



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO (DETC)
NA SUSCEPTIBILIDADE DA *Candida albicans* À
ANFOTERICINA B: em busca do sinergismo**

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

Salvador - Bahia - Brasil

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – BAHIA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**EFEITO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO (DETC)
NA SUSCEPTIBILIDADE DA *Candida albicans* À
ANFOTERICINA B: em busca do sinergismo**

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

**Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Co-orientadora: Dra. Adriana Lanfredi Rangel**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Patologia para a obtenção do
grau de mestre em Patologia Experimental

Salvador – Bahia, 2006.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Gomes Júnior, Rafael Araújo

G633e Efeito do dietilditiocarbamato de sódio (DETC) na susceptibilidade da *Candida albicans* à anfotericina B: em busca do sinergismo [manuscrito] / Rafael Araújo Gomes Júnior. - 2007.

00 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Microscopia Eletrônica.

1. Dietilditiocarbamato. 2. *Candida albicans*. 3. Anfotericina. 4. Fungos. 5. Superóxido dismutase. 6. Sinergismo. 7. Microscopia eletrônica. I.Título.

CDU 615.32:582.28

PHL
UFV 2669

003378

112 DE1

615.32:582.28
G633e

“EFEITO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO (DETC) NA SUSCEPTIBILIDADE DA CÂNDIDA ALBICANS À ANFOTERICINA B: EM BUSCA DO SINERGISMO”

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

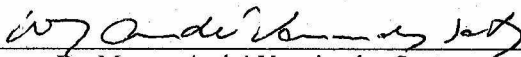
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto
FAMED / UFBA



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu grandioso Deus, por ter me concedido mais uma grande vitória.

Aos meus pais Rafael Gomes e Joana Gomes pelo apoio nas tantas horas difíceis de minha caminhada, as minhas irmãs Ana Rafaela e Priscila pela compreensão nos momentos em que precisei ficar horas e horas sentado em frente ao computador.

À minha noiva Celiane pela sua infinita paciência e compreensão. Valeu mesmo Amore! Por todos os finais de semana em passamos dentro Lab, pelas amostras que me ajudou a processar, as correções de textos em fim por tudo. Te Amo!!!

Ao meu grande companheiro e irmão Diego Menezes, este sabe o quanto lhe dei trabalho e o que é pior, continuo dando trabalho.

À Elis. Olha, só você mesmo sabe o quanto lhe torrei a paciência.

A Alene Vanessa pelo apoio nas horas difíceis.

A Karlinha, Kaka temos que discutir mais estresse.

À Mara, valeu Marea!

Ao CPF (Cláudio) por todo material piramidado e cortado.

À Elisabeth pelos inúmeros meios que levou para a esterilização.

A Abrahão, pela estatística. Cara o quanto tempo lhe tomei hein?

Aos meus orientadores Marcos Vannier e Ariana Rangel e pela divina paciência. E põe divina nisso!

A Astria pelas tão servidas discussões de drogas.

À Fernanda, Eline, Laíse, Eliana, Cristina, Cristiana, ao Clone (meu chara Rafael Costa), Sinhá Menina (Síntia), Gustavo e Tony.

Aos meus colegas de turma: Clarissa Gurgel Fernanda Oliveira, Ana Beatriz, Antônio Marcos, Balbino Lino, Bruno Antonio, Carlos Alberto, Fred Luciano, Maria José, Marinho Marques, Micely Del Rei, Ridalva Felzemburgh e Wendell Vila Boas.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

A FAPESB pelo fomento a pesquisa.

À Universidade Federal da Bahia e ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

Ao pessoal do colegiado da Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. CANDIDÍASE	10
1.2. EPIDEMIOLOGIA	13
1.3. COMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO	15
1.4. A MORFOLOGIA	20
1.5. PROCESSO AUTOFÁGICO	22
1.6. ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DO METABOLISMO DO O ₂	25
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	35
3. METODOLOGIA	36
3.1. ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	36
3.2. MEDIDAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	36
3.3. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE	37
3.4. DETERMINAÇÃO DO MIC	37
3.5. CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	38
3.6. ENSAIOS DE INTERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA	38
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	39
3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	39

4. RESULTADOS	41
4.1 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE	41
4.2 ASSOCIAÇÃO DE DROGAS	42
4.3 CÉLULA HOSPEDEIRA X CITOTOXICIDADE	43
4.4 POTENCIAL MICROBICIDA	44
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA	44
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenina Trifosfato
CFU	Unidade Formadora de Colônia
DETC	Dietilditiocarbamato de sódio
ERO	Espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio
FIC	Concentração Inibitória Fracionária
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSSG	Glutathiona Oxidada
GR	Glutathiona Redutase
G-6PDH	6-fosfato desidrogenase
IA	Índice de Associação
ILSI	International Life Sciences Institute
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% do Crescimento
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
MTT	3-(4,5 dimetil tiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCD	Morte celular programada

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química do ácido ascórbico	28
FIGURA 2	Formas reduzida e oxidada da glutathiona	29
FIGURA 3	Reação catalisada pela glutathiona peroxidase	30
FIGURA 4	Reação catalisada pela glutathiona redutase	31
FIGURA 5	Reação catalisada pela catalase	31
FIGURA 6	Dietilditiocarbamato	33
FIGURA 7	Efeito do DETC na proliferação da <i>Candida albicans</i> em meio BHI e RPMI	49
FIGURA 8	Cultivo <i>in vitro</i> da <i>Candida albicans</i> na presença do DETC	50
FIGURA 9	Cultivo <i>in vitro</i> da <i>Candida albicans</i> na presença da anfotericina B	51
FIGURA 10	Anfotericina B associado ao IC ₅₀ do DETC no cultivo da <i>Candida albicans</i>	52
FIGURA 11	DETC associado ao IC ₅₀ da anfotericina B no cultivo da <i>Candida albicans</i>	53
FIGURA 12	Teste de citotoxicidade do DETC em macrófagos	54
FIGURA 13	Índice de associação dos macrófagos às leveduras na presença do DETC	55
FIGURA 14	Efeito microbicida dos macrófagos na presença do DETC	56

FIGURA 15	Visão geral da microscopia eletrônica de transmissão de leveduras não tratadas	58
FIGURA 16	Detalhes da parede celular, membrana plasmática e mitocôndrias	60
FIGURA 17	Em detalhes vacúolos e inclusões lipídicas	62
FIGURA 18	Flexibilidade da parede celular	64
FIGURA 19	<i>Candida albicans</i> formato bizarro	66
FIGURA 20	Extração e desorganização do citoplasma após tratamento com DETC	68
FIGURA 21	Mitocôndria tumefeita e fragmentos de membrana após o tratamento com DETC	70
FIGURA 22	Células tratadas com DETC apresentando numerosos vacúolos	72
FIGURA 23	Microscopia eletrônica de varredura de células controle e tratadas com DETC	74
FIGURA 24	Microscopia eletrônica de varredura de células controle, tratadas com anfotericina B e em combinação com o DETC	76
FIGURA 25	Célula aparentemente rompida quando tratada com DETC e em combinação com anfotericina B	78

RESUMO

Candida albicans, fungo cosmopolita, é considerado um comensal comum da microbiota de pessoas saudáveis. No entanto, com o avanço da AIDS e outras condições que comprometem o sistema imunológico, como o tratamento de neoplasias dentre outros, fizeram com que as infecções fúngicas aumentassem 400% nas últimas duas décadas (Beck-Sangue *et al.*, 1993; Pfaller, 1994; Jarvis *et al.*, 1995). A superóxido dismutase (SOD), fator de virulência em *C. albicans*, é requerida na detoxificação do superóxido. Sendo o dietilditiocarbamato de sódio (DETC) um potente inibidor da SOD, avaliamos no presente estudo o seu efeito fungicida na proliferação *in vitro* da *Candida albicans*, sozinho e em combinação com a anfotericina B. O DETC demonstrou um efeito dose-dependente e inibição significativa da proliferação com apenas 6hs de cultivo. A sua combinação com a anfotericina B apresentou um efeito sinérgico com FIC = 0,8. Com o objetivo de avaliar as alterações ultraestruturais induzidas pelo DETC, as leveduras foram tratadas ou não por 24 horas e então processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A ultraestrutura de leveduras tratadas com 100 μ M ou 150 μ M de DETC apresentaram extração quase completa do citoplasma e componentes intracelulares. Além disso, foram observados múltiplos corpos vesiculares, contendo matéria de natureza diversa e figuras de mielina. Nossos dados sugerem indução de processo autofágico porém, novos experimentos com abordagem citoquímica serão realizados para confirmação dos resultados.

ABSTRACT

Candida albicans is a cosmopolitan fungus, considered a common commensal of healthy people microbiota. However, with the progression of AIDS and other conditions that compromise the immunologic system, such as neoplastic treatment among others, increased the fungal infections occurrence by about 400% in last the two decades (Beck-Blood et al., 1993; Pfaller, 1994; Jarvis et al., 1995). Superoxide dismutase (SOD), virulence factor in *C. albicans* is required in the detoxification of superoxide. As sodium diethyldithiocarbamate (DETC) is a powerful SOD inhibitor, in the present study we evaluated its fungicidal effect in the proliferation in vitro of the *Candida albicans* in combination or not with the amphotericin B. The DETC demonstrated a dose-dependent effect and produced significant inhibition of the proliferation with only 6hs of culture. Its combination with amphotericin showed a synergic effect with FIC = 0.8. In order to evaluate the ultrastructural alterations induced by DETC, the yeasts were treated or not with 150 μ M DETC for 24 hours and then processed for transmission electron microscopy. The ultrastructure of cells treated with 100 or 150 μ M DETC often presented almost complete cytoplasmic extraction and loss of intracellular material. Besides we observed numerous multivesicular bodies displaying varied contents and myelin-like figures. Our data suggest induction of autophagic process however new experiments with cytochemical approach will be carried out to confirm these results.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Candidíase

O termo candidíase refere-se a qualquer infecção causada por leveduras do gênero *Candida*. Existem mais de duzentas espécies conhecidas, mas somente algumas são patogênicas para o homem, sendo *C. albicans* a mais freqüente e outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* com menor freqüência.

Candida albicans, fungo cosmopolita é considerado um comensal da flora normal do trato digestivo de pessoas saudáveis. No entanto, variáveis que promovem um desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal como o uso de quimioterápicos, oclusão intestinal, jejum prolongado, nutrição parental total e hipotensão potencializam o fenômeno da translocação da *Candida* spp. até os capilares mesentéricos, resultando assim, na maioria dos casos de candidemia adquirida por via endógena (Alexander *et al.*, 1990).

De acordo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_7_2004.pdf), a candidemia é confirmada quando há duas ou mais culturas positivas para a mesma espécie de *Candida*, provenientes de amostras diferentes, coletadas após 72 h da admissão. A sua elevada biodiversidade fenotípica contribui para os mecanismos de escape da resposta imune e

comportamento patogênico. Modificações secundárias nesses mecanismos iniciam transformações fenotípicas no fungo favorecendo sua patogenicidade (Senet, 1997).

Dois aspectos são essenciais na interação parasito-hospedeiro: a aderência das leveduras às células epiteliais, pré-requisito para a sua invasão e a imunomodulação da resposta do hospedeiro. *C. albicans* pode aderir não somente às células epiteliais, mas também a células endoteliais, fatores solúveis, matriz extracelular e materiais inertes implantados no corpo do hospedeiro. A interação microorganismo-receptor é mediada por adesinas do agente infectante e receptor protéico do hospedeiro. Um polímero de manose covalentemente associado a proteínas, um dos constituintes da parede celular, chamado manoproteína, tem se mostrado com potente atividade imunomoduladora (Chaffin *et al.*, 1998).

O dimorfismo fúngico, fenômeno importante na micologia médica, refere-se à variação morfológica, que se expressa por um crescimento micelial entre 22 e 28°C e leveduriforme entre 35 e 37°C. Neste sentido, cabe salientar que *Candida* sp. apresenta dimorfismo inverso, sendo a forma de levedura encontrada no ambiente e a micelial encontrada na luz intestinal, manifestando propriedades invasivas no organismo humano (Drago *et al.*, 2000). Entre os aspectos inerentes ao microorganismo, o desenvolvimento do tubo germinativo, representa uma importante característica, em função do aumento na superfície de contato com a célula do hospedeiro. Além disso, a produção e secreção de enzimas citotóxicas como proteinases, lipases, fosfolipases e fosfatases, também estão envolvidas na virulência e aumentam o poder invasor do fungo. Estes fatores são geneticamente determinados e expressos em condições de temperatura, pH e nutrientes. (Delgado & Aguirre 1997; Drago *et al.*, 2000).

O epitélio estratificado da mucosa oral forma uma barreira mecânica que protege os tecidos subjacentes. Esta proteção depende do grau de queratinização e da descamação contínua das células epiteliais. Adicionalmente, a flora comensal bacteriana serve como um mecanismo de modulação da candidíase oral, podendo inibir a aderência destas leveduras, tanto por competição por locais de aderência como pela disponibilidade de nutrientes (Nair & Samaranayake, 1996). Além disto, a saliva é um potente antifúngico e antibacteriano natural e seu fluxo constante inibe mecanicamente o acúmulo de microrganismos na cavidade oral (Samaranayake *et al.*, 1984). Vários elementos na saliva inibem o crescimento de *Candida*, tais como proteínas ricas em histidina ou prolina, sistema peroxidase salivar, lactoferrina e lisoenzima (Pollock *et al.*, 1984; Samaranayake *et al.*, 1997; Tobgi *et al.*, 1987).

Nas gestações, os altos níveis de hormônios reprodutivos aumentam a concentração de glicogênio no ambiente vaginal e, além disso, há alteração do pH vaginal propiciando a germinação de leveduras do gênero *Candida* ocasionando, conseqüentemente, candidíase vulvovaginal (Reed, 1992). Fatores de risco também podem estar ligados ao papel da progesterona em células T e na atividade candidicida dos polimorfonucleares (Spinillo *et al.*, 1995; Nohmi *et al.*, 1995). Além disso, a resposta sistêmica Th₁ pode ser modulada negativamente durante a gestação. A gonadotrofina coriônica humana (hCG), o hormônio luteinizante humano (hLH) e outras proteínas homólogas induzem a transição do fungo de blastosporos à forma de pseudomicélio patogênica para humanos (Caticha & Odell, 1994). A presença de receptores para estrógenos e progesterona no citosol da célula fúngica favorece a aderência e a formação de pseudo-hifas. Em mulheres diabéticas, a glicosúria favorece o

aparecimento da candidíase devido à assimilação e fermentação de açúcares pelas leveduras (Horowitz *et al.*, 1984). Além disso, o estresse emocional cada vez mais presente nos grandes centros urbanos, também é responsável por imunossupressão transitória, a qual aumenta a incidência de diferentes formas clínicas de candidíase (Reszel *et al.*, 1993). A ocorrência desta micose em neonatos parece estar ligada à ineficiência tímica (Senet, 1997).

1.2. Epidemiologia

O estudo de episódios de candidemia (forma sistêmica) registrados entre março de 1999 e março de 2000 (Godoy *et al.*, 2003), em hospitais de quatro países da América Latina, confirma que *C. albicans* é a espécie mais freqüente, correspondendo a 42% de todos os isolados (*vide* Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos em 37 relatos publicados entre 1952 e 1992, onde foram descritos 1.591 casos de infecções sistêmicas por *Candida* em pacientes com câncer, sendo 46% de todas as infecções, ocasionadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, particularmente *C. tropicalis* (25%), *C. glabrata* (8%), *C. parapsilosis* (7%) e *C. krusei* (4%) (Wingard, 1995).

Tabela 1: Episódios de candidemia em hospitais de quatro países da América Latina durante o período de um ano

Agente Etiológico	Nº	%
<i>Candida albicans</i>	43	42,0
<i>Candida tropicalis</i>	25	24,2
<i>Candida parapsilosis</i>	22	21,3
<i>Candida glabrata</i>	8	7,7
<i>Candida guilliermondii</i>	3	2,9
<i>Candida lusitanae</i>	2	1,9

▪ Segundo Godoy *et al.*, 2003.

O surgimento de enfermidades que provocam neutropenia/leucopenia, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), neoplasias e a realização de transplantes de órgãos, repercutiram expressivamente na incidência de infecções fúngicas, causando um aumento de 400% nos últimos 20 anos (Pfaller 1994; Beck-Sangue & Jarvis 1993; Jarvis 1995). Elas estão intimamente relacionadas com pacientes portadores da AIDS. Devido à sua alta frequência, candidíases como as orofaríngeas que atinge até 90% destes pacientes, podem servir como indicadores para o prognóstico da doença (Lopez-Ribot *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 1994; Samaranayake *et al.*, 1984).

Em pacientes transplantados, sua incidência varia desde 5% para receptores de transplante de rins a 40% para os receptores de transplante de fígado (Paya, 1993). Estas severas infecções fúngicas nesta população causam um grande impacto nas taxas de morbimortalidade no ambiente hospitalar, uma vez que 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação na qual houve o episódio, particularmente em

decorrência do diagnóstico tardio e das dificuldades terapêuticas (Wenzel, 1995; Banerjee *et al.*, 1991; Pfaller, 1994).

O risco de infecções graves por *C. albicans* pode ser devido à quimioterapia citostática de pacientes com diferentes tipos de tumor bem como a imunossupressora em transplantados. A leucopenia em decorrência do uso de quimioterápicos pode alterar a função dos polimorfonucleares e causar ulceração da mucosa digestiva, contribuindo para a migração sistêmica da *Candida* (Denning, 1991; Chanock, 1993; Ueta *et al.*, 1994).

Complicações clínicas levando a candidemia podem advir de uma simples injúria do tegumento provocada por um cateterismo, uma vez que o sangue forma rapidamente um revestimento de fibronectina, fibrinogênio e outros componentes do plasma, constituindo assim, um substrato para a adesão e proliferação de microrganismos. Adicionalmente, a *Candida* sp. pode aderir diretamente a superfícies plásticas, constituindo um biofilme fixado a cateteres, válvulas cardíacas e próteses dentárias (Lecciones *et al.*, 1992; Raad & Badey, 1992). Assim sendo, manifestações da candidíase podem agravar consideravelmente o quadro clínico de pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas.

1.3. Complicações do tratamento

Na prática clínica, complicações infecciosas observadas em vísceras podem aparecer semanas ou meses após o episódio de candidemia, como em alguns casos de retinite,

meningite ou osteomielite por *Candida* spp. Outro aspecto relevante é a ausência de dados clínicos ou laboratoriais que permitam um prognóstico fidedigno e a profilaxia da candidíase hematogênica disseminada com invasão tecidual de vísceras (Colombo, 2000; Debusk *et al.*, 1994).

Ao mesmo tempo, a terapia empírica em casos suspeitos de candidíase, bem como os tratamentos prolongados, aos quais estes pacientes são submetidos, favorecem a seleção de cepas com diferentes graus de resistência ou ainda, a substituição por espécies não-*albicans* tornando-se um grave problema de saúde pública.

A anfotericina B, droga antifúngica usada na terapia empírica de casos suspeitos de candidíase, possui elevado efeito tóxico, levando 50 a 90% dos pacientes a efeitos colaterais importantes, como a nefrotoxicidade, coibindo assim, o seu uso na clínica (Patel, 1998). A anfotericina B é um antibiótico poliênico de amplo espectro derivado do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Vem sendo usado nos últimos 40 anos como tratamento de escolha para infecções fúngicas disseminadas e tem permanecido como padrão ouro. Como mecanismo de ação comum dos poliênicos, a anfotericina B liga-se preferencialmente ao ergosterol da membrana celular fúngica promovendo, através da formação de canais ou poros, o rompimento da integridade osmótica (revisto por Ellis, 2002).

A resistência a anfotericina B é ainda bastante rara. Alguns mecanismos recentemente descritos estão associados a mutações na via de biossíntese do ergosterol: (i) produzindo componentes semelhantes ao ergosterol com baixa afinidade pela droga; (ii) ou estão associados a um decréscimo na quantidade de ergosterol na membrana. Ao contrário do seu

efeito tóxico, o desenvolvimento de resistência não tem sido fator significativo no tratamento dos pacientes. Dos 200 agentes poliênicos conhecidos, a anfotericina B é a única que apresenta alta toxicidade, limitando sua administração intravenosa (Ellis 2002).

Com a utilização de novos antifúngicos azólicos houve uma significativa diminuição do efeito tóxico. Os derivados azólicos têm como ação a inibição da 14α demetilase, enzima dependente do sistema citocromo P-450, bloqueando a dimetilação do lanosterol em ergosterol, principal esteroide da membrana da célula fúngica. No entanto, pela ação destas drogas, enzimas que sintetizam hormônios esteróides (citocromo P-450-dependente) ligam-se a estas, influenciando o sistema endócrino do hospedeiro (Georgopapadaku & Walsh, 1994). Os azólicos constituem uma das famílias de antifúngicos com maior número de derivados, os quais se dividem em imidazólicos diazólicos (possuem dois nitrogênios em seu anel aromático) e imidazólicos triazólicos (possuem três nitrogênios em seu anel aromático). Os triazólicos possuem menor potencial tóxico em relação aos diazólicos, devido à sua maior especificidade de ligação da célula fúngica do que das células do hospedeiro.

Uma nova era no tratamento das infecções fúngicas surgiu com os derivados do triazol, melhor representado pelo fluconazol, sendo um agente de amplo espectro, que se destaca por ser hidrofílico, desta forma permanecendo mais tempo na circulação sanguínea. Apresenta baixa ligação a proteínas, permite uma alta concentração no soro e uma rápida e ampla distribuição nos tecidos, incluindo o sistema nervoso central (Eggimann *et al.*, 2003), com biodisponibilidade de 90% e meia-vida de 30 horas. A absorção não é afetada pela alimentação ou ácido gástrico, possui concentração plasmática máxima 3 horas após a

administração, porém, tem como efeitos adversos náuseas, cefaléia, exantema, dor abdominal, vômitos e diarreia. A sua eficiência é comprovada em muitas situações clínicas, tais como candidíase hepatoesplênica (Kauffman *et al.*, 1991; Anttila *et al.*, 1997), infecções sistêmicas por fungos em transplantados de medula óssea, fígado e em pacientes neutropênicos com câncer. Porém, a incidência de *C. albicans* fluconazol-resistente em pacientes aids com candidíase orofaríngea tem criado sérios problemas na administração deste agente antifúngico e controle da infecção, nos Estados Unidos, Europa e Japão (*apud*. Maebashi *et al.*, 2003).

Recentemente, surgiram os triazólicos de 2º geração: posaconazol, ravuconazol e voriconazol, sendo este último, aprovado na Europa para o tratamento de infecções causadas por *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. O considerável aumento de infecções por *Candida albicans* nesta última década está certamente ligado ao pouco desenvolvimento de novas drogas e técnicas médicas menos invasivas, evitando soluções de continuidade nos tegumentos e, conseqüentemente, potenciais focos de invasão (Senet, 1997).

O dissulfiran, droga empregada no tratamento do alcoolismo desde os anos 50, tem como mecanismo de ação em *C. albicans*, a inibição da atividade ATPase sensível a oligomicina do Cdr1p, membro da família dos transportadores ABC, principal responsável pelo desenvolvimento de resistência aos azólicos (Shukla *et al.*, 2004). Simultaneamente, possui atividade moduladora da resistência a drogas anticâncer inibindo a P-glicoproteína em células cancerígenas, bem como outros multitransportadores de drogas (MRP1 e MRP4) (Sauna *et al.*, 2004).

Com relação a Cdr1p foi demonstrado que o dissulfiran inibe tanto a ligação de análogos de ATP (8-azidoATP) quanto de substratos de drogas. Na presença do dissulfiran a eficiência de agentes antifúngicos é aumentada, e as células tornam-se mais sensíveis às drogas. Além disso, este também inibe a super-expressão do Cdr1p e o desenvolvimento de resistência à droga mediada por esta molécula em *Saccharomyces cerevisiae* (Shukla *et al.*, 2004). Inibição destas bombas provavelmente resulta no aumento da concentração intracelular das drogas, tais como os azólicos, assim, aumentando a eficiência destas.

O dissulfiran pode inibir a hidrólise de ATP diretamente bloqueando a ligação do nucleotídeo ou indiretamente interagindo com o substrato no sítio de ligação. Esta inibição parece ocorrer por modificações em resíduos de cisteína no local ou próximo ao sítio ativo. Assim, o dissulfiran atua formando pontes dissulfeto em resíduos de cisteína nos domínios de ligação ao ATP do Cdr1p (Shukla *et al.*, 2004).

O aumento na incidência de patógenos resistentes a drogas, como a *C. albicans* e *C. guilliermondii* (Maebashi *et al.*, 2003; Colombo & Guimarães, 2003), vem promovendo a necessidade de novos agentes antifúngicos, bem como a compreensão dos efeitos colaterais e dos mecanismos que levam a um rápido desenvolvimento de resistência, como o influxo celular reduzido e/ou aumento do efluxo de drogas e modificação da enzima-alvo da droga (Maebashi 2003).

1.4. A Morfologia

Apesar da expressão “fungo dimórfico” ser comumente aceita para a *Candida albicans*, este pode adotar diversas morfologias, podendo assim, ser considerado um organismo polimórfico ou pleomórfico. Sob diferentes condições ambientais, este pode apresentar-se como leveduras (blastoconídios ou blastosporos), pseudo-hifa, hifa e clamidósporos. A levedura é a forma unicelular que se divide por brotamento, processo que envolve o crescimento de novo material celular em um pólo distal onde ocorre à formação de um septo separando o blastoconídio da célula-mãe. A produção do tubo germinativo resulta na conversão do crescimento hifal ou filamentosos, estrutura composta de várias unidades celulares divididas pelo septo. A formação de pseudo-hifa ocorre por uma divisão celular polarizada, as leveduras crescem por brotamento e tornam-se alongadas sem se destacar da célula mãe. Sob condições não favoráveis de crescimento ocorre a formação de clamidósporos, que são células redondas com espessa parede celular. Transição morfológica de levedura a hifa pode ser favorecida por alguns fatores ambientais como temperatura de 37 - 40 °C, pH neutro e concentração inicial de blastosporos não excedente a 10^6 células /mL. O mesmo também ocorre quando quimicamente induzido pela N-acetil-D-glicosamina, alguns aminoácidos, biotina, compostos apresentando sulfidril, grupos heme, zinco e soro.

A *C. albicans* regula sua forma de duas maneiras: em geral de forma lenta, em resposta adversa às condições nutricionais e de forma rápida, em resposta às condições fisicoquímicas. A parede celular é a última estrutura responsável por sua forma, sendo a sua composição e

propriedades biológicas diretamente relacionada às mudanças morfológicas, as quais permitem adaptar-se a diferentes nichos biológicos.

Aproximadamente 80 a 90% da parede celular é composta de carboidrato. Os três maiores polissacarídeos são: (i) polímeros de glicose contendo B- 1,3 e B 1,6 (B-glicans); (ii) polímeros de N-acetil-D-glicosamina (quitina); e (iii) polímeros de manose que estão covalentemente associados às proteínas (glicomanoproteínas); adicionalmente contém proteínas (6-25%) e em menor quantidade lipídeos (1-7%). Dos constituintes da parede celular, a quitina, glicanas e especialmente as manoproteínas, podem ter efeito modulatório sobre a resposta efetora do sistema imune tais como, as células natural killer, células fagocíticas e mecanismo humoral.

A análise ultraestrutural destes microrganismos revela células esféricas ou ovais com a membrana celular bem definida, aderente à parede celular e organelas comuns a organismos eucariontes tais como núcleo, mitocôndrias, vacúolos e cisternas de retículo endoplasmático (Maebashi *et al.*, 2003).

A ultraestrutura das leveduras jovens, obtidas de culturas recentes (24-26h), mostra mitocôndrias e ribossomos abundantes, grandes inclusões lipídicas, membrana plasmática irregular e parede celular com espessura entre 75 e 100 nm, com a superfície externa recoberta por uma estrutura pilosa. Já as leveduras maduras possuem a parede celular caracteristicamente espessa (400 nm) e constituída de três camadas: a mais interna aparenta uma matriz complexa composta de proteínas; a central aparece como uma área eletrolucente e a mais externa, como uma estrutura granular eletrondensa. A quantidade de mitocôndrias e

ribossomos decresce de forma significativa devido ao seu baixo metabolismo, podendo, algumas vezes, não serem detectados. Também são observadas características ultraestruturais típicas, como arranjos de membrana (Miller *et al.*, 1974).

1.5. Processo Autofágico

A autofagia faz parte de um programa de morte celular (PCD), o qual é dividido em dois tipos (I e II). No primeiro tipo (CPD-I), está a apoptose, caracterizada com condensação da cromatina e do citoplasma, fragmentação do DNA, formação de corpúsculo apoptóticos seguido de degradação e remoção das células mortas por fagócitos. No tipo II encontra-se a autofagia, caracterizada pelo acúmulo de vesículas autofágicas (autofagossomo ou autofagolisossomo) e é freqüentemente observada quando há uma eliminação celular maciça ou quando os fagócitos não têm fácil acesso às células mortas. Uma das características que ajudam a distinguir ambos os processos é o fato da célula apoptótica usar lisossomos fagocíticos para este processo, enquanto a célula autofágica usa lisossomos de sua maquinaria endógena (Shintani & Klionsky 2004).

Inicialmente descrita em mamíferos, a autofagia pode ser caracterizada em três principais formas: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas, proteínas que têm como função auxiliar o dobramento apropriado de outras proteínas. Micro e macroautofagia são altamente conservadas desde leveduras a mamíferos, enquanto a autofagia mediada por chaperona aparece largamente restrita a mamíferos. A macroautofagia envolve o

engolfamento direto do citoplasma por protusões, invaginação ou outras deformações da membrana lisossomal. A macroautofagia envolve grandes proteínas do citoplasma e organelas, tais como mitocôndria, parte do retículo endoplasmático, peroxissomos e outras vesículas de origem não lisossomal que se fundem aos lisossomos. A autofagia mediada por chaperonas envolve a formação de um complexo entre a proteínas a ser degradada e a chaperona que interage com receptores na membrana lisossomal promovendo a sua passagem para o lúmen deste. Entre as três a macroautofagia é a maior via de catabolismo geradora de energia a partir da quebra de macromoléculas e organelas danificadas em seu interior durante períodos de estresse ou de privação de nutrientes.

O processo de formação do autofagossomo é morfológicamente e bioquimicamente distinto nas fases de iniciação, execução e maturação, todas dependentes de ATP. O processo tem início com a formação de uma membrana crescente isolada ou fagóforo que seqüestra parte do citoplasma e organelas, eventualmente expande e fecha o fagóforo. O autofagossomo contém uma mistura de marcadores de retículo endoplasmático, endossomas, lisossomas e uma boa parte do conteúdo citoplasmático sendo difícil determinar as origens da bicamada lipídica. A maturação destas vesículas envolve a fusão com endossomas e ou lisossomos, culminado na liberação do conteúdo seqüestrado para degradação e reciclagem por enzimas catabólicas no lúmen dos lisossomos. A fusão lisossomal é o que diferencia o autofagossomo em intermediário; esta fusão com os lisossomas é intermediada por proteínas filamentosas, citoqueratina, vimentina e sistema microtubular.

Em leveduras, muitas das proteínas do processo autofágico são homólogas aos eucariontes. A proteína Atg2 é covalentemente conjugada com Atg5 por uma reação de ubiquitinação durante o passo de inicialização do autofagossomo. Os conjugados comportam-se como uma única molécula e é associado não covalentemente a Atg16L, proteína em espiral que está associada à membrana e ao processo de alongação. Além desta, mais três cadeias de proteínas, MAP, LC3 e Atg8, também estão envolvidas no processo de alongação, as quais permanecem até a maturação do autofagossomo, diferentemente do complexo Atg5-Atg12-Atg16 que dissocia-se logo após sua formação. A LC3 sofre de modificações pós-transcricionais para LC3-I e LC3-II em série, passo que inicia com a clivagem pelo Atg4 seguido por uma reação transitória de ubiquitinação ligado ao Atg7 e Atg3, resultando no selamento da vesícula. Proteínas associadas à membrana do lisossomo LAMP-1 e LAMP-2 estão associados ao autofagossomo intermediário e maduro, o qual enzimas degradativa, catepsina e fosfatase ácida.

Durante a atividade de diferenciação e desenvolvimento dos tecidos tais como, rim, pulmão, intestino, duodeno fetal, involução de glândulas mamárias e queratinização da pele, encontram-se um pronunciado processo autofágico, além disso, parece ser crítico em neonatos, onde o aumento de energia requerido imediatamente após o nascimento é obtido por degradação autofágica do glicogênio no fígado fetal (Kelekar, 2005).

Várias doenças estão associadas com o aumento da autofagia, particularmente em células do sistema nervoso e muscular, onde a reciclagem de proteínas costuma ser crítica. Desordem musculares, conhecida como miopatias vacuolares estão associados com acúmulo

de vacúolos lisossomal ou autofágico. Já em outra condição, cardiomiopatia e retardo mental pode ser causada pela deficiência de LAMP-2, proteína transmembrana envolvida na fusão entre endossomo e lisossomo durante a fase de maturação do autofagossomo tardio. Enfim, inúmeras patologias, envolvendo até algumas formas de câncer, estão associadas a um processo autofágico defeituoso.

1.6. Espécies Reativas derivadas do metabolismo do O_2

Em organismos aeróbicos, o oxigênio molecular (O_2) é utilizado como acceptor final de elétrons, durante a fosforilação oxidativa, onde é reduzido à água (H_2O), via metabólica responsável pela manutenção do equilíbrio energético. A redução incompleta do oxigênio pela mitocôndria durante a cadeia de transporte de elétrons pode gerar espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio (ERO), tais como: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (revisado por Cohen, 1989).

As ERO são conhecidas por sua habilidade em reagir e oxidar componentes celulares tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos podendo agir tanto próximo quanto distante do local onde foram produzidas, uma vez que a meia-vida dessas espécies pode variar bastante.

A oxidação dos lipídeos, também conhecida como lipoperoxidação, pode diminuir a fluidez da membrana e alterar sua função como barreira semipermeável. A lipoperoxidação não-enzimática, estimulada por metais de transição tais como ferro e cobre, causa a decomposição de lipoperóxidos pré-formados. Já a lipoperoxidação enzimática, catalisada pela

ciclooxigenase e lipooxigenase têm importantes funções biológicas, catalisam a peroxidação controlada de substratos graxos, produzindo hidroperóxidos e endoperóxidos. Entretanto, os hidroperóxidos podem interagir com substratos oxidáveis, como os compostos tiólicos, carotenóides e metais de transição levando, estes últimos, à formação de espécies radicalares que podem causar danos e ou reiniciar o processo de lipoperoxidação (Aust *et al.*, 1990; revisto por Miller *et al.*, 1990).

Em proteínas, as ERO podem causar: (i) alteração nos resíduos de aminoácidos específicos, levando a alterações conformacionais, bem como fragmentação ou polimerização; (ii) desnaturação e aumento da susceptibilidade à hidrólise. Proteínas com altos índices de grupos sulfidrilas são mais susceptíveis ao ataque de ERO.

Na cromatina, as ERO também podem causar quebra de uma ou das duas fitas do DNA, modificação das bases nitrogenadas ou ainda modificações de proteínas ligadas ao DNA (Aust *et al.*, 1990; revisto por Miller *et al.*, 1990).

A exposição de um organismo à radiação ionizante, cigarro, poluentes, pesticidas e ainda, durante a biotransformação de xenobióticos pode ocasionar produção de intermediários reativos de oxigênio. Estas espécies também podem ser geradas por hipóxia, isquemia-reperfusão e no processo de ciclo redox, por exemplo, durante a oxidação de quinonas. Vale lembrar que as ERO representam um importante papel em alguns processos fisiológicos como, por exemplo, na proteção contra infecções microbianas por células fagocíticas (polimorfonucleares de macrófagos) bem como sinalizadoras em diferentes processos celulares (revisto por Babior, 1997).

Para proteger-se contra os efeitos deletérios das ERO as células necessitam de diversos mecanismos de defesa antioxidante. Em organismos aeróbios, é essencial que os níveis de ERO estejam em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante. Entretanto, o desequilíbrio metabólico entre eles caracteriza o **estresse oxidativo** celular. Esse desequilíbrio pode ser causado pelos seguintes fatores: (i) diminuição da defesa antioxidante causada por mutações nas enzimas de defesa; (ii) diminuição da ingestão de vitaminas e outros constituintes na dieta; (iii) aumento da produção de ERO causada por fatores ambientais como, por exemplo, fumo, radiação (ultravioleta, raios X etc.); (iv) excesso de atividade física; (v) consumo de álcool; (vi) estresse físico e mental; (vii) inflamações e infecções, entre outros.

Dentre as substâncias químicas antioxidantes naturais encontram-se por exemplo o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico e tióis, o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil- L-cisteinil-glicina) que podem agir aumentando capacidade antioxidante celular através de diferentes mecanismos.

O ácido ascórbico tem propriedade antioxidante por atuar como um agente redutor (AH_2), destacando desta forma uma de suas mais importantes características que são a de ser oxidado a ácido dehidroascórbico (A) (Figura 1).

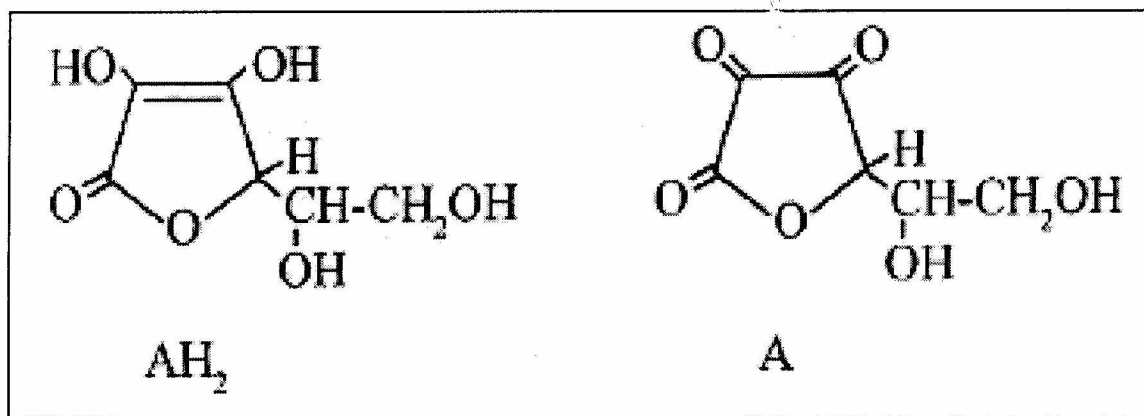


Figura 1. Estrutura química das formas do ácido ascórbico: à esquerda na forma reduzida e à direita na oxidada.

O ácido ascórbico pode reagir rapidamente com $O_2^{\bullet-}$ e com o radical OH^{\bullet} e ainda, neutraliza o oxigênio singlete. Este também auxilia na detoxificação contra outros radicais orgânicos e danos induzidos pela radiação UV, capturando as espécies reativas geradas. Possui um papel fundamental em várias reações enzimáticas (e.g.: biossíntese do colágeno), participando como cofator das mesmas. Contudo, o ácido ascórbico, assim como o α -tocoferol, pode atuar como pró-oxidante, pois, por ser um forte agente redutor, além de capturar espécies reativas, pode também reduzir metais de transição, facilitando a formação dessas espécies, a exemplo, da redução do FeIII para FeII que na presença de peróxido de hidrogênio estimula a formação de OH^{\bullet} por meio da Reação de Fenton.

O α -tocoferol (vitamina E) é um antioxidante lipossolúvel que, devido às suas características hidrofóbicas, tende a se concentrar nas membranas. Por isso, constitui a primeira linha de defesa antioxidante, contra danos às membranas celulares. A sua ação antioxidante reside na sua eficiente propriedade de suprimir radicais peroxila (LOO^{\bullet}) das porções lipídicas das membranas, interrompendo assim, a reação em cadeia da lipoperoxidação.

Os carotenos são pigmentos orgânicos encontrado nas plantas e microrganismos como algas e fungos. O β -Caroteno e o licopeno são exemplos de carotenóides, ambas são moléculas altamente apolares, que exercem funções antioxidantes nas fases lipídicas, através da supressão de radicais livres, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxila (HO_2) e o radical hidroxila, além disso, diminui a formação de oxigênio singlete reagindo diretamente com ele, liberando energia na forma de calor.

A GSH é o tiol-composto mais abundante no meio intracelular, essencial na proteção contra agentes ionizantes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta, atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (Fig. 2). Normalmente, a forma intracelular predominante é a reduzida, estando a oxidada presente em menos de 5%. É ainda requerida para síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Ferreira & Matsubara, 1997).

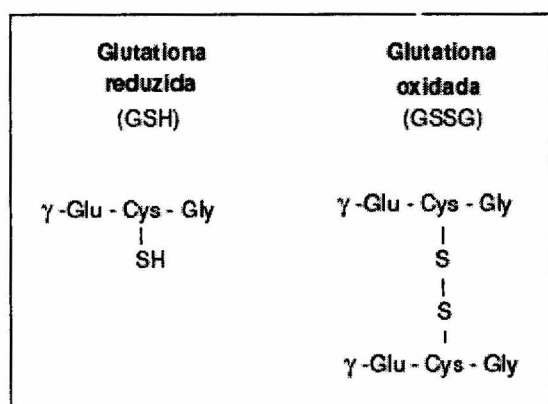


Figura 2. Estrutura química das formas reduzida e oxidada da glutathiona.

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é a enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus álcoois às custas da conversão da GSH a GSSG (Fig 3).

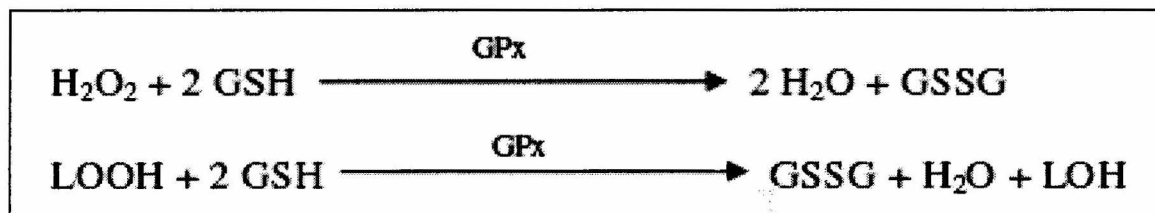


Figura 3. Reação catalisada pela glutathiona peroxidase, fundamental no metabolismo do peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos, bem como ERO.

A glutathiona oxidada (GSSG) pode ser convertida a sua forma reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR), utilizando a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) como coenzima, restabelecendo assim, os níveis intracelulares de GSH. A glicose 6-fosfato desidrogenase (G-6PDH), enzima da via das pentoses, fornece o potencial redutor NADPH, indispensável para manutenção da atividade da GR. A GR utiliza os elétrons do NADPH para redução da ponte dissulfeto da GSSG, restabelecendo os níveis intracelulares de GSH.

A relação de concentração entre GSH/GSSG é mantida alta nas células normais, pelas enzimas auxiliares, GRH e G-6PDH, que regeneram GSH. Esta relação deve ser mantida alta, devido ao fato da GSSG poder reagir com várias enzimas, inativando-as pela adição de pontes dissulfeto. Assim, em condições em há diminuição do fornecimento de NAHPH, como no jejum e na deficiência da G-6PDH, a função da GR fica prejudicada (Ferreira & Matsubara, 1997).

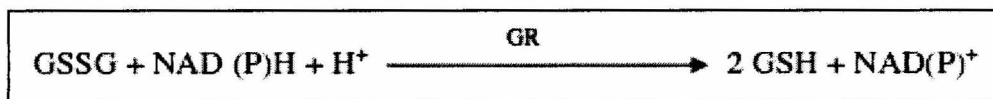


Figura 4. Reação catalisada pela glutathiona redutase.

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que decompõe o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Fig 5). Está presente nos principais tecidos, principalmente no fígado, sangue, medula óssea, mucosa e rim.

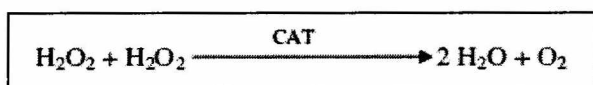
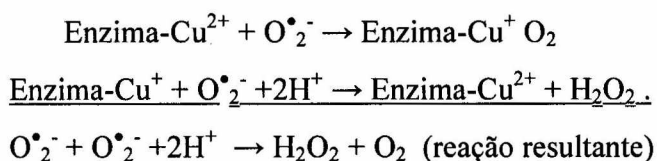


Figura 5. Reação catalisada pela catalase, enzima que localiza-se nos peroxissomos.

A superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como cofator em seu sítio catalítico, podendo ser CuZnSOD, MnSOD, FeSOD e NiSOD (Fridovich, 1995, Youn *et al.*, 1996).

A superóxido dismutase cobre/zinco (CuZnSOD) inicialmente descrita em 1938 por Mann e Keilin como proteína azul-verde isolada do sangue de bovino também ficou conhecida como hemocupreína. Outras proteínas deste tipo também foram isoladas do fígado do cavalo (hepatocupreína) e do cérebro (cérebro-cupreína), mas nenhuma função enzimática foi detectada em nenhuma destas proteínas, sendo então, sugerido que elas funcionariam no armazenamento de metais. Até que em 1969 McCord e Fridovich, demonstraram que a proteína do eritrócito pode remover cataliticamente o radical superóxido e, assim, identificaram a atividade enzimática superóxido dismutase.

CuZnSODs são razoavelmente resistentes ao aquecimento, ao ataque por proteases e a desnaturação por reagentes como cloreto de guanidina, sulfato dodecil de sódio e uréia. Estão virtualmente presentes em todas as células eucarióticas e localizam-se no citosol, alguns lisossomos, núcleo, espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria e também, em alguns peroxissomos (Halliwell & Gutteridge, 1999, *apud*. Hwang *et al.*, 2002). A reação sem o catalisador é fortemente dependente do pH da solução, mas quando catalisada pela CuZnSOD o mesmo pode variar de 5,3 a 9,5. Na reação de dismutação o íon de cobre na CuZnSOD atua alternadamente em reações de oxidação e redução, enquanto que o Zn, apesar de não possuir atividade catalítica, ajuda a estabilizar a enzima (vide reação a baixo):



Em uma infecção causada por *Candida albicans*, as células fagocíticas do hospedeiro apresentam como principal mecanismo fungicida a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO), as quais são altamente tóxicas. Porém, este microrganismo tem como mecanismo de defesa enzimas antioxidantes, como a SOD, a qual catalisa a dismutação do radical superóxido e, conseqüentemente, reduz o estresse oxidativo. Recentemente, surgiram vários relatos mostrando a superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/ZnSOD) como fator de virulência e proteção contra o estresse oxidativo em *Candida albicans* (Hwang *et al.*, 2002). Do mesmo modo, também está envolvida em uma série de outras alterações durante a transição

morfológica (Gunasekaran *et al.*, 1998), desenvolvimento hifal defeituoso e biossíntese de um aminoácido essencial, a lisina (Hwang *et al.*, 2002).

O dietilditiocarbamato (DETC *vide* fórmula abaixo) é um potente inibidor de Cu/ZnSOD, por se ligar ao cobre inibindo sua atividade redox. Isto o fez o primeiro agente na escolha do uso de inibidores de SOD, o qual permitirá a elucidação de mecanismos antioxidantes enzimáticos e suas implicações nas infecções *in vitro* e *in vivo*.

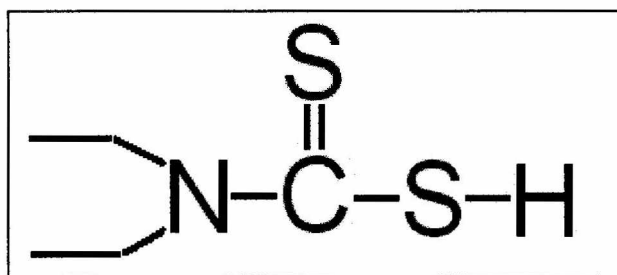


Figura 6. Dietilditiocarbamato – DETC

A microscopia eletrônica de microrganismos cultivados em presença de fármacos com potencial atividade microbicida podem produzir dados que levem à elucidação de mecanismos de ação destas drogas (*e.g.* Vannier-Santos *et al.*, 1995; 1999; Yong *et al.*, 2000; Vannier-Santos & Lins 2001), incluindo drogas fungicidas como o cetoconazol e terbinafina (Vannier-Santos *et al.*, 1995; 1999). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* ao fluconazol também foram determinados por microscopia eletrônica (Maebashi *et al.*, 2002; 2003).

As mitocôndrias, organelas responsáveis pela maior fonte de ATP, consomem cerca de 85 a 90% do O₂ da célula dessa forma, constitui o principal sítio de produção de superóxido podendo chegar até 4% do oxigênio absorvido pela organela o que a faz, em condição de

estresse, o principal alvo dos danos causados por esses radicais. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão buscaremos evidências sobre sua participação, bem como de outras organelas, nos mecanismos de proteção contra a morte celular associada ao estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Abordar os mecanismos antioxidantes de *Candida albicans* frente ao dietilditiocarbamato de sódio (DETC).

2.2. Objetivo Específico

- Determinar a sensibilidade da *C. albicans* ao DETC;
- Avaliar a atividade microbicida dos macrófagos na presença do DETC;
- Avaliar os efeitos deste composto na organização ultraestrutural da *C. albicans*.
- Verificar a atividade fungicida *in vitro* da combinação DETC e anfotericina B;

3. METODOLOGIA

3.1. Organismos e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizada a linhagem *Candida albicans* ATCC 18804 isolada de um paciente do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O cultivo foi feito em meio ágar batata dextrose 4% e Brain-heart infusion broth - BHI (Acumedia) ambos a 26 e 37°C.

3.2. Medidas de proliferação celular

As colônias foram pinçadas de um meio sólido, ágar batata dextrose, com auxílio de uma alça de platina e ressuspensas em 4 mL de água miliq estéril. Através de contagem em câmara de Neubauer, inóculos de $2,5 \times 10^5$ células/mL foram pré-estabelecidos em meio BHI. Para acompanhar o crescimento e a viabilidade celular, alíquotas de 100µL foram retiradas e plaqueadas em meio sólido, após uma diluição seriada. Posteriormente, o número de colônias foram contados após 24hs incubação a 37°C e multiplicado pelo seu respectivo fator de diluição, tendo como resultado a unidade formadora de colônias por mL (CFU/mL).

3.3. Testes de susceptibilidade

Para os testes de susceptibilidade foram utilizados inóculos de $2,5 \times 10^5$ CFU/mL em 4,5 mL de meio BHI na presença e ausência das drogas. Os tubos foram incubados a 37°C e tiveram a sua proliferação acompanhada nos períodos de 0, 6, 12, 24 e 48hs.

3.4. Determinação do MIC

A concentração mínima inibitória do crescimento (MIC) foi realizado de acordo as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) em placas de 96 poços. Resumidamente, 100 µL de meio BHI foram colocados em cada um dos poços, em seguida adicionou-se 100 µL da droga no primeiro poço, homogeneizou-se (4x) e em seguida retirou-se os 100 µL e o adicionou no poço seguinte repetindo o mesmo procedimento até o último poço, depois deste, o volume excedente foi descartado. Por fim, foi adicionado em cada poço 100 µL do inóculo inicial (6×10^3 CFU/mL). A leitura foi realizada com base na concentração mais baixa da droga que inibiu o seu crescimento visível após 24 e 48 h de cultura a 37° C.

3.5. Cultivo de macrófagos peritoneais

Macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos de lavagem peritoneal com meio DMEM gelado e plaqueados em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, os macrófagos não aderidos foram removidos por lavagem com PBS. Posteriormente adicionou-se novo meio suplementado com 10% SFB, mantendo as mesmas condições.

3.6. Ensaios de interação e sobrevivência

Leveduras crescidas em meio BHI foram lavadas duas vezes em PBS estéril, contadas e adicionadas à monocamada de macrófagos peritoneais na proporção 5:1 (leveduras – macrófagos). Após 1 hora de interação, a 37°C, o meio foi retirado, as lamínulas lavadas com PBS estéril e fixadas com álcool absoluto. As lamínulas desidratadas em álcool absoluto foram coradas com hematoxilina e eosina para observação e contagem por microscopia óptica sob objetiva de 100X. O índice de associação (IA) foi determinado segundo Bianco e cols., 1975, onde $I.A = \% \text{ macrófagos infectados} \times \text{média do número de parasitos/macrófago}$. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significante se $P < 0,05$, como determinado por análise de variância. Os ensaios de sobrevivência foram realizados com as leveduras e macrófagos na mesma

proporção no tempo de 24 horas. O percentual de sobrevivência foi determinado por contagem do número de colônias em meio sólido (CFU/mL).

3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído (sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 5 horas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M e ferrocianeto de potássio 0,8 %, ao abrigo da luz. A seguir, foram feitas desidratações em concentrações crescentes de acetona (15 - 100%), infiltração em resina Spurr (Ted Pella). Cortes ultrafinos foram obtidos por ultramicrotomia, coletados em grades de cobre (malha 300) e contrastados em acetato de urânio (1%) e citrato de chumbo 5%. A análise ultraestrutural foi feita em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura

As leveduras pré-tratadas com as drogas foram fixadas como descrito acima. Após fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e as células aderidas

sobre lamínulas pré-cobertas com solução de poli-L-lisina por 1 h. As amostras foram pós-fixadas como descrito acima e em seguida lavadas por duas vezes com o mesmo tampão e submetidas à desidratação em séries crescentes de etanol (50-100%) com a duração de 10 minutos em cada concentração. Após desidratação as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico em aparelho BALTEC. As lamínulas foram montadas em suportes metálico e estes submetidos a uma atmosfera de argônio de 0,1 mBAR para metalização. As amostras foram observadas em microscópio de varredura JEOL JSM5310.

4. RESULTADOS

4.1 Testes de susceptibilidade

Os testes de susceptibilidade para *C. albicans* foram realizados de acordo as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e International Life Sciences Institute (ILSI). Desta forma, com base em três experimentos independentes, estabelecemos com um período de 24hs de cultura a 37°C, o MIC para o DETC, a qual foi de 156,2 μ M, corroborando na identificação de um novo alvo farmacológico em potencial para a quimioterapia da candidíase.

O tratamento com 150 μ M de DETC promoveu a inibição do crescimento *in vitro* em relação ao controle de aproximadamente 80% em meio BHI e de 13% em meio RPMI após 24 h de cultura (Fig.7). Além disso, quando comparamos os controles verificamos um maior crescimento no primeiro meio.

A figura 8 demonstra o efeito dose-dependente do DETC na proliferação das leveduras. Foi possível perceber em curtos períodos, uma inibição significativa no crescimento celular, como a que ocorreu em 6hs de cultivo, onde a concentração mínima de 10 μ M foi capaz de inibir 20% do crescimento celular, enquanto as concentrações de 300 e 500 μ M apresentaram efeito fungicida. Os efeitos das concentrações apresentaram diferenças acentuadas em períodos mais longos de cultivo. Nas incubações de 24 h essas diferenças se tornaram máximas, fase em que também foi determinada a concentração inibitória de 50% do

crescimento (IC_{50}), e que coincide com o fim da fase exponencial e início da fase estacionária. Em 24 horas houve uma inibição completa do crescimento e efeito fungicida para 500 μ M, enquanto, 10 μ M inibiu apenas 17% do seu crescimento. Após este período foi observado proeminente crescimento microbiano em 300 μ M, enquanto que em 500 μ M permaneceu o efeito fungicida. Com base em três experimentos independentes, a média do IC_{50} para o DETC foi de 115 μ M.

A anfotericina B, de um modo geral, demonstrou efeito muito semelhante ao DETC, também agindo de forma dose-dependente. Em curtos períodos de apenas 6hs de cultivo já havia inibição de 44% para 5 nM e efeito fungicida para as concentrações de 100 e 250 nM como demonstrado na figura 9. As diferenças entre as concentrações se tornaram maiores em 24hs, onde a inibição foi de 22% para 5 nM, não houve inibição em 1 nM e o efeito fungicida permaneceu para a concentração de 250 nM. A partir desse período também houve um crescimento proeminente em 100 nM, enquanto em 250nM, houve morte celular (ou perda de viabilidade). A média do IC_{50} de três experimentos independentes para a anfotericina B foi de 20 nM.

4.2 Associação de drogas

A fim de verificar o tipo de associação entre o DETC e anfotericina B realizamos experimentos combinando ambas as drogas, onde a partir destes determinamos o IC_{50} do

DETC na combinação com a anfotericina B ($49,9\mu\text{M}$) e o IC_{50} da anfotericina B quando combinado com o DETC ($8,47\text{nM}$), como demonstrado na figura 10 e 11.

De acordo Tallarida (1992), as combinações são consideradas sinérgicas quando os valores da concentração inibitória fracionária (FIC) são menores que 1. Combinações antagonistas possuem valores de FIC maiores que 1 e quando aditivo iguais a 1. Em nossos resultados o FIC foi igual a 0,8, verificando assim, efeito sinérgico da combinação das drogas.

4.3 Célula hospedeira X Citotoxicidade

A citotoxicidade do DETC para os macrófagos foi avaliada *in vitro* em diferentes concentrações (Fig.12). A viabilidade celular foi mensurada a partir da análise da atividade mitocondrial das células, através do método da redução do 3-(4,5 dimetil tiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT) após 24 h de exposição à droga. Os resultados mostraram que o DETC não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Ao invés disso, apresentou uma tendência ligeiramente protetora na concentração de $100\mu\text{M}$. Neste experimento foi aplicado o teste estatístico ANOVA para verificar possíveis diferenças entre as amostras, e Dunnett, como pós-teste para encontrar estas diferenças.

4.4 Potencial microbicida

Para verificar a participação do DETC na infecção da célula hospedeira e sobrevivência intracelular, macrófagos peritoneais foram incubados com as leveduras a 37°C por 1 e 24 h. O tratamento com a metade do valor do MIC para o DETC por uma hora, não diminuiu de forma significativa, a adesão das leveduras aos macrófagos (Fig.13), quando comparado com o controle. No entanto, após 24 h de interação o efeito microbicida dos macrófagos foi significativamente maior do que o controle (Fig.14). Por se tratar de dados não paramétricos foi utilizado nos ensaios de interação o teste de Mann-Whitney na comparação das duas amostras. Como os resultados de viabilidade celular tiveram distribuição normal aplicou-se teste t-Student na comparação das amostras.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Com o objetivo de avaliar as alterações ultraestruturais induzidas pelo DETC, as leveduras foram tratadas ou não por 24 horas e então processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Leveduras não tratadas apresentaram-se normais, com suas estruturas íntegras (Figs 15a, 16a-c). Dentre as diferentes formas as quais estas podem se apresentar, as esféricas e oblongadas são as que se apresentam mais prevalentes. Seu tamanho também é bastante variável. O citoplasma apresenta-se tão eletrondenso, que as membranas passam a ser

percebidas de maneira eletrolucente em contraste negativo – mesmo com a preparação de cortes mais finos dos que os obtidos normalmente. A figura 15a apresenta uma célula de forma alongada, onde se observa um núcleo grande possuindo formato irregular, que é visualizado preferencialmente na região central da célula. Grandes vacúolos que também são freqüentemente observados na região central da levedura apresentam forma arredondada e material eletrondenso em seu lúmen. Numerosos perfis mitocondriais são percebidos na periferia da célula. Em torno da célula, observa-se espessa parede subdividida em camadas, sendo a mais interna de aspecto reticular, a intermediária aparecendo como uma área mais eletrolucente e a externa, bastante eletrondensa, com uma aparência fibrilar ou floculenta na sua porção mais externa.

Logo abaixo da parede, verifica-se a presença da membrana plasmática. Esta pode se apresentar lisa (fig. 16a), justaposta à parede celular, ou projetar-se para o citoplasma formando invaginações de diferentes tamanhos (Fig. 16b). Material eletrondenso e estruturas fibrilares podem ser observadas no espaço periplasmático, localizado entre a parede celular e a membrana plasmática (Fig. 16b). Foram observados perfis mitocondriais com variadas dimensões e formas (Figs 16a - c).

Os vacúolos contendo material granular eletrondenso podem ser vistos em associação homofílica (Fig. 17a), possivelmente em fusão ou associação com inclusões lipídicas (Fig. 17b).

A figura 18a mostra inflexões inversas e diametralmente opostas da parede celular, modelada via processo altamente dinâmico que permite a célula dividir-se por brotamento

(Fig. 18 b) e a formação de pseudo-hifa, fatores importantes na virulência. Apesar de considerado um fungo dimórfico, *C. albicans* pode apresentar considerável variação polimórfica, como ilustra a ocorrência da célula asteromorfa da Fig. 19, a qual apresenta ultraestrutura normal de suas organelas. Tal achado pode ser devido a múltiplos pontos de gemulação alterando a inclinação da parede como visto na Fig. 18.

A maioria das leveduras incubadas por 24 horas em meio contendo 150 μM de DETC, apresentaram extração quase completa do citoplasma e de componentes intracelulares (Fig. 20a). O arcabouço celular foi mantido devido à presença da parede celular, a qual apresentava-se mais espessa, provavelmente decorrente de um afrouxamento dos componentes da mesma. Perfis membranares foram observados fora das células presumivelmente em decorrência da lise celular (Fig. 20b). Em células tratadas com 100 μM de DETC podem-se notar, em parte as mesmas alterações: porções de membrana celular fora da célula (Fig. 21a-c). As mitocôndrias encontram-se ligeiramente tumefeitas contendo em seu interior material amorfo (Fig. 21a - detalhe).

Em células bem preservadas foi possível notar a presença de áreas maiores de espaço periplasmático, parecendo haver um espaçamento maior entre a membrana plasmática e a parede celular (Fig. 22a). O número de vacúolos aparentemente foi aumentado (Fig. 22b-f).

Em células incubadas com 150 μM de DETC os vacúolos freqüentemente apresentaram material amorfo de diferentes níveis de compactação e eletrondensidade (Fig. 22a). Foram observados vacúolos contendo material homogêneo (Fig. 22b) e inclusões

lipídicas com variações nos níveis de eletrondensidade (Fig. 22c) ou envoltas por cisternas de retículo endoplasmático (Fig. 22d).

A presença de material granular no lúmen destes vacúolos pode indicar a origem citoplasmática do mesmo (Fig. 22e) e foi observada a presença de figuras de mielina e áreas isoladas de membrana (Fig. 22f) Em conjunto estes dados indicam a indução de processo autofágico em *C. albicans* induzido pelo DETC.

Leveduras não tratadas, observadas no microscópio eletrônico de varredura, apresentaram formas oblongas, alongadas e de superfície lisa, muitas destas encontram-se em processo de divisão, mostrando boa preservação estrutural (Fig. 23a-b). Em algumas destas células também foram observadas ondulações em sua superfície.

Leveduras tratadas com 115 μM de DETC por 24 h apresentaram células com estruturas aparentemente normais, porém, foi encontrado em sua superfície um material amorfo de aparência floculenta (Fig. 23c). De forma muito interessante também houve o rompimento de algumas células corroborando os resultados vistos na microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 25a).

Os diferentes tratamentos com anfotericina (20 nM) e DETC (115 μM), alteraram a capacidade de adesão deste fungo a lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina e utilizadas rotineiramente na adesão de amostras para microscopia eletrônica de varredura (Fig. 24a-c). Foi bastante evidente a formação de pseudo-hifas em culturas tratadas apenas com anfotericina B (20 nM) o que não foi observado na combinação com o DETC (Fig. 24b e c), valendo ressaltar que esta refere-se à forma infectante para o hospedeiro; além disso, também

foi encontrada a presença de material amorfo aderido a sua superfície, no entanto, em menor quantidade do que a vista nas células tratadas com DETC.

Na combinação DETC (115 μM) com anfotericina B (20 nM) houve uma polarização do material amorfo encontrado na sua superfície das leveduras, localizando-se preferencialmente nas extremidades destas, as quais podem ter se rompido (Fig. 25a-b). Desta vez, o material amorfo apresentado tem uma aparência mais fibrilar do que o vista nas células tratadas apenas com DETC (Fig. 25b). Cabe ressaltar, que para o processamento do material tratado com drogas, foram utilizadas as mesmas condições do controle, porém em duplicata, e quadruplicata para as combinações. Portanto, além da diminuição da viabilidade celular (CFU/mL) observadas nos tratamentos com as combinações, as leveduras apresentaram-se na microscopia eletrônica de varredura em menores quantidades, sugerindo a redução da capacidade de proliferação e/ou adesão.

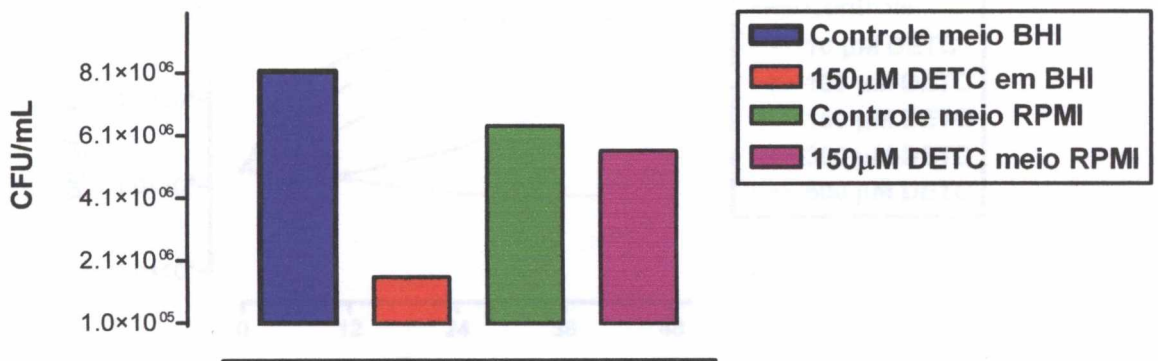


Figura 7. Efeito fungicida do DETC *in vitro* em *C. albicans*, meio BHI e RPMI. 24 h após o tratamento o n° de colônias foi determinado em meio sólido ágar batata (gráfico representativo de três experimentos independentes).

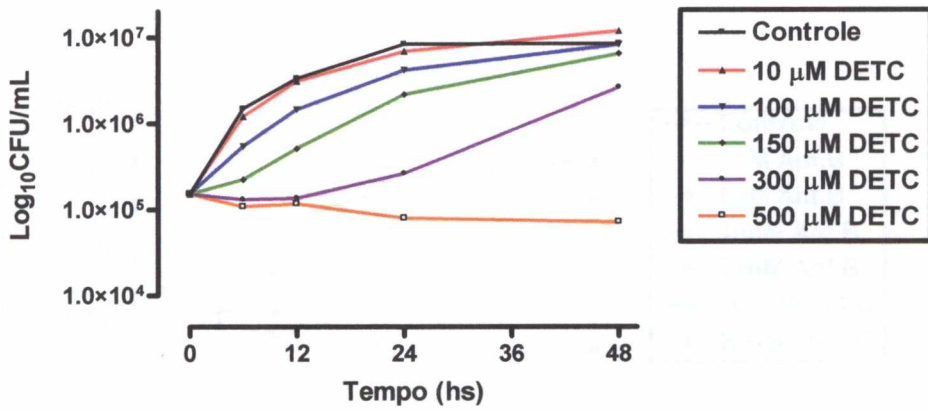


Figura 8. Efeito fungicida do DETC na proliferação *in vitro* de *C. albicans* em meio BHI. Os resultados médios de ao menos três ensaios independentes demonstraram um IC₅₀ de 115 μM (dados representativos de três experimentos independentes).

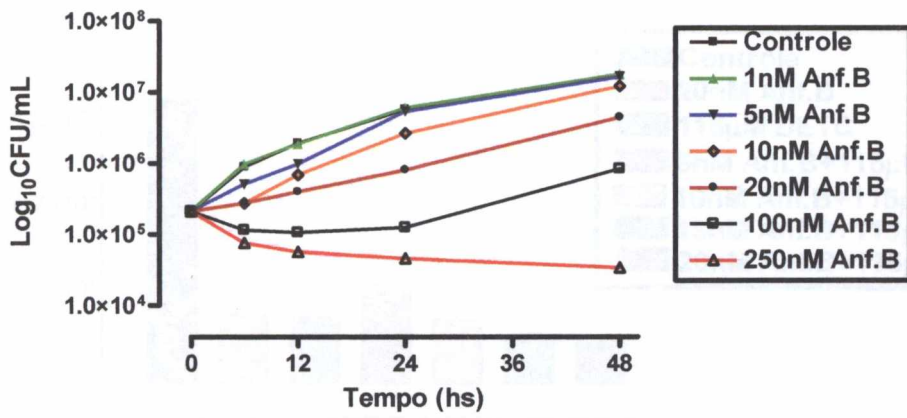


Figura 9. Efeito dose-dependente da anfotericina B na proliferação *in vitro* de *C. albicans* em meio BHI. Os resultados médios de ao menos três ensaios independentes demonstraram um IC₅₀ de 20 nM (dados representativos de três experimentos independentes).

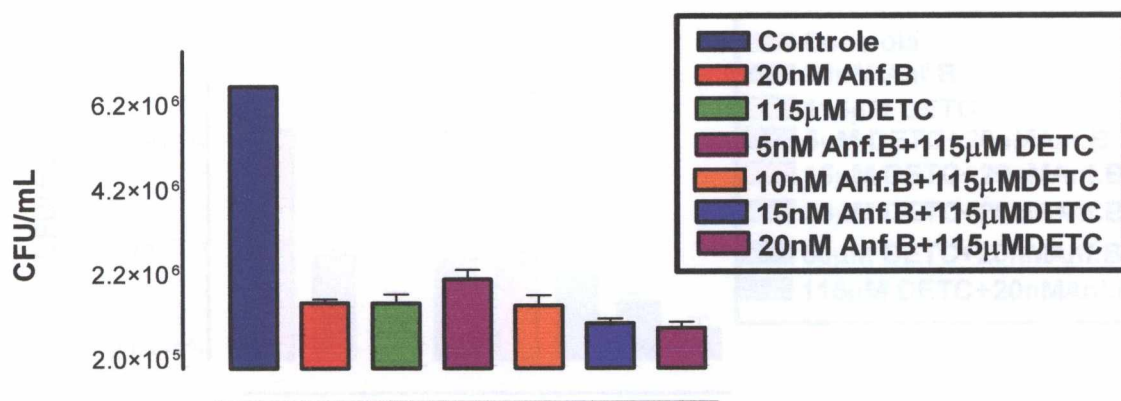


Figura 10. Atividade fungicida de diferentes concentrações da anfotericina B associadas ao IC_{50} do DETC em *C. albicans*, após 24h de cultivo em meio BHI o nº de colônias foi determinado.

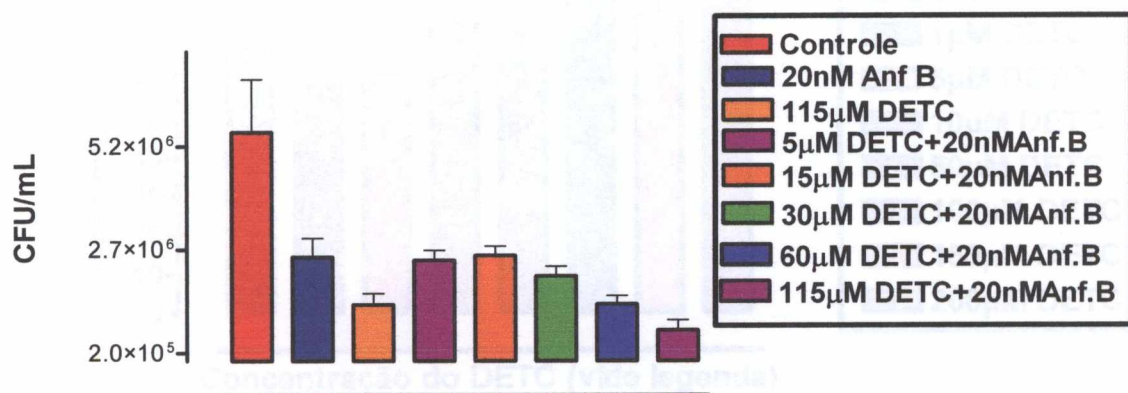


Figura 11. Efeito fungicida de diferentes concentrações de DETC associadas ao IC₅₀ da anfotericina B em *C. albicans*, após 24h de cultivo em meio BHI o n° de colônias foi determinado.

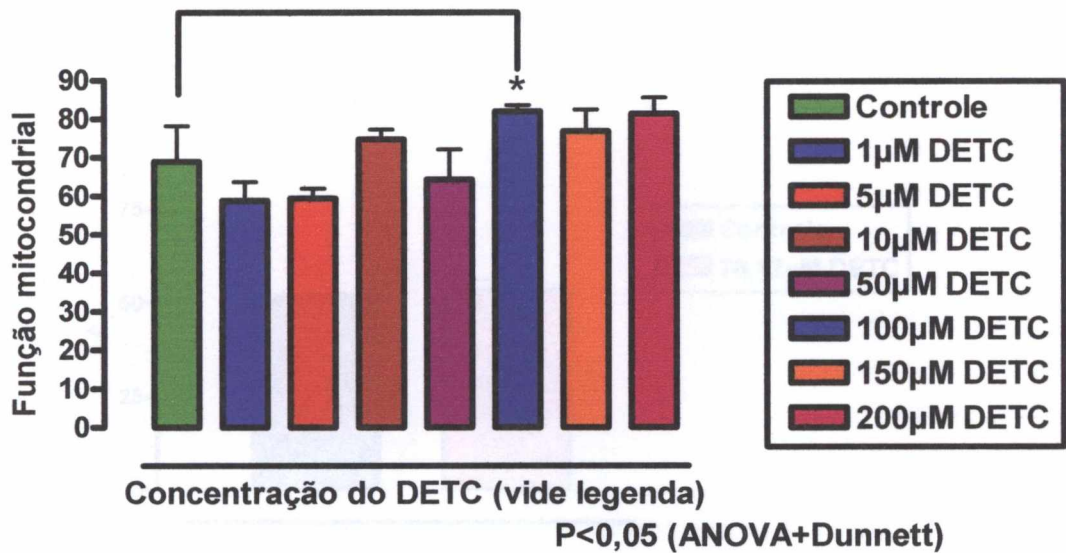


Figura 12. Teste de citotoxicidade em macrófagos peritoneais com diferentes concentrações de DETC. Após 24h de cultivo, o MTT reduzido à azul de formazan pela atividade mitocondrial, foi quantificado por espectrofotômetro em absorbância de 540nm. O tratamento acima não revelou efeito tóxico demonstrado pela função mitocondrial.

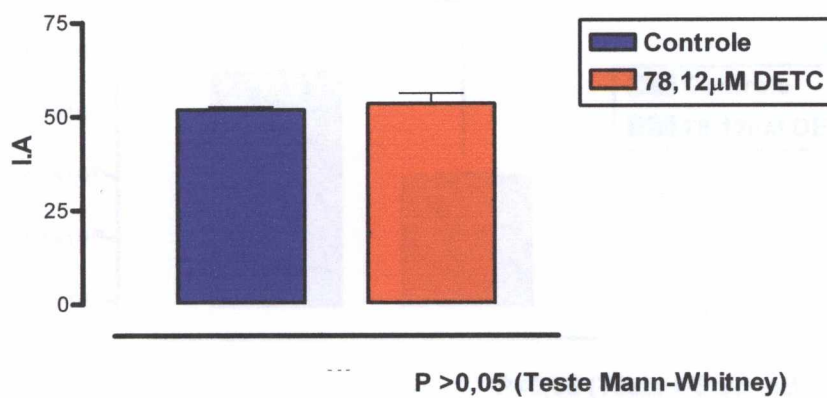


Figura 13. Índice de associação (produto da média de fagócitos apresentando leveduras aderidas e/ou endocitadas pela média de leveduras por fagócito – vide metodologia) dos macrófagos às leveduras cultivadas na presença e ausência do DETC por 1 h.

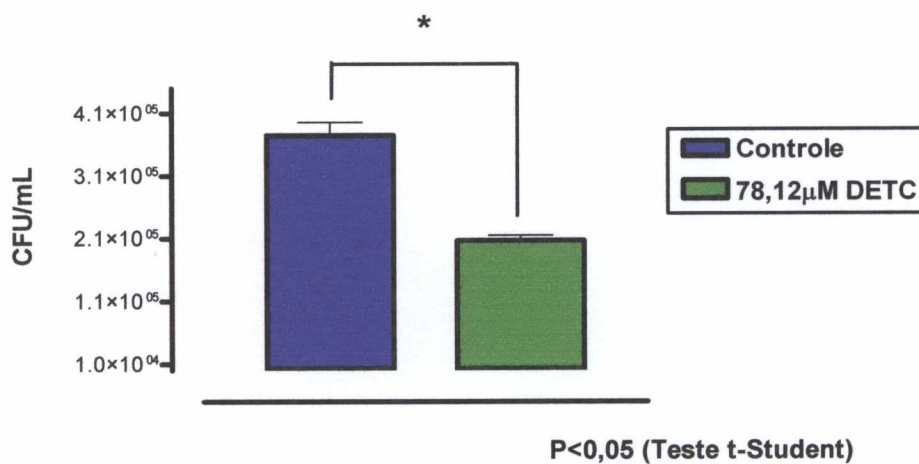


Figura 14. Atividade microbicida dos macrófagos na ausência e presença do DETC. Após 24h de interação os números de colônias foram determinados em meio sólido ágar batata.

Figura 15. Microscopia Eletrônica de Transmissão de células não tratadas após 24h de cultivo
– Visão geral de *Candida albicans* apresentando núcleo irregular (n), extensos perfis mitocondriais (m) e volumosos vacúolos contendo material granular eletrondenso (v).

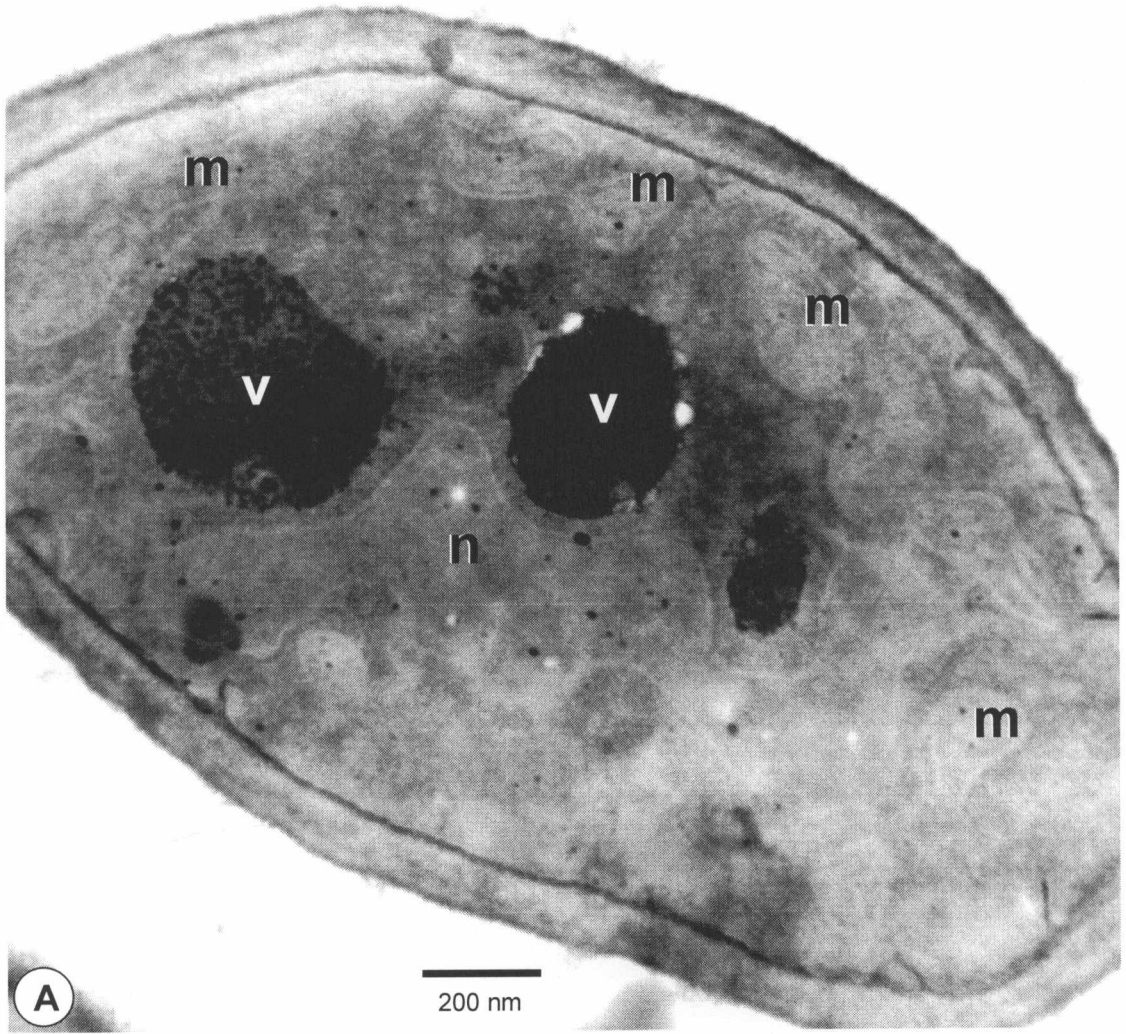


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Transmissão de células não tratadas cultivadas por 24h – Detalhes da superfície da *C. albicans* (A-C) apresentando parede celular (p) e membrana plasmática (setas) com invaginações (B-C). (A) Observar a disposição longitudinal das cristas mitocondriais (cabeças de seta).

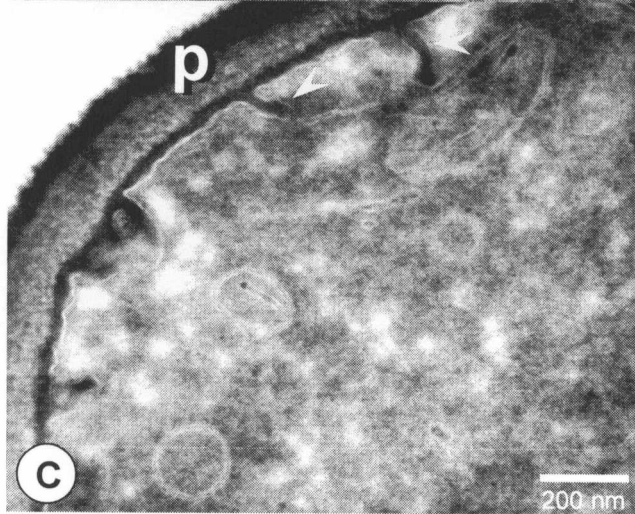
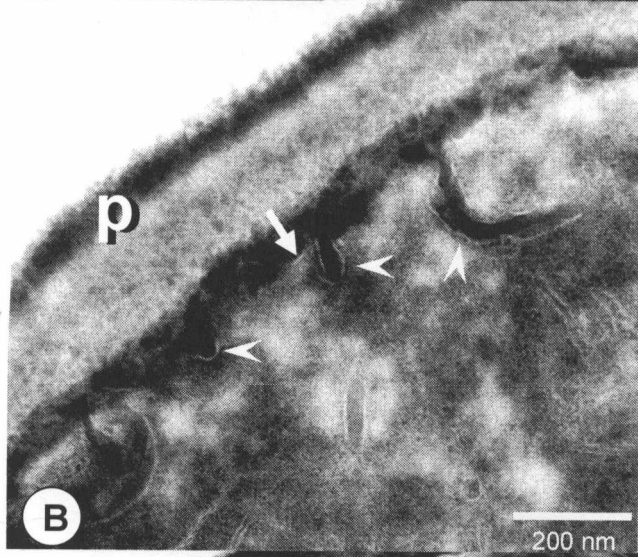
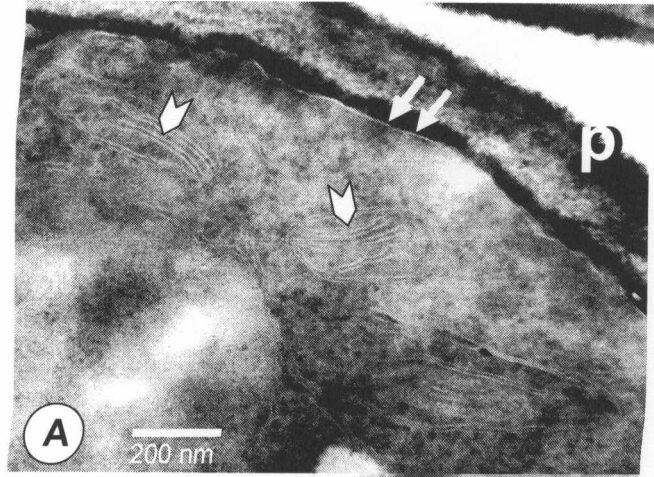


Figura 17. Microscopia Eletrônica de Transmissão de células não tratadas cultivadas por 24h – *C. albicans* apresentando associação (setas) de vacúolos contendo material eletrondenso entre si (A) e com inclusões lipídicas (B).

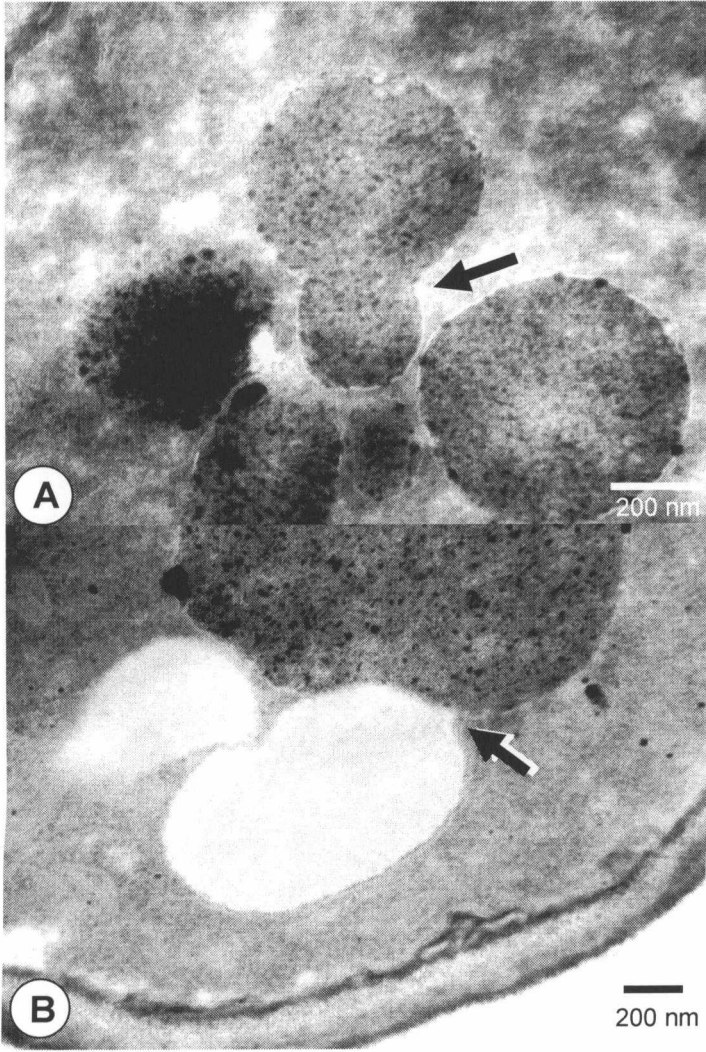


Figura 18. Microscopia Eletrônica de Transmissão de *C. albicans* não tratada cultivada por 24h – A morfologia de células bem preservadas ultraestruturalmente sugerem a flexibilidade da parede celular que podem se mostrar côncava e convexa na mesma direção diametral na célula (A) e há uma protrusão da parede em sítios de gemulação (B – setas).

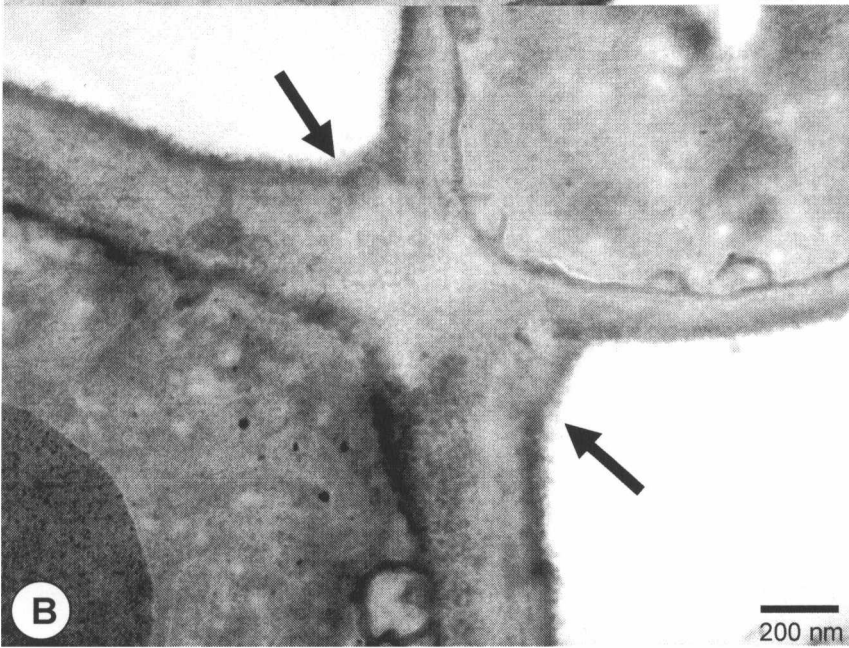
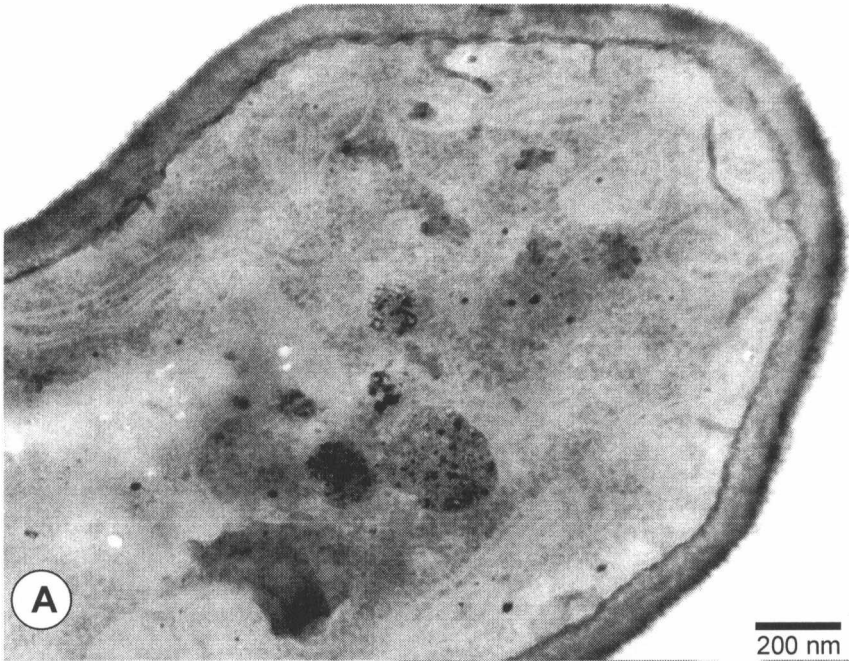


Figura 19. Microscopia Eletrônica de Transmissão de *C. albicans* não tratada cultivada por 24h – O bizarro formato da célula pode ser devido a múltiplas gemulações em diferente(s) plano(s) de corte.

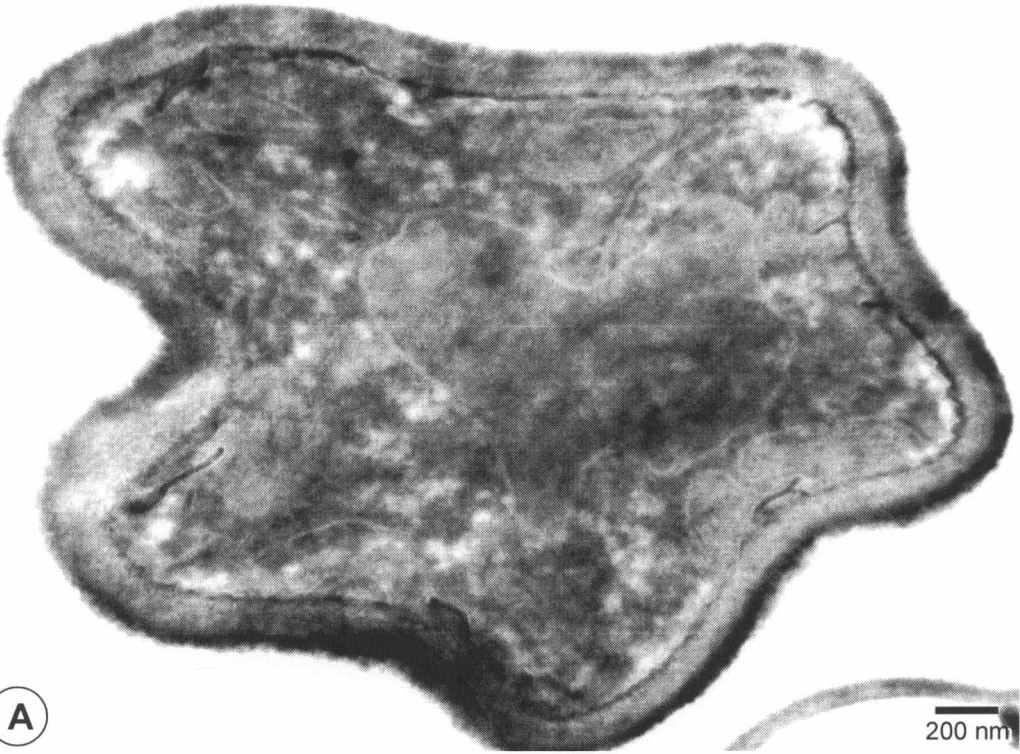
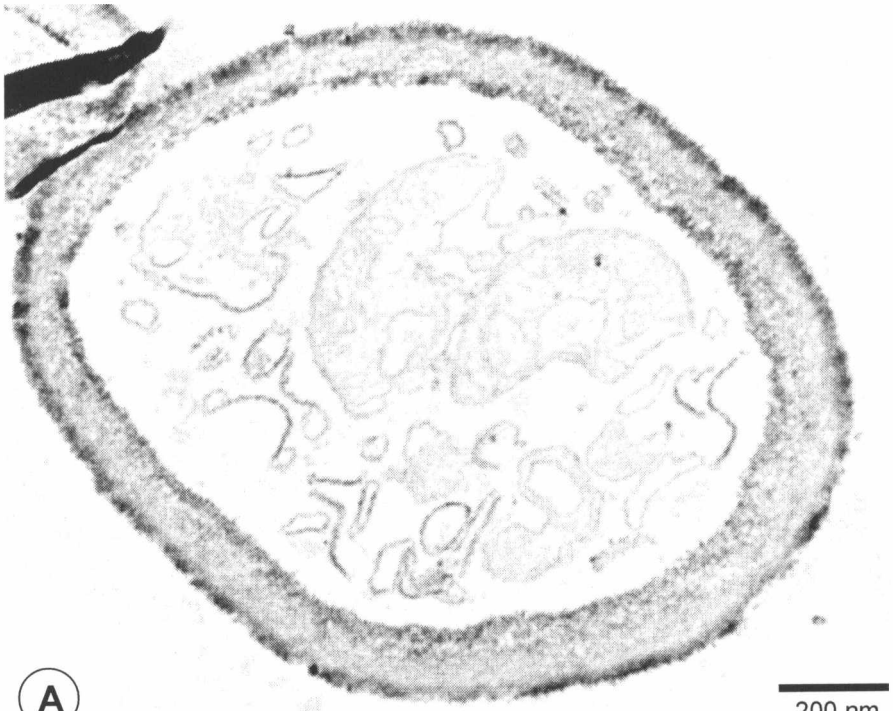
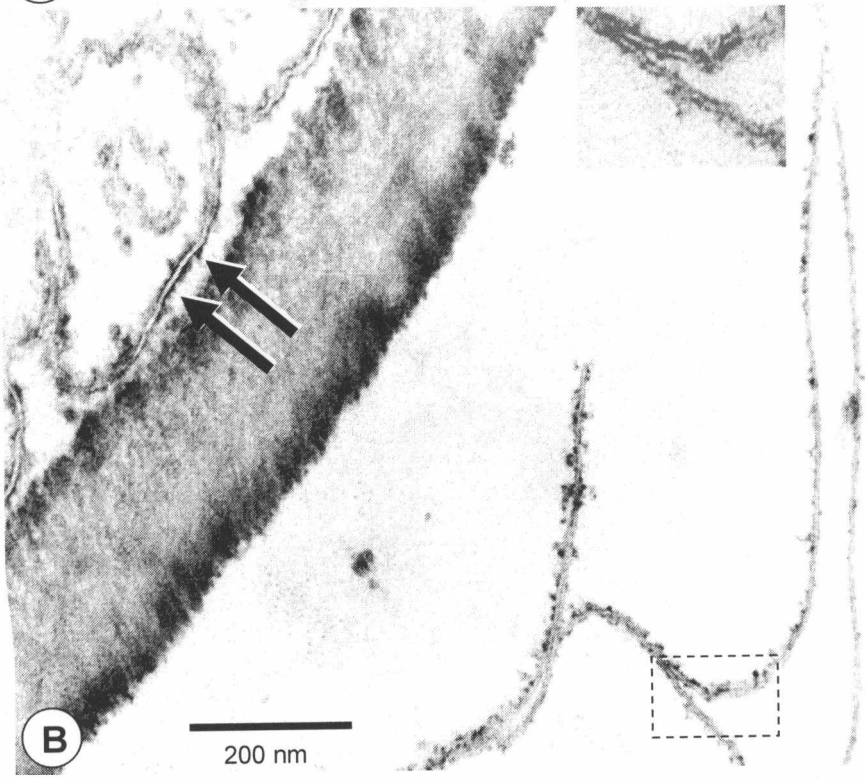


Figura 20. Microscopia Eletrônica de Transmissão de *C. albicans* tratadas por 24h com 150 μ M de DETC – (A) Célula apresentando acentuada extração e desorganização citoplasmática. (B) Foram visualizados perfis de membrana extracelulares “*vide inset*” com precipitados eletrondenso semelhantes a os encontrados no interior das células (setas), presumivelmente derivados de células rompidas.



A

200 nm



B

200 nm

Figura 21. Microscopia Eletrônica de Transmissão de *C. albicans* tratadas por 24h com 100 μ M de DETC – (A-C) Fragmentos de membranas extracelulares freqüentemente aderem-se a células bem preservadas. Observar área eletróluscente (*) na matriz mitocondrial “inset”.

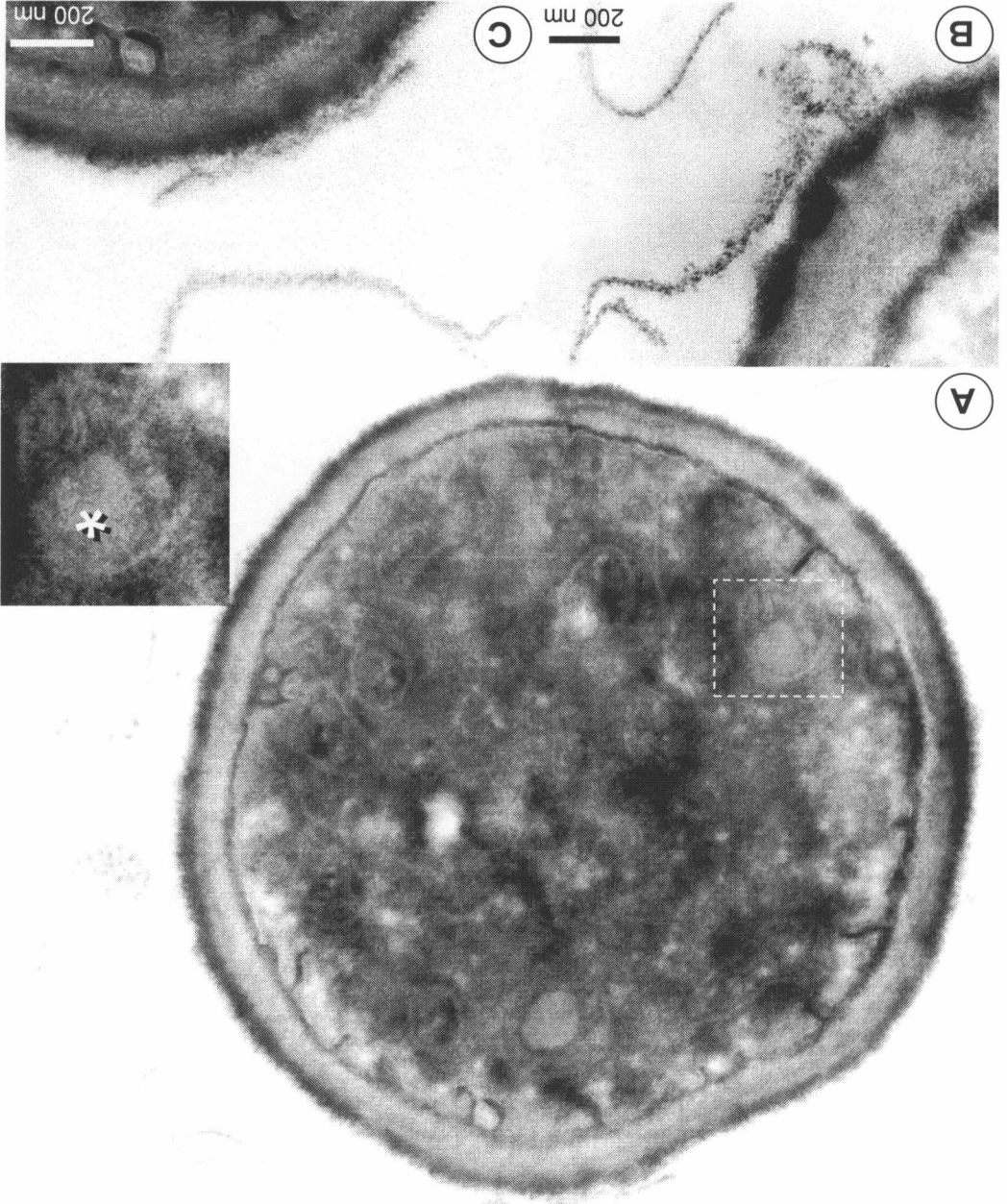


Figura 22. Microscopia Eletrônica de Transmissão de *C. albicans* tratadas por 24h com 150 μ M de DETC – O tratamento ocasionou alterações compatíveis com a indução de processo autofágico (A-F). A célula mostrada na Fig. A apresenta numerosos vacúolos (v), sendo que alguns demonstram material membranar luminal (B). Foram vistas inclusões lipídicas de aspecto heterogêneo (C) e envoltas por cisterna de retículo endoplasmático (D). Foram vistas grandes vesículas contendo material amorfo, gotículas lipídicas, perfis de membrana (E) e figuras de mielina (F).

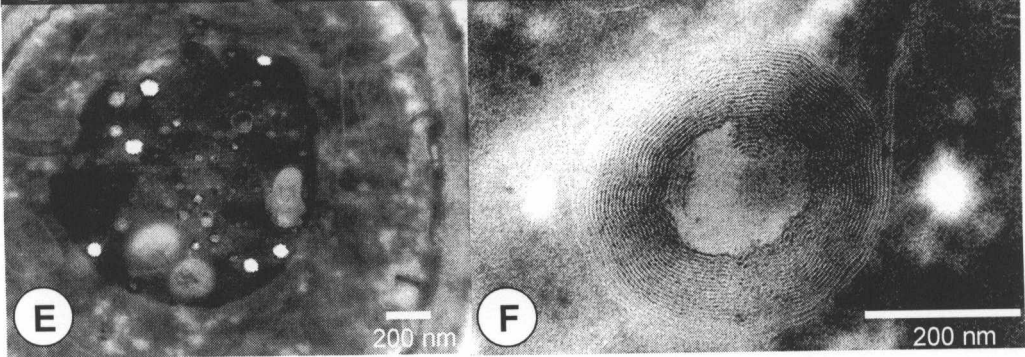
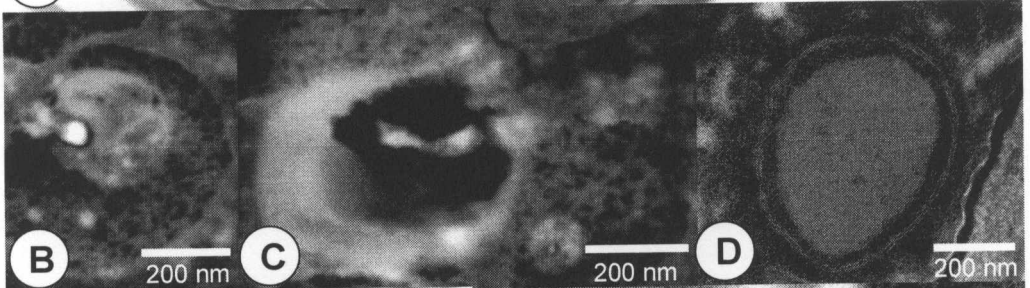
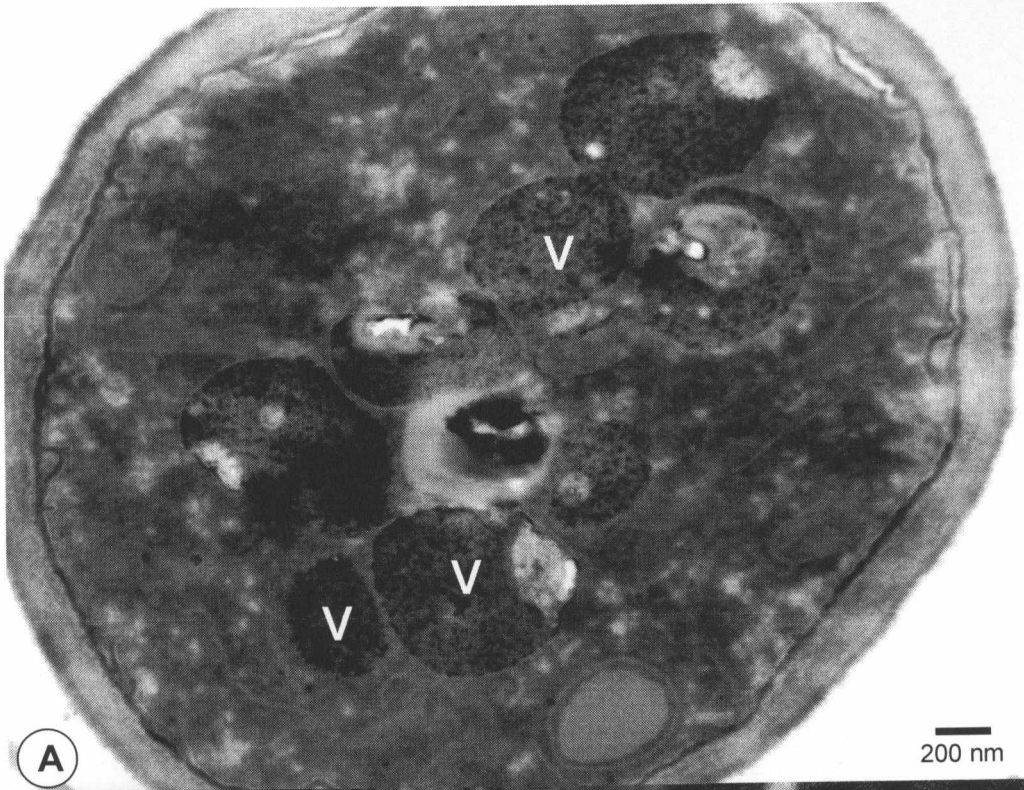


Figura 23. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Candida albicans* - No controle (A-B) as leveduras apresentaram-se oblongadas e eventualmente esféricas e de superfície lisa, Pode-se verificar também, células em processo de divisão (setas). Em algumas podem-se observar superfícies com algumas ondulações (B cabeça de seta). Em células incubadas com 115 μ M de DETC por 24hs (C) foi observada a presença de material amorfo (seta) de aparência floculenta em associação com as células.

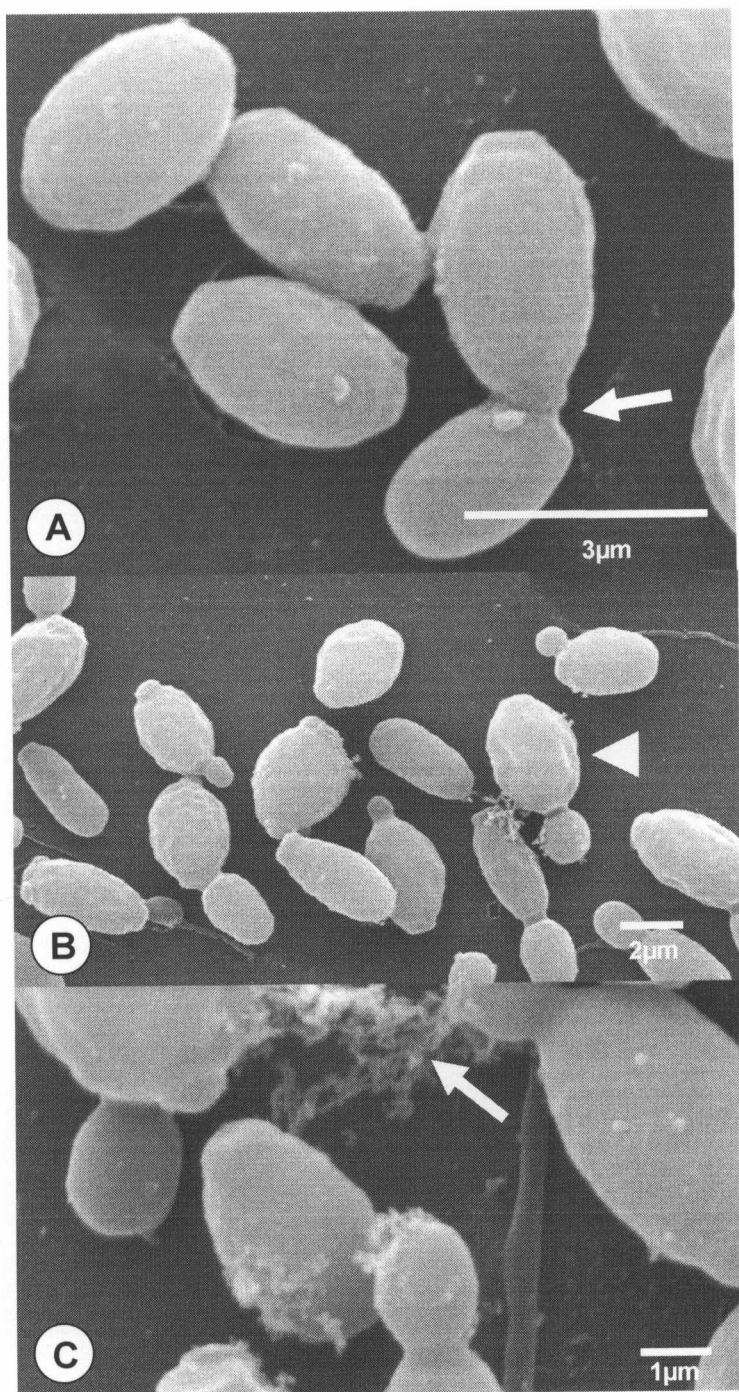


Figura 24. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Candida albicans* - Comparação do processo de adesão a lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina. Aparentemente pode-se observar maior número de células aderidas no controle (A) e nas incubadas apenas com 20 nM de Anfotericina B (B) em relação à combinação 20 nM de anfotericina B e 115 μ M de DETC (C). Adicionalmente, nota-se maior número de formas de pseudo-hifas nas células tratadas com Anfotericina B (B).

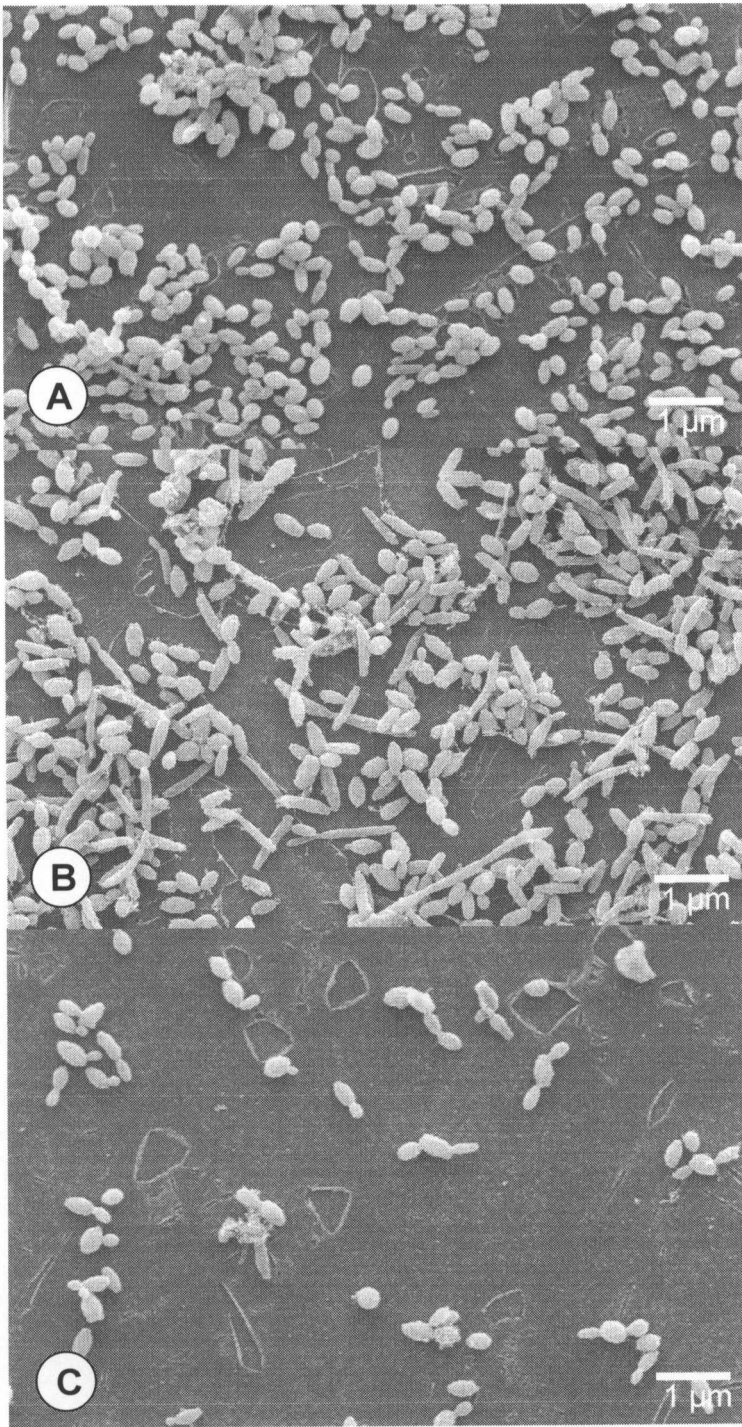
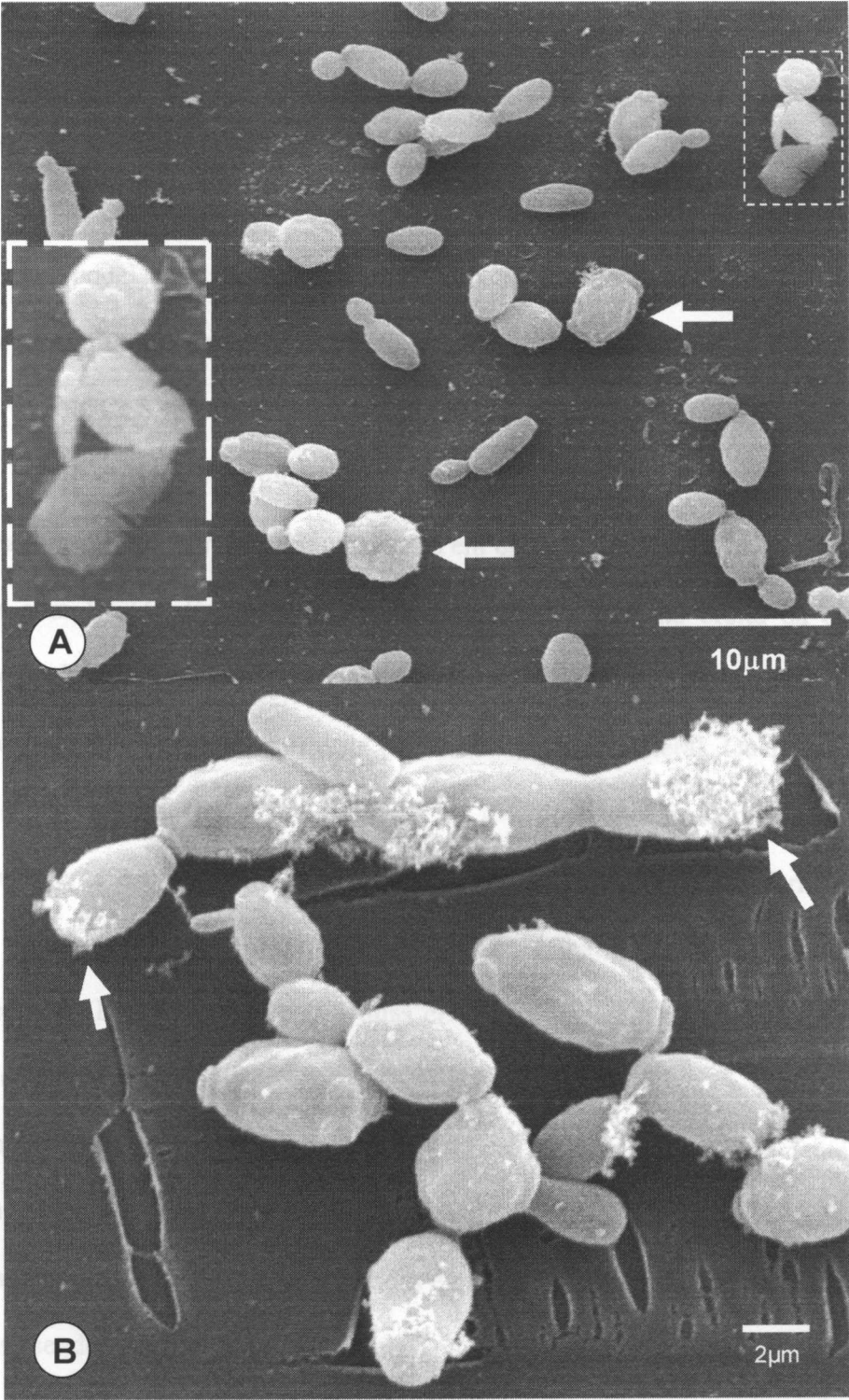


Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Candida albicans* - Leveduras tratadas com 115 μ M de DETC (A), apresentaram algumas células com alteração de sua forma (setas), apresentando-se por vezes onduladas e rompidas (inset). Na combinação de 115 μ M de DETC associado a 20 nM de anfotericina B (B), houve uma agregação de material de aparência fibrilar (setas) sobre a superfície das leveduras, localizando-se preferencialmente nas extremidades destas.



5. DISCUSSÃO

Testes de susceptibilidade de *C. albicans* podem ajudar a identificar alvos farmacológicos em potencial para a quimioterapia da candidíase. A abordagem celular/subcelular pode auxiliar na elucidação do modo de ação destes compostos, possivelmente presumindo o desenho de drogas e/ou regimes mais eficientes.

Apesar do NCCLS recomendar como meio sintético para os testes de susceptibilidade antifúngica o RPMI – 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) tamponado a pH 7,0 com MOPS, neste caso em específico ele não foi o mais adequado para os testes com DETC. É possível que esta grande diferença no efeito da droga, seja ocasionada pelo elevado teor de L-cistina no meio RPMI (1mg/L). A cisteína é um dos aminoácidos que possui um grupo sulfidril (-SH) na sua cadeia lateral. Quando exposta ao oxigênio a cisteína oxida-se formando cistina. Esta tem um papel fundamental no interior celular, cujo ambiente é tipicamente redutor, mantendo as cisteínas na sua forma reduzida, dessa forma, limitando a ação pró-oxidante do DETC. Cabe ainda ressaltar que a forma encontrada no meio (L-cistina) refere-se a duas cisteínas ligadas por ponte dissulfeto o que vem a potencializar o seu efeito.

Já com relação ao meio BHI, por se tratar de um meio complexo, altamente rico em proteínas, houve como esperado um maior crescimento das leveduras quando comparado ao RPMI, no entanto, com relação às células tratadas é provável que a droga tenha associado-se a estas proteínas, sendo assim internalizada pela célula com maior eficiência, ou, de forma

contrária tenha impedido a internalização das mesmas. Neste sentido vale salientar que a via endocítica pode constituir um importante mecanismo de entrada de drogas microbicida (Jones *et al.*, 2003). Contudo, a eficácia da droga em meio complexo é de grande importância, porque melhor mimetiza o ambiente encontrado na infecção do hospedeiro, muito mais rico tanto em concentração quanto em variedade de proteínas.

O DETC, metabólito do dissulfiran, é um potente agente quelante de metal que exerce seu papel fundamentalmente inibindo a Cu/Zn SOD, enzima essencial na prevenção à lesão oxidativa de membranas, proteínas e DNA de *C. albicans* produzido pelo radical superóxido. Os testes de susceptibilidade *in vitro* para determinação do MIC mostraram que a droga tem seu efeito antiproliferativo reduzido à metade a cada 24hs, sendo o MIC em 48hs de cultivo duas vezes o valor encontrado em 24hs. O mesmo comportamento também foi encontrado nas curvas de proliferação, onde a partir de 24hs de cultivo houve um aumento pronunciado na maioria das concentrações, principalmente em 150 μ M, coincidentemente a concentração mais próxima à do MIC (156,2 μ M). Provavelmente, após 24hs de cultivo houve uma perda de sua atividade, a qual tem mostrado um efeito dose-dependente, uma vez que o mesmo, não aconteceu em 500 μ M da droga. Ou de outro modo, é possível que a atividade cistosólica da Cu/Zn SOD tenha aumentado significativamente conferindo a *C. albicans* uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo como demonstrado para o H₂O₂ e menadiona (Jamieson *et al.*, 1996), no entanto, outros experimentos são necessários para a sua comprovação. Em *C. albicans* a Cu/Zn SOD possui atividade ótima em 40°C e pH 7, onde o máximo de sua atividade é encontrado com 72hs de cultivo (Gunasekaran *et al.*, 1998), sendo por isso,

essencial à dosagem de atividade da Cu/Zn SOD e um acompanhamento do cultivo de pelo menos 120hs.

A morte celular necrótica por estresse oxidativo é algo bem documentado. No entanto, várias observações sugerem que ERO possam atuar como mensageiros químicos na ativação transcricional via receptor, capaz de induzir o processo de morte celular programada.

A apoptose é mediada por uma cascata de proteases baseada em cisteína denominada caspases. Estas, estão inicialmente presentes nas células como zimógenos inativos, até o momento em que as caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9) clivem pro-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (caspase-3 e caspase-7), por sua vez clivam outros substratos protéicos da célula, resultando no processo apoptótico.

A ativação de caspases pode ser desencadeada por vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose; na via intrínseca, vários sinais extracelular e intracelular, tais como o estresse oxidativo, podem desencadear a liberação do citocromo C no espaço intermembranar mitocondrial, induzindo a formação do complexo apoptótico, que recruta a caspase 9 promovendo ativação das caspases; a via extrínseca é ativada pela união de ligantes, tais como FasL e fator de necrose tumoral α (TNF- α) a seus receptores na superfície celular, o que resulta no recrutamento da caspase 8 e ativação da cascata de pro-caspases. A via mitocondrial é regulada por membros da família Bcl-2, os quais incluem proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas, tais como a Bcl-2 e a Bax que respectivamente reprimem ou estimulam a apoptose.

O etoposídeo é um inibidor da topoisomerase II, que desencadeia ativação intrínseca de caspases envolvendo perturbações mitocôndriais, enquanto TNF- α é uma citocina que promove ativação extrínseca de caspases, não necessariamente envolvendo a mitocôndria. Ambos processos apoptóticos dependem da produção em alto nível de ERO seguido de distúrbio das mitocôndrias, tais como translocação de Bax, liberação do citocromo C e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Na indução de apoptose em células HeLa, pela adição de TNF- α ou etoposídeo, o DETC tem demonstrando propriedades antiapoptóticas inibindo fortemente a redução do potencial de membrana e a ativação de caspases, enquanto que, na ausência do TNF- α ou etoposídeo o mesmo desencadeou a translocação de Bax e citocromo C. A ação do DETC em Bax e citocromo C é dependente de ERO e modulada por vários agentes redutores, tais como ditiotreitol (Dumay *et al.*, 2006). Provavelmente o DETC inibe diretamente as caspases pela formação de pontes dissulfeto como já demonstrado para o dissulfiran.

A autofagia é a maior via de degradação e reciclagem de proteínas e organelas citoplasmáticas. Semelhante a apoptose, a autofagia é essencial na regulação de parte do crescimento e manutenção da homeostasia de organismos multicelulares. A formação de vacúolos autofágicos também é ativada em resposta adaptativa a uma variedade de estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo deprivação de nutrientes, hormonal, procedimentos terapêuticos e infecções bacterianas (Kelekar, 2005).

A autofagia contribui para manutenção da homeostasia celular por sua continuada renovação de grandes proteínas e organelas danificadas, tais como mitocôndria, complexo de

Golgi, retículo endoplasmático e ainda o núcleo, de modo similar ao sistema proteolítico de reciclagem ubiquitina-proteossoma. Esta função ajuda na manutenção da variedade de aminoácidos pela gliconeogênese e síntese proteínas essenciais durante o período de privação. Adicionalmente, pode ser via de escolha quando necessária a eliminação de células para manutenção da homeostasia.

Na resposta adaptativa a fatores limitantes do crescimento, a autofagia tem como função retirar proteínas e organelas não funcionais do citoplasma. Neste processo, a presença de nutrientes por si só, não garante a sua inibição, como foi demonstrado, fator de crescimento que permitem as células expressar em sua superfície transportadores de nutrientes também são essenciais (Shintani & Klionsky 2004). Além disto, esta também pode promover atividade protetora na infecção por bactérias e vírus.

A indução de processo autofágico em *C. albicans* foi observado após a exposição a baixas concentrações de fluconazol (Pancaldi *et. al.*, 1994). Porém, em nossos resultados a ultraestrutura de leveduras tratadas com 150 μ M de DETC apresentaram uma morfologia compatível à autofagia, múltiplos corpos vesiculares contendo material amorfo de diferentes níveis de compactação e eletrondensidade, bem como material eletrolucente, de natureza presumivelmente lipídica e por vezes, a presença de figuras de mielina. Porém, novos experimentos com abordagem citoquímica serão realizados para confirmação dos resultados.

O estudo por microscopia eletrônica em leveduras foi inicialmente descrito por Agar e Douglas (1957). No entanto, o processamento das amostras ainda não apresenta preservação da amostra desejável, necessitando de modificações nas etapas de fixação e inclusão. Até

1970, apenas o permanganato de potássio era conhecido na preservação de estruturas membranosas em leveduras, e estas mostravam a unidade bilaminar das membranas com alta eletrondensidade. O estudo ultraestrutural de leveduras teve uma nova fase com a fixação em glutaraldeído, tetróxido de ósmio e digestão enzimática da parede com zimolase (Kitamura *et al.*, 1971). Nos casos em que é feita a pré-fixação com glutaraldeído seguida da digestão enzimática da parede celular, a fixação de componentes nucleares com tetróxido de ósmio é reduzida, e estruturas membranosas permanecem obscuras (Osumi, 1998). Portanto, algumas vezes o limite das membranas de algumas organelas, tais como membrana nuclear, mitocondrial, vacúolos e retículo endoplasmático são vistas em contraste negativo.

Apesar dos recentes avanços no tratamento de infecções fúngicas invasivas, com os azóis de segunda e terceira geração (Ghannoum *et al.*, 2002), mantém-se as altas taxas de mortalidade (30-80%), permitindo com isso, o estudo de novas abordagens terapêuticas, como o uso combinado de drogas. Esta, em alguns casos, trouxe um forte potencial terapêutico, como é o caso da anfotericina B e flucitosina, combinação largamente aceita no tratamento de neuromeningite criptocócica em pacientes HIV-positivos. No entanto, ainda existem poucos estudos conclusivos (Fohrer *et al.*, 2006).

A terapia combinada de drogas pode ter como benefícios a inibição de diferentes estágios de uma mesma via bioquímica, aumentar a penetração de um agente pela ação do outro na membrana ou parede celular, ação em diversos alvos moleculares, complementação farmacocinética, interação de transporte, redução da toxicidade com diminuição das doses individuais e diminuição do tempo tratamento.

A combinação de agentes antifúngicos pode, entretanto ter um efeito antagonista, a exemplo da anfotericina B e azóis, como aumentar a toxicidade.

A terapia combinada pode ter seu efeito diminuído nas condições em que haja competição por alvos iguais; a modificação do alvo por um dos agentes antifúngicos pode diminuir a susceptibilidade ao outro agente (como proposto entre anfotericina B e azóis); a interação pode aumentar a toxicidade de um dos agentes (*e.g.* injúrias renais causada pela anfotericina B, levando a uma diminuição do “clearance” da flucitosina) potencializando a hematoxicidade. Além de tudo, o sucesso dos testes de susceptibilidade *in vitro* nem sempre é garantia de resposta nos pacientes (Fohrer *et al.*, 2006).

No que se refere à associação entre o DETC e anfotericina B, esperávamos como foi confirmado um efeito sinérgico, uma vez que estes fármacos não competem pelo mesmo alvo, a anfotericina B pode estar favorecendo a entrada em maior quantidade do DETC potencializando seu efeito fungicida. Por outro lado, a anfotericina B também aumenta a produção de superóxido em macrófago (Okamoto *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 1991), potencializando ainda mais a ação do DETC.

6. CONCLUSÕES

O DETC pode ser empregado em um modelo experimental para o estudo de estresse oxidativo em *Candida albicans*. Este composto tanto apresenta efeito fungicida *in vitro*, em condições axênicas, quanto promove esta atividade em macrófagos peritoneais murinos. O cultivo de *C. albicans* com este composto induziu o processo autofágico, associado com a inibição na proliferação e redução da viabilidade deste fungo. Observamos efeito sinérgico quando o tratamento axênico foi combinado com anfotericina B. Os fagócitos profissionais constituem uma das principais fontes de estresse oxidativo para este patógeno, sendo assim, uma vez que ajustadas às devidas condições experimentais, será possível obter combinações com atividade fungicida associada a efeitos ainda mais sinérgicos em macrófagos e *in vivo*. Portanto, a eficácia das combinações *in vitro* sugere resultados promissores no tratamento da candidíase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agar H D, Douglas H C 1957. Studies on the cytological structure of yeast: electron microscopy of thin sections. *J Bacteriol* 73(3): 365-75.
- Alexander J W, Boyce S T, Babcock GF 1990. The process of microbial translocation. *Annals of Surgery* 212: 496-510.
- Anttila V J, Elonen E, Nordling S, Sivonen A, Ruutu T, Ruutu P 1997. Hepatosplenic candidiasis in patients with acute leukemia: incidence and prognostic implications. *Clin Infect Dis* 24: 375-380.
- Aust SD, Miller DM, Samokyszyn VM. 1990. Iron redox reactions and lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:457-63.
- Babior BM. 1997. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 30(2):141-55.
- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *American Journal of Medicine* 91: 86S-89S.
- Beck-Sague CM, Jarvis WR 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 167: 1247-1251.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar; 62(1): 130-80.
- Caticha O, Odell WD 1994. Characterization and purification of the chorionic gonadotropin-like protein binding site in *Candida albicans*. *Endocrin Res* 20: 1-19.
- Chanock S 1993. Evolving risk factors for infectious complications of cancer therapy. *Hematol Oncol Clin North Amer* 7: 771-793.
- Cohen MV. 1989. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann Intern Med.* 111(11): 918-31.
- Colombo AL 2000. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazil *Journal of Infectious Diseases* 4: 113-118.

- Colombo A L, Guimarães T 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. 36(5): 599-607.
- Debusk CH, Daud R, Thirumoorthi MC, Wilson FM, Khatib R 1994. Candidemia: current epidemiologic characteristics and a long-term follow-up of survivors. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 26: 697-703.
- Denning DW 1991. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. J Antimicrob 28: 1-16.
- Delgado W, Aguirre JM 1997. Las micosis orales em era del SIDA. Ver Iberoam Micol 14: 14-22.
- Drago L, Mombelli B, De Vecchi E, Bonaccorso C, Fassina MC, Gismondo MR 2000. *Cândida albicans* cellular internalization : a new pathogenic factor? Int J Antimicrob Agents 16:545-547
- Dumay A, Rincheval V, Trotot P, Mignotte B, Vayssiere JL. 2006. The superoxide dismutase inhibitor diethylthiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. Free Radic Biol Med. 40(8):1377-90
- Dupont B, Denning DW, Marriot D, Sugar A, Viviani MA, Sirisanthana T 1994. Mycoses in AIDS Patients. Mycoses in AIDS patients. J Med Vet Mycol 65-77.
- Eggimann P, Garbino J, Pitter D 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 3: 685-702.
- Ellis D 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother. 49(1):1:7-10.
- Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress.1997. Rev Assoc Med Bras. Jan-Mar;43(1):61-8
- Fohrer C, Fornecker L, Nivoix Y, Cornila C, Marinescu C, Herbrecht R 2006. Antifungal combination treatment: a future perspective. Int J Antimicrob Agents. Review Suppl 1:25-30.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases.1995. Annu Rev Biochem. 64:97-112.

- Georgopapadaku N H and Walsh T J 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens 264: 371-373.
- Ghannoum MA, Kuhn DM 2002. Voriconazole -- better chances for patients with invasive mycoses. Eur J Med Res 31;7(5):242-56.
- Gunasekaran U, Yang R, Gunasekaran M. 1998. Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Candida albicans*. Mycopathologia 141:59-63.
- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(3):401-5.
- Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. 2002. Microbiology. Nov;148(Pt 11):3705-13
- Horowitz Bj, Edelstein SW, Lippman L, 1984. Sugar chromatography studies in recurrent *Candida* vulvovaginitis. J Reprod Med 29:441.
- Jamieson DJ, Stephen DW, Terriere EC. 1996. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 138(1):83-8
- Jarvis WR 1995. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 20:1526-1530.
- Kauffman CA, Bradley SF, Ross SC, Weber DR, 1991. Hepatosplenic candidiasis: successful treatment with fluconazole. Am J Med 91: 137-141.
- Kelekar A 2005. Autophagy. Ann N Y Acad Sci. 1066:259-71.
- Kitamura K, Kaneko T, Yamamoto Y 1971. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. Arch Biochem Biophys 145(1): 402-4.
- Lecciones J, Lee J, Navarro E 1992. Vascular catheter-associated fungemia in patients with cancer: analysis of 155 episodes. Clin Infect Dis 14: 875-883.
- Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Perea S, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, and Patterson TF 1999. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of

oropharyngeal candidiasis in human immuno-deficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 43: 1621-1630.

Lum J J, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120(2):237-48.

Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Kamai Y, Uchida K and Yamaguchi H 2003. Proliferation of intracellular structure corresponding to reduced affinity of fluconazole for cytochrome P-450 in two-susceptibility strains of *Candida albicans* isolated from a Japanese AIDS patient. *Microbiol Immunol* 47(2): 117-124.

Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Uchida K, Mori T, Yamaguchi HA novel mechanism of fluconazole resistance associated with fluconazole sequestration in *Candida albicans* isolates from a myelofibrosis patient. 2002. *Microbiol Immunol.* 46(5):317-26.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 8(1):95-108.

Miller SE, Spurlock BO and Michaels GE 1974. Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydospores. *Journal of Bacteriology* 119: 992-999.

Nair R and Samaranayake LP 1996. The effect of oral commensal bacteria on *Candidal* adhesion to human buccal epithelial cells. *J Med Microbiol* 45:179-185.

Nohmi T, Abe S, Dobashi K, Tansho S, Yamaguchi 1995. Suppression of anti-*Candida* activity of murine neutrophils by progesterone in vitro: a possible mechanism in pregnant women's vulnerability to vaginal candidiasis 39: 405-409.

Okamoto Y, Aoki S, Mataga I 2004. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. *Mycopathologia* 158 (1):9-15.

Osumi M 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 29(2-3):207-33.

Pancaldi S, Dall'Olio G, Poli F, Fasulo MP. 1994 Stimulation of the autophagic activity in blastospores of *Candida albicans* exposed in vitro to fluconazole. *Microbios.*;80 (322):55

Patel R 1998. Symposium on antimicrobial agents: part III-amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin Proc* 1205-1225.

- Paya CV 1993. Fungal Infections in Solid-Organ Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 16: 677-788.
- Pfaller MA 1994. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis* 19 (Suppl.1): S8-S13.
- Pollock JJ, Denepitiya L, MacKay BJ and Iacono VJ 1984. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich-polypeptides on *Candida albicans*. *Infect Immun* 44: 702-707
- Raad I and Bodey G 1992. Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin Infect Dis* 15: 197-210.
- Reed BD 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Surv* 47:551-560
- Reszel E, Mishra S, Mishra J, Mishra A, Pierson D 1993. Stress, immunity and mucocutaneous candidiasis. *J Osteopath Med* 7: 26-28.
- Samaranayake LP, Calman KC, Ferguson MM, Kaye SB, MacFarlane TW, Main B, Welsh J and Willox J 1984. The oral carriage of yeasts and coliforms in patients on cytotoxic therapy. *J Oral Pathol* 13: 390- 393.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC and So M. 1997. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMS* 105: 875-883.
- Sauna ZE, Peng XH, Nandigama K, Tekle S, Ambudkar SV 2004. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked atp binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol. Pharmacol* 65: 675-684.
- Senet Jean-Marcel 1997. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 14: 6-13.
- Shintani T, Klionsky DJ 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306(5698):990-5.
- Shukla S, Sauna ZE, Prasad R, Ambudkar SV. 2004 Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 322(2):520-5.
- Spnillo A, Capuzzo E, Nicola S, Baltaro F, Ferrari A, Monaco 1995. The impact of oral contraception on vulvovaginal candidiasis. *Contraception* 51: 293-297.

- Tallarida RJ 1992. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain* 49(1): 93-7.
- Tobgi ST, Samaranayake LP and MacFarlane 1987. The in vitro susceptibility of *Candida* species to lysozyme. *Oral Microbiol Immunol* 2: 1-4.
- Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Umazume M 1994. Influence of inductive chemoradiotherapy on salivary polymorphonuclear leukocyte (SPMN) functions in oral cancer. *J Oral Med* 23: 418-422.
- Vannier-Santos MA, Lins U. Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa. 2001. *Biol Proced Online*. Aug 4;3:8-18.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, Lins U, Urbina JA, Borges VM, de Souza W. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania* acidocalcisomes. 1999 *Microbiology*. Nov;145 (Pt 11):3213-20
- Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, de Souza W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. 1995 *J Eukaryot Microbiol*. Jul-Aug;42(4):337-46.
- Wenzel RP 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases* 20: 1531-1534.
- Wilson E, Thorson L, Speert DP 1991. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 35(5):796-800.
- Wingard JR 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* ; 20: 115-125.
- Yong V, Schmitz V, Vannier-Santos MA, de Lima AP, Lalmouach G, Juliano L, Gauthier F, Scharfstein J. Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. 2000. *Mol Biochem Parasitol*. Jun; 109(1):47-59
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. 1996. *Biochem J*. Sep 15318 (Pt 3):889-96.