

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRESSA TERESINA DE LIMA

**EFEITO DE NITRÓXIDOS SOBRE O MECANISMO FUNGICIDA
OXIDANTE DE NEUTRÓFILOS**

Alfenas/MG
2012

ANDRESSA TERESINA DE LIMA

**EFEITO DE NITRÓXIDOS SOBRE O MECANISMO FUNGICIDA
OXIDANTE DE NEUTRÓFILOS**

Dissertação apresentada ao programa do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maísa Ribeiro Pereira Lima
Brigagão

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Amanda Latércia Tranches
Dias

Alfenas/MG
2012

Lima, Andressa Teresina de.

Efeitos de nitróxidos sobre o mecanismo fungicida oxidante de neutrófilos / Andressa Teresina de Lima. - 2012.

79 f. -

Orientador: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Neutrófilos. 3. Candida albicans. 4. NADPH oxidase. 5. Radicais Livres. I. Brigagão, Maísa Ribeiro Pereira Lima.
II. Título.

CDD: 572

ANDRESSA TERESINA DE LIMA

**EFEITO DE NITRÓXIDOS SOBRE O MECANISMO FUNGICIDA
OXIDANTE DE NEUTRÓFILOS**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em 08 de fevereiro de 2012.

Prof^a. Dr^a. Leda Quércia Vieira

Instituição Universidade Federal de Minas Gerais **Assinatura:** _____

Prof^a. Dr^a. Fernanda Borges de Araújo Paula

Instituição Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Prof^a. Dr^a. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Instituição Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

A DEUS, pelo dom da vida e da sabedoria. Aos meus Pais (Roseni e Ana Rosa), irmãos, cunhados e sobrinhos pelo apoio, carinho e incentivo para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas - MG, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

À Prof^a. Dr^a. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão pela orientação, apoio e confiança para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Amanda Latércia Tranches Dias pela co-orientação, paciência e dedicação durante os experimentos executados.

Ao Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo pelo auxílio nos ensaios de “Killing”.

Ao Prof. Dr. Eric Batista Ferreira pela colaboração na análise estatística dos resultados.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica Básica e Microbiologia que colaboraram para a execução deste trabalho. Deixo aqui meu agradecimento especial à Gérsika, Talita, Maurício e Ingrid que se tornaram não apenas colegas de laboratório, mas grandes amigos.

Aos amigos e colegas de Mestrado, que nestes dois anos sempre acrescentaram em minha formação e vida, eterna gratidão a todos.

Aos Funcionários da Unifal-MG, em especial, aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica Básica/Clínica e Microbiologia pela colaboração e ajuda prestada.

À Unifal-MG e CNPq-Redoxoma, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

RESUMO

A ação de espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio (ERO/ERN), produzidas por neutrófilos através do complexo NADPH oxidase (Nox2) e óxido nítrico sintase (iNOS), estão diretamente associadas à capacidade microbicida de fagócitos. Entretanto, se a produção destes oxidantes escapa ao controle da homeostase bioquímica, ocorrem danos oxidativos aos tecidos circunvizinhos do foco inflamatório, quando, então, há necessidade de intervenção farmacológica. Neste trabalho foi testado o efeito dos nitróxidos piperídínicos 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil (Tempo) e 4-((9 acridinecarbonil)amino)-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil (Ac-Tempo) sobre a atividade de Nox2 de neutrófilos inflamatórios e suas consequências sobre a capacidade fungicida dos fagócitos. Neutrófilos isolados de cavidade peritoneal de camundongos foram incubados (37°C, 10 min) com Tempo (50-400 µM) ou Ac-Tempo (25-200 µM) e estimulados com *Candida albicans* (ATCC 10231) opsonizadas (10^7 *C. albicans*/10⁵ neutrófilos). A atividade de Nox2 foi determinada polarograficamente, pelo consumo de oxigênio mensurado através de eletrodo de Clark, ou espectrofotometricamente, medindo-se a redução de citocromo c (550nm). A atividade de Nox2 ($119,3 \pm 11,6$ nmol de O₂^{-•}.min⁻¹) foi diminuída pelo tratamento com ambos os nitróxidos, de forma dose-dependente, embora Ac-Tempo tenha sido mais eficaz (ED₅₀ 31 µM) que Tempo (ED₅₀ 160 µM). Paralelamente, foi verificada a fluorescência (λ_{exc} 361, λ_{emi} 440) emitida pelo grupo acridina após reação de espécies radicalares com Ac-Tempo, corroborando a hipótese de que nitróxidos depletam radicais produzidos por neutrófilos estimulados com *C. albicans*. O nitróxido Tempo não mostrou nenhuma ação direta sobre culturas de *C. albicans*, conforme análises de antifugigramas padrões. Entretanto, testes de capacidade microbicida de neutrófilos mostraram que o tratamento prévio das células com Tempo (300 µM) causou decréscimo de 80% na efetividade fungicida sobre *C. albicans*. Testes *in vivo* mostraram que Tempo administrado em dose oral única (26,52 mg/kg) foi capaz de diminuir o edema de pata originado em resposta à inoculação do fungo (10^7 *C. albicans*) cujo ponto máximo de efeito foi 18

horas após a administração do nitróxido, bem como determinou significativa diminuição de nitração de proteínas em tecido muscular das patas dos animais, conforme resultados de ensaios com anticorpos anti-nitrotirosina. Em conjunto, os resultados corroboram a premissa de que a atividade de Nox2 é essencial para a resposta do hospedeiro a *C. albicans* e que a administração de nitróxidos para modular a produção de oxidantes nos focos infecciosos pode diminuir a resposta do sistema imune à infecção fúngica.

Palavras-chave: Antioxidantes. Neutrófilos. *Candida albicans*. NADPH oxidase. Radicais livres.

ABSTRACT

Production of oxidants species by neutrophils through NADPH oxidase complex (Nox2) is directly associated with the microbicidal activity of phagocytes. In this work we tested the effect of the nitroxides 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-piperidine-1-oxil (Tempo) and 4-((9 acridinecarbonil)amino)-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine-1-oxil (Ac-Tempo) on the activity of inflammatory neutrophil Nox2 complex and the consequences on the fungicidal phagocytes capability. Neutrophils were incubated with Tempo (50-400 mM) or Ac-Tempo (25-200 mM) and stimulated with *Candida albicans*. Nox2 activity was determined polarographically by oxygen consumption measured by Clark electrode. Oxidase activity decreased by treatment with both nitroxides in a dose-dependent manner. However, Ac-Tempo was more effective (ED₅₀44μM) that Tempo (ED₅₀160μM). In parallel, the fluorescence intensity elicited by acridine after reaction with free radicals was determined. Neutrophils stimulation elicited significant fluorescent response in direct correlation with Ac-Tempo doses (R²=0.997), supporting the hypothesis that nitroxide is consumed by free radicals neutrophils-released. Fungicidal neutrophils activity assay explicated that pretreatment of cells with Tempo caused 80% decrease in the effectiveness on *C. albicans* death. Oral administration of a Tempo single dose was able to reduce paw edema elicited in response to inoculation of the fungus. Also, a significant decrease in protein nitration in paw tissues was found in this condition. Together, the results support the premise that Nox2 activity is essential for the host response against *C. albicans* and that nitroxides cause a decrease on the oxidant immune response to fungal infection.

Key words: Antioxidants. Neutrophils. *Candida albicans*. NADPH oxidase. Free radicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito.....	21
Figura 2- Produção de ERO/ERN por fagócitos.....	22
Figura 3- Estrutura química de nitróxidos piperidinícos.....	33
Figura 4- O processo redox de metabolização de nitróxidos.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
CAT	catalase
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DC-SIGN	receptor de lectina tipo C
DGC	doença granulomatosa crônica
DNA	ácido desoxirribonucléico
ED ₅₀	dose efetiva para inibição de 50%
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
ERO/ERN	espécie reativa de oxigênio/ espécie reativa de nitrogênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
fMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPRRs	receptores de reconhecimento de padrão fúngico
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gr	glutathione redutase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GST	glutathione S-transferase
HIV	vírus da imunodeficiência humana

iNOS	óxido nítrico sintase induzível
MN	mononucleares
MPO	mieloperoxidase
MR	receptor de manose
MRI	imagem de ressonância magnética
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	fator de transcrição nuclear kappa B
Nox	oxidase não fagocítica
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	polimorfonucleares
RRP	região rica em prolina
Se-Gpx	glutationa peroxidase
SOD	superóxido dismutase
TGI	trato gastrointestinal
TGU	trato geniturinário
TLR	receptores semelhantes a Toll
Txr	tiorredoxina redutase

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1	INFLAMAÇÃO.....	13
1.2	PRODUÇÃO DE ERO/ERN E CONTROLE METABÓLICO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
1.3	COMPONENTES DA NADPH OXIDASE E SUA REGULAÇÃO.....	18
1.4	DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA.....	23
1.5	NADPH OXIDASE COMO ENZIMA FUNGICIDA.....	25
1.6	CANDIDÍASE CUTÂNEO-MUCOSA.....	30
1.7	NITRÓXIDOS CÍCLICOS.....	33
1.7.1	Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos.....	35
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	41
3	RESULTADOS.....	42
3.1	ARTIGO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A.....	78

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INFLAMAÇÃO

Conceitua-se inflamação como uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e células do sangue para o interstício tissular. Por meio dela, o organismo localiza e elimina células, elementos estruturais alterados, microrganismos e outros agentes reconhecidamente estranhos. Embora seja um mecanismo defensivo desenvolvido ao longo de séculos de evolução, o qual envolve uma complexa rede de moléculas e células, em muitos casos pode causar danos ao organismo. Isso ocorre quando a capacidade de eliminar substâncias estranhas ou tecidos lesados fica comprometida, ou ainda quando os mecanismos de regulação fisiológica sofrem distúrbios. Nesses casos, a inflamação não traz benefícios, acarretando perda da função do órgão ou tecido (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS ; LICHTMAN, 2005; RUBIN et al. 2006).

As fontes de inflamação são comuns e incluem infecções microbianas e virais, exposição a alérgenos, à radiação e a substâncias químicas tóxicas, doenças auto-imunes e crônicas, obesidade, consumo de álcool, uso de tabaco e uma dieta rica em calorias (SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010; AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009).

Infecção pressupõe invasão de um tecido normalmente estéril por um microrganismo, que leva à resposta inflamatória local e à resposta imunológica manifestada pela formação de anticorpos contra o agente agressor. Já a inflamação é uma resposta do organismo a um dano tecidual que pode ser infeccioso ou não. Esta tem por função conter, isolar e destruir os microrganismos invasores, inativar as toxinas e preparar o tecido ou o órgão para a cicatrização e reparação. Essa resposta inflamatória pode ser localizada ou sistêmica e é mediada pela liberação e

ação de diversos fatores, como as citocinas (RUBIN; FARBER, 1999; GYSSENS, 1999).

Durante o processo inflamatório, ocorre no local da injúria uma elevação do suprimento sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos (granulócitos, monócitos e linfócitos) e, simultaneamente, indução da liberação de mediadores bioquímicos, tais como proteínas de fase aguda, eicosanóides e citocinas, em uma resposta coordenada do organismo. Com a interrupção da ação do agente inflamatório, a liberação de mediadores é diminuída, a microcirculação retoma o equilíbrio hemodinâmico original e as células exsudadas retornam à circulação sanguínea, geralmente pelos vasos linfáticos (OHSHIMA et al. 2005).

A inflamação divide-se em padrões agudo e crônico, dependendo da persistência da lesão, dos sintomas clínicos e da natureza da resposta existente (RUBIN et al. 2006).

Inflamação aguda é um estágio inicial de inflamação (imunidade inata), o qual é mediado pela ativação do sistema imune. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto tempo e é normalmente benéfico para o hospedeiro. Se a inflamação dura por um longo período de tempo, a segunda fase da inflamação, ou inflamação crônica, pode predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas (LIN ; KARIN, 2007).

As características mais importantes da inflamação aguda incluem: acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN – principalmente neutrófilos) do espaço intraluminal até o tecido extravascular. Por outro lado, os componentes celulares característicos da inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

A resposta inflamatória crônica é prolongada, com persistência de células inflamatórias e dano tissular frequentemente resultando em reparo aberrante (RUBIN et al., 2006).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm examinado em detalhes as ações específicas dos elementos do sistema imune. Em especial, a resposta aguda do

hospedeiro é vista como uma coalizão de elementos antimicrobianos, alguns transitórios e outros duradouros, que colaboram entre si para a criação de um ambiente fagocítico que promova a destruição da maioria dos agentes invasores (BALDRIDGE ; GERARD, 2000).

Na maioria dos casos, as primeiras células a deixar os vasos são os PMN. Por isso mesmo, eles constituem as células predominantes no exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Os monócitos começam a sair dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a exsudação, mas, a partir daí, se acumulam rapidamente, passando a constituir as células dominantes após 24 horas. Os PMN têm vida média muito curta após a exsudação (oito horas em média), ao passo que os macrófagos, originados dos monócitos, sobrevivem por maior intervalo de tempo. Essa é uma das razões pelas quais, nas inflamações agudas, em geral predominam PMN, enquanto que nas crônicas, os leucócitos mais numerosos são aqueles derivados de mononucleares, linfócitos e plasmócitos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os neutrófilos medem 10-20 μm de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. No citoplasma, exibem dois tipos principais de grânulos (cerca de 600 por célula). Os azurófilos (ou primários), que representam 10-20% do total, são lisossomos verdadeiros e contêm mieloperoxidase, catepsina G, elastase, colagenase, muramidase, várias proteínas catiônicas microbicidas, defensinas, além de hidrolases existentes nos lisossomos das demais células. O segundo tipo, os grânulos específicos (ou secundários), contém lisozima, lactoferrina, ativador de plasminogênio, histaminase e fosfatase alcalina (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os neutrófilos constituem a população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes e são produzidos na medula óssea onde se originam de uma linhagem comum àquela dos fagócitos mononucleares. Um ser humano adulto produz mais de 10^{11} neutrófilos/dia, os quais podem migrar para locais de infecção ou lesão poucas horas após a entrada de microrganismos ou o contato com o agente agressor. No entanto, caso não sejam recrutados, sofrem morte celular

programada e são normalmente fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS ; LICHTMAN, 2005).

Muitas células inflamatórias, incluindo monócitos, macrófagos tissulares, células dendríticas e neutrófilos possuem a capacidade de reconhecer, internalizar e digerir materiais estranhos, como microorganismos ou fragmentos celulares através de um processo conhecido como fagocitose (RUBIN et al. 2006).

A sequência de eventos na qual estas células fagocitárias reconhecem e eliminam estes agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos finais de 1800 por um cientista russo, (METCHNIKOFF, 1883, citado por BABIOR, 2000) constituindo o processo de fagocitose. Nesse processo, agentes estranhos ao organismo, após o engolfamento pela membrana plasmática dos fagócitos, com formação do fagossoma, são internalizados e destruídos.

Vários estímulos atuam cooperativamente para ativar os fagócitos e seus mecanismos destrutivos durante a fagocitose, em um processo subsequente à ativação de receptores semelhantes ao Toll (TLR), acoplados à proteína G, específicos para região Fc de anticorpos, ou porções C3 e 5a do complemento, ou ainda, pela estimulação direta de componentes celulares por substâncias como os ésteres de forbol. Em decorrência dessas interações, dois tipos de mecanismos comuns a todos os fagócitos podem ser ativados simultaneamente. Os mecanismos não oxidativos, que constituem a fusão de lisossomos aos vacúolos fagocíticos com subsequente degranulação de proteínas, e os mecanismos oxidativos, que se caracterizam pela produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) (GROEMPING et al. 2003; BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

1.2 PRODUÇÃO DE ERO/ERN E CONTROLE METABÓLICO DO ESTRESSE OXIDATIVO

As células geram energia principalmente através da redução do oxigênio molecular em água. Durante esse processo, pequenas quantidades de formas de oxigênio reativas parcialmente reduzidas são produzidas como um subproduto inevitável da respiração mitocondrial (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Como a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo, essencialmente todas as células aeróbias produzem, naturalmente, ou por alguma disfunção biológica, quantidades significantes de ERO/ERN, sendo essa uma condição fisiológica associada a esse tipo de vida (GRISHAM, 2004; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Entre os danos mais graves ocasionados por ERO/ERN, estão aqueles causados ao DNA, envolvendo clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases. O maior gerador de ERO, a mitocôndria, é alvo de oxidação com consequências deletérias, tais como danos oxidativos no DNA da mitocôndria (CIRCU et al. 2009; RACHEK et al. 2009). O acúmulo de lesões no DNA tem consequências relacionadas à mutagênese e carcinogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder ou sofrer alteração de sua atividade catalítica. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (SIES, 1999; MOREL et al. 2001; NIE et al. 2001; RIBEIRO et al. 2005).

A produção dessas espécies oxidantes pode ser observada em vias metabólicas como a da cadeia respiratória mitocondrial, via do catabolismo de purinas para a formação de ácido úrico, do sistema NADPH citocromo p-450 redutase microsomal, da síntese de prostaglandinas e isoprostanos, e de especial

interesse nessa revisão, no sistema NADPH oxidase fagocítico, também denominado como Nox2 (ZHUKOV; ARCHAKOV, 1982; GORSKY; KOOP; COON, 1984; BLANCK et al. 1991; ZHUKOV; INGELMAN-SUNDBERG, 1999; RIBEIRO et al. 2005).

O organismo apresenta uma série de mecanismos endógenos e exógenos capazes de manter a concentração de ERO/ERN dentro de limites fisiológicos, os quais, quando ultrapassados seja por uma disfunção biológica ou por atuação de agentes externos, geram uma condição celular oxidativa associada a diversas patologias como, doenças infecciosas, inflamatórias, vasculares, neurodegenerativas, de origem auto-imune, câncer e acidentes que envolvam isquemia e reperfusão. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; KOJDA; HARRISON, 1999; RIBEIRO et al. 2005; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006).

Um dos mecanismos endógenos de controle da concentração de ERO/ERN é a ação de enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano. Entre elas, cita-se a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Se-Gpx), glutathione reductase (Gr), glutathione S-transferases (GST), catalase (CAT), tioredoxina reductase (Txr) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose 6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconolactona e transidrogenases. Através destas enzimas e da ação de antioxidantes não enzimáticos de baixa massa molecular, o organismo mantém a concentração de oxidantes dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al. 2005).

1.3 COMPONENTES DA NADPH OXIDASE E SUA REGULAÇÃO

NADPH oxidase, especificamente a isoforma fagocitária Nox2, é reconhecido como um dos primeiros complexos enzimáticos envolvidos na ação anti-patogênica

de neutrófilos e outras células brancas fagocíticas. Esta ação é mediada pela produção de ERO/ERN, as quais são liberadas no interior do fagossoma (JONES; HANCOCK; MORICE, 2000).

Na inflamação, a produção de ERO/ERN inicia-se quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula o evento referido na literatura como *burst* oxidativo ou *burst respiratório*, o qual é caracterizado pelo aumento abrupto do consumo de oxigênio pelos fagócitos, aumento da glicólise anaeróbica, mobilização de cálcio intracelular e produção de ERO/ERN (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008). A forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) tem um importante papel nessa resposta por ser o doador de elétrons para o oxigênio extracelular, produzindo o radical ânion superóxido, $O_2^{\bullet-}$ (SEGAL et al. 2000).

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).

Esta oxidase leva os elétrons do NADPH citoplasmático, gerado pela via de hexose monofosfato, e os transfere ao oxigênio no vacúolo fagocítico para produzir $O_2^{\bullet-}$ (WIENTJES; SEGAL, 1995). Esse radical é a primeira espécie reativa formada, sendo produzido pela redução do oxigênio por um único elétron, e dando origem a outras ERO/ERN, uma vez que é capaz de agir como oxidante ou redutor (RIBEIRO et al. 2005). O sistema Nox2 compõe-se por elementos citossólicos e componentes ligados à membrana de grânulos (gp91^{PHOX}, p22^{PHOX} e rap); esses últimos constituem o citocromo b558. A codificação do cDNA destas proteínas foi elucidada e os diferentes componentes foram clonados e sequenciados e a localização cromossômica foi identificada (HARPER; CHAPLIN; SEGAL, 1985; ROYER-POKORA et al. 1986; DINAUER et al. 1987; TEAHAN et al. 1987; PARKOS et al.

1988; LOMAX et al. 1989; VOLPP et al. 1989; YAMAGUCHI et al. 1989; DINAUER et al. 1990; LETO et al. 1990; TEAHAN et al. 1990).

Segundo Morel et al. (1991) e Babior (1992) a ativação da NADPH oxidase do fagócito catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ a partir de oxigênio molecular e NADPH, de acordo com a seguinte reação:



A identificação dos componentes da oxidase foi facilitada pela disponibilidade de células de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), disponibilidade de ensaios de complementação e de fusão celular (HAMERS et al. 1984).

As duas subunidades gp91^{PHOX} e p22^{PHOX} são proteínas integrais de membrana, sendo que gp91^{PHOX} contém os componentes responsáveis pela transferência de elétrons. A porção C-terminal dessa proteína está voltada para o lado citosólico da membrana e contém os sítios de ligação para FAD (Flavina Adenina Dinucleotideo) e NADPH. A porção N-terminal da proteína forma uma sequência de seis domínios em α - hélice aos quais está ancorado um par de grupos heme (LAMBETH, 2007). Os grupos heme estão orientados perpendicularmente a ambos os lados da membrana, formando um conduto à passagem dos elétrons oriundos do NADPH citosólico em direção ao O_2 extracelular ou intra-fagosômico (ISOGAI; IZUKA; SHIRO, 1995). A subunidade p22^{PHOX} apresenta na porção C-terminal uma região rica em prolina (RRP) que interage com o p47^{PHOX} fosforilado, evento indispensável à ativação do complexo enzimático (LAMBETH, 2007). O citocromo b558 desempenha uma função primordialmente regulatória e suas subunidades estão inativas na célula em estado de repouso. Em resposta a estímulos apropriados, tais como partículas opsonizadas, lipídios bioativos, peptídeos quimiotáticos ou anticorpos, o complexo formado pelas subunidades citosólicas migra do citosol para a membrana plasmática e associa-se ao citocromo b558 (BABIOR, 1999; GROEMPING ; RITTINGER, 2005; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). Uma vez montado o complexo enzimático, os dois grupos heme

localizados na subunidade gp91^{PHOX} realizam a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de O₂^{•-} (CROSS, 1999).

Reações subseqüentes no fagossoma levam à produção de uma grande variedade de ERO/ERN, de forma coordenada. A Figura 1 ilustra a ativação do complexo Nox2, destacando-se a liberação do O₂^{•-} no fagossoma.

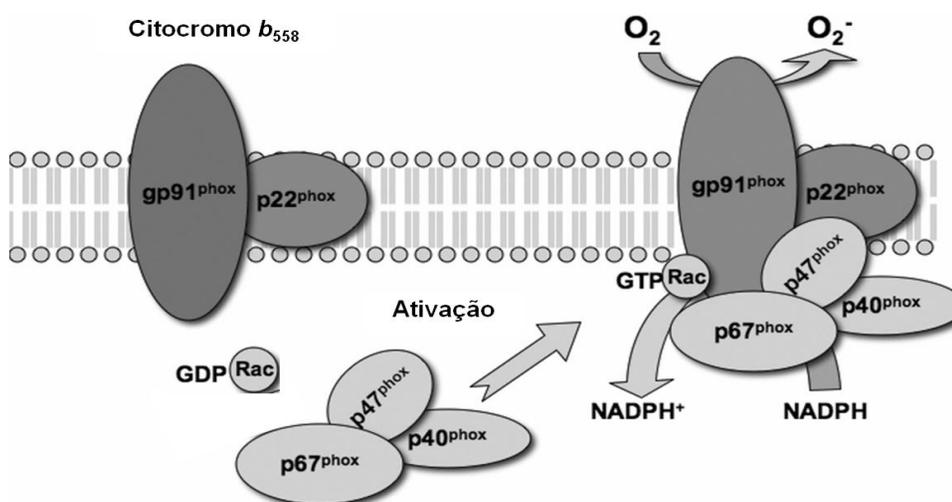


Figura 1- Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito. Em neutrófilos em repouso, os componentes da Nox2 estão espacialmente segregados entre citosol e membrana. Mediante estímulo, o complexo formado pelas unidades citosólicas p67^{PHOX}, p47^{PHOX}, p40^{PHOX} e Rac associa-se ao citocromo *b*₅₅₈, possibilitando a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, o que resulta na geração de O₂^{•-}. Ilustração adaptada de: Biochem. Soc. Trans.: 34, 960-964, 2006.

A produção de ERO/ERN por fagócitos é reconhecida como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, e, portanto, essencial para a sobrevivência. A partir do O₂, que se encontra no estado tripleto, pode ser produzido O₂^{•-}, por ganho de um elétron, ou oxigênio singlete (¹O₂), por mudança do número de spin de um dos dois elétrons não pareados do O₂ através de uma reação endotérmica. Embora o O₂^{•-} não seja uma espécie oxidante forte, reações subseqüentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes como microbicidas, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila

(HO[•]). No fagossoma, o O₂^{•-} sofre dismutação, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, além de ser capaz de atravessar membranas e oxidar GSH e metionina, ativa a expressão de genes que estão sob o controle do fator de transcrição NF-κB. Além disso, este peróxido, através de reação de Fenton, na presença de metais como Fe²⁺ origina o radical hidroxila (HO[•]), extremamente reativo, capaz de causar danos em fitas de DNA, inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. O O₂^{•-} pode, adicionalmente, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa radical hidroperoxil (HO₂[•]). A mieloperoxidase (MPO), enzima que é liberada no fagossoma durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H₂O₂ e Cl⁻. Este ácido, altamente reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas, servindo, ainda, de substrato para a produção subsequente de HO[•] e ¹O₂ (HAMPTON; KETLE; WINTERBOURN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 2).

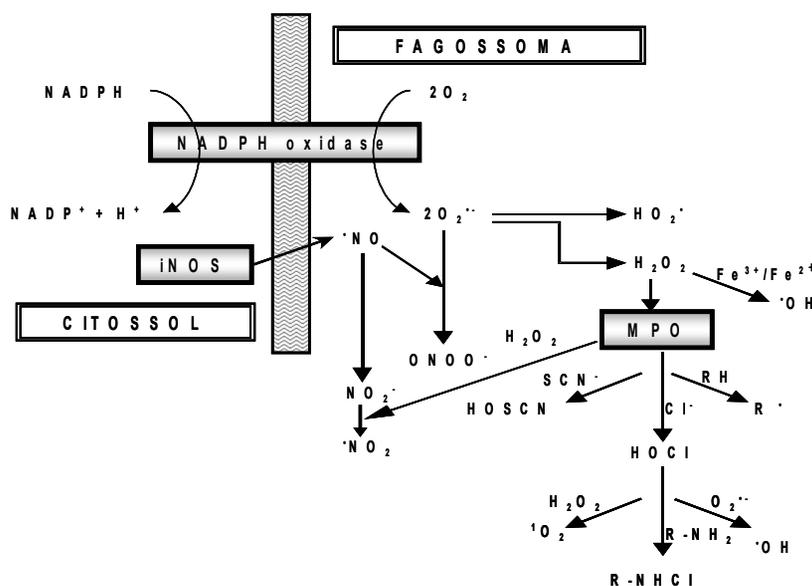


Figura 2- Produção de ERO/ERN por fagócitos. Ressaltam-se os doadores citossólicos de elétrons para o sistema Nox2 que produz O₂^{•-} no fagossoma. Fonte: HAMPTON et al (1998).

Uma grande variedade de agentes, tanto substâncias solúveis quanto particuladas, é capaz de estimular, seletivamente ou em conjunto, o sistema Nox2 em fagócitos. Entre as solúveis incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a concanavalina A, os leucotrienos, as citocininas, os ionóforos de cálcio, o fluoreto de sódio e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Bactérias e leveduras opsonizadas que atuam pela via alternativa do complemento, complexos imunes formados pela interação antígeno/anticorpo que atuam pela via clássica do complemento e estreptolisina O são substratos particulados capazes de ativar fagócitos (JESIATIS et al. 1991).

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (JESIATIS et al. 1991; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000).

1.4. DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA

A importância do complexo enzimático NADPH oxidase é claramente mostrada nos pacientes portadores de DGC, nos quais a produção de $O_2^{\bullet-}$, é ausente ou diminuída em relação a indivíduos não portadores (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

DGC é uma condição geneticamente heterogênea, afeta aproximadamente 1 em cada 200.000 indivíduos, caracteriza-se por infecções graves bacterianas por microrganismos catalase-positivos (*Staphylococcus aureus*, enterobactéria) e fúngicas (*Aspergillus*, *Candida*), e é, muitas vezes, fatal. Decorre da falha enzimática no sistema Nox2 e estes defeitos resultam na incapacidade de fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) em destruir os microrganismos fagocitados (ROSENZWEIG; HOLLAND, 2004).

Até o momento foram descritos na literatura quatro defeitos bioquímicos causadores da DGC, induzidos por diferentes mutações nos genes que codificam

quatro proteínas, cadeia pesada beta (p91^{phox}) e cadeias leves alfa (p22^{phox}) do citocromo *b558*, e dois fatores citosólicos que se ligam a este citocromo, p47^{phox} e p67^{phox}. Defeitos do p91^{phox} causam DGC ligada ao cromossomo X e perfazem 65% dos casos, enquanto que defeitos do p47^{phox}, uma das causas de DGC autossômica recessiva, são responsáveis por 25% dos casos. Defeitos do p22^{phox} e p67^{phox} também levam a DGC autossômica recessiva, cada um contribuindo com 5% dos casos (ROOS; CURNUTTE, 1999).

Mais recentemente, *Burkholderia cepacia* tem sido o maior complicador para os portadores da doença, causando pneumonia de difícil tratamento, o que é surpreendente, pois este é normalmente um patógeno de cebolas. O real problema, entretanto, é o gênero *Aspergillus* que causa pneumonia intratável e às vezes septicemia em pacientes com DGC, e são, provavelmente, a causa mais frequente de morte desses pacientes (BABIOR, 2004). Outros patógenos que afligem estes pacientes são espécies de *Salmonella*, *Nocardia*, micobactérias tuberculosas e não tuberculosas. As infecções por *Pseudomonas*, embora seja um microrganismo catalase positivo, raramente ocorrem.

Como qualquer órgão pode ser afetado, as superfícies mucosas e cutâneas normalmente são mais susceptíveis à colonização por fungos e bactérias por constituírem barreiras naturais do organismo. Portanto, dermatite, enterite e abscessos peri-retais são formas comuns de infecção. As manifestações cutâneas incluem principalmente dermatite eczematóide ou piogênica, furunculose e abscessos (ARBISER, 1995; BERRON-RUIZ et al., 2000; CONDINO NETO; GRUMACH, 2008). Além dos processos infecciosos, pacientes com DGC frequentemente formam granulomas persistentes e exuberantes. As manifestações clínicas da inflamação crônica são variadas e incluem ulceração da pele, inflamação excessiva em feridas cirúrgicas com drenagem e deiscência, doenças auto-imunes lembrando lúpus eritematoso sistêmico, lúpus discóide, pneumonite e doença inflamatória intestinal lembrando doença de Crohn. O envolvimento granulomatoso de vísceras ocas pode resultar em obstrução gastrointestinal e de trato geniturinário.

Os fenótipos mais comuns de portadores de DGC ligada ao X são as lesões cutâneas lembrando lupus discóide clinicamente e histologicamente, e a estomatite aftosa de repetição. Tais lesões cutâneas foram observadas em pacientes com DGC ligada ao X e autossômica recessiva. Apesar da maioria dos portadores com aproximadamente 10% dos fagócitos normais apresentarem defesa normal, em situações raras uma grande proporção dos granulócitos circulantes apresenta defeitos funcionais e os portadores podem desenvolver manifestações clínicas sugestivas de DGC com infecções de repetição.

O diagnóstico é estabelecido por uma história clínica compatível e demonstração de um defeito no *burst respiratório*.

Vários estudos retrospectivos mostraram que a profilaxia com sulfametoxazol-trimetoprim reduz o índice de infecções graves nos pacientes com DGC. Em um estudo prospectivo europeu, a profilaxia com itraconazol reduziu as infecções por *Aspergillus* e a droga foi bem tolerada. O interferon gama é um fator ativador de macrófago e aumenta a geração de H_2O_2 em monócitos circulantes. Vários estudos multicêntricos mostraram que o interferon gama é capaz de reduzir em até 67% a incidência de infecções graves em pacientes com DGC (especialmente crianças de tenra idade) (MOREIRA et al, 2005). Ocasionalmente, o transplante de medula pode ser indicado em casos de infecções severas, apesar da antibioticoterapia e da profilaxia com interferon; por exemplo, em pacientes com DGC com aspergilose pulmonar crônica (BABIOR, 2004). Recentemente, a terapia gênica foi realizada em cinco pacientes com deficiência de $p47^{PHOX}$ com boa resposta (MALECH et al., 1997).

1.5. NADPH OXIDASE COMO ENZIMA FUNGICIDA

Atualmente entende-se que a morte por oxidação de células fúngicas representa uma importante linha de eliminação de microrganismos patogênicos. Não

surpreendente, correlações têm sido feitas entre o funcionamento da resposta ao estresse oxidativo em certos fungos patogênicos e a sua habilidade de proliferar no hospedeiro. Além disso, o estudo do estresse oxidativo em leveduras, especialmente o papel das mitocôndrias, claramente auxilia na compreensão de mecanismos envolvidos em envelhecimento, apoptose e doença em organismos superiores (MOYE-ROWLEY, 2003).

A fagocitose de *C. albicans* é mediada por vários receptores opsônicos e não-opsônicos. Fixação de complemento e ativação é mediada pela via alternativa e a ativação do complemento é principalmente importante para a quimiotaxia e opsonização de *C. albicans*, mas não para a lise. Ainda, embora *C. albicans* seja reconhecida pelo receptor de lectina ligante de manose, a via da lectina de ativação do complemento provavelmente exerce somente um efeito menor no englobamento desta espécie. Muitos receptores ligados a membrana contribuem para a fagocitose de *C. albicans*. Entre eles, dectina-1, receptor de manose (MR), receptor de lectina tipo C (DC-SIGN) demonstraram mediar diretamente o englobamento de partículas fúngicas (FROHNER et al., 2009).

Segundo Naoum (1996), após a ingestão, a morte de *C. albicans* ocorre através de mecanismos tanto oxidativos quanto não-oxidativos. A morte desse fungo também ocorre no meio extracelular, através de ações não definidas de receptores de reconhecimento de padrão fúngico (FRRs) e galectina-3.

Como todos os organismos aeróbios expostos a ERO, os fungos sintetizam e ativam enzimas antioxidantes – SOD, CAT e diversas peroxidases – e metabólitos não enzimáticos – trealose, manitol e melanina – contra o estresse oxidativo (MISSALL et al., 2004).

Thompson e Wilton (1992) demonstraram que a capacidade de eliminação de *C. albicans* por PMN e macrófagos foi maior em condições aeróbicas do que em anaeróbicas e também que a morte por macrófagos foi reduzida por inibidores de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 e a morte por PMN foi diminuída por inibidores de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl e HO^{\bullet} , sugerindo que essas células usam ERO para eliminar *C. albicans* e que o arsenal químico utilizado difere entre esses tipos celulares.

Kusch et al. (2007) estabeleceram o perfil proteômico da resposta ao estresse oxidativo de *C. albicans* induzida por concentrações não-letais de H₂O₂ e de diamida. A expressão de 57 e 45 proteínas foi modificada pela exposição a esses estressores, respectivamente. As assinaturas de indução foram praticamente idênticas, enquanto as de repressão demonstraram sobreposição pequena. Entre as proteínas induzidas estavam enzimas com funções antioxidantes conhecidas como catalase e tioredoxina-redutase e um conjunto de oxidoredutases.

Enjalbert et al. (2007) examinaram através de genes repórteres fusionados a *green fluorescent protein* (GFP), a extensão em que células individuais de *C. albicans* ativam uma resposta ao estresse oxidativo em microambientes específicos do processo da candidíase sistêmica. Os resultados indicaram que essa espécie é exposta a estresse oxidativo significativo após fagocitose por neutrófilos, porém poucas células fúngicas são expostas a um estresse oxidativo depois de exposição a macrófagos ou quando uma infecção renal é estabelecida. Para estes autores, pareceu claro que o estresse oxidativo não é uma ameaça constante durante infecção sistêmica e que as células fúngicas mais provavelmente são expostas ao estresse oxidativo precocemente no estabelecimento de uma infecção sistêmica, quando entram em contato com neutrófilos circulantes. Nesse estágio, a habilidade para adaptar-se apropriadamente ao estresse oxidativo pode promover a sobrevivência do patógeno e o subsequente desenvolvimento de infecção profunda. Esses concluem que a resposta ao estresse oxidativo por *C. albicans* é nicho-específica durante o estabelecimento e progresso de infecção sistêmica.

De modo interessante, a inativação da enzima iNOS-2 não faz com que camundongos se tornem mais susceptíveis a infecção por *C. albicans*, sugerindo que a produção de ERN pode não ser a principal defesa contra candidíase e que aparentemente ERO seriam mais importantes. No entanto, ERN são protetoras em candidíase oral (BROWN et al., 2009).

Aratani et al. (1999) demonstraram que camundongos sem MPO apresentaram susceptibilidade aumentada à pneumonia e à morte após infecção intratraqueal por *C. albicans* e houve igualmente maior disseminação para vários

órgãos quando células do fungo foram injetadas intraperitonealmente, aparentemente provando que a MPO é importante na defesa contra a infecção fúngica por *C. albicans* e que a inabilidade de gerar HOCl não pode ser compensada por outros sistemas dependentes de oxigênio em camundongos.

A importância das duas principais enzimas produtoras de oxidantes, MPO e NADPH oxidase, na ação fungicida *in vivo* foi comparada diretamente em camundongos geneticamente modificados. Camundongos deficientes em MPO (MPO - / -) e NADPH oxidase (doença granulomatosa crônica ligada ao cromossomo X [DGC-X]) mostraram aumento da susceptibilidade a infecções pulmonares por *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* em comparação com camundongos normais, e os camundongos DGC-X exibiram um tempo de sobrevivência mais curto do que camundongos MPO-/- . Este aumento da mortalidade de camundongos DGC-X foi associado com um aumento do crescimento do fungo em seus órgãos, de 10 a 100 vezes, durante os 6 primeiros dias. Estes resultados sugerem que o $O_2^{\bullet-}$ produzido pela NADPH oxidase é mais importante do que o HOCl produzido pela MPO, embora ambos os produtos oxidativos, obviamente, contribuem para a defesa do hospedeiro contra a infecção pulmonar por esses fungos. Observou-se também que camundongos knockout duplos MPO-/-/DGC-X mostraram níveis comparáveis de susceptibilidade aos camundongos DGC-X contra *C. albicans* e *A. fumigatus*, indicando que a MPO é incapaz de desempenhar um papel na defesa do hospedeiro, na ausência da NADPH oxidase. Isto sugere fortemente que o H_2O_2 , o precursor de HOCl, é o único derivado de $O_2^{\bullet-}$ produzido pela NADPH oxidase (ARATANI et al., 2002a).

Wellington et al. (2009) investigaram a produção de ERO em fagócitos expostos a *C. albicans* e *C. glabrata* e observaram um efeito supressivo na produção de ERO particularmente por *C. albicans*. Células vivas foram mais efetivas, sugerindo não se tratar somente de neutralização de ERO por SOD, CAT, ou outros compostos antioxidantes e sim de um mecanismo ativo de supressão. Esse efeito sobrepôs o efeito de sinais estimulatórios da parede celular, previamente descritos, e não foi dependente de fagocitose, sugerindo que esse possa ser um importante

mecanismo de evasão imune. Esta supressão da produção de ERO não ocorreu com *S. cerevisiae*. Esse grupo também relatou que das diferentes espécies testadas, *C. albicans* foi a que suprimiu mais a produção de ERO por fagócitos, sendo *C. krusei* também bastante efetiva. Nem *C. glabrata*, nem *C. tropicalis* foram supressores efetivos da formação de ERO (MACCALLUM, 2008).

Sobre a questão envolvendo uma maior efetividade de neutrófilos em comparação com monócitos/macrófagos em sua habilidade de matar *C. albicans*, em um estudo (FRADIN et al., 2005) foram comparados os perfis de transcrição gênica de *C. albicans* incubada com diferentes tipos de células sanguíneas humanas e sangue total. Entre as diversas conclusões, a fração de PMN mimetizou proximamente os eventos que ocorreram com o sangue total com relação ao crescimento do organismo e a transcrição gênica. Células leveduriformes predominaram no sangue total enquanto que em eritrócitos, plasma ou monócitos, a forma de hifas foi predominante. Aproximadamente 97% das células permaneceram como leveduras em PMN. Ainda nestas células, 16 de 18 genes antioxidantes foram induzidos, enquanto só 2 dos 18 foram induzidos em células mononucleares. Desta forma, os eventos transcripcionais que ocorrem em neutrófilos humanos e populações de monócitos são substancialmente diferentes e estas diferenças parecem correlacionar-se com maior atividade inibitória do crescimento de *C. albicans* por PMN comparados com MN.

Jamieson et al. (1996) estudaram a resposta de *C. albicans* a oxidantes como um primeiro passo para determinar o papel de respostas ao estresse oxidativo no processo de virulência e observaram que essa levedura possui uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 e menadiona e que esta resposta difere da observada na levedura normalmente não-patogênica *Saccharomyces cerevisiae*. *C. albicans* foi constitutivamente mais resistente a oxidantes que *S. cerevisiae*. Esses autores também demonstraram a capacidade de um oxidante levar a adaptação e resistência a doses normalmente letais de um segundo oxidante (proteção cruzada). Os oxidantes induziram a atividade de diferentes enzimas antioxidantes testadas em *C. albicans*: aldeído-redutase; CAT, gliceraldeído-6-

fosfato-desidrogenase, glutationa-peroxidase, quinona-redutase, manganês-SOD e cobre/zinco SOD.

Ingram et al. (2001) compararam a resistência a oxidantes de *C. albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Alternaria* spp. Entre essas espécies, *C. albicans* apresentou a maior resistência geral aos oxidantes e o maior conteúdo intracelular de GSH. Em todos esses microrganismos o tratamento com oxidantes diminuiu o conteúdo intracelular de GSH. O aumento de GSH total no meio externo foi também observado e pode dever-se, segundo os autores, à exportação da forma oxidada da GSH, GSSG.

Srikantha et al. (2005) lembram que os patógenos fúngicos são expostos a combinações de diferentes estresses no hospedeiro, em lugar de somente ERO ou ERN sozinhos, de forma que claramente é necessário estudar o impacto combinatório de estresses nos patógenos fúngicos. Da mesma forma, segundo Temple et al. (2005), nenhum oxidante é representativo do estresse oxidativo, mesmo com o amplo uso de um único composto como o H_2O_2 em estudos *in vitro*. O padrão de resposta transcricional a determinada ERO depende de sua concentração e um sistema antioxidante clássico induzidos por altas concentrações de certa ERO pode ser reprimido quando células se adaptam a baixas concentrações dessa mesma ERO.

1.6. CANDIDÍASE CUTÂNEO-MUCOSA

A candidíase é uma infecção fúngica 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). *C. albicans* é a espécie mais frequente em infecções, sendo considerada o patógeno oportunista mais comum na espécie humana (WHITE et al., 2004; AVRELLA; GOULART, 2008).

Normalmente, diferentes espécies de *Candida* são comensais dos tratos geniturinário (TGU) e gastrointestinal (TGI), portanto, a habilidade do fungo se tornar patogênico é determinada primariamente pelo estado imune do hospedeiro. Quando o equilíbrio dos ambientes colonizados é perturbado, como a supressão da função imune ou em alterações na microbiota, espécies de *Candida* são capazes de invadir e danificar os tecidos (CHENG et al., 2007; HUBE, 2009).

Candida spp. são comensais em até 71% da população saudável (dependendo de métodos de coleta de amostras e sítios do organismo) (CALDERONE, 2002). Em média, 25% a 30% dos indivíduos são portadores de *C. albicans*, na cavidade oral, com maior incidência em crianças pequenas, lactentes e indivíduos com AIDS. Estima-se que humanos saudáveis tenham índices de prevalência $\geq 50\%$ no TGI e entre 10 e 20% na cavidade oral, trato anorretal e vagina (ODDS, 1988). Especificamente, entre 25 e 30% das mulheres adolescentes e adultas têm colonização vaginal em algum momento, sendo particularmente prevalente durante a gravidez. Mulheres adolescentes e adultas têm a mesma distribuição de espécies de *Candida* na vagina (KONEMAN et al., 2001; NANTEL et al., 2002; FIDEL Jr., 2004).

Fatores de risco para infecções por *Candida* incluem: colonização prévia por espécies deste gênero, infecção com HIV, quimioterapia de câncer, neutropenia, transplante de órgãos, utilização de cateteres ou dispositivos invasivos, infecções prévias por outros organismos (por exemplo, citomegalovírus), doenças autoimunes, queimaduras, terapia antimicrobiana, idade (avançada ou infantes prematuros), cirurgias abdominais ou perfurações, politrauma, doença cardíaca, tratamento intensivo, radioterapia, distúrbios reumáticos e qualquer terapia envolvendo exposição prolongada a esteróides. Nem todos estes fatores predisõem igual para candidíase (MAVOR et al., 2005). Estima-se que a candidíase ocorra em 8 a 10% dos pacientes com condições predisponentes (ARATANI et al., 2002b).

As manifestações clínicas da candidíase dividem-se em: candidíase cutâneo-mucosa, sistêmica ou visceral e alérgica. A forma cutâneo-mucosa acomete pele, unhas, mucosa orofaríngea e genitais. Quando atingem a pele, causam candidíase

intertriginosa em regiões inframamárias, axilares, inguino-crurais, pregas suprapúbicas, interdigitais palmares e plantares, pois são áreas onde ocorre sudorese excessiva. As lesões apresentam-se eritematosas, úmidas, com bordas mal definidas e maceradas (WAGNER; SOHNLE, 1995; SIDRIM; ROCHA, 2004).

C. albicans fermenta a glicose e a maltose, não fermentando a lactose. Apresenta ação fermentativa variável com a sacarose e a galactose. Quanto às “fontes de carbono”, assimila a galactose, a maltose e a trealose, o amido solúvel, D-xilose e D-manitol. A assimilação é variável com a L-sorbose, a sacarose, a melizitose, a L-arabinose, D-arabinose, o glicerol, o ribitol, o D-glucitol, o DL-ácido láctico, o ácido succínico e o ácido cítrico. Não assimila a celobiose, a lactose, a melibiose, a rafinose, a L-ramnose, o eritritol, o galactitol, a salicina e o inositol. Não assimila o nitrato de potássio (LACAZ et al., 2002).

C. albicans ATCC 10231, o foco deste estudo, foi isolada primariamente de paciente com broncomicose e 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, 2011).

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, esteróide 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).

1.7 NITRÓXIDOS CÍCLICOS

Os nitróxidos são quimicamente conhecidos como aminóxils ou nitroxils, que podem ser definidos como radicais livres sintéticos e estáveis, capazes de proteger células, tecidos e órgãos animais contra danos oxidativos (GOLDSTEIN et al. 2008).

Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) ou seis átomos (piperidina), sendo que um desses é de nitrogênio e os demais de carbono (Figura 3) (SOULE et al. 2007). Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui elétron livre, fornecendo natureza radicalar a tais compostos. Ligados ao anel existem grupamentos metil, os quais conferem estabilidade ao prevenir a dismutação radical-radical e limitar o acesso de substâncias reativas que poderiam quelatar as espécies radicalares. 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).

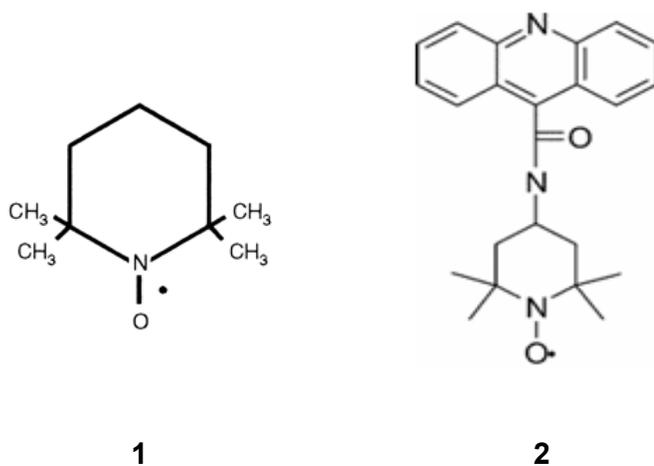


Figura 3. Estrutura química de nitróxidos piperidínicos. O composto 1, 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempo), apresenta estrutura cujo anel possui quatro grupos metil ligados. O composto 2, 4-((9-acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil (Ac-Tempo), possui adicionalmente, ligado ao anel do nitróxido, o grupamento acridina, responsável pela emissão de fluorescência quando espécies radicalares reagem com o elétron livre centrado no oxigênio.

Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL; LANGNER; BORCHERT, 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al. 2007).

Através de processos metabólicos celulares ou reações não enzimáticas, nitróxidos são metabolizados produzindo hidroxilaminas ou cátion oxoamônio (Figura 4). A atividade antioxidante dos nitróxidos está associada com a troca de um elétron envolvendo sua forma reduzida (hidroxilamina) e oxidada (cátion oxoamônio). O par nitróxido e cátion oxoamônio agem como uma eficiente dupla redox suportando processos catalíticos. Ao contrário, o par nitróxido e hidroxilamina não suporta este processo catalítico (ISRAELI et al. 2005; SOULE et al. 2007).

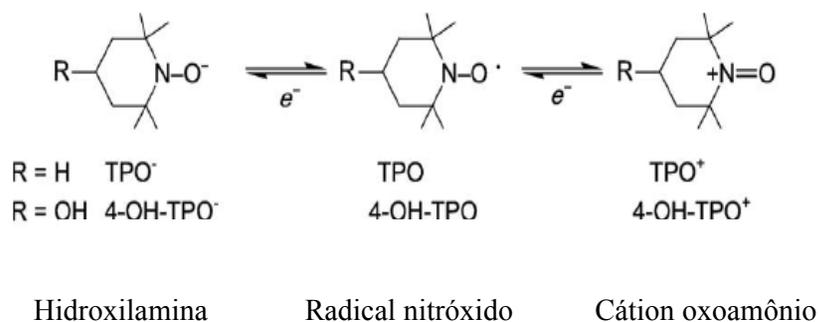


Figura 4. O processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio. Fonte: ISRAELI et al (2005).

O cátion oxoamônio é altamente oxidante e é responsável pelas atividades pró-oxidantes dos nitróxidos e seus efeitos colaterais (ISRAELI et al. 2005). Por outro lado, a hidroxilamina pode doar um átomo de hidrogênio funcionando como defesa antioxidante (SOULE et al. 2007).

1.7.1 Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos

Durante os últimos anos, e com base nas propriedades descritas anteriormente, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, mostrando-se capazes de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por oxidantes. Assim, diversos estudos os apontam como candidatos eficientes a atuar contra os danos tissulares causados pelas ações deletérias de células inflamatórias, cuja produção de ERO/ERN fuja ao controle da homeostase orgânica (HAHN; MITCHELL; SHACTER, 1997; ISRAELI et al. 2005; SOULE et al. 2007; LAIGNIER et al. 2008; TIMONER et al. 2008).

Aronovitch e colaboradores (2007) estudaram a natureza dual dos nitróxidos como pró- e antioxidantes, tendo levantado como uma das questões centrais de seu trabalho os possíveis efeitos derivados da capacidade oxidante dos cátions oxoamônio. Esses, na presença de nitróxidos, poderiam desencadear várias reações seletivas de oxidação de álcoois primários, açúcares, e outras biomoléculas, sendo então considerados os responsáveis pelos potenciais efeitos adversos da classe (DRAGUTAN ; MEHLHORN, 2007). Contudo, esses resultados apontaram que tais reações tenderiam a ocorrer em tecidos pobres em agentes redutores.

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. Ao contrário desses, os nitróxidos apresentam as habilidades que devem estar presentes em antioxidantes realmente efetivos, pois, podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos; detoxificam uma ampla gama de espécies reativas oxidantes, impedindo o início e a propagação da cadeia oxidativa, além de atuarem de modo que o nitróxido utilizado nessa função possa ser, ao menos parcialmente, reciclado à sua estrutura original. Especificando, os meios pelos quais essa classe atua incluem (i) a dismutação de $O_2^{\bullet-}$, através de

uma atividade mimética à da SOD, (ii) aumento da atividade semelhante à da catalase e de outras heme-proteínas, (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).

Uma das primeiras propriedades de interesse foi a capacidade de mimetizar as enzimas SOD, atividade observada inicialmente nos nitróxidos oxazolidina, e confirmada em outras classes. O mecanismo dessa atividade mimética é compreendido atualmente como fruto da atuação do par redox cátion oxoamônio/nitróxido, o qual forma um ciclo que tende a regenerar o nitróxido. Sendo assim, a forma radicalar é oxidada através da doação de um elétron do ânion superóxido, originando um cátion oxoamônio, o qual sofre redução através da doação de um elétron de outro ânion superóxido, restaurando o nitróxido e originando oxigênio molecular. Ou seja, de maneira similar à da SOD, os nitróxidos atuam como catalisadores, e não são consumidos durante o processo de dismutação (SAMUNI et al. 2002; SOULE et al. 2007).

Apesar de o mecanismo permanecer obscuro, os nitróxidos são capazes de proteger a células de danos que possam ser induzidos pela presença do peróxido de hidrogênio (SAMUNI et al. 2001). Krishna e colaboradores (1994) demonstraram no ano de 1996 que eles aumentam o comportamento semelhante ao da catalase apresentado por algumas heme-proteínas. Adicionalmente, a interação entre nitróxidos e metais de transição se mostra importante, uma vez que eles são capazes de oxidar os metais que se encontram na forma reduzida, tais como Fe^{2+} e Cu^+ , tornando-os indisponíveis para a reação de Fenton, e evitando a produção de espécies muito oxidantes como o HO^\bullet . Nessa ação, ao contrário da apresentada na detoxificação de ferril derivados de heme-proteínas, eles atuam como oxidantes fracos, sendo convertidos à forma de hidroxilaminas (ARONOVITCH et al. 2007; SOULE et al. 2007).

Os nitróxidos também atuam como “scavengers” de radicais, realizando reações rápidas que produzem espécies não tóxicas e evitando os efeitos deletérios desses no organismo, podendo encerrar reações em cadeia, como a peroxidação lípídica (GLEBSKA et al. 2003). As interações entre nitróxidos e radicais, em muitos casos, ainda necessitam ser elucidadas. Um exemplo está na complexidade das interações entre esses compostos e as espécies derivadas do nitrogênio. O óxido nítrico $\bullet\text{NO}$ e peroxinitrito (ONOO^-) não reagem diretamente com os nitróxidos simples em pH neutro, mas eles podem ser oxidados por $\bullet\text{NO}_2$ formado durante a auto-oxidação do $\bullet\text{NO}$ ou da decomposição do ONOO^- . No entanto, reagem diretamente com nitróxidos nitronil, formando imino nitróxidos e $\bullet\text{NO}_2$ (GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2003).

A possibilidade de que os nitróxidos atuem diminuindo os danos causados por oxidantes produzidos por células efectoras da imunidade os coloca como possíveis antiinflamatórios. Em um trabalho de 1997, Hahn e colaboradores, propunham que os nitróxidos podiam atuar sobre as condições inflamatórias, exercendo uma ação protetora em células de plasmacitoma, RIMPC 2394, impedindo danos ao DNA causados pelas espécies reativas produzidas por neutrófilos estimulados com forbol.

Fernandes e colaboradores demonstraram em 2005 que a inibição da nitração de proteínas, a qual ocorre por mecanismos radicalares, pode ser responsável pela proteção que o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) fornece a tecidos e células em modelos de inflamação. Logo, uma hipótese que desperta atenção de nosso grupo de pesquisa, é a de que nitróxidos possam atuar como “scavengers” de radicais tiila ($\text{RS}\bullet$), especialmente glutacionila, impedindo modificações pós-traducionais de diferentes proteínas. O fato, a princípio, reduziria a atividade da quinases, diminuindo a permanência do estado de fosforilação das proteínas responsáveis pela sustentação da atividade do complexo Nox2 de fagócitos, levando a uma redução da produção de oxidantes formadas durante o processo inflamatório.

Quando administrados de forma sistêmica, os nitróxidos, em muitos casos, desencadeiam respostas acompanhadas de alterações da hemodinâmica, as quais

envolvem o desenvolvimento de hipotensão e a inibição da agregação plaquetária. Contudo, existem nitróxidos que não causam essas manifestações, sendo ainda benéficas as atividades antioxidantes, antiinflamatórias e radioprotetoras apresentadas por esses (RAIKOV; RAIKOVA; ATANASOV, 2001).

A capacidade antioxidante de nitróxidos já se mostrou eficiente em auxiliar na recuperação e redução de danos causados pela isquemia e reperfusão em corações de ratos. Esses resultados podem ter sido atingidos, não só combatendo os danos causados por radicais formados sob essa circunstância, mas também potencializando os efeitos positivos ocasionados pela administração de L-arginina e posterior produção de $\bullet\text{NO}$, o qual pode atuar sem que os efeitos deletérios do ONOO^- e derivados estivessem presentes (HOFFMAN et al. 2003).

Como já foi mencionado, a atividade antiinflamatória dos nitróxidos pode oferecer novas alternativas terapêuticas no tratamento de inúmeras patologias, principalmente aquelas que envolvem a participação de células fagocitárias e a produção de ERO/ERN. Dentre essas, pode-se citar a uveoretinite de origem auto-imune, que quando induzida em ratos de linhagem Lewis e tratada com Tempol, obteve redução de danos causados a nível clínico, bioquímico e histopatológico (ZAMIR et al. 1999). Alguns nitróxidos, como Tempo (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), Tempol e Tempamina (4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), também foram capazes de proteger o cérebro, em modelos experimentais de injúria causada por trauma, sendo esse efeito antiinflamatório atribuído à atividade mimética à da SOD, à inibição da reação de Fenton e à capacidade de atuar neutralizando radicais (ZHANG; GOLDSTEIN; SAMUNI, 1999).

A maioria dos textos encontrados não descreve ou cita nenhuma evidência de que a classe dos nitróxidos possua ação mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (SOULE et al. 2007). No entanto, Wang e colaboradores (1996) apontam o fato de que existem informações conflitantes a respeito da mutagenicidade dos nitróxidos, tendo sido observados tanto efeitos citotóxicos, como mutagênicos em células de *S. typhimurium* sensíveis a danos oxidativos e expostas a doses elevadas. Ao contrário do esperado, os nitróxidos também demonstraram baixa capacidade de proteger

células mutantes de *Escherichia coli* deficientes em genes de reparo do DNA, podendo potencializar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio e a ocorrência de danos oxidativos no material genético. Contudo, os resultados sugerem que a atividade observada não resulta da ação dos nitróxidos, mas sim da deficiência das células em questão.

Também é conveniente lembrar que existe a possibilidade de que o metabolismo de nitróxidos ocorra de maneira distinta, dependendo do tipo celular, sendo necessário conhecer as vias que ditam esse processo e como obter proveito dessas descobertas visando, por exemplo, diminuir a metabolização, o que repercutiria na duração e intensidade dos efeitos (NISHIMURA ; SWARTZ, 1994).

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.

Vale ressaltar que poucas pesquisas foram conduzidas para esclarecer o efeito de nitróxidos em processos inflamatórios associados à infecções. Recentemente, Linares e colaboradores (2008) descreveram que o Tempol inibe a ação microbicida de macrófagos na infecção *in vivo* e *in vitro* por *Leishmania amazonensis*. Tempol foi administrado via oral, na água de beber, e mostrou alcançar patas infectadas, na forma reduzida, derivado de hidroxilamina, pela análise de EPR. Ao mesmo tempo da infecção máxima (6 semanas), Tempol aumentou o tamanho da lesão da pata (120%) e a carga parasitária (150%). Em extratos de lesão, Tempol, diminuiu, em geral, produtos do óxido nítrico e a expressão da iNOS, em torno de 80% dos níveis de animais controle. Produtos derivados do óxido nítrico, produzidos por mecanismos radiculares, tais como 3-nitrotirosina e nitrosotiol, diminuíram por volta de 40% dos níveis dos camundongos controle. Os resultados do estudo apontaram

que o Tempol acentua a infecção por *L. amazonensis*, através de um duplo mecanismo envolvendo a sub-regulação da expressão da iNOS e o efeito scavenger de oxidantes derivados do óxido nítrico. Assim, deve se ter em mente o potencial risco deste fármaco em infecções e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em nitróxidos devem levar em conta o potencial risco da alteração da resistência do hospedeiro na infecção parasitária.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Nos últimos anos, há uma grande busca a agentes antiinflamatórios potentes que não apresentem os efeitos colaterais típicos das drogas esteroidais. Recentemente, o fato de que antiinflamatórios comercializados como fármacos seguros, são mostrados como compostos danosos, em alguns casos, letais, levantam a hipótese de que vias bioquímicas diferentes devem ser estudadas detalhadamente como possíveis alvos celulares para novos compostos. Aliado a isso, o fato de que a longevidade da população está aumentando significativamente, o que determina uma incidência mais prolongada de patologias com componentes inflamatórios, torna de vital importância a pesquisa de novos mecanismos de prevenção e/ou minimização destas alterações do organismo. Entre os compostos mais prescritos e também utilizados em automedicação encontram-se os antioxidantes, especialmente aqueles de origem natural. Entretanto, pouco se conhece dos efeitos a longo prazo decorrentes do uso sistemático destes compostos, especialmente em eventos onde a produção de ERO/ERN é benéfica ao organismo, como no caso específico da atividade microbida de Nox2. Tornam-se, então, necessários, estudos mais aprofundados sobre este tema.

Este trabalho teve por objetivo central verificar o efeito de nitróxidos sobre a atividade fungicida de neutrófilos inflamatórios, em processos infecciosos induzidos por *C. albicans*. Para tanto, o efeito dos nitróxidos Tempo e Ac-Tempo sobre a atividade do complexo Nox2 foi testado, contribuindo para um melhor entendimento dos sinais moleculares associados à desativação do mecanismo microbida oxidativo de fagócitos. Adicionalmente, foi avaliado o potencial de nitróxidos como possíveis inteferentes no curso do processo infeccioso, visando avaliar se esses compostos poderiam elicitar respostas que venham a se constituir um fator agravante de quadros de infecções fúngicas.

3 RESULTADOS

Em concordância com o Capítulo IX, Artigo 22 das Normas Acadêmicas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, a dissertação está apresentada como uma revisão de literatura, e a Metodologia desenvolvida, bem como Resultados e Discussão, constam do artigo originado do projeto de Mestrado.

3.1 ARTIGO

O artigo mostra os resultados da ação inibitória dos nitróxidos Tempo e Ac- Tempo sobre a atividade do sistema enzimático NADPH oxidase de neutrófilos, em processos infecciosos induzidos por *C. albicans* ATCC 10231.

O artigo foi submetido ao periódico *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, ISSN: 0934-9723, fator de impacto (2010) 2,631.

Piperidine nitroxides hinder fungicidal oxidant mechanism of neutrophils

Andressa T. Lima^a, Eric B. Ferreira^a, Amanda L. T. Dias^b, Tomaz H. Araújo^b, Maísa R. P. L. Brigagão^a

^aInstituto de Ciências Exatas; Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

^bInstituto de Ciências Biomédicas; Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

Corresponding author:

Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Instituto de Ciências Exatas

37130.000 Alfenas MG Brazil

Phone +55-35-3299-1262

Fax +55-35-3299-1384

e-mail: maisa.brigagao@unifal-mg.edu.br

Abstract

Production of oxidants species by neutrophils through NADPH oxidase complex (Nox2) is directly associated with the microbicidal activity of phagocytes. In this work we tested the effect of the nitroxides 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-piperidine-1-oxil (Tempo) and 4-((9 acridinecarbonil)amino)-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine-1-oxil (Ac-Tempo) on the activity of inflammatory neutrophils Nox2 complex and the consequences on the fungicidal phagocytes capability. Neutrophils were incubated with Tempo (50-400 mM) or Ac-Tempo (25-200 mM) and stimulated with opsonized *Candida albicans*. Nox2 activity was determined polarographically by oxygen consumption measured by Clark electrode. Oxidase activity was found be significantly reduced by cellular treatment with both nitroxides in a dose-dependent manner, although Ac-Tempo was more effective ($ED_{50}44\mu\text{M}$) than Tempo ($ED_{50}160\mu\text{M}$). In parallel, the fluorescence intensity elicited by acridine release from Ac-Tempo after nitroxide reaction with radicalar species was determined. Stimulation of phagocytes triggered significant fluorescent response in direct correlation with Ac-Tempo doses ($R^2=0.997$), supporting the hypothesis that nitroxide is consumed by free radicals neutrophils-released. Fungicidal neutrophils activity assays explicated that pretreatment of cells with Tempo caused 80% decrease in the effectiveness on *C. albicans* death. Oral administration of a Tempo single dose (25 mg/kg body weight) was able to reduce mouse paw edema elicited in response to inoculation of the fungus. Also, a significant decrease in protein nitration in paw tissues was found in this condition. Together, the results support the premise that Nox2 activity is essential for the host response against *C. albicans* and that nitroxides cause a decrease on the oxidant immune response to fungal infection.

Key words: nitroxide; NADPH oxidase; *Candida albicans*; free radicals; neutrophils; respiratory burst.

1. Introduction

Phagocytic NADPH oxidase complex (Nox2) is recognized as an essential component in the anti-pathogenic mechanism of neutrophils, such action is mediated by the production and release of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) inside the phagosome (Jones et al., 2000). This event, called respiratory burst, initiates with the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), from which other ROS/RNS with higher oxidant potential are produced (Segal et al. 2000).

A variety of agents are able to stimulate Nox2, including opsonized bacteria and yeasts, that elicit the alternative complement pathway, and immune complexes that activate neutrophils through the classical complement via (Song et al., 2011).

Nox2 importance on the host defense against microorganisms is clearly shown in patients with chronic granulomatous disease (CGD), in which phagocytic $O_2^{\cdot-}$ production is absent or decreased due to genetic conditions (Mayer-Scholl et al., 2004).

Currently, it has been a wide consensus that fungicidal phagocytic mechanisms, either non-oxidative or via oxidants production, represent an important line of pathogenic microorganisms control and elimination by host. Not surprisingly, correlations have been made between the oxidative stress response in certain pathogenic fungi and their ability to proliferate in the host (Moye-Rowley, 2003).

Candidiasis is a fungal infection of wide spectrum which affects mainly immunocompromised patients (Urizar, 2002; Avrella and Goulart, 2008). *Candida albicans* is the most common specie in fungal infections, and is considered the major opportunistic pathogen in humans (White et al. 2004).

2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-piperidine-1-oxil (Tempo) and 4-((9 acridinecarbonil)amino)-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine-1-oxil (Ac-Tempo) are stable, low-molecular-weight piperidine nitroxides that permeate biological membranes and scavenge ROS/RNS (Teke et al., 2008). Nitroxides cellular actions involve biochemical mechanisms related to the down regulation of pro-inflammatory cytokines and the enzymatic inhibition of myeloperoxidase-catalysed oxidative

damage (Cuzzocrea et al. 2000; Fernandes et al. 2005; Khattab, 2006; Soule et al. 2007; Teke et al., 2008; Thaler et al. 2010; Tsuhako et al. 2010).

So, we attempted to verify the hypothesis that nitroxides would down modulate fungicidal neutrophils capability by decreasing ROS/RNS release by neutrophil Nox2, leading to an impaired host response to *C. albicans*.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (Tempo), horse heart ferricytochrome c type VI (cyt c) and amphotericin B were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. 4-((9 acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (Ac-Tempo) was purchased from Invitrogen, OR, USA. All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2. Preparing of *Candida albicans*

C. albicans (ATCC 10231) was grown in Sabouraud's dextrose agar medium at 37°C, 24 h. Viability was determined by trypan blue exclusion, and the number of *Candida* yeast was determined in an AO Spencer hemacytometer chamber. All experiments were performed with cell viability greater than 95%.

2.3. Neutrophil suspensions preparation

Swiss male mice (25-28 g, 6-8 weeks in age) were obtained from Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil. The animals were housed in plastic cages, and water and food were available *ad libitum*. The experiments which animals were used received a previous approbation by the Ethics Committee in accordance with an institutional authorised protocol based on the 2010/63/European Union directive.

Neutrophils were obtained and purified as previously described (Brigagão and Colepicolo, 1996). Briefly, animals were injected intraperitoneally with 1.0 ml 12% (w/v) sodium caseinate; after 4 h, the peritoneal cells were harvested in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation (2,000xg, 10 min), pelleted cells were resuspended in D-PBS-G (1.35 mg/ml D-glucose), and the number of cells was determined by counting in an AO Spencer hemacytometer chamber. All experiments were performed with cell suspensions containing 1×10^5 neutrophils/ml, such viability was checked by trypan blue exclusion.

2.4. Activation of neutrophil Nox2

2.4.1. Neutrophil oxygen consumption

Cellular consumption of oxygen was polarographically measured by detecting changes in the oxygen tension of the reaction media using a Clark-type electrode, based on the oxygen consumption of neutrophils (Metcalf et al. 1986). This is a reliable measure of the ability of phagocytes to produce oxygen radicals and is valuable for the discrimination of Nox2 inhibition from nitroxide superoxide dismutase-like activity. Cells were incubated (37°C, 10 min) with Tempo (50-400 μ M) or Ac-Tempo (25-200 μ M) with subsequent addition of Nox2 stimulation (opsonized 10^7 *C. albicans*/ 10^5 neutrophils). Data were recorded as the amount of oxygen consumed per minute per 10^5 cells. The results are expressed as Nox2 activity, considering the stoichiometric conversion of oxygen to $O_2^{\bullet-}$ by stimulated neutrophils (Makino et al., 1986).

The ED₅₀ was defined as the Tempo or Ac-Tempo dose effectively inhibiting 50% of oxygen consumption. Controls were performed for all experiments using activated and dormant neutrophils incubated with vehicle alone or with phagocytes under identical stimulation and pretreated with vehicle.

2.4.2 Fluorescence spectroscopy of Ac-Tempo

Free radicals can convert Ac-Tempo probe into a fluorescent product through directly oxidization of the nitroxide and relieve quenching of the acridine ring system (Cohn et al., 2008; Borisenko et al., 2004). A Varian spectrofluorimeter model Cary Eclipse was employed for fluorescence measurements in a 3 ml quartz cuvette. Ac-Tempo fluorescence spectra were detected using an excitation wavelength of 361 nm (excitation slit of 1.5 nm and an emission slit of 3 nm). The time course of fluorescence intensity was monitored using an emission wavelength of 440 nm. Cells were incubated (37°C, 10 min) with Ac-Tempo (12.5-100µM), with subsequent addition of Nox2 stimulation (opsonized 10^7 *C. albicans*/ 10^5 neutrophils). Controls were performed for all experiments using activated and dormant neutrophils incubated with vehicle alone or without nitroxide preincubation.

2.5. Inhibition of paw edema

The assays were conducted under the original methodology described originally by Vinegar et al. (1969), whereby the volume of the paws of the animals is determined using a plethysmometer. Animals were orally treated Tempo (25 mg/kg body weight) or received an intraperitoneal amphotericin B (2.5 mg/kg body weight) dose, thereafter injection of 0.1 ml of 10^7 *C. albicans* in the plantar side of right hind paws of the rats. Paw volume was measured prior to the 10^7 *C. albicans* injection and at 1.5, 3, 4.5, 24 and 48 h intervals after the administration of the treatments using a plethysmometer (model 7140, Ugo Basile). Controls were performed for all experiment using animal treatment with vehicle alone. The increase volume paw relative to the pre-injection value for each animal was calculated and positive control was considered to be 100%. After the final period, animals were euthanized and paws were dissected and frozen at -80 °C.

2.6. Antifungigram

We employed as the gold standard methodology the broth microdilution procedure described in document 7.1 by Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotics Susceptibility Testing (2002) that presents a high correlation with the document 27-A2 proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2002).

Antifungigram was repeated twice: Tempo was assayed with *in vivo* (25 mg/kg body weight) and *in vitro* (100, 200 and 300 μ M) concentrations and amphotericin B was tested with final concentrations of 0.5 mg/ml (*in vivo*) and 4 μ g/ml, 2 μ g/ml, 1 μ g/ml (*in vitro*). Controls were performed for all experiments using vehicle alone.

2.7. Phagocytosis and fungicidal activity of neutrophils

The fungicidal assay was performed according to the modified method by Sampaio et al. (2001) as follows. Swiss male mice were injected intraperitoneally with 10^7 *C. albicans*, following oral Tempo (25 mg/kg body weight) treatment. After 4 h, neutrophils were elicited, pooled, centrifugated (2,000xg, 10 min). The pellet was resuspended and counted until to get 10^5 cells. A control group, without treatment, was conducted. In another group, inflammatory neutrophils were elicited from peritoneal cavity after 4 h Swiss male mice sodium caseinate (12% m/v) injection, following Tempo (300 μ M) treatment (10 min, 37°C) and Nox2 activity was triggered (opsonized 10^7 *C. albicans*/ 10^5 neutrophils). The cells were centrifugated at 2,000 xg, for 10 min (4°C). Eventually, thereafter of resuspension of pellets of each group, an aliquot of 0.03 mL of those suspensions were adhered to cover slip glass by cytocentrifugation (1,500 xg, 5 min). After centrifugation, cover slips were stained with May-Grunwald-Giemsa modified stain. Data was obtained by examining 100 cells on the optical microscope. The results of phagocytosis were expressed as percent of cells with engulfed yeast and, the results of killing were expressed as the following score: cells with only alive ingested yeasts - x 0 = x; cells with one to two

dead ingested yeasts - $x_1 = y$; cells with three to four dead ingested yeasts - $x_2 = w$; cells with more than four dead ingested yeasts - $x_3 = z$ (Chan et al., 1998).

The score values were obtained by the sum of x , y , w , and z results. The alive yeast shows blue color, and the dead yeast shows no color. Both tests were performed in triplicate (three slides from each subject).

2.8. Analysis of protein nitration by immunoblotting

Samples of paw extracts (5 μ g protein) were transferred onto a nitrocellulose membrane by vacuum for dot blots, and the membrane was blocked with 5% nonfat dried milk (2 h) before exposure to primary antibody solution for 2 h (sheep anti-nitrotyrosine, 1/2500; Oxis). Primary antibody was detected by 1 h incubation with secondary antibody (anti-sheep IgG peroxidase conjugated, 1/2500; Calbiochem). Dot blots were revealed with chemiluminescent reagents (Amersham) and relative quantification of 3-nitrotyrosine was performed by densitometry (ImageQuant v5.2; Molecular Dynamics) (Linares et al., 2008).

2.9. Statistical analysis

All data were expressed as the mean values \pm standard deviation (S.D.). The comparisons among different groups were performed using ANOVA followed by the Tukey t test. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of Tempo and Ac-Tempo on oxygen consumption by *C. Albicans*-activated neutrophils

The Tempo effect on oxygen consumption by neutrophils due to Nox2 system activity is shown in Figure 1A. *C. albicans* triggered strong oxidase activity and caused

substantial oxygen consumption ($119.25 \pm 11.55 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$). Tempo inhibited oxygen consumption by neutrophils in a concentration-dependent manner, such data of the concentration-response curves were mathematically described with an ED_{50} of 160 μM . When phagocytes were pre-incubated with 300 μM and 400 μM of Tempo, neutrophil suspensions showed equivalent maximal significant inhibition of the oxygen consumption or Nox2 activity, hence, the dose of choice for the following experiments was 300 μM . Whereas, Ac-Tempo inhibited oxygen consumption by neutrophils in a similar behavior to Tempo. However, concentration-dependent mathematical analysis of data obtained with cellular treatment with Ac-Tempo showed an ED_{50} of 44 μM (Figure 1B), value that was found to be four times smaller than the one described above for Tempo. Also, while phagocytes were pre-incubated with 200 μM Ac-Tempo, neutrophil suspensions showed no oxygen consumption due to Nox2 activity.

3.2. *Candida albicans* activity on neutrophil suspensions fluorescence emission

Because of our interest in the reactions of radical oxidants released by phagocytes with nitroxides, we determined whether of these oxidant species could convert Ac-Tempo into a non-paramagnetic fluorescent product in *Candida albicans*-stimulated neutrophil suspensions. Ac-Tempo exhibited a concentration-dependent ($R^2=0.997$) increase on fluorescence (Figure 2), suggesting nitroxide interaction with free radicals produced by phagocytes. 50 μM Ac-Tempo exhibited the detectable higher fluorescence, being statistically equal to dose of 100 μM , indicating that radical species produced by neutrophils were totally scavenged with the preceding nitroxide concentration.

3.3. Fungal susceptibility to nitroxide

To verify *in vitro* susceptibilities of the yeast isolates to nitroxide treatment, fungal cultures in the presence of Tempo were done. *C. albicans* showed no change in growth rate and fungal morphology due Tempo addition (300 μ M), demonstrating none fungicidal activity of nitroxide (data not shown).

3.4. Inhibition of paw edema by Tempo nitroxide

The Figure 3 shows data from *in vivo* experiments with Tempo on the time course of paw edema induced by *C. albicans* inoculation. A substantial increase in the inhibition of edema due to nitroxide administration occurred after 3 h of the yeast injection, such effect culminated at 24 h. This infection period matched with cellular transition on the infectious, when a mixed population of phagocytic cells are found in the candidiasis focus. A subsequent decrease of the values of inhibition was found, probably due to nitroxide metabolic transformation. Identical pattern was observed in animals treated with amphotericin B (data not shown). However, it is important to note that we detected no *in vitro* *C. albicans* susceptibility to nitroxide, as described in the previous item (3.3.), thus excluding the fungicide action of Tempo.

3.5 Action of nitroxide on phagocytosis and neutrophil fungicidal activity

Standard pictures of optical microscopy analysis from performed killing assays are shown in Figure 4 and the corresponding detected results of fungicidal activity are explicated in Figure 5, respectively. No significant differences were found between the mean values of the phagocytosis index within the control group and *in vivo* Tempo treatment (25 mg/kg body weight), demonstrated no fungicidal action of nitroxide, at least at the used dose. However, neutrophils elicited with sodium caseinate and incubated *in vitro* with Tempo showed a significant decrease in fungicidal activity (68 ± 13.11) compared to control group (untreated cells).

3.6. Tempol action on paw protein nitration

A unique Tempol dose administration decreased the levels of nitrated proteins in the footpad homogenates to about 30% of control animals, as demonstrated by experiments of immunoblotting monitoring 3-nitrotyrosine protein levels. As that amphotericin B cause no effect on this protein modification, it is clear that both tested compounds, Tempol and the antifungal have different mechanism of action.

4. Discussion

In these studies, we evaluated the role of oxidants production by inflammatory neutrophils on the host defense against *C. albicans* infection trough neutrophil Nox2 activity. We used two piperidine nitroxides, previously reported as effective ROS/RNS scavengers, to verify phagocyte oxidant fungicidal efficiency.

C. albicans is an opportunistic pathogen causing life-threatening infections in immunosuppressed patients. The release of ROS/RNS by phagocytizing neutrophils and monocytes, that employ these species as microbicides, appears to be of crucial importance for the host defense against fungal infections. This oxidant species production is achieved primary by Nox2, an enzymatic complex comprised by cytosolic and granule-founded components that shift from dormant to activate state once a pathogen is identified (Babior, 2004).

Tempo and Ac-Tempo were capable to deactivate neutrophil Nox2 (Figure 1A and B). The respiratory burst is critical for defending the host against invading pathogens. These host defense functions are attributed largely to direct microbicidal action of the toxic intermediates forming in redox reactions on the phagosome from $O_2^{\bullet-}$, such as H_2O_2 and hidroxil radical ($\cdot OH$)

We used a sensitive method for the detection of neutrophil-released free radicals based on their interaction with Ac-Tempo, a nonfluorescent conjugate of fluorogenic acridine with paramagnetic nitroxide Tempo. During reaction of nitroxide ring with radicalar species, acridine fluorescence increases (Borisenko et al., 2004). So,

reaction of nitroxide with radical species released by neutrophils was unequivocally demonstrated through Ac-Tempo fluorescence monitoring (Figure 2).

Strong evidences indicate that the yeast itself has the potential to enhance antioxidant defense functions and to resist phagocytic killing. Previous reports (Thompson and Wilton, 1992) showed that neutrophil and macrophage capability to eliminate *C. albicans* was higher in aerobic than in anaerobic environment, and that the fungus death was reduced by inhibitors of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl and $\cdot OH$, suggesting that these cells use oxidants as a crucial part of their arsenal to eliminate *C. albicans*. Interestingly, inactivation of the enzyme iNOS does not cause mice to become more susceptible to infection with *C. albicans*, signifying that RNS may not be the primary defense against candidiasis and that, apparently, ROS are more important in this event (Brown et al., 2009).

Moreover, Jamieson et al. (1996) studied the response of *C. albicans* to exogenous oxidants as a first step in determining the role of oxidative stress responses and virulence in the candidiasis. The authors found that the yeast has an adaptive response to oxidative stress caused by H_2O_2 and menadione, and that this response differs from that observed in yeast normally non-pathogenic *S.cerevisiae*. Also, it was demonstrated that *C. albicans* present inducible antioxidant enzymes as part of defense mechanism (Jamieson et al., 1996), besides the capability to increase intracellular content of antioxidant tripeptide glutathione (Wilcox and Pearlman, 2008).

So, we attempted to demonstrate *in vivo* nitroxides actions on fungal infection. As explicated in Figure 3, *C. albicans*-induced edema was significantly diminished by a unique oral treatment with Tempo. This effect can not be attributable to decreasing of fungal population, since no Tempo fungicidal action was identified in our experiments. Then, we hypothesized that nitroxide action on *C. albicans*-induced attenuates the host immune response by altering neutrophilic microbicidal activity. To better evaluate

Tempo influence on neutrophil fungicidal mechanism, we investigated its effects on *C. albicans* killing. Figure 4 shows that, although *in vivo* treatment cause no

alterations on neutrophils ability to eliminate yeast, at last on the used dose, *in vitro* phagocytes incubation lead to a significant (about 70%) decrease on the fungicidal competence. These data are illustrated in Figure 5.

It was confirmed by the immunoblotting assays (Figure 6), where it has been shown that Tempo causes a decreased on protein nitration levels on the fungal infection focus.

Previously, it was shown that Tempol, a structural analogue of Tempo, acted by a dual mechanism involving scavenging of nitric oxide-derived oxidants and down-regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in macrophages, worsened *Leishmania amazonensis* infection (Linares et al., 2008). In addition, Tempol efficiently inhibits both myeloperoxidase- (Muntz Vaz and Augusto, 2006) and peroxynitrite/carbon dioxide-mediated protein nitration *in vitro* (Fernandes et al., 2005), mainly because of its capability to react rapidly with nitrogen dioxide and carbonate radical.

Also, in according with our results, Tempol has been shown to increase *Leishmania chagasi* infection of human and mouse macrophages *in vitro*, such effects have been attributed to $O_2^{\cdot-}$ dismutation (Gantt et al., 2001). The major conclusion from these reports was that the development of therapeutic strategies based on nitroxides should take into account the potential risk of altering host resistance to a variety of infections.

Peroxynitrite ($ONOO^-$) production *in vivo* occurs mainly from simultaneous generation of nitric oxide (NO) and $O_2^{\cdot-}$, and this anion favors the production of nitrotyrosine (Szabo, 2003). In addition to nitroxides action as radical scavengers, we shown here that piperidine nitroxides are able to impair neutrophils fungicidal capability by inhibiting Nox2 inhibition, and, them, depleting oxidant phagocyte mechanism.

Over the last decade, the incidence of fungal infections has increased dramatically, causing high morbidity and mortality. Patients with defective immune systems, due to AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), cancer chemotherapy, or immunosuppressive drugs, are significantly affected by fungi . Additionally, with the large scale application of broad-spectrum antifungal agents and the introduction of

protocols for antifungal prophylaxis in patients at risk, there has been a notable increase in drug resistance. The development of more effective antifungal therapies is therefore of paramount importance, parallel to studies demonstrating pharmacologic interferences on these antifungal treatments.

Taken together, our results support the premise that Nox2 activity is essential for the host response against *C. albicans* and that nitroxides cause a decrease on the oxidant immune response to fungal infection due this oxidase inhibition.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Maísa R.P.L. Brigagão is member of the INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (CNPq Process: 573530/2008-4). Andressa T. Lima was a depositary of a scholarship from Unifal-MG.

References

Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotics Susceptibility Testing. 2002. Method for Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of Fermentative Yeast, discussion document E.Dis7.1. Taufkirchen: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Avrella, D.; Goulart, L. S. 2008. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Rev. Bras. Anal. Clin.** **40**, 205-207.

Babior, B. M. 2004. NADPH oxidase. *Cur. Opin. Immunol.*, **16**, 42-47.

Borisenko, G. G., Martin, I., Zhao, Q., Amoscato, A. A., Tyrunia, Y. Y., Kagan, V. E., 2004. Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **279** (22), 23453-23462.

- Brigagão, M. R. P. L., Colepicolo, P., 1996. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. *Biol. Rhythm Res.* 27, 261-268.
- Brown, A. J. P.; Haynes, K.; Quinn, J. 2009. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Cur. Opin. Microbiol.* 12, 384-391.
- Chan, S. S., Monteiro H. P., Deucher, G. P., Abud, R. L., Abuchalla, D., Junqueira, V. B. C. 1998. Functional Activity of Blood Polymorphonuclear Leukocytes as an Oxidative Stress Biomarker in Human Subjects. *Free Rad. Biol. Med.* 24 (9), 1411-1418.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd edn, M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohn, C. A, Simon, S. R., Schoonen, M. A. A., 2008. Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. *Part. Fibre Toxicol.* 5 (2), 1-9.
- Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Filipe, H.M., Costantino, G., Mazzon, E., Santagati, S., Caputi, A.P., Thiemermann, C., 2000. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 209-222.
- Fernandes, D. C.; Medinas, D. B., Alves, M. J., Augusto, O. 2005. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. *Free Radic. Biol. Med.* 38:189–200.
- Gantt, K. R., Goldman, T. L., McCormick, M. L., Miller, M. A., Jeronimo, S. M., Nascimento, E. T., Britigan, B. E., Wilson, M. E. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 167:893–901.
- Jamieson, D. J.; Stephen, D. W. S.; Terrière, E. C. 1996. Analysis of the adaptative oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol; Let.* 138, 83-88.
- Jones, R.D., Hancock, J.T., Morice A.H. 2000. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. *Free Radic Biol. Med.* 29, 416–424.

- Khattab, M.M., 2006. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: A key role for superoxide anion. *Eur. J. Pharmacol.* 548, 167-173.
- Linares, E., Giorgio, S., Augusto, O. 2008. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. *Free Rad. Biol. Med.* 44, 1668-1676.
- Makino, R., Tanaka, T., Iizuka, T., Ishimura Y., Kanegasaki, S. 1986. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 261, 11444-11447.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., Zychlinsky, A. 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 62-66.
- Metcalf, J. A., Gallin, J. I., Nauseef, W. M., Root, R. K., 1986. Laboratory manual of neutrophil function. New York: Raven. 96-100.
- Moye-Rowley, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell.*, 2, 381-89.
- Muntz Vaz, S. M., Augusto, O. 2006. The mechanism by which tempol inhibits peroxidase-mediated protein nitration. *Free Radic. Biol. Med.* 41:S142.
- Ryu Makino, Torahiko Tanaka, Tetsutaro Iizuka, Yuzuru IshimuraS, and Shiro Kanegasakig. Stoichiometric Conversion of Oxygen to Superoxide Anion during the Respiratory Burst in Neutrophils. *J. B. C.* 261(25) 11444-11447 1986.
- Soule, B.P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone, N.L., Cook, J.A., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2007. The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Rad. Bio. Med.* 42,1632-1650.
- Sampaio, S. C., Sousa-e-Silva, M. C. C., Borelli, P., Curi, R., Cury, Y. 2001. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol.* 70, 551–558.
- Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M: 2000. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine.* 79, 170-200.

- Song, E., Jaishankar, G.B., Saleh, H., Jithpratuck, W., Sahni, R., Krishnaswamy, G. 2011. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin. Mol. Allergy.* 9, 10-24.
- Szabó, C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140, 105-112
- Thaler, S., Fiedorowicz, M., Rejdak, R., Choragiewicz, T.J., Sulejczak, D., Stopa, P., Zarnowski, T., Zrenner, E., Grieb, P., Schuettauf, F., 2010. Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load. *Exp. Eye Res.* 90, 254-260.
- Teke, Z., Kabay, B., Ozden, A., Yenisey, C., Bir, F., Demirkan, N.C., Bicakci, T., Erdem, E. 2008. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on local and remote organ injuries caused by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J. Surg. Res.* 149, 259–271.
- Thompson, H. L.; Wilton, J. M. A. 1992. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin. Experiment. Immunol.* 82, 316-321.
- Tsuhako, M.H., Augusto, O., Linares, E., Chadi, G., Giorgio, S., Pereira, C.A., 2010. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood–brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation *Free Rad. Bio. Med.* 48,704-712.
- Urizar, J. M. A. 2002. Candidiasis orales. *Rev. Iber. Micol.* 19, 17-21.
- Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R. 1969. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166 (1), 96–103.
- White, P.L., Williams, D.W., Kuriyama, T., Samad, S.A., Lewis, M.A.O., Barnes, R.A. 2004. Detection of *Candida* in Concentrated Oral Rinse Cultures by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2101-2107.
- Wilcox, C.S., Pearlman, A., 2008. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. *Pharmacol. Rev.*60, 418–469.

Figure captions

Figure 1. Effect of Tempo and Ac-Tempo on neutrophil respiratory burst elicited by *C. albicans*. Phagocytes (10^5 cells/ml) were preincubated (37°C, 10 min) with diverse nitroxide doses and Nox2 activity was monitored by and oxygen consumption. Results are expressed mean from three independent experiments. *Insert*: mathematical analysis of data.

Figure 2. Fluorescence emission by neutrophils suspensions incubated with Ac-Tempo. Cells were maintained on resting state or triggered with *C. albicans* after Ac-Tempo incubation (10 min, 37°C). Fluorescence intensity was registered and analysed as means from three separate experiments.

Figure 3. *In vivo* effect of Tempo on *C. albicans*-induced paw edema. Paw volume was measured prior to the 10^7 *C. albicans* injection and at 1.5, 3, 4.5, 24 and 48 h intervals after the administration of the nitroxide using a plethysmometer. Controls were performed for all experiment with treatment vehicle alone.

Figure 4. Tempo action on the fungicidal neutrophil capability. Animals were injected intraperitoneally with 10^7 *C. albicans*, following vehicle (1) or oral Tempo (25 mg/kg body) administration (2). Alternatively, phagocytes were elicited, incubated with Tempo (300 μ M) following *C. albicans* exposition (3). Data (mean \pm s.d.) were obtained by examining 100 cells on the optical microscope.

Figure 5. Optical microscopy analysis of fungicidal neutrophil action. After *C. albicans* peritoneal inoculation, cells were harvested following vehicle (A) or Tempo (B) treatment. Phagocytes were centrifugated after peritoneal washing and submitted to May-Grunwald-Giemsa modified stain.

Figure 6. Tempol action on levels of 3-nitrotyrosine residues in paw extracts of *C. albicans* infected mouse. 1. non injected/vehicle-treated; 2. injected/vehicle-treated; 3. injected/Tempol-treated; 4. injected/amphotericin B-treated. On top it is shown staining of protein (ponceau red).

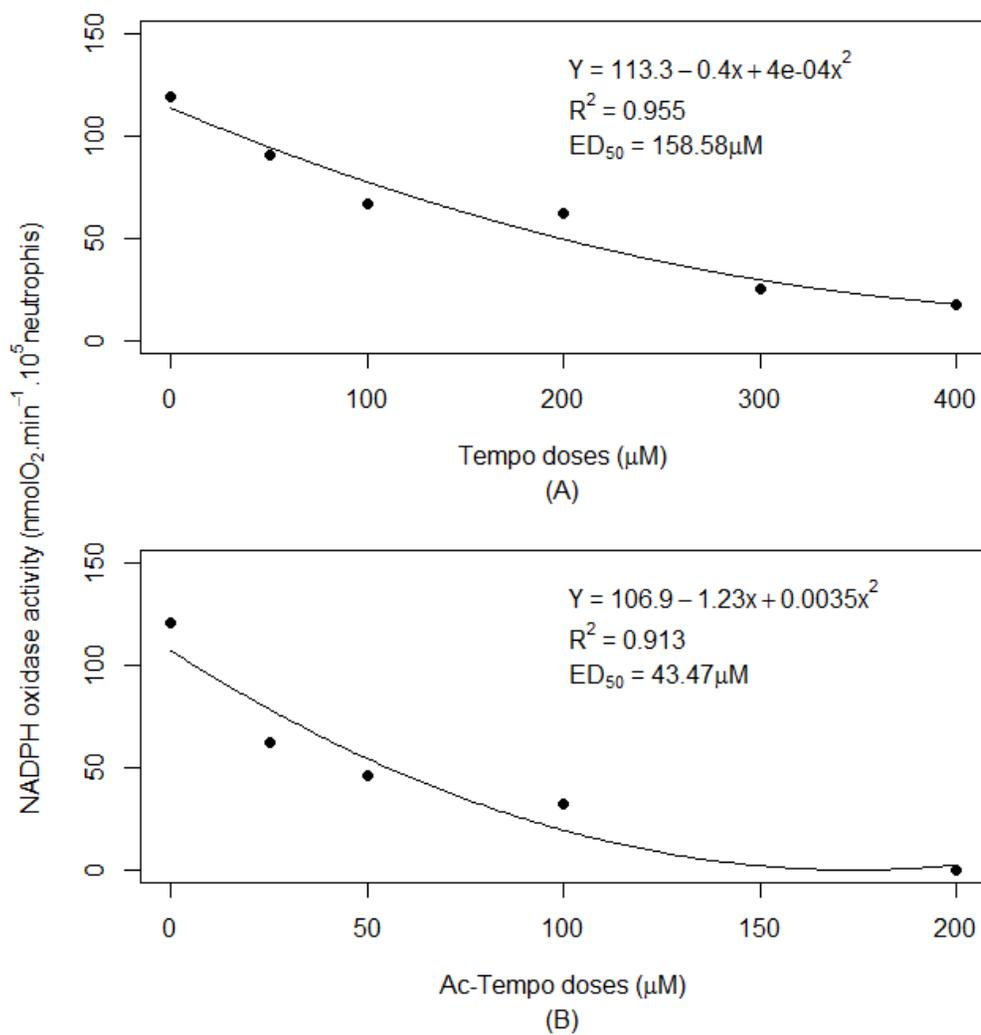


Figure 1.

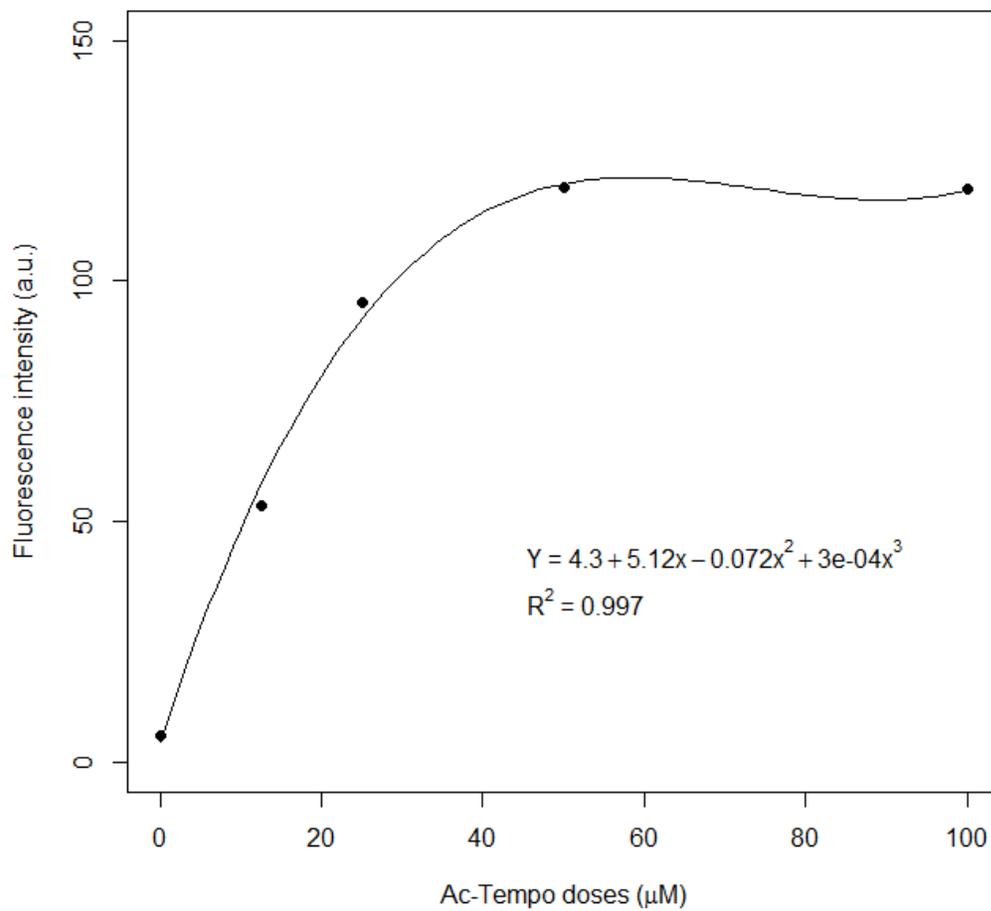


Figure 2

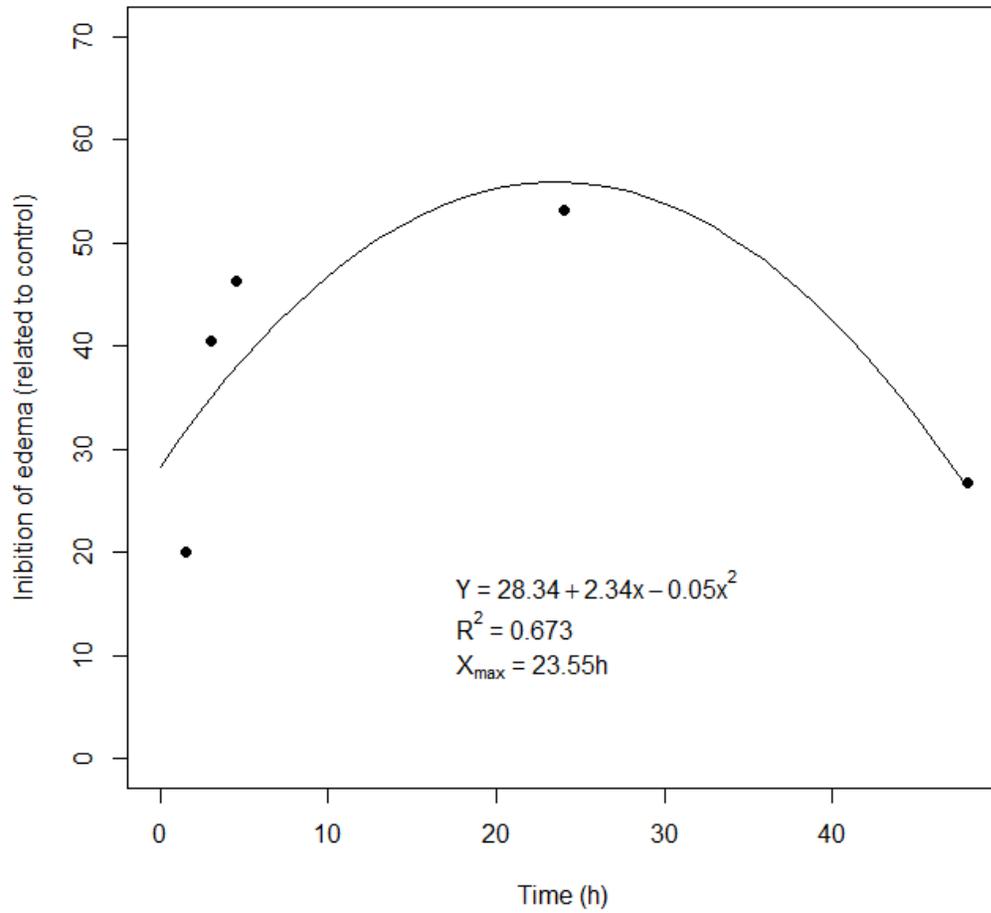


Figure 3.

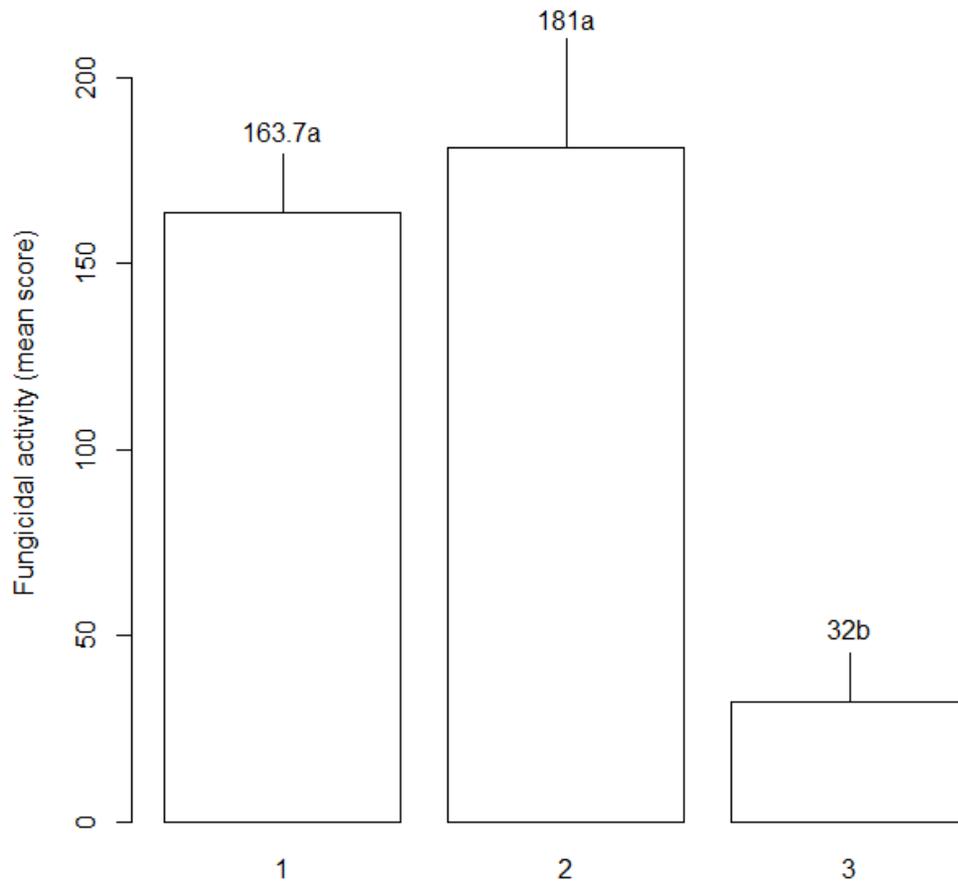


Figure 4.

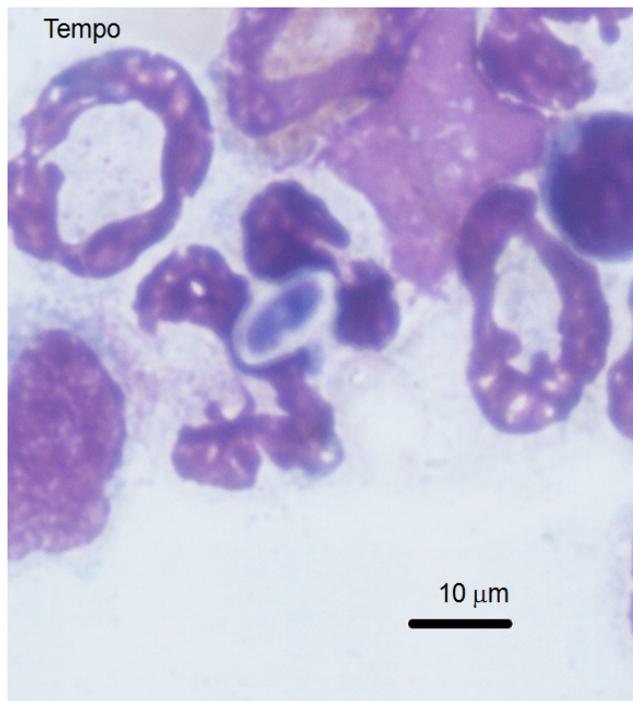
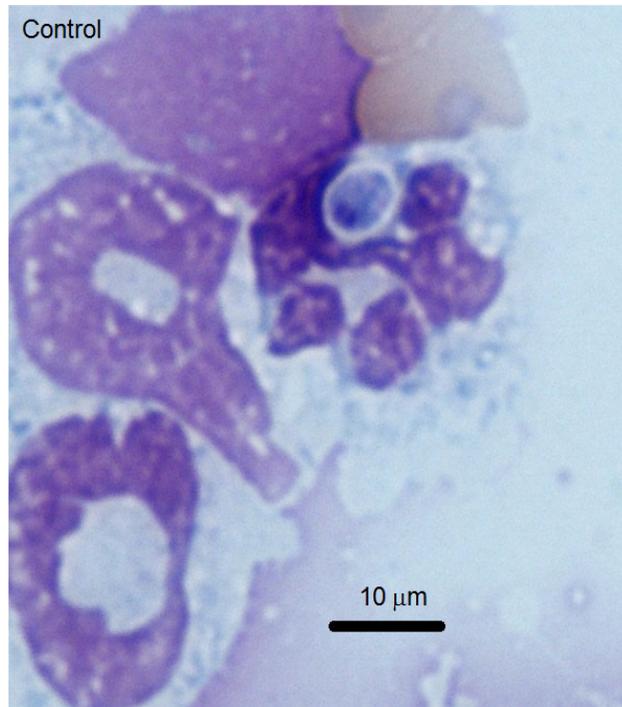


Figure 5.

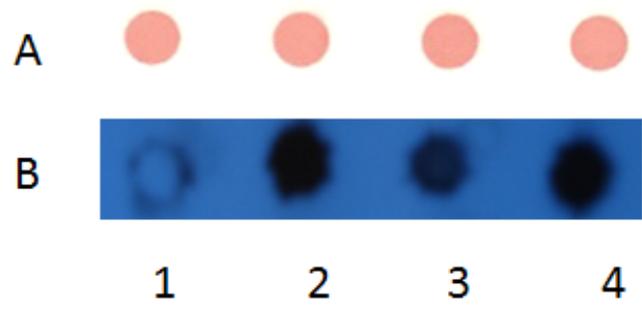


Figure 6.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p.425–430, 2009.

ARATANI, Y. et al. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1828-36, 1999.

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*. **Med Mycol.**, v. 40, n. 6, p. 557-63, 2002a.

ARATANI, Y. et al. Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 12, p. 1833-37, 2002b.

ARBISER, J. L. Genetic immunodeficiencies: cutaneous manifestations and recent progress. **J Am Acad Dermatol.**, v. 33, n. 1, p. 82-89, 1995.

ARONOVITCH, Y. et al. Dual activity of nitroxidos as pro- and antioxidants: Catalysis of copper-mediated DNA breakage and H₂O₂ dismutation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 42, p. 1317-1325, 2007.

ATCC. ATCC Number. Disponibiliza informações sobre *Candida albicans* ATCC 10231. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 12 out. 2011.

AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, v. 40, n.3, p. 205-207, 2008.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol.**, v. 65, p. 49-95, 1992.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

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

BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. **Am. J. Physiol.**, v. 103 p.235-236, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.

BERRON-RUIZ, A. R.; BERRON-PEREZ, R.; RUIZ-MALDONADO, R. Cutaneous markers of primary immunodeficiency diseases in children. **Pediatr. Dermatol.**, v. 17, n. 2, p 91-96, 2000.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BLANCK, J. et al. Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. **Xenobiotica**, v. 21, p.121– 135, 1991.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRIGAGÃO, M.R.P.L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol. Rhythm. Res.**, v. 27, p. 269-280, 1996.

BRIGAGÃO, M.R.P.L.; BARROSO, A.S.; COLEPICOLO, P. Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells. Driessche T.V. (Ed). In: **The Redox State and Circadian Rhythms**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

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. **Candida and candidiasis**. 1 ed. American Society of Microbiology, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHENG, S. et al. Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 492-501, 2007.

CIRCU, M.L. et al. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 47, p. 1190-1198, 2009.

CONDINO NETO, A.; GRUMACH, A. S. Defeitos Funcionais de Fagócitos. In: GRUMACH, A. S. **Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2009, p. 629-43.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CROSS, A. The participation of the hemes of flavocytochrome b245 in the electron transfer process in NADPH oxidase. **Blood**, v. 93, p. 4449, 1999.

DINAUER, M.C. et al. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome *b* complex. **Nature**, v. 327, p.717-720, 1987.

DINAUER, M.C. et al. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p.1729-1737, 1990.

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

DRAGUTAN, I., MEHLHORN, R. J. Modulation of oxidative damage by nitroxide free radicals. **Free Radic. Research**, v. 41, p. 303-315, 2007.

ENJALBERT, B. et al. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2143-51, 2007.

FERNANDES, D. C. et al. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 189–200, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIDEL JR., P. L. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. **Trend in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 220-7, 2004.

- FILIPPIN, F. B; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Braz. J. Pharm. Sc.**, v. 42, n.2, p. 167-194, 2006.
- FRADIN, C. et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 397-415, 2005.
- FROHNER, I, E. et al. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 240-52, 2009.
- GLEBSKA, J. et al. Pro oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 35, p. 310-316, 2003.
- 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.
- GOLDSTEIN, S. et al. Kinetics of the Reaction between Nitroxide and Thiyl Radicals: Nitroxides as Antioxidants in the Presence of Thiols. **J. Phys. Chem. A**, v. 112, p.8600-8605, 2008.
- GORSKY, L.D.; KOOP, D.R.; COON, M.J. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p.6812– 6817, 1984.
- GRISHAM, M.B. Reactive oxygen species in immune responses. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, p. 1479-1480, 2004.
- GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of the phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. **Cell**, v. 113, p. 343-355, 2003.
- GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v. 386, p. 401-416, 2005.
- GYSENS, I. C. Preventing postoperative infections: current treatment recommendations. **Drugs**, v. 57, n. 2, p. 175, 1999.
- HAHN, S. M.; MITCHELL, J. B.; SHACTER, E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 879-884, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic. Biol. Med.** 4. ed. New York: Oxford University Press., 2007.

HAMERS, M.N. et al. Complementation in monocytes hybrids revealing genetic heterogeneity in chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 307, p.553-555, 1984.

HAMPTON, M.B.; KETLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARPER, A.M.; CHAPLIN, M.F.; SEGAL, A.W. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. **Biochem. J.** v. 227, p.783-788, 1985.

HOFFMAN, A. et al. Effect of nitric oxide and nitroxide SOD-mimic on the recovery of isolated rat heart following ischemia and reperfusion. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1279-1286, 2003.

HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 347-49, 2009.

INGRAM, P. et al. Mechanisms of oxidative damage in ocular preservative action. **World Congress Oxidants and Antioxidants in Biology Oxygen Club of California**, 2001. p. 130-31.

ISOGLAI, Y.; IZUKA, T.; SHIRO, Y. The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7853-7857, 1995.

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

JAMIESON, D. J.; STEPHEN, D. W. S.; TERRIÈRE, E. C. Analysis of the adaptative oxidative stress response of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, n. 1, p. 83-88, 1996.

JESIATIS, A.J. et al. The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes. **A.J., Dratz E.A.** (Ed) Montana: Big Sky, 1991.

JONES, R.D.; HANCOCK, J.T.; MORICE A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. **Free Radic Biol. Med.**, v. 29, p. 416-424, 2000.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 562-571, 1999.

- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Medsi, 2001.
- KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 379-388, 1994.
- KROLL, C., LANGNER, A., BORCHERT, H. H. Nitroxide metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 850-857, 1999.
- KUSCH, H. et al. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. **Proteomic**, v. 7, n. 5, p. 686-97, 2007.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 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.
- LAMBETH, J.D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, p. 319, 2007.
- LETO, T.L. et al. Cloning of a 67K neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. **Science**, v. 248, p. 727-730, 1990.
- LIMA, D. R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicológica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1175–1183, 2007.
- LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 1668–1676, 2008.
- LOMAX, K.J. et al. Recombinant 47-kD cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. **Science**, v. 245, p. 409-412, 1989.
- MACCALLUM, D. 9th ASM conference on *Candida* and candidiasis. **FEMS Yeast Research**, Conference Report, 2008.
- MALECH, H. L. et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 12133-12138, 1997.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 8, p. 863-74, 2005.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Curr. Opinion Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2004.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; McEWEN, J. E. Mechanisms of Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress: Implications for Fungal Survival in Mammalian Hosts. **Eukaryotic Cell.**, v. 3, p. 835-46, 2004.

MOREIRA, R. J. et al. Doença granulomatosa crônica: Relato de caso. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 28, n. 6, p. 315-321, 2005.

MOREL, P.; DOUSSIERE, J.; VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating oxidase of phagocyte cells. Physiological, molecular and pathological aspects. **Eur. J. Biochem.**, v. 201, p. 523-546, 1991.

MOYE-ROWLEY, W. S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. **Eukaryotic Cell.**, v. 2, n. 3, p. 381-89, 2003.

MOREL, I. et al. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 308-316, 2001.

NANTEL, A. et al. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 10, p. 3452-65, 2002.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 18, p. 75-81, 1996.

NIE, G. et al. Polyphenol protection of DNA against damage. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 232-244, 2001.

NISHIMURA, T. S., SWARTZ, H. M. Reduction of lipid-soluble nitroxides in CHO cells and macrophage tumor cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 473-479, 1994.

ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. 2nd ed. W. B. Saunders Company, 1988.

OHSHIMA, H. et al. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. **Mutation Research**, v. 591, p. 110-122, 2005.

PARKOS, C.A. et al. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 3319–3323, 1988.

RACHECK, L.I. et al. Troglitazone, but not rosiglitazone, damage mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunctions and cell death in human hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 240, p. 348-354, 2009.

RAIKOV, Z. D., RAIKOVA, E. T., ATANASOV, A.T. Nitric oxide and free stable nitroxyl radicals in the mechanism of biological action of the spin-labeled compounds. **Medical Hypotheses**, v. 57, p. 302-305, 2001.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**, v. 21, p. 133-149, 2005.

ROOS, D.; CURNUTTE, J. Chronic granulomatous disease. In: OCHS, H. D.; SMITH C.I.; PUCK J. M. **Primary Immunodeficiency Diseases: A molecular and Genetic Approach**. New York: Oxford University Press Inc, 1999, p. 353-374.

ROSENZWEIG, S. D.; HOLLAND, S. M. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 113, n. 4, p. 620-6, 2004.

ROYER-POKORA, B. et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. **Nature**, v. 322, p. 32-38, 1986.

RUBIN, E. et al. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999.

SAMUNI, A. M. et al. Cellular sites of H₂O₂-induced damage and their protection by nitroxides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 70-76, 2001.

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.; SAMUNI, A. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p.117-185, 2003.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 37-49, 2010.

SEGAL, B.H. et al. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine**, v. 79, p. 170-200, 2000.

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.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, p. 1632-1650, 2007.

SRIKANTHA, T. et al. Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. **Eukaryotic Cell.**, v. 4, n. 8, p. 1434-45, 2005.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, p. 677-686, 2005.

TEAHAN, C. et al. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β -chain of cytochrome b_{245} . **Nature**, v. 327, p. 720-721, 1987.

TEAHAN, C.G. et al. Purification of the 47 kDa phosphoprotein associated with the NADPH oxidase of human neutrophils. **Biochem. J.**, v. 267, p. 485-489, 1990.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trend in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 319-26, 2005.

THOMPSON, H. L.; WILTON, J. M. A. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 82, n. 2, p. 316-21, 1992.

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. **Rev. Iber. Micol.**, v. 19, p. 17-21, 2002.

VOLPP, B.D. et al. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 7195-7199, 1989.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 317-335, 1995.

WANG, G. et al. Opposing effects of nitroxide free radicals in Escherichia coli mutants deficient in DNA repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1305, p. 71-78, 1996.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K.; KRYSAN, D. J. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 405-13, 2009.

WHITE, P. L. et al. Detection of Candida in Concentrated Oral Rinse Cultures by Real-Time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2101-2107, 2004.

WIEN TJES, F.B.; SEGAL, A.W. NADPH oxidase and the respiratory burst. **Cell biology**, v. 6, p. 357-365, 1995.

YAMAGUCHI, T. et al. Purification and some properties of the small subunit of cytochrome b558 from human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 112-118, 1989.

ZAMIR, E. et al. Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 7-15, 1999.

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

ZHUKOV, A.A.; ARCHAKOV, A.I. Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 109, p. 813– 818, 1982.

ZHUKOV, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol- inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells reductase. **Biochem. J.**, v. 340, p. 453– 458, 1999.

APÊNDICE A - Carta de submissão do artigo científico

December 07, 2011.

Dr. Alex van Belkum
La Balme les Grottes
France

Dear Editor;

I am enclosing herewith a manuscript entitled "*Piperidine nitroxides hinder fungicidal oxidant mechanism of neutrophils*", in order to assess possible publication in the *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, as a research article. The manuscript is authored by Andressa T. Lima, Eric B. Ferreira, Amanda L. T. Dias, Tomaz H. Araújo, and Máisa R. P. L. Brigagão, affiliate to Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

A new regulation of inflammatory leukocyte NADPH oxidase complex by piperidine nitroxides is suggested. During cellular activation, different amounts of the nitroxides induced, in a dose-response manner, changes in the oxidant fungicidal mechanism of neutrophils, implying a decrease on the host defense against *C. albicans* infections.

The research project was fully sponsored by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) with grant number 573530/2008-4.

With this submission I would like to undertake that the above mentioned manuscript has not published elsewhere, accepted for publication or under editorial review for publication elsewhere. I declare that the co-authors had an active part in the final manuscript, have no conflicts of interest and they all agree with the publication.

I will be looking forward to hearing from you.

Sincerely,

Prof. Dr. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Associate Professor
Instituto de Ciências Exatas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Centro
37130-000 Alfenas – MG
Brazil
Phone (+55-35) 3299-1262
Fax (+55-35) 3299-1384
E-mail maisa.brigagao@unifal-mg.edu.br