em infecções hospitalares. Esta atividade enzimática é um fator primordial na ação protetiva da levedura frente ao sistema imune humano.

Quanto ao uso de antioxidantes, verificamos que o Tempol foi capaz de diminuir a atividade das enzimas SOD e CAT em todas as situações analisadas, tanto nos fungos quanto nos neutrófilos humanos. Isto pode ser prejudicial uma vez que os neutrófilos necessitam dessa defesa antioxidante para se auto protegerem da geração de espécies reativas no processo de fagocitose, o que poderia acelerar o processo de apoptose dos neutrófilos, agravando o quadro infeccioso.

Por fim, nossos resultados corroboram que o uso do antioxidante Tempol provocou diminuição considerável da ação fungicida dos neutrófilos, levando a uma situação na qual o organismo hospedeiro passa a apresentar maior dificuldade para controlar a disseminação do microrganismo

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vivo. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ANDES, D. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6023-31, 2004.

ANGIOLELLA, L. et al. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 927-36, 2008.

ARATANI, Y. et al. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 40, p. 557-63, 2002.

ARENDRUP M. C. et al. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004–2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 487–494, 2008.

ATCC. ATCC Number. Disponibiliza informações sobre *Candida albicans* ATCC 10231. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 04 jun. 2010.

AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n.3, p. 205-207, 2008.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 671-9, 1999.



BARROS, A. I. R. N. A. et al. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food Chemistry**, v. 128, p. 165–172, 2011.

BITENCOURT SANTOS, G.; OLIVEIRA, A. F.; LIMA, S.N.P.; RIBEIRO, A. C. G.; BRIGAGÃO, M. R. P. L. Inhibitory Action of Nitroxide Tempolon the Catalytic Activity of Protein Disulfide isomerase. In: XXXIX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. Anais da XXXIX Reunião da SBBq, 2010.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, A. J. P.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 384-91, 2009.

CALDERONE, R. A.; CLANCY, C. J. **Candida and candidiasis**. 2<sup>a</sup> ed. Washington: ASM press, 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHANDRA, J. et al. Fungal biofilms and antimycotics. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 887-894, 2005.

CHAUHAN, N.; LATGE, J. P.; CALDERONE, R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 435-44, 2006.

CHAVASCO, L. S. Regulação da atividade Nox2 de neutrófilos por nitróxidos. Alfenas: UNIFAL, 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2009.

CHAVASCO, L. S. et al. Nitroxides Modulate Neutrophil NADPH Oxidase Activity Via Pos-Traslational Protein Phosphorylation. In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009, Águas de Lindóia. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, v. único, p. 41-41, 2009.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 192-208, 2004.

CHEN, S. et al. Active surveillance for candidemia, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1508-1516, 2006.

CHOI, G. J.; LEE, H. J.; CHO, K. Y. Involvement of Catalase and Superoxide Dismutase in Resistance of *Botrytis cinerea* to Dicarboximide Fungicide Vinclozolin. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 59, p. 1–10, 1997.

COHEN, H. J.; CHOVANIEC, M. E. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocyte. A basis for continuous assay for monitoring superoxide production for the study of the activation of the generation system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 61, p. 1081-1087, 1978.

COLOMBO A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

CULAKOVA, H.; DZUGASOVA, V.; GBELSKA, Y.; SUBIK, J. Antibacterial activity of CTBT (7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine) generating reactive oxygen species. **Microbiological Research**, v.168, p. 147-152, 2013.

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

DISMUKES, W. E. Antifungal therapy: lessons learned over the past 27 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 9, p. 1289-1296, 2006.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n.2, p. 167-194, 2006.

FRANCA, M. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, p. 167-170, 2005.

GEORGIU, C. D.; TAIRIS, N.; SOTIROPOULOU, A. Hydroxyl radical scavengers inhibit sclerotial differentiation and growth in *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, v. 104, p. 1191-1196, 2000.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Reactions of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Carbonate Radicals with Nitroxides and Their Corresponding Oxoammonium Cations. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 250-257, 2003.

GRANT, C. M. Role of glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress condition. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 533-541, 2001.

HAHN, S. M.; MITCHELL, J. B.; SHACTER, E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, p. 879-884, 1997.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2004.

HALLIWELL, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

HALPNER, A. D. et al. Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 355–359, 1998.

HANNULA, J., et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 238-244, 2000.

HASSET, D. J.; COHEN, M. S. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. **The FASEB Journal**, v. 3, p. 2574-2582, 1989.

HATANAKA E., RIBEIRO F.P., CAMPA A. The acute phase serum amyloid A primes neutrophils. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 81-84, 2003.

HENDERSON, L. CHAPPEL, J. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.15, p. 87-107, 1996.

HEO, Y. J. et al. The Major Catalase Gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Is under both Positive and Negative Control of the Global Transactivator OxyR in Response to Hydrogen Peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 381-390, 2010.

HOLBROOK, N. J.; IKEYAMA, S. Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 999–1005, 2002.

IYAMA, K. et al. Effect of Superoxide Dismutase Gene Inactivation on Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the Silkworm, *Bombyx mori*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1569 – 1575, 2007.

ISRAELI, A., et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and the hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, p. 317-324, 2005.

IWASAWA, A. et al. Fungicidal action of hydroxyl radicals generated by ultrasound in water. **Journal of Clinical Biochemical Nutrition**, v. 45, p. 214–218, 2009.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects in Medicine**, v. 26, p. 340-352, 2005.

KANCHEVA, V. D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chainbreaking activity: a comparative study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 1072–1089, 2009.

KATRAGKOU, A. et al. Interactions between Human Phagocytes and *Candida albicans* Biofilms Alone and in Combination with Antifungal Agents. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1941–1949, 2010.

KING, D. A.; SHEAFOR, M. W.; HURST, J. K. Comparative toxicities of putative phagocyte-generated oxidizing radicals toward a bacterium (*Escherichia coli*) and a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 765–774, 2006.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, p. 311–320, 2010.

KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 17, p. 379-388, 1994.

LAGRANHA, C. J. et al. Função e apoptose do neutrófilo: modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, p. 95-108, 2005.

LAIGNIER, E. P. et al. Papel de radicais tiila na produção de oxidantes por macrófagos: busca de novos alvos bioquímicos para o controle do estresse oxidativo na inflamação. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO, 1, 2008, Alfenas. CD-ROM.

LAMARRE, C. et al. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutases (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 43784-43791, 2001.

LEE, J.H.; CHOI, I.Y.; KIL, I.S.; KIM, S.Y.; YANG, E.S.; PARK, J.W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1526, p. 191-198, 2001.

LIMA, D. R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicológica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

LIMA, S.N.P. ; FERNANDES, M. M. ; RIBEIRO, A. C. G. ; BITENCOURT SANTOS, G. ; PAIVA, A.G. ; BRIGAGÃO, M. R. P. L. . Tempol Attenuates Endotoxin-induced Sickness Behavior and Modulates Neutrophils' Responses to Inflammatory Stimuli. In: XXXIX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. Anais da SBBq, 2010.

LIMA, A. T., BITENCOURT SANTOS, G, GUIMARÃES, T. A., REIS JUNIOR, M. A., GARCIA, I. T., DIAS, A. L. T., BRIGAGÃO, M.R.P.L. Effect of Nitroxides on the Fungicidal Oxidant Mechanism of Neutrophils. In: 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto. 8th CIFARP Abstracts, 2011.

LIM, C. S. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 21-31, 2012.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 44, p. 1668–1676, 2009.

MALUCHE, M.E.; SANTOS, J.I. *Candida* sp e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 65-67, 2008.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Research**, v.38, p 204-211, 2004.

MARTCHENKO, M. et al. Superoxide dismutases en *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 456-467, 2004.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 5753-5760, 1968.

MELONI-BRUNERI, L. H. et al. Neutrophil oxidative metabolism and *killing* of *P. braziliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 526-533, 1996.

MICELI, M. H.; LEE, S. A. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 54, p. 666-678, 2011.

MIRANDA, L. N. et al., *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, p. 9-16, 2009.

NAKAGAWA, Y. Catalase gene disruptant of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is defective in hyphal growth, and a catalase-specific inhibitor can suppress hyphal growth of the wild-type cells. **Microbiology & Immunology**, v. 52, p. 16-24, 2008.

OLIVEIRA, O.A. et al. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 11, p. 32-37, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.18, 2010.

ORTH, A. B. et al. Assessing the Involvement of Free Radicals in Fungicide Toxicity Using  $\alpha$ -Tocopherol Analogs. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 134-141, 1993.

PAVARINA, A. C. et al. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 30, p. 1085-9, 2003.

PFALLER, M. A. et al. 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. 3254-9, 2001.

PEREIRA, E.M. Modificação induzida por  $\beta$ 2-Glicoproteína I na resposta oxidativa de polimorfonucleares humanos durante a fagocitose. São Paulo: USP, 2005. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, p. 321-346, 2007.

PESARICO, A.P.; SARTORI, G.; SANTOS, C.F.A.; NETO, J.S.S.; BORTOLOTTI, V.; SANTOS, R.C.V.; NOGUEIRA, C.W.; PRIGOL, M. 2,2\_-Dithienyl diselenide prooxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. **Microbiological Research**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.009>.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 43, p. 516-520, 2006.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 2, p. 219–236, 2007.

RAMAGE, G. et al. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surgery**, v. 98, p. 53-9, 2004.

RIBEIRO, A.C.G. Nitróxidos como reguladores do estado de fosforilação proteica associado a atividade do complexo NADPH oxidase de fagócitos. In: II Jornada de Iniciação Científica da UNIFAL-MG, 2009. Anais da II Jornada de Iniciação Científica da UNIFAL-MG, 2009.



RIBEIRO, A. C. G. ; CHAVASCO, L.S. ; LIMA, S.N.P. ; BITENCOURT SANTOS, G. ; BRIGAGÃO, M. R. P. L. Nitroxides Regulate Protein Phosphorylation Signaling to Nox2 Activity in Neutrophils. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. Anais da XXXIX Reunião da SBBq, 2010.

ROSSETTI, M. L. R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, 2002.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamine's. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 8719-8724, 2002.

SAMUNI, A. M.; BARENHOLZ, Y. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p.117-185, 2003.

SEGAL, B. H.; DING, L.; HOLLAND, S. M. Phagocyte NADPH Oxidase, but Not Inducible Nitric Oxide Synthase, Is Essential for Early Control of *Burkholderia cepacia* and *Chromobacterium violaceum* Infection in Mice Infect. **Immunity**, v. 71, p. 205-210, 2003.

SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 604-618, 2008.

SEIFRIED, H. E. et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SIEDLE, B. et al. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**, v. 7559, p. 1-7, 2003.

SOHAL R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, p. 59-63, 1996.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1632-1650, 2007.

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

TIMONER, B.E. et al. Efeito do nitróxido Ac-Tempo sobre o burst respiratório e S-glutonação de proteínas de macrófagos. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO, 1, 2008, Alfenas. CD-ROM.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 17-21, 2002.

VAZQUEZ, N. et al. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 145-150, 1998.

VILLEGAS, L.B.; AMOROSO, M.J.; FIGUEROA, L.I.C. Responses of *Candida fukuyamaensis* RCL-3 and *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 to copper stress. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, p. 395-403, 2009.

ZARR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall. 3 ed., 1996.

ZHANG, R.; GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A. Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1245-1252, 1999.

**ANEXO:** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unifal-MG.



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Envolvimento da defesa antioxidante de fungos na formação de biofilme

**Pesquisador:** Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 17799013.7.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 415.860

**Data da Relatoria:** 02/07/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto da área básica que busca entender a defesa antioxidante de fungos no processo de formação de biofilme, associando a patogenicidade do fungo *C. albicans* ao uso de antioxidante.

**Objetivo da Pesquisa:**

O projeto tem por objetivos estudar o papel de enzimas antioxidantes do *fungo Candida albicans* como fator de patogenicidade do mesmo. Será estudada a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por neutrófilos humanos expostos aos fungos nas formas planctônica e de biofilme e a correlação com a patogenicidade do mesmo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos para os sujeitos: mínimos: coleta de sangue.

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-000

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3299-1318

**Fax:** (35)3299-1318

**e-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

Continuação do Parecer: 415.860

**Benefícios:** indiretos: geração de conhecimento que poderão ser utilizados no desenho de intervenções terapêuticas medicamentosas para a aterosclerose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um tema relevante, pois propõe o estudo de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na morbidade/mortalidade por infecções fúngicas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentou o TCLE, folha de rosto e projeto de pesquisa. O TCLE esta irretocável. A FR adequadamente preenchida e assinada. O projeto com boa fundamentação teórica e métodos detalhadamente explicitados.

**Recomendações:**

Sou favorável a sua aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

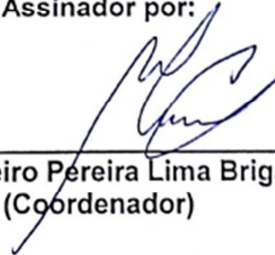
Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 04 de Outubro de 2013

Assinador por:



Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão  
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br