

Diego Conrado Pereira Rossi

**Estudo terapêutico da gomesina em
camundongos com candidíase
disseminada e vaginal**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Diego Conrado Pereira Rossi

**Estudo terapêutico da gomesina em
camundongos com candidíase
disseminada e vaginal**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rossi, Diego Conrado Pereira.

Estudo terapêutico da gomesina em camundongos com candidíase disseminada e vaginal / Diego Conrado Pereira Rossi. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Sirlei Daffre.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica, biologia celular e molecular e imunologia de artrópodos.

Versão do título para o inglês: Therapeutic study of gomesina in mice with disseminated and vaginal candidiasis.

Descritores: 1. Peptídeo antimicrobiano 2. Gomesina 3. Candidíase (tratamento) 4. *Candida albicans* 5. Antifúngicos I. Daffre, Sirlei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0174/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diego Conrado Pereira Rossi.

Título da Dissertação: Estudo terapêutico da gomesina em camundongos com candidíase disseminada e vaginal.

Orientador(a): Sirlei Daffre.

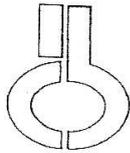
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 87 nas fls. 48 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Sirlei Daffre** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudo terapêutico da gomesina em camundongos infectados com Paracoccidioides brasiliensis e Candida albicans**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Diego Conrado Pereira Rossi, Alexandre Marques Ferreira e o pesquisador Carlos Pelleschi Taborda**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **25.09.2007**.

São Paulo, 26 de setembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais...

AGRADCIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de expressar a minha eterna gratidão aos meus pais. Sem eles eu não seria o que eu sou agora, e provavelmente essa dissertação não existiria.

Gostaria de agradecer à Sirlei por me escolher em seu laboratório e me orientar. Os anos que passei no Laboratório foram especiais e aprendi muito. Agradeço todos os momentos de paciência, ensinamentos, conselhos e puxadas de orelha.

Agradeço ao Carlos Taborda pela orientação e por ceder o seu laboratório para eu trabalhar. Agradeço por sempre estar presente e sempre me incentivar, além de mostrar que os fungos são bem mais legais do que eu pensava!!

Agradeço aos meus colaboradores que dedicaram um pouco do seu tempo para o meu trabalho:

À professora Bluma e sua equipe (IPEN/CNEN, SP) que me ajudaram com os ensaios de biodistribuição.

À professora Primavera e suas alunas (FCF-USP) que me ajudaram com os ensaios de toxicidade.

Ao Julian (Puti) pela dedicação e companheirismo e pelas longas horas no biotério, além de sua sincera amizade.

À Sueli Daffre pela ajuda na parte estatística.

Agradeço os técnicos que me auxiliaram na parte operacional do meu trabalho:

À Susana do nosso Lab. O pessoal dos biotérios da parasitologia e da microbiologia.

Agradeço aos amigos do laboratório que sempre estarão comigo:

À Fernanda pela a minha iniciação no Lab e por sempre me ajudar.

Ao Rodrigo por sempre estar ao meu lado em tudo, até mesmo em festas onde serviam Heineken a 20 °C!

Ao Carlos, a Eli e a Claudia que sempre me davam bons conselhos.

A Déia e a Maria Fernanda por me ajudarem com o meu texto e meu abstract, respectivamente.

Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos de fora que sempre me incentivaram.

Agradeço a Ju, que apesar de não entender o porquê que eu tinha que ficar no Lab até altas horas da noite ou no biotério aos finais de semana, sempre me ajudou e sempre esteve presente. Te amo!

Agradeço a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

RESUMO

ROSSI, D. C. P. **Estudo terapêutico da gomesina em camundongos com candidíase disseminada e vaginal.** 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Peptídeos antimicrobianos estão presentes em animais, plantas e microorganismos e fazem parte do sistema imune inato. A gomesina é um peptídeo antimicrobiano catiônico, purificado dos hemócitos da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Possui amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e células tumorais. *Candida albicans* é uma levedura comensal que faz parte da microbiota humana. Em pacientes imunossuprimidos este fungo pode causar infecções cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. O tratamento desta micose geralmente é feito com fluconazol, no entanto, casos de resistência a este fármaco vêm sendo reportados. Com o aparecimento de microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais, vários peptídeos antimicrobianos vêm sendo estudados a fim de se tornarem tratamentos alternativos. Entretanto há poucos dados na literatura sobre tratamentos com peptídeos antimicrobianos utilizando modelos experimentais murinos infectados com fungos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento com a gomesina em um modelo de candidíase disseminada e vaginal. Os tratamentos com 5 mg/kg e 15 mg/kg de gomesina mostrou ser eficaz no controle do fungo nos rins, baço e fígado dos animais infectados em relação ao controle, assim como os tratamentos com os cremes vaginais com gomesina a 0,2% e 0,5%. A avaliação da biodistribuição da gomesina marcada com tecnécio-99m mostrou que o peptídeo é captado em órgãos de tropismo do fungo como rins, baço e fígado. Em adição a ação direta antimicrobiana da gomesina, verificou-se um efeito imunomodulatório, pois seu tratamento aumentou as concentrações de IL-6, TNF- α e INF- γ dos rins dos animais com candidíase disseminada. Foram também realizados tratamentos com gomesina, fluconazol e a combinação destes em camundongos imunossuprimidos e infectados com o isolado 78 de *Candida albicans*. Os tratamentos com gomesina não aumentaram a sobrevivência dos animais em relação ao controle, sugerindo que a imunomodulação exercida pela gomesina deve ser importante para o controle da doença. Além disso, a gomesina não apresentou nenhum efeito tóxico para os animais. Os dados apresentados neste estudo reforçam o potencial da gomesina

para ser um agente antifúngico para aplicações terapêuticas em seres humanos e animais.

Palavras-chave: Peptídeo Antimicrobiano; Gomesina; Candidíase; *Candida albicans*; Tratamento *in vivo*; Antifúngico.

ABSTRACT

ROSSI, D. C. P. **Therapeutic study of gomesina in mice with disseminated and vaginal candidiasis.** 64 p. Master thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Antimicrobial peptides are present in animals, plants and microorganisms, being part of the innate immune system. The gomesin is a cationic antimicrobial peptide, purified from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. It has a broad spectrum of activity against bacteria, fungi, protozoa and tumor cells. *Candida albicans* is a commensal yeast that is part of the human microbiota. In immunocompromised patients this fungus can cause skin infections, and systemic disorders. The treatment of this mycosis is usually done with fluconazole although cases of resistance to this drug have been reported. With the emergence of microorganisms resistance to conventional antibiotics, several antimicrobial peptides have been studied in order to become alternative treatments. However, there are few data in the literature on treatment with antimicrobial peptides using experimental murine models infected with fungi. This study aimed to evaluate the effectiveness of treatment with gomesin in a model of disseminated and vaginal candidiasis. The treatments with 5 mg/kg and 15 mg/kg gomesin showed to be effective in controlling the fungus within the kidneys, spleen and liver of infected animals compared to the control as well as the treatment with vaginal creams with gomesin 0.2% and 0.5%. The evaluation of the biodistribution of gomesin labeled with technetium-99m indicated that the peptide is captured within tropism's organs to the fungus such as kidneys, spleen and liver. In addition to the direct antimicrobial action of gomesin, there was also found an immunomodulatory effect as its treatment increased concentrations of IL-6, TNF- α and INF- γ in the kidneys of animals with disseminated candidiasis. The use of combination therapies with gomesin and fluconazole in immunocompromised infected mice were also studied with 78 isolate of *Candida albicans*. The treatments with gomesin did not increase survival of animals compared to the control, suggesting that the immunomodulation exerted by gomesin could be important to control the disease. Moreover, the gomesin did not show any toxic effect to animals. The data presented in this study reinforce the potential of gomesin to be an antifungal agent for therapeutic applications in humans and animals.

Key words: Antimicrobial Peptide; Gomesina; *Candida albicans*, Candidiasis, Treatment *in vivo*; Antifungal.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: the american type culture collection
BHI: brain Heart Infusion
CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média
CLSI: clinical and laboratory standars
CVC: clorose Variegada dos Citros
DL-50: dose capaz de ocasionar 50% de morte
DMSO: dimetilsulfóxido
EDDA: ácido etilenodiaminodiacético
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS: exopolissacarídeos
HCM: hemoglobina corpuscular média
IFI: índice de fração inibitória
IL-6: Interleucina 6
INF- γ : interferon gama
MCI: mínima concentração inibitória
MOPS: 3-(N ácido sulfônico-propano-morfolino)
PAM(s): peptídeo(s) antimicrobiano(s)
PBS: tampão fosfato salino
RDW: variação do volume de hemácias
RMN: ressonância magnética nuclear
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
SDS: dodecil sulfato de sódio
TLR: toll-Like receptors
UFC: unidade formadora de colônia
VCM: volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Peptídeos antimicrobianos.....	16
1.2 Gomesina	19
1.2.1 Estrutura	19
1.2.2 Espectro de atividade	20
1.2.3 Estabilidade da gomesina em soro	22
1.2.4 Estudo da relação estrutura-atividade da gomesina.....	22
1.2.5 Mecanismo de ação da Gomesina	23
1.3 O gênero <i>Candida</i>	24
1.4 Candidíases	25
1.5 Tratamento	26
1.5.1 Azóis.....	27
1.5.2 Equinocandinas.....	27
1.5.3 Polienos	27
1.6 Resistência aos agentes antifúngicos.....	28
1.6.1 Resistência antifúngica aos derivados azólicos	28
1.6.2 Resistência antifúngica a equinocandinas	29
1.6.3 Resistência antifúngica a polienos.....	29
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Compostos antimicrobianos	31
3.2 <i>Candida albicans</i>	31
3.4 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	32
3.5 Infecções dos camundongos com <i>C. albicans</i>	33
3.6 Tratamento dos camundongos com compostos antimicrobianos	34
3.7 Dosagem de citocinas.....	35
3.8 Eritrograma e leucograma	35
3.9 Avaliação da biodistribuição da gomesina radiomarcada com tecnécio-99m em camundongos.....	36
3.10 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> da gomesina	38

4.2 Avaliação da atividade antifúngica da gomesina em camundongos com candidíase disseminada	38
4.3 Dosagem de citocinas dos rins dos camundongos tratados com gomesina	41
4.4 Padronização da carga fúngica no tratamento dos camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada.....	41
4.5 Avaliação da atividade antifúngica da gomesina em camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada.....	43
5 DISCUSSÃO	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que fazem parte do sistema imune inato de vertebrados e invertebrados, possuindo um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Mais de 850 peptídeos antimicrobianos já foram descritos em diversos grupos de eucariotos, tais como insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, plantas, pássaros, anfíbios, peixes e mamíferos (BULET *et al.*, 2004) (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>).

Em geral, os PAMs são moléculas de pequena massa molecular, variando de 1 a 10 kDa, e exibem um alto teor de aminoácidos básicos, que lhes conferem uma carga líquida positiva em pH 7,0. Os PAMs também possuem uma estrutura anfipática, apresentando regiões ricas em aminoácidos hidrofóbicos alternadas com regiões ricas em aminoácidos hidrofílicos. Assim, enquanto as cargas positivas dos aminoácidos básicos facilitam sua interação com as cargas negativas dos fosfolípidios de membranas biológicas, o seu caráter hidrofóbico facilita sua inserção na membrana, podendo promover a lise de microrganismos. Alguns peptídeos, no entanto, podem agir em alvos internos, ocasionando, por exemplo, a inibição da síntese de ácidos nucleicos e/ou de proteínas (BULET *et al.*, 2004; BROGDEN, 2005). Os PAMs podem provocar a morte rápida de diferentes microrganismos, tais como bactérias, fungos, protozoários e vírus. Além disso, esses peptídeos podem atuar contra células de eucariotos superiores como, por exemplo, células tumorais, levando-as a morte em questão de minutos (BROGDEN, 2005).

Além da ação direta dos PAMs sobre os microrganismos, os mesmos possuem função imunomodulatória como, por exemplo, a regulação das respostas inflamatórias de vertebrados. Os PAMs podem ativar “Toll-Like receptors” (TLR), e também podem regular a produção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas. Outras ações incluem o recrutamento e estímulo da proliferação dos linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, estimulando assim, a fagocitose e a liberação de prostaglandina. Os PAMs também podem atuar na diferenciação de células dendríticas e estimulam a angiogênese (BOWDISH *et al.*, 2005; MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007).

Dentre os PAMs com funções imunomodulatórias, podemos citar as defensinas humanas, tendo sido demonstrado que estes peptídeos agem como agentes quimiotáticos para linfócitos T CD4+ não ativados, T CD8+ e células dendríticas imaturas. As defensinas estimulam os mastócitos a secretarem histamina, facilitando a quimiotaxia através da diapedese (BEFUS *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000).

Os PAMs podem ser classificados em peptídeos lineares ou peptídeos cíclicos. Os peptídeos lineares não apresentam pontes de dissulfeto em sua estrutura. Dentre eles, encontram-se os peptídeos que assumem uma estrutura em α -hélice anfipática, após o contato com a membrana celular, como por exemplo, as cecropinas, as catelicidinas e as magaininas. Os PAMs cíclicos, diferentemente dos lineares, apresentam resíduos de cisteína engajados na formação de uma ou mais pontes de dissulfeto, podendo apresentar as extremidades amino e carboxi terminais abertas ou fechadas. Dentro desse grupo destacam-se as defensinas e as protegrinas (BULET *et al.*, 2004).

O interesse pelo uso de peptídeos antimicrobianos como alvos para o desenvolvimento de uma nova geração de antibióticos aumentou ao longo dos últimos anos, devido ao surgimento de um grande número de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais. Algumas características tornam o tratamento com PAMs atraente como alternativa terapêutica, por exemplo: ação direta contra microrganismos, possibilidade da combinação com antimicrobianos convencionais a fim de promover, efeito aditivo ou sinérgico, ação imunomodulatória e ação neutralizadora sobre endotoxinas, prevenindo as complicações associadas às mesmas (MIRANDA *et al.*, 2008). Os PAMs apresentam, em geral, uma farmacocinética acelerada, exibindo uma alta taxa de excreção e uma rápida depuração da circulação com conseqüente penetração em tecidos extravasculares, facilitando assim, o seu acúmulo nos sítios de infecções. Através da marcação radioativa com Tecnécio-99m, a biodistribuição dos PAMs e o diagnóstico de sítios de infecções já foram analisados em tempo real *in vivo* por cintilografia (WELLING *et al.*, 2001; LUPETTI *et al.*, 2003).

Atualmente, o grande desafio é associar as vantagens que os PAMs oferecem e diminuir seus efeitos tóxicos para o desenvolvimento de antibióticos eficientes. Muitas empresas de biotecnologia têm interesse nessa perspectiva e, com isso,

existem diferentes PAMs sendo investigados em programas de pesquisa clínica, tais como:

- Plectasina (Novozymes): é uma defensina isolada do fungo *Pseudoplectania nigrella*, a qual exibe atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* resistente a antibióticos convencionais. O desenvolvimento da plectasina como agente terapêutico encontra-se na fase pré-clínica (MYGIND *et al.*, 2005);
- MBI-226 (Migenix): é um peptídeo catiônico com 12 aminoácidos, tendo sido sintetizado com base na estrutura da indolicidina bovina, com a finalidade de aplicações tópicas em biofilmes de cateteres. Atualmente, o MBI-226 encontra-se na fase clínica III (MIRANDA *et al.*, 2008);
- Protegrina PG-1 (Intrabiotics): A protegrina foi isolada de neutrófilos suínos, sendo que o sucesso da fase clínica II para o tratamento de infecções causadas pelas bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente ao antibiótico metilina (ZAIUO, 2007);
- HLF1-11 (AM-Pharma): é um peptídeo correspondente aos primeiros 11 aminoácidos da lactoferrina humana. O HLF1-11 é efetivo *in vivo* contra vários fungos e bactérias, incluindo cepas resistentes a antibióticos. O HLF1-11 passou com segurança pela fase clínica I e atualmente está sendo encaminhado para fase clínica IIa contra infecções que ocorrem em transplantes de medula óssea e também para tratamentos de infecções nosocomiais associadas a *S. epidermidis*, *S. aureus* e *C. albicans* (MIRANDA *et al.*, 2008).

1.2 Gomesina

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Os estudos realizados com a hemolinfa desta aranha resultaram na purificação e identificação de três peptídeos com atividade antimicrobiana: theraphosinina (4.052Da) (SILVA *et al.*, 2000; PEREIRA, 2005), gomesina (2.270Da) (SILVA *et al.*, 2000) e duas isoformas da acanthoscurrina (10.111 Da e 10.225 Da) (LORENZINI *et al.*, 2003). Dentre estes peptídeos, apenas a theraphosinina foi purificada da hemolinfa livre de células, enquanto os outros dois foram isolados dos hemócitos. Um quarto composto antimicrobiano, a mygalina (417 Da), uma acilpoliamina, também foi purificada dos hemócitos de *A. gomesiana* (PEREIRA *et al.*, 2007).

1.2.1 Estrutura

A gomesina é um peptídeo catiônico cíclico que apresenta 18 resíduos de aminoácidos (ZCRRLCYKQRCVITYCRGR) e duas pontes de dissulfeto (Cys2-Cys15 e Cys6-Cys11). Sua seqüência primária mostrou-se similar a de outros PAMs, como os integrantes da família das taquiplesinas e das polifemusinas de limúlídeos, a androctonina do escorpião *Androctonus australis* e a protegrina PG-1 de suínos (SILVA *et al.*, 2000).

A análise da estrutura tridimensional da gomesina por ressonância magnética nuclear (RMN) demonstrou que este peptídeo possui duas folhas β -pregueadas antiparalelas, conectadas por uma volta β e estabilizada por duas pontes de dissulfeto. A gomesina apresenta ainda uma estrutura anfipática bem definida (MANDARD *et al.*, 2002).

1.2.2 Espectro de atividade

1.2.2.1 Antibacteriano

Foi demonstrado que a gomesina possui uma alta atividade contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Das 27 cepas de bactérias testadas somente três não foram suscetíveis a gomesina, sendo que 50% das cepas de bactérias suscetíveis a gomesina apresentaram mínima concentração inibitória (MCI) inferior a 1,56 μM , 42% apresentaram MCI entre 1,56 μM e 6,25 μM e 3% apresentaram MCI entre 6,25 μM e 12,5 μM (SILVA *et al.*, 2000). Em outro estudo realizado em colaboração com a Dra. Vanda Magalhães (Hospital Albert Einstein), verificou-se que a gomesina apresentou um grande potencial antimicrobiano sobre várias cepas de bactérias resistentes a antibióticos utilizados atualmente. As cepas isoladas de pacientes estudadas foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complexo, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* complexo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Todas as cepas foram sensíveis à gomesina em concentrações inferiores a 12,5 μM , exceto a *B. cepacia* que foi resistente em concentrações maiores que 100 μM (SOUZA *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Antifúngico

Foi observado que a gomesina possui ação contra uma grande variedade de fungos, tendo sido obtidos valores de MCI entre 0,3 e 25 μM contra *Aspergillus fumigatus* (0,8 μM), *Fusarium culmorum* (0,8 μM), *Candida albicans* (0,3 μM), *Candida glabrata* (25 μM), *Candida tropicalis* (6,25 μM), *Cryptococcus neoformans* (1,6 μM) e *Saccharomyces cerevisiae* (3,15 μM) (SILVA *et al.*, 2000).

A gomesina mostrou ter potente atividade fungicida contra *Cryptococcus neoformans*, agindo individualmente ou em sinergismo com o fluconazol. Testes *in vitro* revelaram que cinco minutos de incubação das leveduras com o peptídeo na concentração de 5 μM foram suficientes para matar aproximadamente 80% das mesmas. Quando a gomesina foi utilizada em uma concentração de 1 μM e associada a 1 μM de fluconazol, cerca de 90% das leveduras foram mortas. Além

disso, foi demonstrado que o peptídeo interfere na expressão da cápsula do fungo, modulando, dessa forma, a expressão de fatores de virulência, o que tornaria o microorganismo mais susceptível à ação das células do hospedeiro (BARBOSA *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Antiprotozoária

Ensaio *in vitro* realizados com *Plasmodium falciparum* mostraram que a gomesina é capaz de inibir formas eritrocíticas desse protozoário. Além disso, quando a gomesina foi adicionada à cultura de gametas de *Plasmodium berghei*, ela inibiu a extraflagelação dos gametas masculinos e a formação de oocinetos. Experimentos *in vivo* mostraram que o peptídeo apresenta a capacidade de impedir o desenvolvimento dos oocistos de ambas as espécies de *Plasmodium* nos mosquitos, não impondo para isso nenhuma redução no fitness do inseto (MOREIRA *et al.*, 2007).

Além da atividade anti-Plasmodium, a gomesina mostrou-se tóxica para os parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp* (BURGIERMAN, 2003). O peptídeo foi inicialmente testado *in vitro* contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando uma DL 50 (dose capaz de ocasionar a morte de 50% dos parasitas) equivalente a 6,5 µM. Um experimento *in vivo* realizado com gomesina na forma livre ou lipossomal, usando modelo murino de Chagas mostrou que ambas as formas levaram a um pequeno aumento da sobrevivência dos animais, apesar da parasitemia ser similar nos grupos tratados e controles (BURGIERMAN *et al.*, 2002).

A gomesina também mostrou atividade contra *Acanthamoeba castellanii*. Após uma hora de incubação com 34 µM da gomesina, 50% dos trofozoitos foram permeabilizados. Também foi visto que a ação da gomesina é dose e temporalmente dependente (SACRAMENTO *et al.*, 2009).

1.2.2.4 Antitumoral

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que a gomesina apresenta atividade antitumoral. Valores de DL 50 entre 3,58 µM a 5,30 µM foram encontrados para gomesina contra células de linhagem tumoral humana e murina. Após a

incubação com gomesina, células de uma linhagem tumoral murina (B16F10-Nex2) apresentaram suas membranas permeabilizadas. Além disso, o tratamento tópico com gomesina diminuiu significativamente o desenvolvimento do melanoma subcutâneo murino, além de ter aumentado a sobrevivência dos animais (RODRIGUES *et al.*, 2008).

1.2.2.5 Antihemolítica

Ao contrário da toxicidade contra células tumorais, a gomesina mostrou-se pouco tóxica no tratamento *in vitro* para os eritrócitos humanos. As concentrações em que a gomesina possui atividade antimicrobiana (1 a 10 μM) (SILVA *et al.*, 2000) é capaz de provocar uma hemólise entre 20 e 30% *in vitro* (FAZIO *et al.*, 2006).

1.2.3 Estabilidade da gomesina em soro

Experimentos de incubação da gomesina com soro humano e soro fetal bovino mostraram que ela é muito estável, não sendo detectada sua proteólise em até 6 horas de incubação em meio contendo 20% de soro (FAZIO *et al.*, 2006).

1.2.4 Estudo da relação estrutura-atividade da gomesina

Foram sintetizados vários análogos da gomesina, pelo grupo do Dr. Antonio Miranda (UNIFESP), nos quais uma ou ambas as pontes de dissulfeto estavam ausentes. Ensaios *in vitro* demonstraram que a presença de pelo menos uma ponte de dissulfeto é essencial para a atividade biológica contra microorganismos e também para a ação hemolítica (FAZIO *et al.*, 2006).

Dando continuidade ao estudo da relação estrutura-atividade da gomesina, as pontes de dissulfeto foram substituídas por pontes de lactama com o intuito de se estudar a estabilidade química desses novos análogos, assim como a influência do tamanho e da orientação das pontes de lactama na atividade biológica e na conformação do peptídeo. No entanto, não se obteve nenhum análogo com redução da atividade hemolítica sem comprometer sua atividade antimicrobiana (FAZIO *et al.*, 2006). Também foi sintetizado um análogo linear, cujas pontes de dissulfeto

foram removidas, sendo incorporado um resíduo de prolina na posição 9, enquanto os outros resíduos de cisteína foram substituídos por D-aminoácidos. Verificou-se que a estrutura terciária deste análogo manteve-se equivalente à da gomesina nativa, com uma redução da atividade hemolítica e com a manutenção da atividade antimicrobiana e estabilidade em soro humano (FAZIO *et al.*, 2007).

Na busca de entender a importância de cada resíduo de aminoácido da gomesina para sua atividade antimicrobiana, análogos foram sintetizados nos quais 14 dos 18 resíduos de aminoácidos foram substituídos pela alanina, mantendo-se somente as cisteínas. Os resultados mostraram que os aminoácidos Leu5, Tyr7, Gln9, Arg10, Val12 e Tyr14 são de extrema importância para a manutenção da atividade antimicrobiana. Esses aminoácidos se encontram na face hidrofóbica e na volta β da gomesina (MIRANDA *et al.*, 2008).

1.2.5 Mecanismo de ação da Gomesina

Para elucidar o mecanismo de ação da gomesina, uma cultura de *E.coli* foi incubada com 1 μ M ou 10 μ M do peptídeo e com uma mistura de fluorocromos específicos para detectar permeabilização de membrana. A análise por microscopia de fluorescência mostrou que a gomesina na concentração de 10 μ M causou forte permeabilização na membrana das bactérias, após apenas 5 minutos de incubação. Já com 1 μ M, a permeabilização foi parcial (MIRANDA *et al.*, 2008). Dados obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando-se mistelas de SDS, sugeriram que a gomesina permeabiliza a membrana através da formação de poros ou de um efeito “detergente-like” (FAZIO *et al.*, 2007).

Recentemente, foi demonstrado que, em uma concentração subletal, a gomesina é capaz de modular a expressão gênica global da fitobactéria *Xylella fastidiosa*, o agente etiológico da Clorose Variegada dos Citros (CVC), sem alterar a viabilidade celular (FOGAÇA *et al.*, 2009). Interessantemente, a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na produção de exopolissacarídeos (EPS), uma importante etapa da produção do biofilme bacteriano, foi induzida pelo tratamento. Através da coloração com cristal violeta foi possível confirmar que a produção do biofilme de *X. fastidiosa* é de fato aumentada pelo tratamento com gomesina. O aumento da produção de biofilme ocasionado pelo tratamento com gomesina sugere

uma possível estratégia de *X. fastidiosa* de se proteger contra os efeitos tóxicos desse peptídeo, uma vez que o biofilme é uma estrutura conhecidamente envolvida na resistência bacteriana a antibióticos (FUX *et al.*, 2005).

1.3 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* compreende cerca de 150 espécies de leveduras, estando presente em uma grande variedade de nichos ecológicos, sendo que a grande maioria das espécies possui características saprofiticas, dentre as quais algumas fazem parte da microbiota humana e destas, somente 10% causam infecção. Estas leveduras reproduzem-se de forma assexuada por brotamento (PAPPAS, 2006).

Algumas espécies de *Candida* podem apresentar um estágio filamentososo com produção de hifas verdadeiras e pseudohifas. Esta mudança morfológica pode ocorrer tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que esta característica possui implicações importantes na virulência e no diagnóstico do fungo. Além disso, em condições de cultivo *in vitro*, *C. albicans* podem produzir clamidósporo. O clamidoconídeo é uma estrutura de resistência formada por uma parede celular grossa e citoplasma condensado. Normalmente é produzido quando a levedura está em condições de crescimento desfavorável (LACAZ *et al.*, 2002).

Candida albicans é uma das espécies mais importantes, pois é responsável por um grande número de infecções oportunistas, sendo apontada como uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano (PAPPAS, 2006). Esta espécie possui fatores de virulência que auxiliam na infecção, como, por exemplo, a alteração do fenótipo de levedura para formas alongadas de crescimento, denominadas pseudo-hifas e hifas. As formas de hifas e pseudo-hifas são invasivas e penetram nos tecidos do hospedeiro, sendo o primeiro passo para a infecção. Esta levedura também tem a capacidade de secretar diversos tipos de enzimas, como proteinases e fosfolipases, que podem influenciar na sua virulência. Estas enzimas agem sobre os tecidos do hospedeiro e auxiliam na invasão. Além disso, a levedura possui a capacidade de adesão a diversos tecidos, esta função é considerada muito importante nos estágios iniciais das infecções e está relacionada diretamente a seu grau de virulência. A adesão é adquirida por meios específicos (expressão de

adesinas) e inespecíficos (forças eletroestáticas e de van der Waals) (CALDERONE e FONZI, 2001).

A microbiota bacteriana afeta a colonização por *C. albicans* pela competição por nutrientes e pela produção de substâncias tóxicas que interferem na aderência das leveduras às células epiteliais do hospedeiro (CALDERONE e FONZI, 2001). Além disso, o sistema imune do hospedeiro controla a proliferação do fungo, bem como dos outros comensais (CALDERONE e FONZI, 2001).

1.4 Candidíases

As infecções fúngicas ocasionadas pelo gênero *Candida* são genericamente conhecidas como candidíases, apresentando a espécie *C. albicans* como principal agente etiológico. Porém, outras espécies podem ocasionar a doença, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (PFALLER e DIEKEMA, 2007).

A Candidíase é a quarta doença mais comum em todo planeta de infecções sanguíneas nosocomiais superando infecções causadas por bactérias Gram-negativas. A frequência de infecções por *Candida* vem aumentando regularmente em hospitais de todo mundo (PFALLER e DIEKEMA, 2007). No Brasil, a candidíase foi a segunda micose que mais matou pacientes HIV positivos entre os anos de 1996 e 2006. As regiões Sudeste e Nordeste foram as que exibiram um maior número de mortes, e o estado que mais apresentou mortes por candidíase foi o estado de São Paulo (PRADO *et al.*, 2009).

Esta doença pode apresentar um quadro agudo, subagudo ou crônico, podendo ainda ser superficial ou profundo, mas sempre de caráter oportunista. Os processos patológicos produzidos são diversos e compreendem inflamação, formação de pus e resposta granulomatosa. Os locais mais acometidos são as mucosas orofaríngeas e vaginais, a pele, brônquio, pulmão, trato gastrointestinal, rim, baço, fígado e coração. Além disso, a doença pode se tornar sistêmica (PAPPAS *et al.*, 2006). Ambas as estruturas morfológicas, filamentosa e levedura são encontradas nas infecções, onde normalmente as leveduras predominam, entretanto com o avanço da infecção há o aparecimento das formas filamentosas, as quais são formas invasivas e resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, enquanto as leveduras são mais susceptíveis a fagócitos. De forma geral as

leveduras são responsáveis pelo início dos processos infecciosos, com as formas filamentosas respondendo por episódios invasivos (LACAZ *et al.*, 2002).

Quando ocorre a ruptura do equilíbrio imunológico entre o hospedeiro e o fungo, há uma multiplicação exacerbada e ou invasão do fungo em tecidos, e se instala a infecção. Este desequilíbrio está associado a fatores de risco, tais como: neutropenia, hemodiálise, cirurgias, o uso indiscriminado de antibióticos, anticoncepcionais e corticóides, queimaduras, quimioterapia, transplante de órgãos sólidos como rim e fígado, Síndrome da imunodeficiência humana adquirida e diabetes (PAPPAS, 2006; SPELLBERG *et al.*, 2006; PERLROTH *et al.*, 2007).

A maioria das infecções por *Candida* são de origem endógena, sendo decorrentes da proliferação ou da mudança do sítio da levedura induzidos por algum fator de risco. No entanto, existe também a possibilidade de infecções exógenas em ambientes hospitalares, sendo que a levedura pode ser veiculada pelas mãos, aparelhos de ventilação, sondas e cateteres (PERLROTH *et al.*, 2007).

A candidíase vaginal ocupa o segundo lugar dentre as vaginites. Aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio de candidíase vaginal em sua vida (SOBEL, 2007). As infecções por cepas não-albicans têm aumentado muito nos últimos anos. Clinicamente ambas as infecções, albicans e não albicans são indistinguíveis, uma vez que causam sintomas muito semelhantes como leucorréia, fissuras, dor, prurido, entre outros. O diagnóstico e o tratamento da candidíase vaginal resultam em um custo estimado de 1 bilhão de dólares por ano somente nos EUA (SOBEL, 2007).

1.5 Tratamento

A escolha do tipo de antifúngico assim como sua formulação é feita a partir do quadro clínico que o paciente desenvolve. As infecções cutâneas podem ser tratadas com vários cremes tópicos, loções, pomadas e supositórios a base de derivados azólicos (miconazol e cetoconazol). Para o tratamento da candidíase disseminada, desde 2004 a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda equinocandinas (caspofungina), derivados azólicos (fluconazol e itraconazol), polienos (anfotericina B), entretanto novos antifúngicos estão sendo

incluídos no tratamento como voriconazol, posaconazol e micafungina (PAPPAS *et al.*, 2004)

1.5.1 Azóis

Esta classe de antifúngicos pode ser dividida de acordo com sua estrutura: imidazóis (duas moléculas de nitrogênio) e triazóis (três moléculas de nitrogênio). Entre os imidazóis somente o cetoconazol possui atividade sistêmica, contudo todos os triazóis têm atividades sistêmicas e incluem o fluconazol, itraconazol e voriconazol. Tanto os imidazóis como os triazóis inibem a biossíntese do ergosterol pela inibição da enzima 14- α -desmetilase do citocromo P-450 que é responsável pela demetilação do lanosterol. No entanto os triazóis apresentam uma maior seletividade pelo sítio de ação em relação aos imidazóis, devido ao acréscimo de nitrogênio em seu anel azóico. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um átomo de nitrogênio proporciona estabilidade metabólica, prolongando o tempo de meia vida plasmática dos triazóis. Dependendo do organismo e do azol empregado, a inibição da síntese do ergosterol resulta na inibição do crescimento da célula fúngica (fungistático) ou na morte celular (fungicida) (SHEEHAN *et al.*, 1999).

1.5.2 Equinocandinas

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos altamente seletivos de lipopéptídeos que inibem a síntese das β -(1,3) glucanas, constituintes da parede celular fúngica. Tendo em vista que células de mamíferos não possuem β -(1,3) glucanas, esta classe de agentes se torna seletiva em sua toxicidade a fungos (KURTZ e DOUGLAS, 1997). Atualmente existem três equinocandinas no mercado: micafungina, caspofungina e anidulafungina, dentre estas somente a caspofungina está aprovada para o tratamento de candidíase (PERLIN, 2007).

1.5.3 Polienos

A estrutura básica dos polienos consiste em um anel lactâmico, com uma cadeia lipofílica rígida contendo de três a sete ligações duplas e uma porção

hidrofílica flexível sustentando vários grupos hidroxilas. Entre eles, temos a anfotericina B, que contém sete ligações duplas conjugadas, e pode ser inativada por calor, luz e extremos de pH. A anfotericina B é pouco solúvel em água e não é absorvida pela via de administração intramuscular ou oral. A formulação convencional da anfotericina B na administração intravenosa é a anfotericina B desoxicolato. As formulações lipídicas da anfotericina B foram desenvolvidas na tentativa de evitar a natureza nefrotóxica da anfotericina B convencional. Dependendo da dose, a anfotericina B pode ter uma ação fungistática ou fungicida. Esta droga atua através da permeabilização da membrana plasmática, mas sua atividade, inicialmente, depende de sua ligação ao esterol da membrana. Essa ligação pode resultar na perda de íons intracelulares, o que caracteriza a natureza fungistática da droga. A anfotericina B em concentrações fungicidas pode levar a formação de poros na membrana, com conseqüente perda de constituintes celulares de baixo peso molecular; essa condição é irreversível (BRAJTBURG *et al.*, 1990).

1.6 Resistência aos agentes antifúngicos

Ao contrário dos mecanismos de resistência aos agentes antibacterianos, não existe nenhuma evidência de que os fungos são capazes de inativar ou modificar os agentes antifúngicos como meio de adquirir resistência. Da mesma forma, os genes de resistência antifúngica não são transmissíveis de célula a célula como ocorre com muitos genes de resistência bacterianos. É evidente, entretanto, que bombas de efluxo de multidrogas, alteração do alvo, super expressão do alvo sejam mecanismos importantes na aquisição de resistência aos agentes antifúngicos (ESPINEL-INGROFF, 2008).

1.6.1 Resistência antifúngica aos derivados azólicos

A utilização profilática dos azóis, especialmente do fluconazol, no tratamento e na prevenção de infecções por *Candida* aumentou a ocorrência de resistência do fungo a este antifúngico. A resistência da *Candida* frente aos derivados azólicos ocorre pelos seguintes mecanismos: mutação do gene (ERG11) que codifica a enzima 14- α -desmetilase, modificando o alvo de ação do antifúngico e assim não

haverá interação com a droga. A super expressão do gene (ERG11) resultando na produção excessiva da enzima alvo, criando a necessidade de maiores concentrações da droga dentro da célula. Além disso, a super expressão dos genes CDR1 e CDR2, que codificam bombas de efluxo de multidrogas, e do gene BENr, que codifica bombas de efluxo específicas para o fluconazol (ESPINEL-INGROFF, 2008).

1.6.2 Resistência antifúngica a equinocandinas

Os isolados de *Candida* resistentes a equinocandinas são bastante raros. Os mecanismos de resistência são diretamente ligados a mutações do gene FKS1, que codifica β -1,3-D-glucana sintetase. Esta enzima faz parte de um complexo enzimático responsável pela síntese das β -(1,3) glucanas (PERLIN, 2007).

1.6.3 Resistência antifúngica a polienos

O mecanismo de resistência que a *Candida* exerce sobre a anfotericina B é pouco conhecido, mas provavelmente o aumento ou a diminuição de ergosterol na membrana do fungo está associado à resistência fúngica. Já foi mostrado que isolados de *Candida* resistentes apresentam uma diminuição de ergosterol em relação aos isolados suscetíveis. Esta deficiência de ergosterol pode ser resultado de mutações em genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de ergosterol. Também há a possibilidade de substituições de esteróis que ligam polienos (ergosterol) por aqueles que apresentam uma afinidade menor pelos polienos (fecosterol) (ESPINEL-INGROFF, 2008; KANAFANI e PERFECT, 2008).

2 OBJETIVOS

Conforme apresentado, vários peptídeos antimicrobianos vêm sendo utilizados em tratamentos *in vivo* contra infecções microbianas. No entanto, a maioria dos estudos é direcionada a bactérias causadoras de infecções, havendo ainda poucos dados na literatura sobre tratamentos de infecções fúngicas com peptídeos antimicrobianos.

A gomesina tem ótimo potencial para ser um agente antifúngico para aplicações terapêuticas em humanos, animais e plantas. Isto se deve ao fato deste peptídeo possuir amplo espectro de atividade, rápida ação antimicrobiana e características estruturais que conferem estabilidade contra proteases presentes no soro humano.

Sendo assim, este trabalho tem como principal objetivo a avaliação do potencial antifúngico *in vivo* da gomesina contra *Candida albicans*, utilizando-se o modelo experimental murino. Foram propostos neste trabalho:

1. Avaliar o potencial terapêutico da gomesina em camundongos com candidíase disseminada e vaginal.
2. Avaliar o potencial imunomodulatório da gomesina *in vivo*, através da quantificação dos níveis de citocinas dos rins dos camundongos com candidíase disseminada tratados com gomesina.
3. Avaliar a toxicidade da gomesina *in vivo*, a partir da análise de eritrogramas e leucogramas assim como dosagens de bilirrubinas, creatinina e gama GT do sangue de camundongos tratados com gomesina.
4. Avaliar a biodistribuição da gomesina marcada com Tecnécio-99m.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos antimicrobianos

A gomesina sintética foi obtida da GENEPEP (França), tendo sido sintetizada quimicamente através da utilização da metodologia previamente descrita por Fázio et al. (2006), tendo 97% de grau de pureza analisada por cromatografia líquida ligada a espectrometria de massas. A gomesina foi dissolvida em tampão fosfato salino (PBS, 8 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,2) para os ensaios *in vivo* e em água ultrapura para os ensaios *in vitro*.

Uma molécula modificada de gomesina, na qual o resíduo de ácido piroglutâmico foi substituído por 6-hidrazino nicotinamida (HYNIC), foi utilizada para avaliar a biodistribuição do peptídeo no modelo murino. O HYNIC-gomesina foi sintetizado pelo Prof. Dr. Antônio Miranda (Departamento de Biofísica, INFAR, UNIFESP, SP). A conjugação do HYNIC-gomesina foi realizado segundo a metodologia descrita por Fázio et al. (2006) apresentando 77% de grau de pureza analisada por cromatografia líquida ligada a espectrometria de massas. O conjugado foi dissolvido em água ultrapura para os estudos de biodistribuição.

O fluconazol foi obtido da Pfizer Inc. e foi dissolvido em PBS para os ensaios *in vivo* e em água para os ensaios *in vitro*. O miconazol foi obtido da Janssen Pharmaceutica e foi dissolvido em PBS com 20% de Dimetilsulfóxido (DMSO) para a incorporação ao creme vaginal.

3.2 *Candida albicans*

Dois isolados de *Candida albicans* foram utilizados: o isolado 78, (TAVARES e THEVISSEN *et al.*, 2008) e o isolado ATCC 90028. As leveduras foram mantidas no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Periodicamente, as cepas foram inoculadas em camundongos com o objetivo de manter sua virulência.

3.3 Animais

Camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de vida e pesando em torno de 30 gramas foram utilizados para os experimentos de candidíase. Os animais foram fornecidos pelos biotérios dos Departamentos de Parasitologia e de Imunologia ICB-USP.

Para os estudos envolvendo o modelo de candidíase disseminada foram utilizados camundongos do sexo masculino imunossuprimidos e não imunossuprimidos. Para a imunossupressão dos animais, doses de 100 mg/kg de ciclofosfamida foram administradas intraperitonealmente quatro e um dia antes da infecção com *C. albicans*, no terceiro dia após a infecção e, a partir deste ponto, em intervalos de 4 dias até o final do tratamento (MATSUMOTO *et al.*, 2002). Os animais foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha autoclavada e fechadas com filtro, sendo servidos de ração e água autoclavadas, de modo a manter um ambiente estéril. As trocas de gaiolas foram realizadas duas vezes por semana em fluxo laminar. Os animais foram considerados anérgicos quando o número de leucócitos encontrava-se inferior a 100 células mm³ (ANDES *et al.*, 2008).

Para os estudos utilizando o modelo de candidíase vaginal foram utilizados camundongos fêmeas. A fase de pseudoestro foi previamente induzida através da administração subcutânea de 0,5 mg de 17 beta-valerato-estradiol dissolvido em óleo de gergelim 3 dias antes da infecção vaginal. A fase de pseudoestro é de grande importância para o estabelecimento da infecção (HAMAD *et al.*, 2004).

Para os estudos de biodistribuição da gomesina foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* com 6 a 8 semanas de vida e pesando de 25 a 30 gramas, os quais foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN, SP).

3.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica *in vitro* dos compostos antimicrobianos foi avaliada pelo ensaio modificado de inibição de crescimento em meio líquido M-27A, de acordo com o "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)". Brevemente, 80µl do meio RPMI 1640 (Cultilab), com 1,6 M de ácido 3-[N-morfolino] propanesulfônico

(MOPS) pH 7, contendo 10^4 leveduras/mL de *C. albicans* em fase logarítmica de crescimento foram adicionados aos poços de uma placa contendo 20 μ l de diluições seriadas da gomesina (44 μ M a 1,52 μ M), ou de fluconazol (744 a 1,42 μ M) ou ainda da combinação de gomesina (11 μ M a 0,34 μ M) e fluconazol (115 μ M a 0,72 μ M). Após 48 h de incubação a 37 °C em câmara úmida, o crescimento fúngico foi avaliado pela determinação da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro (Labsystem, modelo iEMS Analyser). A menor concentração que inibiu 100% do crescimento foi considerada a mínima concentração inibitória (MCI).

O índice de fração inibitória (IFI) da combinação entre a gomesina e fluconazol em diferentes proporções foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{IFI} = (\text{MCI droga A em combinação} / \text{MCI droga A sozinha}) + (\text{MCI droga B em combinação} / \text{MCI droga B sozinha})$$

Valores abaixo de 0,5 foram interpretados como havendo um efeito sinérgico entre os compostos, valores entre 0,5 a 4 como indiferentes e valores maiores que 4 como um efeito antagonista entre os compostos (JOHNSON *et al.*, 2004).

3.5 Infecções dos camundongos com *C. albicans*

Uma colônia de *C. albicans*, proveniente da cultura previamente inoculada em camundongos, foi incubada em meio de infusão de coração e cérebro (Himedia) por 24 h a 37 °C sob agitação a 200 rpm (C25KL incubator shaker, New Brunswick Scientific). O sedimento contendo as leveduras, obtido pela centrifugação a 1500 g por 5 minutos, foi lavado três vezes em PBS e ressuspendido em 5 mL de PBS. O número de leveduras por mL dessa suspensão foi determinado em uma câmara de Neubauer.

O estabelecimento da candidíase disseminada foi realizado pela inoculação intravenosa de 3×10^5 leveduras suspendidas em 100 μ L de PBS. Para o modelo de camundongo imunossuprimido foi necessário determinar a carga fúngica que não levasse a uma taxa de mortalidade elevada em até aproximadamente dez dias. Para isto 10^6 , 5×10^5 , 3×10^5 , 5×10^4 , 10^4 e 10^3 fungos foram suspendidos em 100 μ L de PBS e inoculados intravenosamente em camundongos imunossuprimidos. A infecção da

candidíase vaginal, foi realizada intravaginalmente, inoculando-se 3×10^6 leveduras suspensas em 20 μL de PBS estéril. Ambos os modelos foram estabelecidos com o isolado 78 de *C. albicans*.

3.6 Tratamento dos camundongos com compostos antimicrobianos

Para o tratamento dos camundongos com candidíase disseminada, a gomesina (2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 15 mg/kg), o fluconazol (10 mg/kg e 20 mg/kg) ou a combinação de ambos (2,5 mg/kg de gomesina e 10 mg/kg de fluconazol, 5 mg/kg de gomesina e 20 mg/kg de fluconazol e 15 mg/kg de gomesina e 20 mg/kg de fluconazol) foram administrados intraperitonealmente em um volume final de 500 μL .

Para o tratamento dos camundongos com candidíase vaginal, a gomesina (0,5%, 0,2% e 0,02%), o miconazol (2%) e a combinação de ambos (0,02% de gomesina e 2% de miconazol), foram previamente incorporados a um creme vaginal (10% de Cera auto emulsionante não-iônica, 2% de óleo mineral, 5% de propilenoglicol e 84% de água destilada, pH 4,5). A administração do creme foi realizada com o auxílio de um mini aplicador vaginal.

O tratamento dos animais foi iniciado um dia após a inoculação de *C. albicans*, período em que a doença já se encontra estabelecida. Os compostos antimicrobianos foram administrados um, três e seis dias após a infecção. Como controle, um volume equivalente de PBS ou de veículo (creme) foi administrado aos animais.

Para a avaliação da infecção, os órgãos (rins, baço, fígado e vagina) dos camundongos foram dissecados assepticamente no sétimo dia pós infecção, pesados e homogeneizados em 1 mL de PBS. Alíquotas do homogeneizado resultante (100 μL) foram semeadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) contendo 2% de ágar. Após a incubação das placas por 18 horas a 37 °C, o número de UFC foi determinado. A eficácia dos diferentes tratamentos foi determinada considerando-se o número de UFC por grama de tecido dos animais tratados em comparação com o número de UFC por grama de tecido dos animais utilizados como controle (não tratados). Todos os experimentos foram realizados com grupos variando entre 5 a 10 animais.

3.7 Dosagem de citocinas

Após o tratamento, descrito no item 3.6, com 5 mg/kg de gomesina, 20 mg/kg de fluconazol e a combinação de ambos, os rins dos camundongos infectados com *C. albicans* foram dissecados, lavados em PBS e homogeneizados, com auxílio de um homogeneizador de tecido elétrico (TISSUE*TEAROR™, DREMEL RACINE), em 1 mL de PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases. Este coquetel era composto por 1 µg/ml de pepstatina A (inibidor de aspartil-protease), 4 mM de benzamidina (inibidor de serino-protease), 1mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, inibidor de metalo-proteases) e 1mM de N-etilmaleimida (inibidor de cisteino-protease). Em seguida, as concentrações do Interferon γ (IFN- γ), do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e da Interleucina 6 (IL-6) dos homogeneizados dos rins foram determinadas em um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) com a utilização do kit “Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation™(BD)” conforme a metodologia descrita pelo fabricante. Como controle foram utilizados animais não-infectados, não-tratados e animais infectados tratados com PBS.

3.8 Eritrograma e leucograma

O sangue foi coletado através de punção do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados, utilizando-se EDTA (1%) como anticoagulante. Estas amostras foram utilizadas para a determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global de hemácias e leucócitos em uma câmara de Neubauer de acordo com as metodologias utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (DACIE e LEWIS, 1995). Também foram realizadas extensões sangüíneas, coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes. Os reticulócitos foram determinados em extensão sangüínea após coloração supra vital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949). Também foram determinados bioquimicamente os níveis de bilirrubinas, creatinina e gama GT pelos métodos Sims-Horm, Picrato Alcalino e Enzimático, respectivamente.

3.9 Avaliação da biodistribuição da gomesina radiomarcada com tecnécio-99m em camundongos

O conjugado HYNIC-gomesina foi marcado com o radioisótopo tecnécio-99m. Resumidamente, 10 µg do HYNIC-gomesina foram adicionados a 20 mg de tricina e 5 mg de ácido etilenodiaminodiacético (EDDA) dissolvidos em 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) previamente nitrogenado. Em seguida, 10 µg de cloreto de estanho desidratado dissolvido em ácido clorídrico (HCl) 0,1 N também nitrogenado foi adicionado, seguida da solução (0,5 mL) de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄). A reação ocorreu por aquecimento a 100 °C por 20 min (FAINTUCH *et al.*, 2005).

O produto HYNIC-gomesina-^{99m}Tc (0,1 mL) com atividade aproximada de 74 MBq (2 mCi) foi administrada aos animais pela veia caudal. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical aos 5, 30, 60, 120, 240, 362, e 1440 min após a injeção do radioproduto.

Os órgãos (rins, baço e fígado) foram dissecados e transferidos para tubos de contagem radioativa. A contagem foi realizada em contador de radiação gama tipo poço de NaI(Tl), utilizando-se como padrão a mesma dose injetada nos animais menos a radioatividade da cauda.

O cálculo da captação do radioproduto por órgão foi calculada pela equação:

$$\% \text{ DI} = (\text{CPM órgão} / \text{CPM padrão}) \times 100;$$

em que %DI = Porcentagem da dose injetada e CPM = Contagem por minuto.

3.10 Análise estatística

O teste ANOVA com pós-teste de Tukey foi utilizado para avaliar a significância estatística dos resultados obtidos nos experimentos com o modelo murino de candidíase disseminada, vaginal, dosagem de citocinas e avaliação da toxicidade. Para os dados obtidos do experimento de sobrevivência foi utilizado o teste Long-Rank (Matel-Cox). Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad PRISM® para Windows (versão 5, GraphPad Software, para Windows). As diferenças entre os resultados obtidos pelos tratamentos com os compostos

antimicrobianos em comparação com o controle foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da gomesina

Na **Tabela 1** estão apresentados os valores da mínima concentração inibitória (MCI) da gomesina, fluconazol e combinação entre ele contra o isolado 78. Na **Tabela 2** estão apresentados os valores do índice de fração inibitória (IFI).

A gomesina apresentou a MCI de 5,5 μM e contra o isolado ATCC 90028 a MCI da gomesina foi de 11 μM . A MCI do fluconazol contra o isolado ATCC 90028 foi de 186 μM . Não foi possível detectar a MCI do fluconazol contra o isolado 78 em até 1,6 mM.

Foi observada a inibição de crescimento do isolado 78 quando se combinou a concentração de 0,5 μM de gomesina com 4,5 μM de fluconazol, e inibição do crescimento do isolado ATCC 90028 quando se combinou a concentração de 1,21 μM de gomesina com 18 μM de fluconazol (**Tabela 1**). Os valores obtidos de IFI da combinação entre gomesina com fluconazol contra o isolado 78 foi de 0,25 e de 0,28 para o isolado ATCC 90028 indicando que existe um sinergismo entre as drogas usadas (**Tabela 2**).

4.2 Avaliação da atividade antifúngica da gomesina em camundongos com candidíase disseminada

Os resultados da avaliação da eficácia da gomesina, fluconazol e a combinação entre ambos, no controle da candidíase disseminada em camundongos, estão apresentados na **Figura 1**.

O tratamento com 5 mg/kg e 15 mg/kg de gomesina mostrou ser eficaz no controle do fungo nos rins, baço e fígado dos animais infectados em relação ao grupo controle PBS (**Figuras 1A, 1B e 1C**). Os tratamentos com 10 mg/kg e 20 mg/kg de fluconazol também se mostraram eficazes no controle do fungo em todos os órgãos analisados (**Figuras 1A, 1B e 1C**). Os tratamentos combinatórios de gomesina e fluconazol também foram eficazes no controle do fungo nos órgãos dos animais analisados (**Figuras 1A, 1B e 1C**).

Tabela 1 – Mínima concentração inibitória (MCI) da gomesina, fluconazol e a combinação entre eles.

	MCI (μ M)	
	<i>C. albicans</i> (78)	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)
gomesina	5,5	11
fluconazol	ND	186
gomesina + fluconazol	0,5 / 4,5	1,21 / 18

ND = não detectado em até 1,6 mM

Tabela 2 – Índice de fração inibitória (IFI) da combinação entre a gomesina e o fluconazol.

	IFI	
	<i>C. albicans</i> (78)	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)
gomesina + fluconazol	0,25	0,28

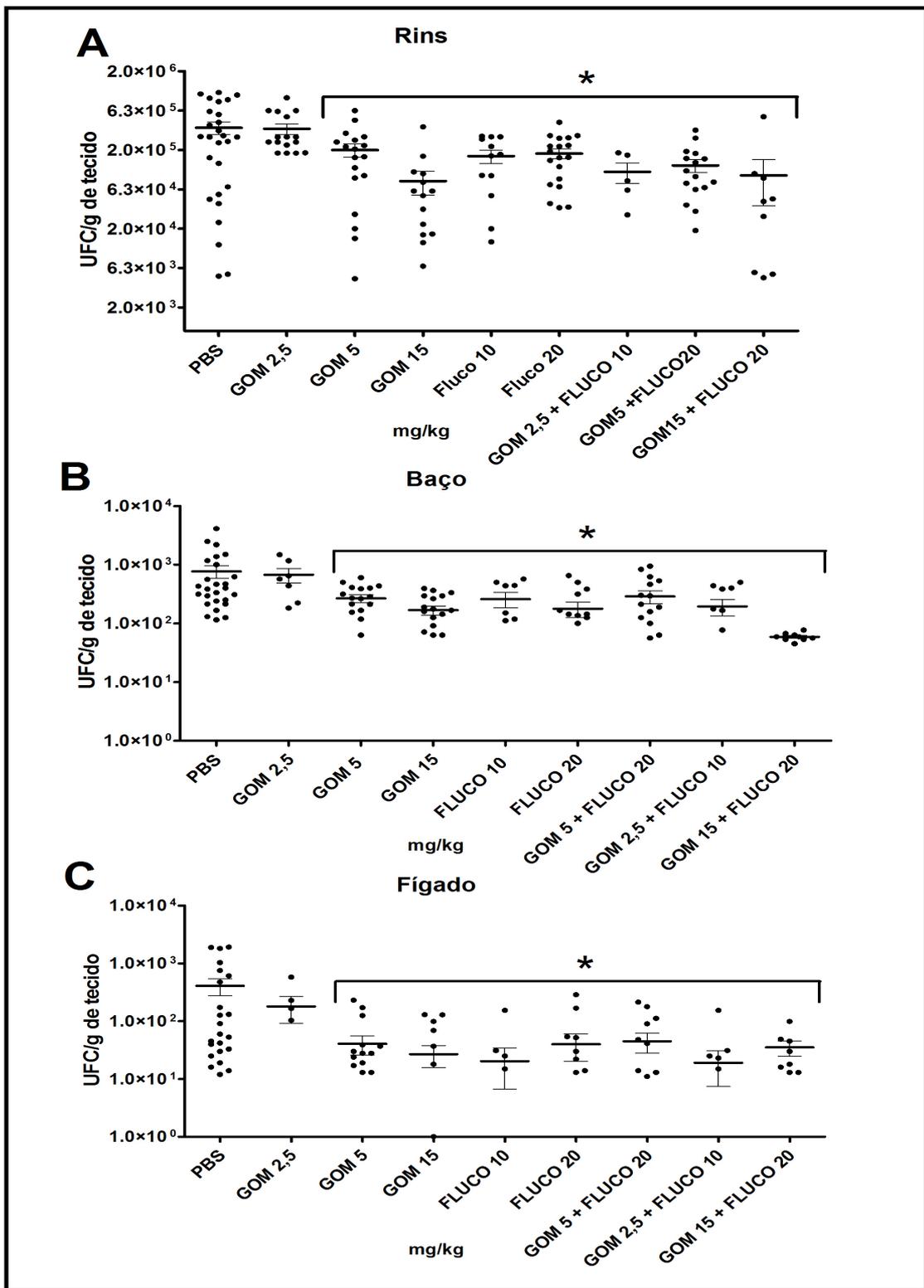


Figura 1: Avaliação do numero de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido (UFC) dos rins (A), baço (B) e fígado (C). Representação de 5 experimentos contendo grupos variando entre 4 a 8 animais cada um. Os animais foram infectados com 3×10^5 leveduras de *C. albicans* isolado 78 e tratados com diferentes doses gomesina (GOM) fluconazol (FLUCO) e a combinação de ambos. Como controle foi utilizado PBS. * indica diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $P < 0,05$).

4.3 Dosagem de citocinas dos rins dos camundongos tratados com gomesina

Os resultados apresentados na **Figura 2** mostram as concentrações das citocinas fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (INF- γ) e Interleucina (IL-6) dos rins dos camundongos tratados com gomesina 5 mg/kg, fluconazol 20 mg/kg e a combinação de ambos.

Os tratamentos com gomesina e fluconazol aumentaram significativamente as concentrações das citocinas em relação aos controles (não infectados e não tratados; tratados infectados e tratados e com PBS). OS valores de TNF- α , INF- γ e IL-6 dos grupos tratados com gomesina e fluconazol foram: 144 e 171 pg/mg de tecido, 34 e 39 pg/mg de tecido e 949 e 1429 pg/mg de tecido, respectivamente. Os grupos controles não-infectado e PBS apresentaram os seguintes valores para TNF- α , INF- γ e IL-6: 28 e 40 pg/mg de tecido, 15 e 15 pg/mg de tecido e 11 e 178 pg/mg de tecido, respectivamente. Entretanto, com o tratamento combinatório houve um aumento significativo de TNF- α em relação aos controles. O tratamento combinatório apresentou os seguintes valores para as citocinas TNF- α , INF- γ e IL-6: 135 pg/mg de tecido, 27 pg/mg de tecido e 152 pg/mg de tecido, respectivamente. Valores de p menores que 0,07 foram considerados estatisticamente significantes.

4.4 Padronização da carga fúngica no tratamento dos camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada

Os grupos de animais que receberam 10^6 , 5×10^5 , 3×10^4 e 3×10^5 leveduras atingiram 100% de mortalidade no segundo dia após a infecção, enquanto que aqueles que receberam 10^4 e 10^3 leveduras atingiram 100% de mortalidade no sétimo dia e no décimo dia após a infecção, respectivamente. A carga fúngica de 10^3 leveduras por animal foi considerada a ideal para o tratamento de sete dias com a gomesina (**Figura 3**).

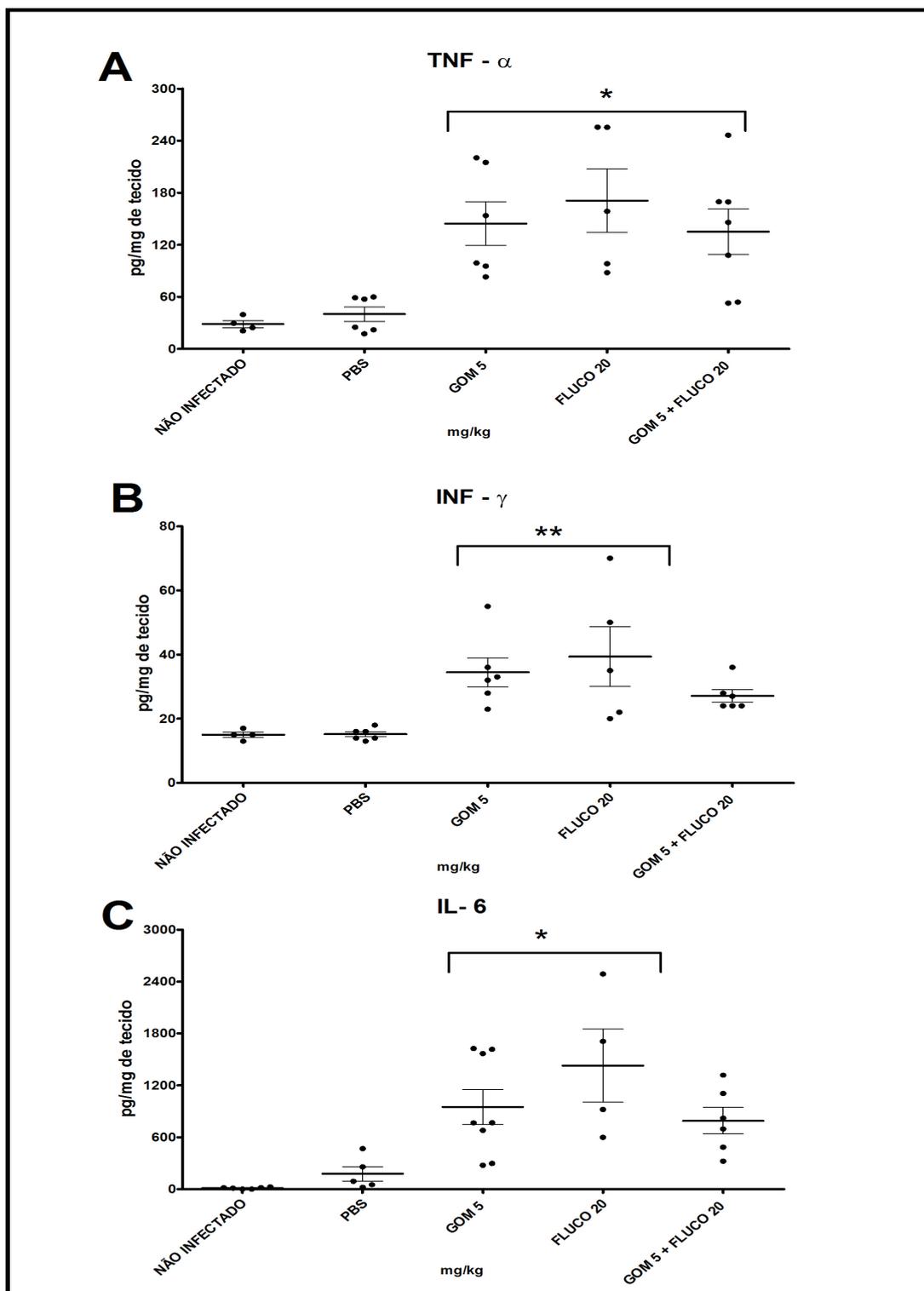


Figura 2: Dosagem das citocinas dos rins dos camundongos tratados com gomesina, fluconazol e a combinação de ambos. Grupos contendo de 5 a 10 animais. As doses empregadas foram de 5 mg/kg de gomesina, 20 mg/kg de fluconazol e a combinação de 5 mg/kg de gomesina e 20 mg/kg de fluconazol. Foram utilizados, como controles, animais não infectados e não tratados; e animais infectados que receberam PBS. * indica diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $P < 0,05$), ** indica diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $P < 0,07$).

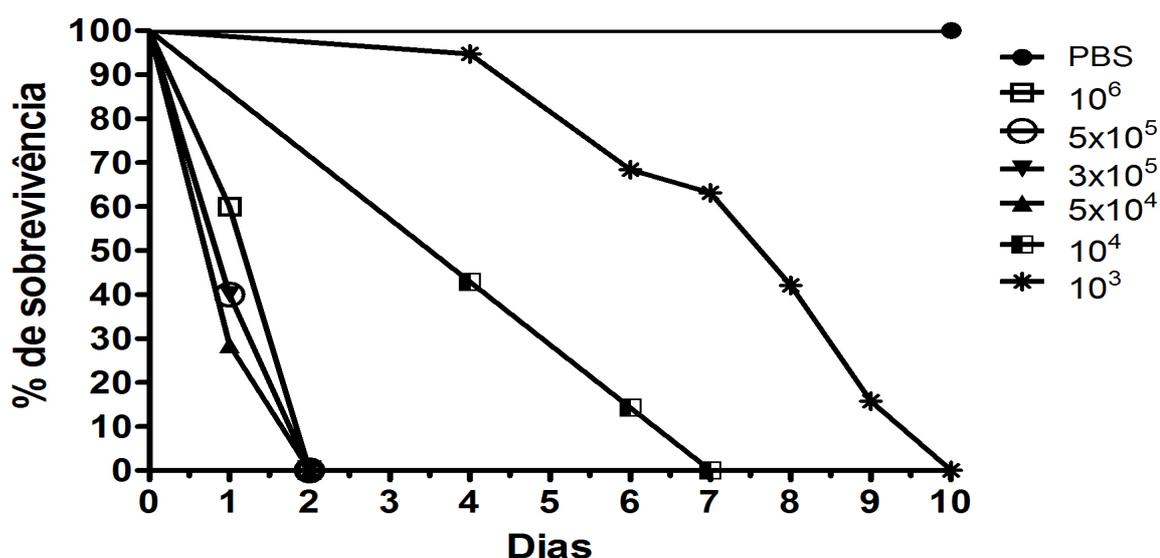


Figura 3: Determinação da carga fúngica a ser utilizada nos tratamentos dos camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada. Grupos variando entre 5 a 10 animais. Os animais foram imunossuprimidos com doses de 100 mg/kg de ciclofosfamida e infectados com 10^6 , 5×10^5 , 3×10^5 , 5×10^4 , 10^4 e 10^3 leveduras do isolado 78 de *C. albicans*. Como controles foram utilizados animais imunossuprimidos tratados com PBS.

4.5 Avaliação da atividade antifúngica da gomesina em camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada

Os dados da avaliação do tratamento da gomesina, fluconazol e a combinação de ambos, da candidíase disseminada em camundongos imunossuprimidos estão apresentados na **Figura 4**.

O grupo de animais infectados que foi tratado com PBS (controle) atingiu 100% de mortalidade no décimo quinto dia pós infecção, assim como o grupo que recebeu o tratamento com 15 mg/kg de gomesina. Entretanto, o tratamento com 5 mg/kg de gomesina aumentou em três dias a sobrevivência dos animais em relação ao controle, atingindo 100% de mortalidade no décimo oitavo dia pós infecção. O tratamento com 20 mg/kg de fluconazol aumentou em 6 dias a sobrevivência dos animais em relação ao controle, atingindo 100% de mortalidade no vigésimo primeiro dia pós infecção. O tratamento combinatório de 5 mg/kg de gomesina com 20 mg/kg de fluconazol proporcionou uma sobrevivência de 23% em até 30 dias pós infecção. Os grupos controles, não infectados, que foram tratados com PBS ou com 5 e 15 mg/kg de gomesina permaneceram vivos até o trigésimo dia pós infecção.

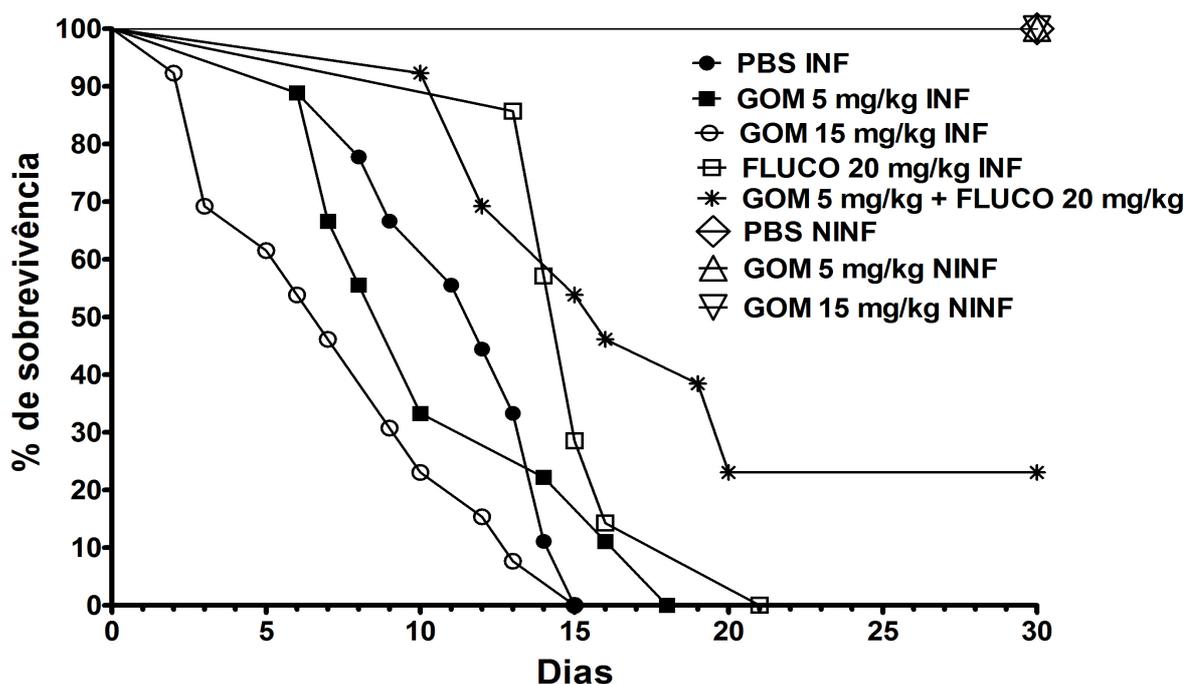


Figura 4: Curva de sobrevivência dos camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada tratados com gomesina, fluconazol e combinação de ambos. Representação de 3 experimentos contendo grupos com 5 animais cada um. Os animais foram imunossuprimidos com doses de 100 mg/kg de ciclofosfamida e infectados com 10^3 leveduras de *C.albicans* isolado 78. Os animais foram tratados com 5 mg/kg e 15 mg/kg de gomesina, 20 mg/kg de fluconazol e a combinação de 5 mg/kg de gomesina com 20 mg/kg de fluconazol. Foram utilizados, como controles, animais infectados que receberam PBS, animais não infectados que receberam PBS, gomesina 5 mg/kg e 15mg/kg. Todas as curvas são diferentes entre si, com exceção das curvas correspondentes aos controles (PBS NINF, GOM 5 mg/kg NINF e GOM 15 mg/kg NINF), Long-ranck (Matel-cox) test $p < 0,05$.

4.6 Avaliação do estabelecimento da infecção vaginal do isolado 78 de *C. albicans*

Foi necessário estabelecer a cinética de infecção vaginal nos animais a fim de iniciar o tratamento com gomesina. Para isso, fêmeas foram tratadas previamente com 0,5 mg/animal de 17 beta-valerato-estradiol e infectadas com 3×10^6 leveduras do isolado 78 de *C. albicans* (**Figura 5**). Foi constatado que o número de UFC/g de tecido de vagina era equivalente a $8,03 \times 10^6$ já no primeiro dia pós infecção, atingindo a $1,4 \times 10^7$ no sétimo dia pós infecção. Portanto a partir do primeiro dia pós infecção, a candidíase já está estabelecida.

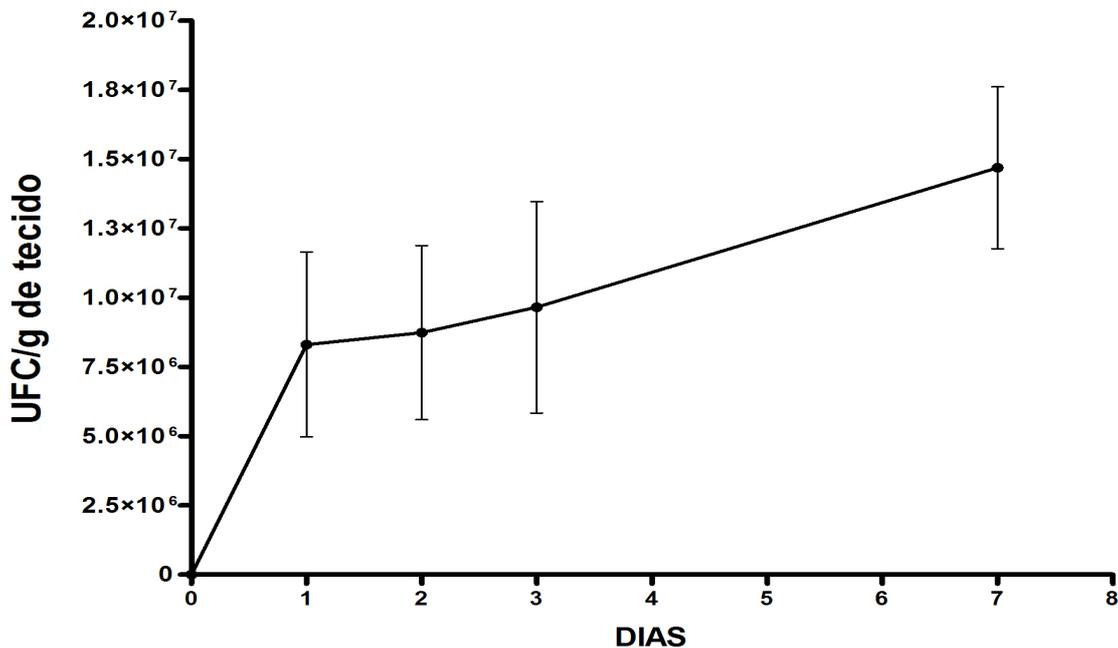


Figura 5: Padronização do estabelecimento de candidíase vaginal. Grupos contendo 5 animais cada um. As fêmeas foram infectadas intravaginalmente com 3×10^6 leveduras do isolado 78, após o primeiro, segundo, terceiro e sétimo dias os animais foram sacrificados e a vaginas retiradas para contagem de UFC.

4.7 Avaliação da atividade antifúngica da gomesina tópica em camundongos com candidíase vaginal

Os resultados da eficácia dos tratamentos da gomesina, miconazol e a combinação de ambos na candidíase vaginal estão apresentados na **Figura 6**.

Os grupos dos animais infectados e tratados com cremes de gomesina a 0,2% e 0,5%, miconazol a 2% e a combinação do entre 0,2% de gomesina com 2% de miconazol apresentaram uma diminuição significativa das UFCs em relação aos grupos controles; não-infectado e não-tratados (**NINF**) e tratados somente com o creme (**Creme**). Os tratamentos com os cremes de gomesina a 0,2% e 0,5%, miconazol a 2% e a combinação exibiram as médias de UFC de $1,19 \times 10^6$, $1,06 \times 10^6$, $2,37 \times 10^6$, e $2,30 \times 10^6$, respectivamente. Já o tratamento com o creme de gomesina a 0,02% não apresentou uma diminuição significativa das UFCs em relação aos controles, exibindo a média de UFCs de $1,47 \times 10^7$. Os controles NINF e CREME exibiram as médias de UFCs de $1,46 \times 10^7$ e $1,18 \times 10^7$.

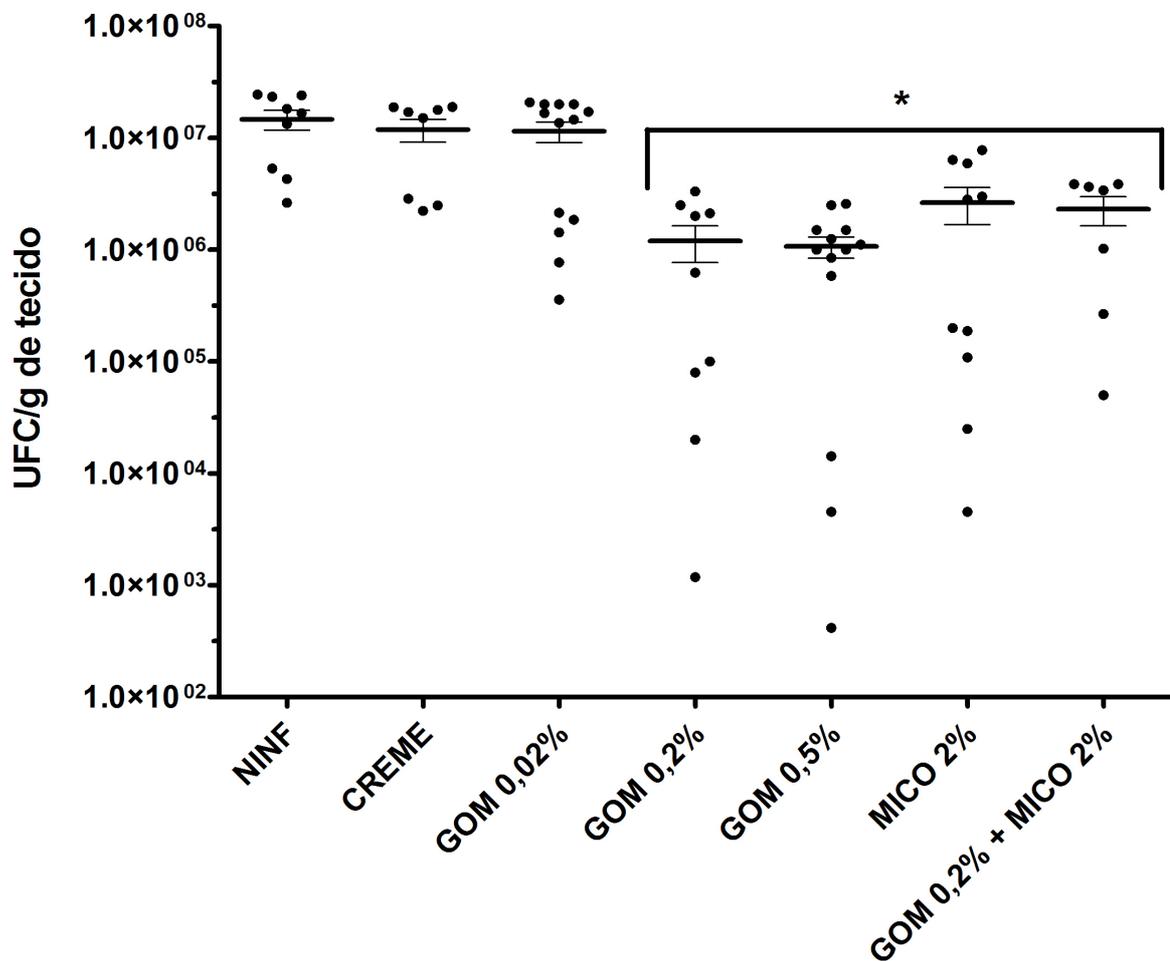


Figura 6: Tratamento tópicamente com gomesina e miconazol nos animais com candidíase vaginal. Representação de 3 experimentos contendo grupos com 5 animais cada um. Os animais foram previamente tratados com 17-beta-valerato-estradiol e depois infectados com 3×10^6 leveduras do isolado 78 de *C. albicans* e então submetidos ao tratamento com cremes vaginais contendo gomesina (0,5%, 0,2% e 0,02%), miconazol (2%) e a combinação de 0,02% de gomesina com 2% de miconazol. Foram utilizados, como controles, animais infectados e não tratados e tratados somente com o veículo (Crema). * indica diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $P < 0,05$).

4.8 Análise da toxicidade da gomesina

As análises da toxicidade da gomesina foram feitas em amostras de sangue de animais infectados com *C. albicans* isolado 78 (**INF + GOM**) e não-infectados (**NINF + GOM**), ambos tratados com gomesina. A dose de gomesina escolhida para a análise foi a de 15 mg/kg, e como controles foram utilizados animais não-infectados (**NINF**) e infectados (**INF**) com leveduras de *C. albicans* isolado 78, ambos não-tratados com gomesina (**Figuras 7 e 8**).

O tratamento com gomesina não alterou o número de leucócitos e linfócitos por mm³ de sangue dos animais em relação aos controles (**Figura 7 A e B**). No entanto, o grupo de animais não-infectados e tratados com a gomesina (**NINF + GOM**) apresentou um número elevado de eosinófilos em relação aos demais grupos (**Figura 7 C**). Tanto o grupo infectado quanto o grupo não-infectado tratados com gomesina (**INF + GOM E NINF + GOM**) exibiram um maior número de neutrófilos em relação aos controles (**Figura 7 D**).

O tratamento com gomesina não alterou os valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), variação do volume de hemácias (RDW) e plaquetas (**Figura 8 B, C, D, E, F, G e H**) em relação aos controles. Contudo o tratamento com gomesina, tanto em animais infectados quanto em animais não infectados (**INF + GOM e NINF + GOM**), elevou a porcentagem, significativamente, dos reticulócitos circulantes (**Figura 8 A**) em relação aos controles.

Na **Tabela 3** são apresentados os valores das dosagens de bilirrubinas, creatinina e gama GT. Os tratamentos com gomesina não mostraram nenhuma alteração nas dosagens de bilirrubinas totais, diretas e indiretas assim como, creatinina e gama GT.

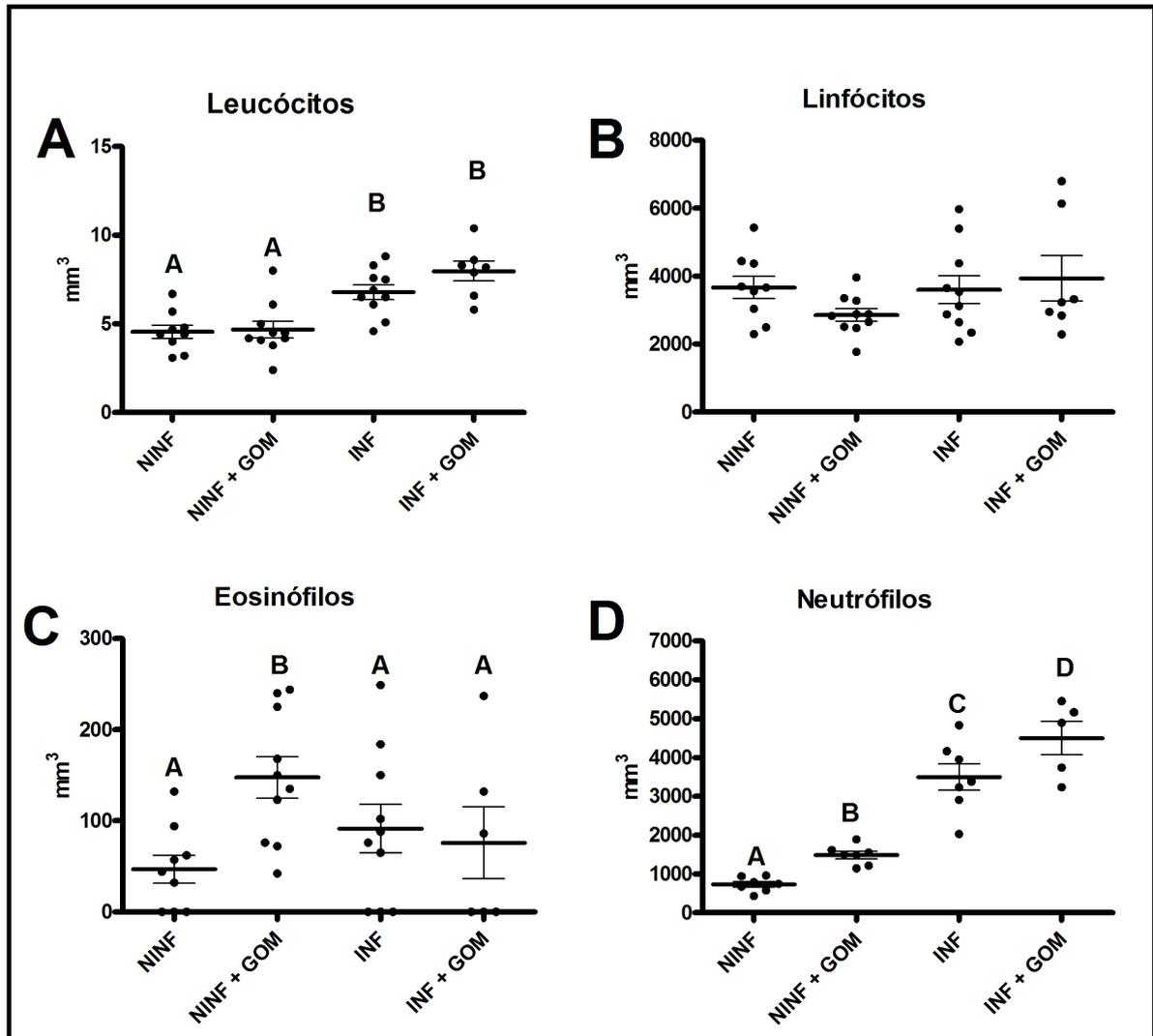


Figura 7: Contagem de leucócitos (A), linfócitos (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D). Grupos contendo 10 animais cada um. **(NINF + GOM)** tratamento com 15 mg/kg de gomesina, **(INF + GOM)** tratamento com 15 mg/kg de gomesina em camundongos infectados com 3×10^5 leveduras do isolado 78. Como controles foram utilizados um grupo não infectado (**NINF**) e um grupo infectado (**INF**). Letras indicam diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $P < 0,05$).

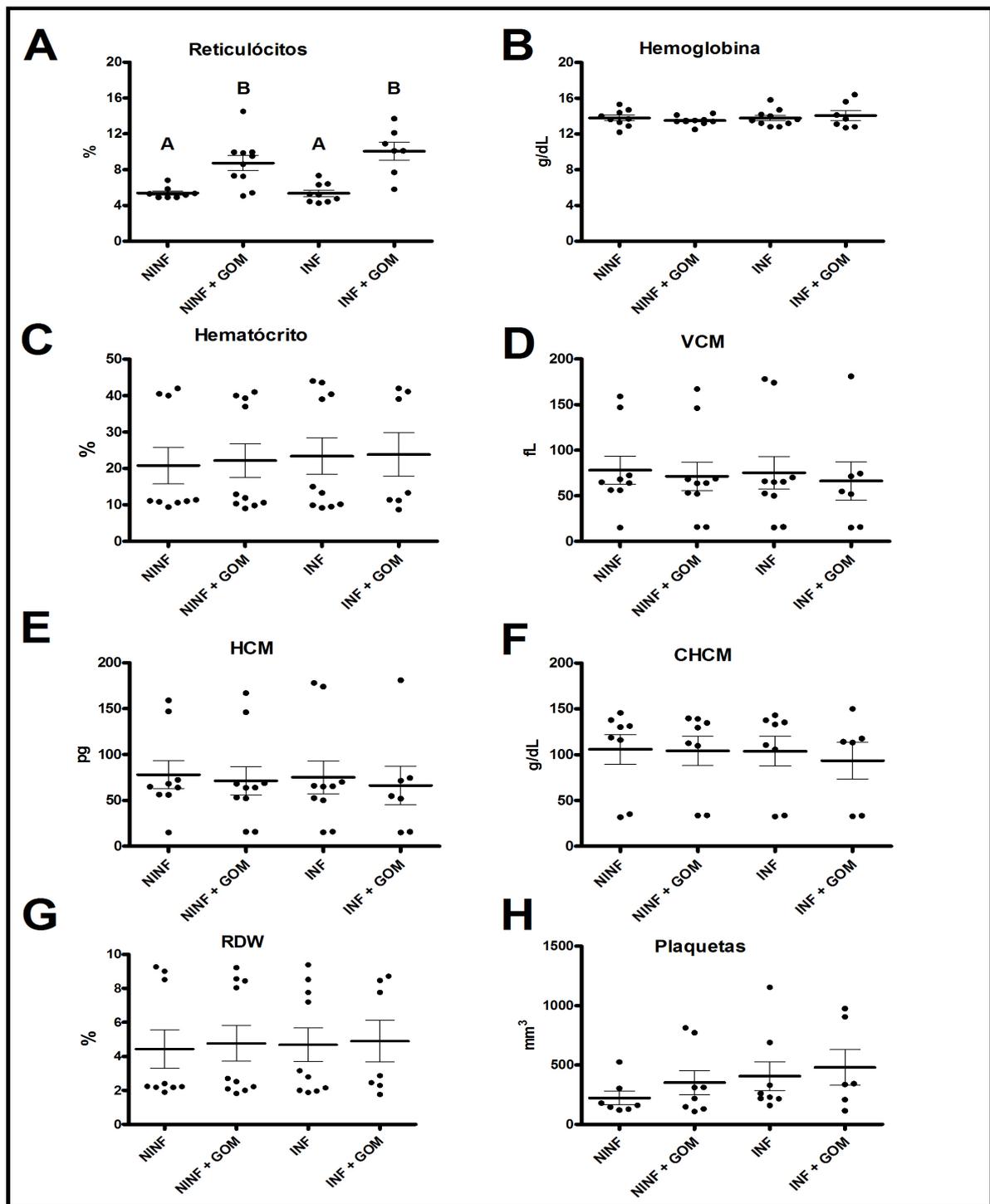


Figura 8: Eritrograma dos animais tratados com gomesina. Grupos contendo 10 animais cada um. **(NINF + GOM)** tratamento com 15 mg/kg de gomesina, **(INF + GOM)** tratamento com 15 mg/kg de gomesina em camundongos infectados com 3×10^5 leveduras do isolado 78 de *C. albicans*. Como controles foram utilizados um grupo não infectado **(NINF)** e um grupo infectado **(INF)**. Reticulócitos **(A)**. Hemoglobina **(B)**. Hematócrito **(C)**. Volume corpuscular médio, VCM **(D)**. Hemoglobina corpuscular média, HCM **(E)**. Concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM **(F)**. Variação do volume de hemácias, RDW **(G)**. Plaquetas **(H)**. Letras indicam diferença estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 3 – Dosagens de bilirrubinas, creatinina e gama GT dos animais infectados (INF) com *C. albicans* e não-infectados (NINF) tratados com gomesina.

	bilirrubinas totais	bilirrubinas Direto	bilirrubinas Indireto	creatinina	gama GT
	mg/dL				U/L
NINF	0,48 ± 0,23	0,35 ± 0,19	0,13 ± 0,13	0,32 ± 0,09	< 1
INF + GOM	0,35 ± 0,15	0,26 ± 0,10	0,09 ± 0,09	0,34 ± 0,05	< 1
INF	0,36 ± 0,06	0,19 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,35 ± 0,05	< 1
INF +GOM	0,41 ± 0,17	0,28 ± 0,16	0,12 ± 0,09	0,34 ± 0,12	< 1

4.9 Biodistribuição da gomesina radiomarcada

A avaliação da biodistribuição da gomesina radiomarcada com tecnécio-99m foi realizada nos rins, baço e fígado após a administração do radioproduto (5, 30, 60, 120, 240, 362, e 1440 minutos) (**Figura 9**).

No tempo precoce de 5 minutos podemos observar o fígado com a maior captação do radiomarcado, seguido dos rins e baço. A captação foi aumentando até os 120 minutos após a injeção da droga para o fígado e rins, seguido de um decaimento lento. Já o aumento de captação para o baço ocorreu apenas até os 60 min após a administração da droga.

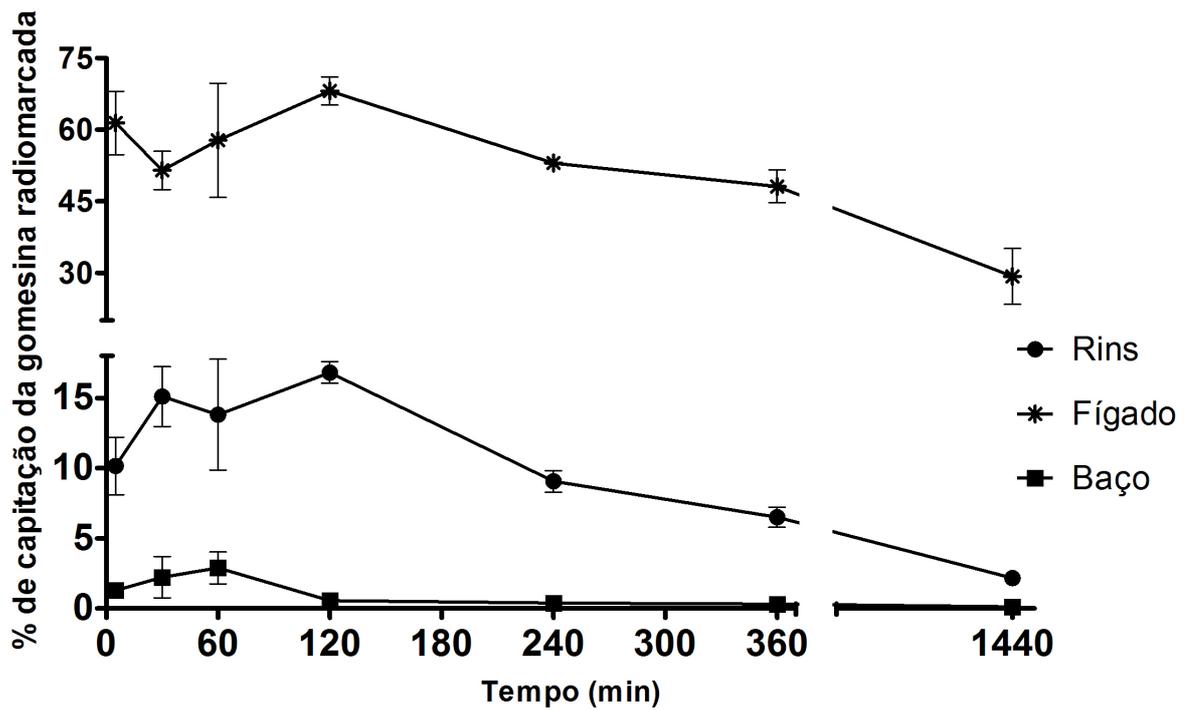


Figura 9: Porcentagem de captação da gomesina-^{99m}Tc nos órgãos: fígado, rins e baço. Após a administração da gomesina marcada os órgãos foram dissecados em diversos tempos para avaliação da sua biodistribuição. Cada ponto representa um grupo de 6 animais.

5 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos envolvendo a terapia com peptídeos antimicrobianos *in vivo* são focados no controle de infecções bacterianas, podendo ser citados os estudos realizados com os peptídeos, MSI-78 (um análogo da magainina), buforina e a indolicidina, que mostraram que os tratamentos realizados com estes peptídeos reduziram a mortalidade de camundongos infectados com *E.coli* (GIACOMETTI *et al.*, 2002; GIACOMETTI *et al.*, 2004). Também podemos citar o estudo realizado com a plectasina, uma defensina isolada do fungo *Pseudoplectania nigrella*, que também apresentou bons resultados em camundongos com peritonite causada por *S. pneumoniae* (MYGIND *et al.*, 2005). Contudo, há poucos dados na literatura sobre tratamentos com peptídeos antimicrobianos utilizando modelos experimentais infectados com fungos.

A gomesina é um peptídeo antimicrobiano isolado dos hemócitos da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, que possui um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e células tumorais. A atividade antifúngica *in vitro* da gomesina, já foi reportada por nosso grupo de pesquisa e colaboradores (SILVA *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2007). Entretanto, a atividade antifúngica *in vitro* da gomesina contra isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes a antifúngicos da classe dos azóis ainda não foi analisada, assim como seu potencial terapêutico contra a candidíase.

Neste trabalho, analisamos a atividade antifúngica da gomesina, assim como a combinação entre gomesina e antifúngicos da classe azólica contra o isolado clínico 78 de *Candida albicans*, *in vitro* e *in vivo*. Este isolado apresenta resistência a antifúngicos clássicos como itraconazol, fluconazol, miconazol e sulfametoxazol (dados não apresentados)¹ Nos estudos *in vitro* foi utilizada a metodologia proposta pelo CLSI (M27-A2), uma referência mundial para testes de sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica, definindo que fungos são resistentes a uma MCI maior que 208 µM de fluconazol.

Observamos que a gomesina apresentou um efeito inibitório sobre o crescimento do isolado clínico 78, apenas 5,5 µM foram necessários para inibir 100% do crescimento do isolado 78, enquanto que o fluconazol não conseguiu inibir

¹ Rossi, D.C.P., Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, São Paulo, 2008.

o crescimento do isolado 78 em até 1,6 mM. Também analisamos a MCI da gomesina contra um isolado suscetível a derivados azólicos, para isso utilizamos o isolado ATCC 90028 e observamos que foram necessários 11 μM de gomesina e 186 μM de fluconazol para inibir 100% do crescimento do fungo. A atividade sinérgica entre a gomesina e o fluconazol contra ambos isolados foi analisada através do cálculo de índice de fração inibitória (IFI). Este parâmetro é utilizado para indicar o sinergismo entre dois compostos, sendo que valores abaixo de 0,5 indicam sinergismos entre os compostos, valores entre 0,5 a 4 indicam indiferença entre os compostos e valores acima de 4 indicam antagonismo entre os compostos (JOHNSON *et al.*, 2004). Verificamos que houve sinergismo entre a gomesina e o fluconazol, pois o IFI da combinação foi de 0,25 para o isolado 78 e 0,28 para o isolado ATCC 90028. O sinergismo entre a gomesina e o fluconazol já havia sido observado para *Cryptococcus neoformans* (BARBOSA *et al.*, 2007). Outros peptídeos antimicrobianos também exibiram, *in vitro*, sinergismo com antifúngicos convencionais, como os casos da lactoferrina e da protegrina que mostraram sinergismo com o fluconazol contra isolados clínicos de *C. albicans* (KUIPERS *et al.*, 1999; BARCHIESI *et al.*, 2007). A taquiplesina mostrou sinergismo contra dermatófitos quando combinada com a terbinafina (SIMONETTI *et al.*, 2009) e a combinação entre a histatina e a anfotericina B também apresentou sinergismo contra isolados de *C. albicans*, *in vitro* (VAN'T HOF *et al.*, 2000). Contudo, o mecanismo sinérgico da combinação de baixas doses de gomesina e de fluconazol não foi ainda completamente elucidado. Estudos realizados com gomesina mostraram que o peptídeo foi capaz de permeabilizar microorganismos como *E.coli* (MIRANDA *et al.*, 2008) e *C. neoformans* (BARBOSA *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que a incubação de células tumorais de linhagem murina com baixas concentrações de gomesina, além da permeabilizar as mesmas, permitiu a internalização de macromoléculas, tais como imunoglobulinas (RODRIGUES *et al.*, 2008). A partir destes estudos podemos hipotetizar que a gomesina facilita a entrada do fluconazol na célula através da permeabilização da membrana.

A literatura sobre o emprego de peptídeos antimicrobianos no tratamento da candidíase disseminada é bastante escassa. Um estudo realizado com o peptídeo HLF (1-11) em camundongos imunossuprimidos com candidíase disseminada mostrou que uma única dose de 0,4 ng/kg do peptídeo 24 horas pós infecção foi

capaz de reduzir UFCs em uma ordem de grandeza nos rins, (LUPETTI *et al.*, 2007). O tratamento com gomesina mostrou-se eficaz contra candidíase disseminada. O peptídeo apresentou eficácia na redução das UFCs dos órgãos dos animais. A aplicação de três doses de gomesina a 5 mg/kg reduziu as UFCs dos rins (órgão de maior tropismo do fungo) na ordem de 47%, já o tratamento com 15 mg/kg reduziu aproximadamente 79% das UFCs dos rins. Não há diferença estatística entre os tratamentos com gomesina, porém os resultados sugerem uma resposta dose-dependente. Esta resposta dose-dependente já foi observada, também, com o peptídeo antimicrobiano HLF (1-11) (LUPETTI *et al.*, 2007). Os tratamentos com 10 mg/kg e 20 mg/kg de fluconazol, assim como os tratamentos combinatórios de gomesina e fluconazol também foram eficazes na redução de UFCs nos rins. Os tratamentos com fluconazol (10 mg/kg e 20 mg/kg) reduziram as UFCs em 50%, sendo similares ao tratamento com gomesina 5 mg/kg, ou seja, é necessário uma dose quatro vezes maior de fluconazol para ter o mesmo resultado obtido pela gomesina. As concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-6 foram dosadas nos rins dos camundongos infectados com *C. albicans* e tratados com gomesina. Estas citocinas, principalmente a IL-6 ativam neutrófilos. Os neutrófilos são uma classe de células leucocitárias que fazem parte do sistema imune que possuem uma função essencial no mecanismo de defesa contra *Candida* (KULLBERG *et al.*, 1999). Observamos que o tratamento com 5 mg/kg de gomesina aumentou as concentrações das citocinas analisadas, assim como os tratamentos realizados com fluconazol .

O aumento das concentrações de citocinas nos rins dos animais tratados com gomesina pode ser resultado de uma possível ação modulatória do peptídeo sobre o sistema imune no local da infecção. Essa ação parece ser semelhante ao verificado para outro peptídeo antimicrobiano, a β defensina – 2 murina, que através da ativação de TLR4 leva a produção de várias citocinas como IL-12 e IL-6, além de quimiocinas (BIRAGYN *et al.*, 2002). Também, é sabido que peptídeos antimicrobianos são produzidos após a ativação de TLR (BIRCHLER *et al.*, 2001), sendo assim a gomesina poderia estimular a produção de outros peptídeos antimicrobianos. Além disso, a ação direta da gomesina pode provocar a liberação de antígenos intracelulares para o meio extracelular e dessa forma eles iriam exacerbar a resposta imune dos animais. Alguns estudos mostraram que em modelos de infecção bacteriana *in vivo*, tratamentos efetuados com peptídeos

antimicrobianos estruturalmente similares a gomesina, tais como a taquiplesina e protegrina, resultaram em uma diminuição dos níveis de TNF- α e IL-6. O tratamento com taquiplesina, contra *Pseudomonas aeruginosa*, mostrou que 12 horas após a administração de uma única dose de 1 mg/kg, os níveis de TNF- α e IL-6 circulantes do animais eram baixos (CIRIONI *et al.*, 2007). Semelhantemente à tachiplesina, a protegrina provocou uma diminuição nos níveis circulantes de TNF- α 48 horas após a administração de uma única dose de 1 mg/kg em camundongos com septicemia (GIACOMETTI *et al.*, 2003). Estes resultados estão em desacordo com os resultados obtidos com gomesina, porém vale ressaltar que ao contrário do tratamento com gomesina onde as citocinas foram dosadas no sitio de infecção, as citocinas dosadas nos tratamentos com taquiplesina e protegrina foram as circulantes. Não há dados na literatura que mostre que o fluconazol possa aumentar as concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-6 dos rins dos animais infectados com *C. albicans*, com isso podemos deduzir que o fluconazol também possa ter uma possível ação imunomodulatória.

Após verificarmos que a gomesina apresentou uma atividade eficaz contra candidíase disseminada em camundongos saudáveis, decidimos avaliar a atividade da gomesina contra candidíase disseminada em animais imunossuprimidos, uma vez que esta doença acomete em hospedeiros imunocomprometidos. Os tratamentos feitos com gomesina (5 mg/kg e 15 mg/kg) não mostraram aumento significativo da sobrevivência dos animais em relação ao controle. Este dado sugere que somente a ação direta da gomesina não foi suficiente para controlar a infecção, havendo necessidade da ação imunomodulatória. Por outro lado, este resultado também pode ser atribuído a metodologia do tratamento empregado, talvez se houvesse uma maior frequência de doses de gomesina, os animais poderiam exibir uma maior sobrevivência em relação ao controle. O tratamento combinatório de 5 mg/kg de gomesina e 20 mg/kg de fluconazol resultou em 23% de sobrevivência dos camundongos em 30 dias após infecção, isto pode ser um efeito combinatório da gomesina e o fluconazol, ou seja o fluconazol pode ser potencializado pela ação da gomesina.

Não há relatos na literatura de tratamentos tópicos realizados com peptídeos antimicrobianos contra candidíase vaginal, no entanto, o tratamento tópico com a gomesina mostrou-se eficaz contra o desenvolvimento de melanoma murino, além

de aumentar a sobrevivência dos animais (RODRIGUES *et al.*, 2008). Considerando esse resultado, decidimos avaliar a eficácia do tratamento tópico da gomesina contra candidíase vaginal. Observamos que os cremes de gomesina a 0,2% e 0,5% reduziram em uma ordem de grandeza as UFCs das vaginas dos animais em relação ao controle. Alteração no protocolo de aplicação da gomesina seja pelo aumento da frequência, ou alteração na formulação poderá surtir um melhor controle da infecção. O tratamento com o creme de miconazol a 2% foi eficaz no controle da UFCs das vaginas dos animais, sendo semelhante aos tratamentos com gomesina. Cabe salientar que para o tratamento com miconazol se assemelhar ao tratamento com gomesina é necessário maiores quantidades de miconazol. O tratamento realizado com o creme combinatório da gomesina e miconazol apresentou uma redução da UFCs da vagina dos animais similar ao o tratamento individual de gomesina (0,2% e 0,5%). Sendo assim, o tratamento combinatório não exibiu efeito aditivo.

A ação tóxica da gomesina foi avaliada através de leucogramas e eritogramas. Os leucogramas realizados dos animais tratados com gomesina mostraram que o peptídeo não alterou a quantidade de leucócitos e linfócitos. No entanto, a quantidade de eosinófilos do grupo não-infectado e tratado com gomesina exibiu um valor maior em relação aos outros grupos. Não sabemos a causa desta eosinofilia provocada pela gomesina, mas poderíamos associá-la a uma possível alergia do hospedeiro ao peptídeo, para comprovar isto novos experimentos deverão ser realizados. Nota-se que o grupo infectado tratado com gomesina não apresentou uma eosinofilia como o grupo não-infectado tratado com gomesina. Isto já era esperado, pois com exceção das infecções causadas por helmintos ou das alergias, sempre em uma infecção o número de eosinófilos não é alterado.

Podemos observar, também, que os grupos de animais tanto infectados como não infectados apresentaram um número de neutrófilos maior que os controles. Da mesma forma, também não podemos explicar a neutrofilia que a gomesina provoca nos animais, mas podemos especular que a gomesina seja um agente pró-inflamatório. Esta possível atividade pró-inflamatória indica que a gomesina talvez esteja estimulando a medula óssea a recrutar neutrófilos, entretanto não podemos afirmar que estes neutrófilos estão sendo endereçados ao sítio de infecção, para isto há necessidade de realizar novos experimentos. Os eritogramas feitos a partir do

sangue dos animais tratados com gomesina revelaram que a gomesina não provocou nenhuma alteração nos valores dos índices hematimétricos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Entretanto, o valor de reticulócitos está maior que o dos controles, indicando que os animais tratados com gomesina estão com a eritropoiese aumentada em relação aos controles. Talvez a gomesina esteja estimulando a produção de eritropoietina, assim aumentando a eritropoiese dos animais. Por outro lado, o tratamento com gomesina também pode estar causando hipóxia dos animais, assim aumentando a eritropoiese. Além do tratamento com gomesina não alterar os valores dos índices hematimétricos, plaquetas, hemoglobina e hematócrito, os valores das bilirubinas também não sofreram nenhuma alteração pelo peptídeo. Com isto, podemos afirmar que a gomesina não foi lítica para as hemácias dos animais. Além disso, o tratamento com gomesina não foi nefrotóxico, tão pouco hepatotóxico, pois os níveis de creatinina e Gama GT dos animais tratados estão similares aos dos animais dos grupos controles.

A biodistribuição da gomesina realizada neste estudo foi de grande importância para o entendimento da farmacocinética do peptídeo. Para isto, radiomarcamos a gomesina com o radioisótopo tecnécio-99m. A escolha deste radioisótopo foi feita, pois as propriedades físico-químicas do tecnécio-99m, permitem marcar inúmeras estruturas moleculares, além do seu baixo custo podendo ser obtido por um gerador de molibdênio. Outra vantagem do tecnécio-99m é sua meia vida curta de seis horas que proporciona uma baixa radiação para os pacientes e a não contaminação do meio ambiente (BROUWER *et al.*, 2007). A biodistribuição da gomesina revelou que o peptídeo é endereçado para os órgãos de tropismo da *Candida*: rins; baço e fígado, já nos primeiros minutos após a administração. Isto também acontece que o com o peptídeo UBI 29 – 41 (LUPETTI *et al.*, 2003). Contudo outros estudos devem ser conduzidos a fim de conhecer melhor a biodistribuição da gomesina em outros órgãos assim como observar a excreção do peptídeo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- A gomesina foi eficaz na inibição do crescimento do isolado 78 de *C. albicans* resistente a fluconazol, *in vitro*.
- O tratamento com a gomesina foi eficaz na redução das unidades formadoras de colônias dos rins, baço, fígado e vagina dos animais com candidíase disseminada e vaginal.
- A gomesina possui atividade imunomodulatória, pois o tratamento com o peptídeo aumentou as concentrações de citocinas de extrema importância no controle da proliferação da *Candida* no sítio de infecção.
- gomesina não teve efeito tóxico sobre os animais.
- A biodistribuição da gomesina mostrou que cinco minutos após a sua administração, o peptídeo já se concentra em órgãos de tropismo do fungo como rins, baço e fígado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; PRINCE, R. A.; MARCHILLO, K.; ASHBECK, J.; HOU, J. In vivo pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 539-50, 2008.

BARBOSA, F. M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R. A.; MIRANDA, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticytotoxic agent that acts in synergism with fluconazole. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 274, n. 2, p. 279-86, 2007.

BARCHIESI, F.; GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; ARZENI, D.; KAMYSZ, W.; SILVESTRI, C.; LICCI, A.; MARIGLIANO, A.; DELLA VITTORIA, A.; NADOLSKI, P.; LUKASIAK, J.; SCALISE, G. In-vitro activity of the synthetic protegrin IB-367 alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. **J. Chemother.**, v. 19, n. 5, p. 514-8, 2007.

BEFUS, A. D.; MOWAT, C.; GILCHRIST, M.; HU, J.; SOLOMON, S.; BATEMAN, A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. **J. Immunol.**, v. 163, n. 2, p. 947-53, 1999.

BIRAGYN, A.; RUFFINI, P. A.; LEIFER, C. A.; KLYUSHNENKOVA, E.; SHAKHOV, A.; CHERTOV, O.; SHIRAKAWA, A. K.; FARBER, J. M.; SEGAL, D. M.; OPPENHEIM, J. J.; WAK, L. W. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 1025-9, 2002.

BIRCHLER, T.; SEIBL, R.; BUCHNER, K.; LOELIGER, S.; SEGER, R.; HOSSLE, J. P.; AGUZZI, A.; LAUENER, R. P. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 11, p. 3131-7, 2001.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J. HANCOCK, R. E. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. **Curr. Protein. Pept. Sci.**, v. 6, n. 1, p. 35-51, 2005.

BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, n. 2, p. 183-8, 1990.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 19, n. 9, p. 895, 1949.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 238-50, 2005.

BROUWER, C. P.; WULFERINK, M.; WELLING, M. M. The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 5, p. 1633-1651, 2007.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 169-84, 2004.

BURGIERMAN, M. R. **Atividade do peptídeo antimicrobiano gomesina contra Trypanosoma cruzi e Leishmania sp.** Dissertação - Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. 59 p.

BURGIERMAN, M. R.; MALDONADO, R. A.; ULIANA, S.; FÁZIO, M. A.; MIRANDA, M. T. M.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S. Gomesin activity against Leishmania sp and Trypanosoma cruzi. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 110, 2002.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of Candida albicans. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 7, p. 327-35, 2001.

CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; SILVESTRI, C.; KAMYSZ, W.; ORLANDO, F.; MOCCHEGIANI, F.; DI MATTEO, F.; RIVA, A.; LUKASIAK, J.; SCALISE, G.; SABA, V.; GIACOMETTI, A. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant Pseudomonas aeruginosa strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 6, p. 2005-10, 2007.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. New York: Churchill Livingstone, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, n. 2, p. 101-6, 2008.

FAINTUCH, B. L.; SANTOS, R. L. S. R.; SOUZA, A. L. F. M.; HOFFMAN, T. J.; GREELEY, M.; SMITH, C. J. ^{99m}Tc-HYNIC-bombesin (7-14)NH₂: Radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA=ethylenediamine-N,N'-diacetic acid), tricine, and nicotinic acid. **Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.**, v. 35, p. 43 - 51, 2005.

FAZIO, M. A.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. **Biopolymers**, v. 88, n. 3, p. 386-400, 2007.

FAZIO, M. A.; OLIVEIRA, V. X.; JR; BULET, P.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 205-18, 2006.

FOGAÇA, A. C.; ZAINI, P. A.; WULFF, N. A.; FÁZIO, M. A.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; DA SILVA, A. M. Gomesin, a β -hairpin antimicrobial peptide, induces *Xylella fastidiosa* biofilm formation at a sublethal concentration. 2009. In press.

FUX, C. A.; COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; MOCCHEGIANI, F.; D'AMATO, G.; DEL PRETE, M. S.; ORLANDO, F.; KAMYSZ, W.; LUKASIAK, J.; SABA, V.; SCALISE, G. Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 874-8, 2003.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; MOCCHEGIANI, F.; DEL PRETE, M. S.; VITICCHI, C.; KAMYSZ, W.; E, L. E.; SABA, V.; SCALISE, G. Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 7, p. 2132-6, 2002.

GIACOMETTI, A.; GHISELLI, R.; CIRIONI, O.; MOCCHEGIANI, F.; D'AMATO, G.; ORLANDO, F.; SISTI, V.; KAMYSZ, W.; SILVESTRI, C.; NALDOSKI, P.; LUKASIAK, J.; SABA, V.; SCALISE, G. Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 654-60, 2004.

HAMAD, M.; ABU-ELTEEN, K. H.; GHALEB, M. Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naive mice. **Mycoses**, v. 47, n. 7, p. 304-9, 2004.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 1, p. 120-8, 2008.

KUIPERS, M. E.; DE VRIES, H. G.; EIKELBOOM, M. C.; MEIJER, D. K.; SWART, P. J. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 11, p. 2635-41, 1999.

KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G.; VONK, A. G.; VAN DER MEER, J. W. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 26, n. 3-4, p. 299-307, 1999.

KURTZ, M. B.; DOUGLAS, C. M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, n. 2, p. 79-86, 1997.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; E.M; H. V.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I.; JR; FOGACA, A. C; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 27, n. 9, p. 781-91, 2003.

LUPETTI, A.; BROUWER, C. P.; BOGAARDS, S. J.; WELLING, M. M.; DE HEER, E.; CAMPA, M.; VAN DISSEL, J. T; FRIESEN, R. H.; NIBBERING, P. H. Human lactoferrin-derived peptide's antifungal activities against disseminated *Candida albicans* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 9, p. 1416-24, 2007.

LUPETTI, A.; PAUWELS, E. K.; NIBBERING, P. H.; WELLING, M. M. ^{99m}Tc-antimicrobial peptides: promising candidates for infection imaging. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 47, n. 4, p. 238-45, 2003.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 4, p. 1190-8, 2002.

MATSUMOTO, M.; ISHIDA, K.; KONAGAI, A.; MAEBASHI, K.; ASAOKA, T. Strong antifungal activity of SS750, a new triazole derivative, is based on its selective binding affinity to cytochrome P450 of fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 2, p. 308-14, 2002.

MIRANDA, A.; MIRANDA, M. T. M.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; DAFFRE, S. Gomesin: a powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. In: DE LIMA, M.E.; PIMENTA, A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. **Animal toxins: state of the art. Perspectives in Health and Biotechnology.** India: Research Signpost, 2008.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 64, n. 7-8, p. 922-33, 2007.

MOREIRA, C. K.; RODRIGUES, F. G.; GHOSH, A.; VAROTTI, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; JACOBS-LORENA, M.; MOREIRA, L. A. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. **Exp. Parasitol.**, 2007.

MYGIND, P. H.; FISCHER, R. L.; SCHNORR, K. M.; HANSEN, M. T.; SONKSEN, C. P.; LUDVIGSEN, S.; RAVENTOS, D.; BUSKOV, S.; CHRISTENSEN, B.; DE MARIA, L.; TABOUREAU, O; YAVER, D.; ELVIG-JORGENSEN, S. G.; SORENSEN, M. V.; CHRISTENSEN, B. E.; KJAERULFF, S.; FRIMODT-MOLLER, N.; LEHRER, R. I.; ZASLOFF, M.; KRISTENSEN, H. H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975-80, 2005.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, n. 3, p. 485-506, 2006.

PAPPAS, P. G.; ANDES, D.; SCHUSTER, M.; HADLEY, S.; RABKIN, J.; MERION, R. M.; KAUFFMAN, C. A.; HUCKABEE, C.; CLOUD, G. A.; DISMUKES, W. E.; KARCHMER, A. W. Invasive fungal infections in low-risk liver transplant recipients: a multi-center prospective observational study. **Am. J. Transplant.**, v. 6, n. 2, p. 386-91, 2006.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; SOBEL, J. D; FILLER, S. G; DISMUKES, W. E.; WALSH, T.; J. EDWARDS, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 161-89, 2004.

PEREIRA, L. S. **Estudos de dois compostos antimicrobianos originários da aranha Acanthoscurria gomesiana.** Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, L. S.; SILVA, P. I. JR; MIRANDA, M. T; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** , v. 352, n. 4, p. 953-9, 2007.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, n. 3, p. 121-30, 2007.

PERLROTH, J; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 4, p. 321-46, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 133-63, 2007.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, 2009.

RODRIGUES, E. G.; DOBROFF, A. S.; CAVARSAN, C. F.; PASCHOALIN, T.; NIMRICHTER, L.; MORTARA, R. A.; SANTOS, E. .L; FAZIO, M. A; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; TRAVASSOS, L. R. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. **Neoplasia**, v. 10, n. 1, p. 61-8, 2008.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315-28, 1947.

SACRAMENTO, R. S.; MARTINS, R. M.; MIRANDA, A; .DOBROFF, A. S; DAFFRE, S; FORONDA, A. S; D, D. E. F.; SCHENKMAN, S. Differential effects of alpha-helical and beta-hairpin antimicrobial peptides against *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology**, p. 1-9, 2009.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SILVA, P. I. JR; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 43, p. 33464-70, 2000.

SIMONETTI, O; GANZETTI, G; ARZENI, D; CAMPANATI, A; MARCONI, B; SILVESTRI, C; CIRIONI, O; GABRIELLI, E; LENCI, I; KAMYSZ, W; KAMYSZ, E; GIACOMETTI, A; SCALISE, G; BARCHIESI, F.; OFFIDANI, A. In vitro activity of Tachyplesin III alone and in combination with terbinafine against clinical isolates of dermatophytes. **Peptides**, 2009. Epub ahead of print.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961-71, 2007.

SOUZA, A.; BEVILACQUA, V.; PASTERNAK, J.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MAGALHÃES, V. Strong in vitro activity of Gomesin against multiresistant bacteria. ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 44., 2004, Washington, DC. **Anais...** Washington, DC: AC, 2004. p. F-1930.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G. EDWARDS, J. E.; JR. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 2, p. 244-51, 2006.

VAN'T HOF, W; REIJNDERS, I. M.; HELMERHORST, E. J.; WALGREEN-WETERINGS, E.; SIMOONS-SMIT, I. M.; VEERMAN, E. C.; AMERONGEN, A. V. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 163-9, 2000.

WELLING, M. M.; LUPETTI, A.; BALTER, H. S.; LANZZERI, S.; SOUTO, B; REY, A. M; SAVIO, O.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; PAUWELS, E. K.; NIBBERING, P. H. 99mTc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. **J. Nucl. Med.**, v. 42, n. 5, p. 788-94, 2001.

YANG, D.; CHEN, Q.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 9-14, 2000.

ZAIYOU, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. **J. Mol. Med.**, v. 85, n. 4, p. 317-29, 2007.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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