



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade antifúngica de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade em
leveduras de *Candida albicans***

Gleyce Moreno Barbosa

ORIENTADORES: Prof^a Dr^a Carla Holandino Quaresma
Prof Dr André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro

2011

GLEYCE MORENO BARBOSA

**Atividade Antifúngica de Correntes Elétricas
Contínuas de Baixa Intensidade em Leveduras de
*Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof^ª Dr^ª Carla Holandino Quaresma

Prof Dr André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro

2011

GLEYCE MORENO BARBOSA

Atividade Antifúngica de Correntes Elétricas Contínuas de Baixa Intensidade em Leveduras de *Candida albicans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

Prof^a Dr^a Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof Dr André Luis Souza dos Santos
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Gisela Maria Dellamora Ortiz
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a Dr^a Marta Helena Branquinha de Sá
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ

Dr^a Lucimar Ferreira Kneipp
Instituto Osvaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Valeria Pereira de Sousa
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a Dr^a Márcia Alves Marques Capella
Instituto de Biofísica Prof. Carlos Chagas Filho – UFRJ

*À minha avó Lenir (in memoriam), por todo amor e afeto.
Aos meus pais, pelo amor, carinho e apoio, e por
representarem um exemplo de vida para mim.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por sempre guiar a minha jornada, me conduzindo a caminhos corretos e seguros. Por sempre me prover energia e saúde, necessárias para a realização adequada de todas as tarefas.

Ao *Cosmo*, por sempre se apresentar tão belo e perfeito em todas as formas disponíveis para nós, principalmente através da presença da *Natureza* e dos *Astros*. Também por todas as oportunidades que estão sendo apresentadas a mim ao longo da vida.

À *Professora Carla Holandino*, orientadora deste trabalho e exemplo de Mestre, que sempre me acompanhou, desde o início da minha vida profissional. Muito obrigada, minha amiga, por todo apoio, confiança e compreensão durante a nossa convivência e por sempre me estimular ao crescimento pessoal e profissional.

Ao *Professor André Luis Souza dos Santos*, orientador deste trabalho, por ter me oferecido condições para a realização deste estudo e pelo acompanhamento criterioso. Muito obrigada, Mestre, por ser um exemplo de dedicação e por me transmitir o conhecimento em todos os momentos.

Aos meus pais, *Carlos Alberto e Edna*, por todo o carinho, atenção e amor desde a minha infância. Muito obrigada por sempre estarem presentes em minha vida, me aconselhando nos momentos adequados e guiando o meu caminho. Muito obrigada por toda a dedicação e esforço realizado por vocês para que eu pudesse chegar a este momento!

Aos meus irmãos, *Glauce e Glauber*, por estarmos sempre juntos e unidos. Muito obrigada por vocês existirem em minha vida, sempre me apoiando, aconselhando e tornando todos os momentos agradáveis! É um prazer conviver com vocês e sempre tê-los por perto!

A toda minha família, aos parentes que moram em Volta Redonda, muito obrigada por sempre cativarem um ambiente familiar muito agradável e por me acolherem em todos os momentos.

A todos os membros do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, que trabalharam aqui durante estes anos e aqueles que estão presentes atualmente. Um agradecimento especial a *Camila Siqueira, Fortune Homsani, Cesar Augusto e Monica Siqueira*, que acompanharam minha trajetória

durante esta fase, auxiliando nas atividades do laboratório e também proporcionando uma convivência muito agradável, tanto no ambiente de trabalho como fora dele. Muito obrigada pela amizade!

À *Roberta Valle, Érika Araújo e Carina Marçal*, alunas do Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, pelo auxílio nos experimentos e análises.

Ao aluno *Eldio Santos*, pela colaboração para a realização de parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Mestre *Venício Feo da Veiga*, por todo o seu talento na área de microscopia e por me orientar na realização desta tarefa.

À banca de acompanhamento, *Professora Marta Helena Branquinha de Sá e Professora Patricia Zancan*, pelas importantes considerações fornecidas acerca do trabalho durante este período.

Às minhas amigas *Isabel e Fabiana*, colegas de graduação e também colegas de mestrado, que me apoiaram nesta etapa.

Aos membros da banca, *Professora Gisela Maria Dellamora Ortiz, Professora Marta Helena Branquinha de Sá e Doutora Lucimar Ferreira Kneipp*, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca.

Aos órgãos que forneceram recursos para este trabalho: *CNPq e FAPERJ*.

A todos aqueles que participaram de alguma forma para que eu chegasse até aqui e também aqueles que ainda estão participando desta trajetória. Muito obrigada pela amizade e companheirismo!

A todos os professores, funcionários, técnicos e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio.

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”

1 Coríntios, cap 13.2

RESUMO

BARBOSA, Gleyce Moreno. **Atividade Antifúngica de Correntes Elétricas Contínuas de Baixa Intensidade em Leveduras de *Candida albicans***. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

As infecções fúngicas constituem um grave problema de saúde pública, pois as taxas de morbidade e mortalidade por esta patologia vêm aumentando nas últimas décadas. A resistência existente em relação aos antifúngicos atualmente disponíveis no mercado farmacêutico motiva o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Neste cenário se encontra a eletroterapia, a qual se baseia no uso de uma corrente elétrica contínua (CE) para promover a destruição de tumores ou para promover a regeneração de tecidos ulcerados. O efeito destrutivo ou regenerativo de CE parece estar relacionado à intensidade de corrente elétrica aplicada. Desta forma, no presente estudo os efeitos de CE sobre leveduras de *Candida albicans* foram avaliados. Para tanto, a viabilidade celular de *C. albicans* submetida ao tratamento elétrico foi avaliada em um sistema experimental *in vitro* através de dois métodos: plaqueamento para avaliação de unidades formadoras de colônia e incorporação de iodeto de propídio. Foi verificada susceptibilidade das leveduras ao Fluxo Anódico (FA). Este efeito foi atribuído principalmente aos produtos de eletrólise gerados, como ácido hipocloroso, o qual não foi produzido em quantidade suficiente para induzir variações significativas no pH do meio eletrolítico. Em contrapartida, o Fluxo Catódico (FC) e o Fluxo Eletroiônico (FEI) não foram capazes de modificar a viabilidade de *C. albicans*. Alterações morfológicas, como desorganização da estrutura celular e rarefação citoplasmática, foram detectadas por microscopia eletrônica de transmissão quando as células foram tratadas pelo FC e FA. A expressão de aspártico peptidases secretadas (SAPs), fator de virulência de

extrema importância para *C. albicans*, também foi avaliada no sobrenadante celular, sendo observada uma redução significativa quando as células foram estimuladas pelo FC. A análise preliminar dos níveis de ergosterol, lipídeo presente na membrana celular e ausente nas células do hospedeiro, indicou uma redução deste parâmetro em leveduras submetidas ao estímulo catódico. Este resultado indica que, apesar de não existir um efeito direto sobre a viabilidade celular, os Fluxos Catódico e Eletroiônico agem sobre o metabolismo celular, induzindo alterações na expressão de enzimas e componentes de membrana celular. A quantificação das taxas de adesão de leveduras tratadas com CE sobre a interação fungo-hospedeiro foi avaliada utilizando células epiteliais de rim de macaco Ma104 como modelo. Os resultados obtidos indicaram que o estímulo elétrico não foi capaz de alterar de forma estatisticamente significativa a adesão das leveduras tratadas ao epitélio. Estes resultados evidenciam que importantes alterações celulares e ultraestruturais são induzidas por CE, de maneira dependente da dose e da polaridade, abrindo novas perspectivas para o estudo dos efeitos deste promissor agente físico sobre leveduras de *C. albicans*.

Palavras-chave: Infecções fúngicas, *Candida albicans*, CE, Eletroterapia, SAPs, Ergosterol, Interação Fungo-Hospedeiro.

ABSTRACT

BARBOSA, Gleyce Moreno. **Antifungal Effect of Low Intensity Direct Electric Current on *Candida albicans* Yeasts**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Fungal infections constitute a serious public health problem, because morbidity and mortality rates of this disease have been increasing in the last decades. The resistance to antifungal agents currently available in the pharmaceutical market motivates the development of new antifungal therapies, as electrotherapy. Electrotherapy is based in the application of direct electric current (DC) to promote destruction of tumors or to promote regeneration of ulcerated tissues. The destructive or regenerative effects of DC seem to be related to the intensity of the applied electrical current. In the present study DC effects on *Candida albicans* yeasts were evaluated. For this, the viability of *C. albicans* submitted to electric treatment was evaluated in an *in vitro* experimental system using two methods: plating for evaluation of colony-forming units and incorporation of propidium iodide. A high susceptibility of yeasts to Anodic Flow (AF) was verified. This effect was mainly attributed to the electrolysis products generation, such as hypochlorous acid, which was not produced in sufficient amount to induce significant changes on pH of electrolytic medium. In contrast, Cathodic Flow (CF) and Electroionic Flow (EIF) were not able to modify the viability of *C. albicans*. Morphological alterations, such as disorganization of cell structure and cytoplasmic rarefaction, were detected by transmission electron microscopy when yeast cells were treated with CF and AF. The expression of secreted aspartic peptidases (SAPs), an important virulence characteristic of *C. albicans*, was also evaluated in cell supernatant. A significant reduction on SAPs expression in CF-treated cells was observed. The preliminary

analysis of expression of ergosterol, an exclusive lipid present in yeast membrane and absent in host cells, indicated a decrease in this parameter when yeasts were treated with CF. This result indicates that, although there is not a direct effect on cell viability, DC can modulate the cellular metabolism, inducing alterations in the expression of enzymes and cell membrane components. The quantification of adhesion indexes of DC-treated yeasts on the host-fungus interaction was assessed using Ma104 epithelial cells as a model. The results indicated that electrical stimulation was not able to modify the adhesion of treated yeasts to the epithelium. The results evidenced significant cellular and ultrastructural changes induced by DC, being dose and polarity dependent. The present work shows new perspectives to study the effects of this promising physical agent on *C. albicans* yeasts.

Keywords: Fungal Infections, *Candida albicans*, DC, Electrotherapy, SAPs, Ergosterol, Host-Fungus Interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Candidíase mucocutânea crônica.	22
Figura 2. Diferentes estágios morfológicos de <i>Candida albicans</i> .	25
Figura 3. Representação das três fases da infecção oral por <i>Candida albicans</i> .	29
Figura 4. Esquema terapêutico para candidíase invasiva e candidemia.	31
Figura 5. Via biossintética de ergosterol.	32
Figura 6. Esquema do sistema experimental utilizado para o tratamento de <i>Candida albicans</i> com correntes elétricas contínuas de baixa intensidade.	43
Figura 7. Viabilidade celular de diferentes concentrações de leveduras de <i>Candida albicans</i> , pelo método UFC, após estímulo com CE.	49
Figura 8. Percentual de viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> avaliado por UFC após estímulo anódico.	51
Figura 9. Percentual de viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> avaliado por UFC após estímulo catódico.	52
Figura 10. Percentual de viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> avaliado por UFC após estímulo com Fluxo Eletroiónico.	53
Figura 11. Citometria de fluxo de leveduras tratadas com corrente elétrica e marcadas com iodeto de propídio.	54
Figura 12. Percentual de incorporação de iodeto de propídio após tratamento com CE.	55
Figura 13. Variação de pH no Fluxo Anódico.	56
Figura 14. Variação de pH no Fluxo Catódico.	57
Figura 15. Viabilidade celular de leveduras após incubação com eletrólitos produzidos no Fluxo Anódico.	58
Figura 16. Viabilidade celular de leveduras incubadas com produtos de eletrólise ao longo do tempo.	59
Figura 17. Micrografias de células controle e tratadas pelo FEI.	61
Figura 18. Micrografias de células tratadas pelo Fluxo Catódico.	62

Figura 19. Micrografias de células tratadas pelo Fluxo Anódico.	63
Figura 20. Avaliação da atividade proteolítica de SAPs após estímulo elétrico.	66
Figura 21. Avaliação da expressão de ergosterol após estímulo elétrico.	67
Figura 22. Fotografias representando a adesão de <i>Candida albicans</i> a células epiteliais Ma104.	68
Figura 23. Índice de adesão entre leveduras de <i>Candida albicans</i> tratadas e células epiteliais Ma104.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações induzidas no organismo pelos diferentes polos de corrente elétrica.	34
Tabela 2. Reações eletrolíticas.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS: sequência tipo aglutinina

APS: persulfato de amônio

BHI: Infusão cérebro-coração

BSA: Albumina de soro bovino

CT: Controle de Células

CE: Corrente Elétrica

DMEM: Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

FA: Fluxo Anódico

FC: Fluxo Catódico

FEI: Fluxo Eletroíônico

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HEPES: N-(-2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

PBS: Tampão salina fosfato

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI: Iodeto de propídio

PMN: Células polimorfonucleares

SAP: Aspártico peptidase secretada

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TLR: Receptor *Toll-like*

TNF: Fator de necrose tumoral

UFC: Unidades formadoras de colônia

YCB: Base de carbono para levedura

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1 Infecções fúngicas	19
1.2 Candidíase	20
1.3 <i>Candida albicans</i>	23
1.3.1 Fatores de virulência	26
1.3.1.1 Aspártico peptidases secretadas	26
1.3.2 Interação de <i>Candida albicans</i> com células do hospedeiro	27
1.4 Tratamento da candidíase	29
1.5 Efeitos biológicos de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade	33
1.5.1 Efeitos biológicos de correntes elétricas contínuas descritos em fungos	35
2 Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 Material e métodos	38
3.1 Material	38
3.1.1 Equipamentos e utensílios	38
3.1.2 Reagentes	38
3.2 Métodos	39
3.2.1 Preparo de soluções	39
3.2.1.1 Preparo de meio YCB	39
3.2.1.2 Preparo de meio BHI	40
3.2.1.3 Preparo de BSA	40
3.2.1.4 Preparo de ágar nutriente	40

3.2.1.5 Preparo de meio de cultura DMEM	40
3.2.1.6 Preparo de tripsina	40
3.2.1.7 Preparo de tampão salina fosfato	41
3.2.1.8 Preparo do corante azul de tripan	41
3.2.1.9 Preparo de gel para SDS-PAGE	41
3.2.1.10 Preparo do gel de empacotamento para SDS-PAGE	41
3.2.2 Microrganismo e cultivo	42
3.2.3 Modelo experimental para a estimulação elétrica	42
3.2.4 Avaliação do efeito da CE na viabilidade celular	43
3.2.4.1 Método de plaqueamento para avaliação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	43
3.2.4.2 Método de incorporação de Iodeto de propídio (PI)	44
3.2.5 Alterações induzidas no meio eletrolítico	44
3.2.6 Avaliação do efeito de eletrólitos na viabilidade celular	45
3.2.7 Alterações ultraestruturais	45
3.2.8 Efeito da CE na atividade de aspártico peptidases secretadas para o sobrenadante celular	46
3.2.9 Avaliação dos níveis de ergosterol após tratamento com CE	46
3.2.10 Cultura de células epiteliais de rim de macaco (Ma104)	47
3.2.10.1 Cultivo das células da linhagem Ma104	47
3.2.10.2 Interação de <i>Candida albicans</i> com células epiteliais	48
3.2.11 Análise estatística	48
4 Resultados	49
4.1 Influência da concentração de leveduras para os efeitos citotóxicos da CE	49
4.2 Viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> após tratamento com diferentes intensidades de corrente elétrica	50
4.2.1 Método UFC	50

4.2.1.1 UFC após estímulo anódico	50
4.2.1.2 UFC após estímulo catódico	51
4.2.1.3 UFC após estímulo com Fluxo Eletroiónico	52
4.2.2 Avaliação da viabilidade celular com iodeto de propídio	54
4.3 Alterações induzidas pela CE no meio eletrolítico e sua influência sobre leveduras de <i>C. albicans</i>	56
4.3.1 Avaliação dos valores de pH no meio eletrolítico	56
4.3.2 Viabilidade celular de <i>Candida albicans</i> após incubação com produtos de eletrólise gerados em tampão PBS	57
4.3.2.1 Efeito dos produtos de eletrólise gerados na presença de leveduras e incubados com leveduras não submetidas ao estímulo elétrico	58
4.3.2.2 Efeito dos produtos de eletrólise gerados na ausência de leveduras e incubados com <i>C. albicans</i> em diferentes tempos	59
4.4 Microscopia eletrônica de transmissão	60
4.5 Atividade de aspártico peptidases secretadas no sobrenadante de leveduras tratadas	65
4.6 Avaliação dos níveis de ergosterol em leveduras tratadas com CE	66
4.7 Interação com células epiteliais Ma104	68
5 Discussão	71
6 Conclusões	79
7 Referências	80

1 Introdução

1.1 Infecções fúngicas

Fungos são organismos eucarióticos dotados de parede celular e membrana plasmática que apresenta ergosterol, ao contrário de células eucarióticas animais, que apresentam colesterol. Tais organismos podem se apresentar na natureza na forma de microrganismos, como leveduras e hifas, ou como seres multicelulares, por exemplo basidiomicetos. Sua importância clínica está relacionada à capacidade de provocar doenças, incluindo as formas cutânea, subcutânea e sistêmica (BARON, 1996). Os fungos patogênicos normalmente são comensais ou estão presentes no meio ambiente e, eventualmente, infectam o hospedeiro humano (SEIDER *et al.*, 2010).

Atualmente, as infecções fúngicas constituem um importante e crescente problema de saúde pública, pois os índices vêm aumentando gradativamente nas últimas décadas, principalmente das chamadas infecções nosocomiais, ou seja, infecções adquiridas em ambiente hospitalar. Consequentemente, a morbidade e mortalidade advindas destas patologias têm apresentado taxas mais elevadas nos últimos anos (GARCÍA-RUIZ, AMMUTIO & PONTÓN, 2004; ALANGADEN, 2011).

O aumento do número de indivíduos infectados coincide com a diminuição da mortalidade por infecções bacterianas, devido ao avanço da antibioticoterapia, responsável por alterar a flora microbiana normal da pele e mucosas, tornando o indivíduo mais susceptível a doenças causadas por fungos (RICHARDSON, 2005).

Os fatores de risco para tais infecções estão relacionados principalmente à imunossupressão ou à alteração das barreiras anatômicas, favorecendo a entrada de microrganismos no hospedeiro. As principais causas que conduzem ao desenvolvimento destas doenças são as seguintes: tempo prolongado de permanência no hospital, diabetes, insuficiência renal, hemodiálise, antibióticos de amplo espectro, cateter venoso, nutrição parenteral, fármacos imunossupressores, câncer e quimioterapia, pancreatite aguda severa, cirurgia e transplante de órgãos ou medula óssea (OSTROSKY-ZEICHNER & PAPPAS, 2006).

A maior frequência de utilização de técnicas invasivas de tratamento, como transplante de células-tronco hematopoiéticas e transplante de órgãos, constitui um

fator que deve ser observado em sua totalidade para promover a diminuição de casos de infecções fúngicas sistêmicas adquiridas em ambiente hospitalar. A equipe de saúde envolvida no preparo e assepsia dos materiais utilizados nestes procedimentos deve ter extrema cautela ao desenvolver suas atividades (ALANGADEN, 2011).

Dentre as infecções sistêmicas causadas por fungos, as mais comuns são candidíase e aspergilose, cujas espécies mais frequentemente envolvidas são *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente (ALANGADEN, 2011).

As infecções subcutâneas também apresentam um alto grau de importância clínica, devido à capacidade de seus agentes etiológicos provocarem lesões e úlceras graves na pele e mucosas, podendo causar complicações mais graves aos pacientes. Um exemplo é a cromoblastomicose, doença subcutânea crônica que acomete principalmente trabalhadores envolvidos em atividades rurais. O principal agente etiológico desta doença é *Fonsecaea pedrosoi*, fungo dimórfico, encontrado sob a forma de conídios e micélio no solo e sob a forma de células escleróticas no hospedeiro (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007).

1.2 Candidíase

A candidíase é uma infecção oportunista que pode se manifestar nas mucosas oral e vaginal e também pode se desenvolver sistemicamente, na qual 90% das infecções são causadas pelas seguintes espécies: *Candida albicans* – que corresponde a 50% do total, sendo a espécie mais prevalente –, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Entre as espécies não-*albicans*, a descrita mais frequentemente nos Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra é *C. glabrata*; enquanto a mais descrita no sul da Europa é *C. parapsilosis*. Já na América Latina, predominam *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Estas diferenças regionais provavelmente são oriundas da diversidade observada entre os pacientes destes locais e também decorrem das variadas técnicas utilizadas clinicamente (CASTÓN-OSORIO *et al.*, 2008; WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2010; ALANGADEN, 2011).

No ambiente hospitalar, as infecções causadas por *Candida* spp., que corresponde ao fungo mais comumente isolado, resultam em um tempo maior de permanência dos pacientes nos hospitais, com aumento de custos, sendo, portanto,

considerado um problema de saúde pública (RENTZ, HALPERN & BOWDEN, 1998). Dados coletados demonstram que o tratamento de candidíase corresponde a 60% do custo total atribuído ao tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Além disso, apesar dos tratamentos disponíveis, a mortalidade por candidemia é alta, ocorrendo em 15 a 25% dos casos em adultos e cerca de 10 a 15% em crianças. Um fato importante que está sendo observado é que o número de casos de candidíase sistêmica vem aumentando tanto no ambiente hospitalar quanto em pacientes ambulatoriais, indicando que a infecção não está restrita a pacientes internados (CASTÓN-OSORIO *et al.*, 2008; ALANGADEN, 2011).

Com relação à predominância de espécies de *Candida* nas unidades hospitalares, é possível observar que *C. albicans* é a principal espécie encontrada em unidades de pacientes queimados. *C. glabrata* é isolada mais frequentemente de pacientes idosos, pacientes com câncer e aqueles expostos primariamente a fluconazol, piperacilina-tazobactam ou vancomicina. *C. parapsilosis* é uma importante causa de candidemia em neonatos, em pacientes transplantados e em infecções que possuem como fator causal cateteres venosos. *C. parapsilosis* também pode ter relação com infecções adquiridas pelo uso de nutrição parenteral, pois tais fungos crescem em soluções extremamente ricas em glicose. A taxa de infecção por *C. tropicalis* está aumentando e está associada a doenças hematológicas. *C. krusei* é a quinta espécie do gênero *Candida* mais comum e apresenta resistência intrínseca ao fluconazol. Um fator de risco para candidemias nosocomiais por *C. krusei* inclui cirurgia gastrointestinal (ALANGADEN, 2011).

A candidemia leva à colonização de órgãos internos, induzindo a candidíase disseminada. Ambas são condições clínicas extremamente graves. Os sintomas da candidemia são similares aos da septicemia bacteriana. Normalmente antifúngicos são administrados profilaticamente depois de transplantes de medula óssea ou cirurgias abdominais, para evitar este tipo de infecção (KIM & SUDBERY, 2011).

A apresentação mucocutânea, conhecida como candidíase oral (Figura 1) e representativa da infecção oportunista mais comum nesta cavidade, pode se apresentar de diferentes formas, de acordo com a cronicidade da doença:

- Candidíase pseudomembranosa aguda, também conhecida como candidíase mucosa ou “sapinho”: apresenta confluência tardia, com a formação de placas, podendo ocorrer sangramento da mucosa;

- Candidíase atrófica crônica: corresponde à estomatite causada pelo uso de dentadura, está associada com edema e eritema da mucosa oral;
- Queilite angular: é um processo inflamatório que ocorre no ângulo da boca, caracterizado por escamação e fissuras;
- Leucoplasia: candidíase hiperplástica crônica;
- Candidíase mucocutânea crônica: está associada à imunodeficiência e a doenças endócrinas, como diabetes (WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2010).

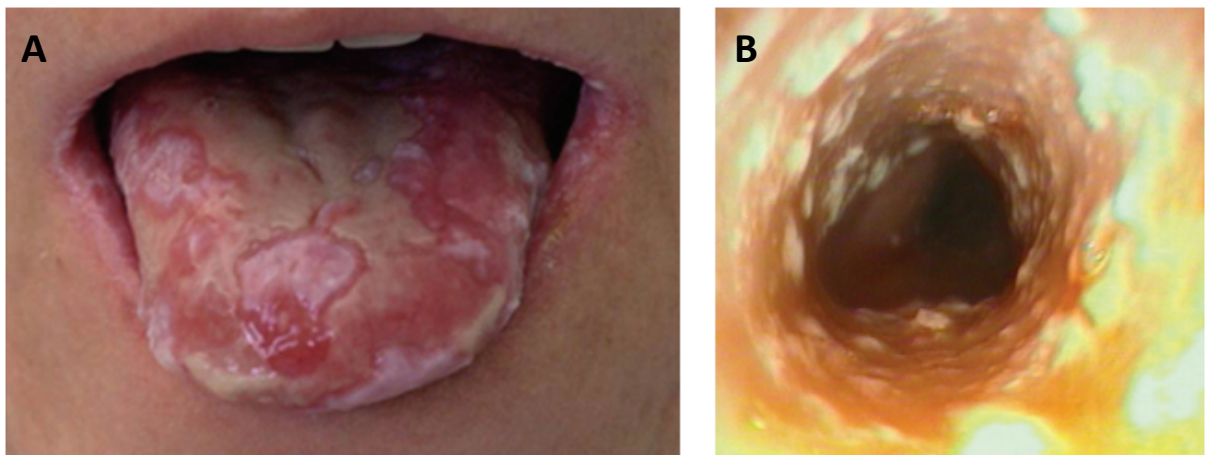


Figura 1. Candidíase mucocutânea crônica. (A) Placas esbranquiçadas e amareladas na língua. (B) Endoscopia apresentando esofagite severa decorrente da infecção. Adaptado de FIRINU *et al.*, 2011.

Portanto, a apresentação clínica da doença inclui basicamente as formas “brancas” – candidíase pseudomembranosa e hiperplástica – e eritematosas, sendo que a última é a mais frequente. Em pacientes com o sistema imune comprometido, a forma pseudomembranosa também afeta outras regiões além da cavidade oral, como orofaringe e esôfago. Os pacientes podem relatar uma sensação de ardência local ou gosto metálico decorrente da infecção (GIANNINI & SHETTY, 2011).

Em pacientes idosos, o uso de medicamentos, como antidepressivos, diuréticos e com efeitos anticolinérgicos, constitui uma causa importante de candidíase oral. Isto se deve ao fato de que tais substâncias são capazes de gerar xerostomia. A diminuição do fluxo de saliva reduz a capacidade de limpeza promovida por este fluido, diminuindo também os níveis locais de imunoglobulina A, o que propicia o crescimento de *C. albicans* (GIANNINI & SHETTY, 2011). O uso de dentaduras, infecções por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e pacientes com câncer oral também constituem fatores importantes que conduzem ao desenvolvimento de candidíase orofaríngea (KIM & SUDBERY, 2011).

A apresentação mucocutânea da doença, onde normalmente o fungo é encontrado sob a forma de micélio ou hifa, está geralmente associada com uma resposta celular imune inadequada, já que a resposta celular consiste na primeira defesa do organismo do hospedeiro contra patógenos. A resposta imune inata é mediada por neutrófilos e macrófagos, células envolvidas em processos de fagocitose. A resposta celular é de extrema importância para a defesa contra o fungo na mucosa orofaríngea e esôfago. O epitélio também é capaz de secretar moléculas efetoras de defesa. Moléculas-chave para a defesa inata do hospedeiro têm sido identificadas, dentre as quais: receptores *Toll-like*, capazes de reconhecer moléculas antigênicas específicas de patógenos, e receptores lectina tipo C, que induzem a resposta imune inata e ativam a resposta humoral e celular durante o curso das infecções (WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2010; GIANNINI & SHETTY, 2011; KIM & SUDBERY, 2011).

A candidíase vulvovaginal ocorre pelo menos uma vez na vida de 75% das mulheres. Os fatores de risco para o desenvolvimento desta forma da doença são: utilização de hormônios, tratamento com antibióticos, uso de contraceptivos locais e diabetes. A imunidade inata é a resposta mais importante na mucosa vaginal e os sintomas são causados por uma resposta inflamatória excessiva (KIM & SUDBERY, 2011).

1.3 *Candida albicans*

C. albicans é um fungo dimórfico normalmente encontrado na mucosa dos tratores gastrointestinal e genitourinário, em 30 a 60% da população, onde reside em equilíbrio com a flora microbiana e o sistema imune do hospedeiro. *C. albicans* está presente em vários animais, mas normalmente não é encontrada no meio ambiente. Este fungo possui mecanismos de adaptação aos diferentes nichos do hospedeiro, devido a características peculiares de pH, níveis de O₂, temperatura e disponibilidade de nutrientes (OSTROSKY-ZEICHNER & PAPPAS, 2006; SANTOS *et al.*, 2006).

Os fungos são dotados de parede celular, cujas principais funções são manter a forma das células e mediar a comunicação entre estas e o meio ambiente, no que tange à nutrição e à capacidade de funcionar como uma barreira que protege o microrganismo de danos físicos e osmóticos. Os principais componentes da parede

celular de *C. albicans* são: polímeros de manose covalentemente associados com proteínas para formar glicoproteínas; β -glucanas, polímeros de glicose contendo ligações β -1,3 e β -1,6; e quitina, polímero de N-acetil-D-glucosamina contendo ligações β -1,4. Proteínas e lipídeos são constituintes presentes em menor proporção (10-20%). Os polímeros estruturais, β -glucana e quitina, são responsáveis pela rigidez da parede celular. Os polímeros de manose constituem uma matriz amorfa, na qual os polímeros estruturais estão inseridos. Proteínas e manoproteínas são capazes de induzir uma potente resposta imune humoral no hospedeiro, o que pode ser utilizado como uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004).

Na membrana plasmática de *C. albicans* está presente o ergosterol, principal esterol presente na membrana de fungos e ausente em células de mamíferos; portanto, é um alvo importante e seletivo para o desenvolvimento de novos fármacos. Este lipídeo regula a fluidez, a assimetria e a integridade da membrana, contribuindo para as funções de enzimas ligadas à membrana (AHMAD *et al.*, 2010).

C. albicans tem a capacidade de crescer em diferentes morfologias, entre elas: levedura, tubo germinativo, pseudo-hifa e hifa, conforme ilustrado na Figura 2. As leveduras unicelulares crescem por brotamento. Os tubos germinativos são considerados um estágio de transição entre leveduras e hifas. As pseudo-hifas podem ocorrer quando os brotos se alongam e ocorre uma falha na separação a partir da célula mãe, o que produz filamentos de brotos alongados, que mantêm as constrições nas junções do septo. O comprimento do broto alongado nas pseudo-hifas é altamente variável. Filamentos de pseudo-hifa podem consistir em células que são apenas alongadas, se assemelhando a hifas. Porém, existem diferenças entre o modo de crescimento de hifas e pseudo-hifas. O crescimento das hifas, um dos principais fatores de virulência, é promovido por condições ambientais, como crescimento à temperatura de 37°C, presença de soro, pH neutro, alta concentração de CO₂ e presença de N-acetilglucosamina. O crescimento de leveduras é favorecido à temperatura de 30°C em pH ácido (pH 4,0). Já a formação de pseudo-hifas é favorecida a 35°C em pH 5,5. A formação de hifas a partir de leveduras é regulada por um mecanismo de sensoriamento no qual as leveduras produzem o álcool farnesol a fim de inibir a formação de hifas (KIM & SUDBERY, 2011).

Candida albicans

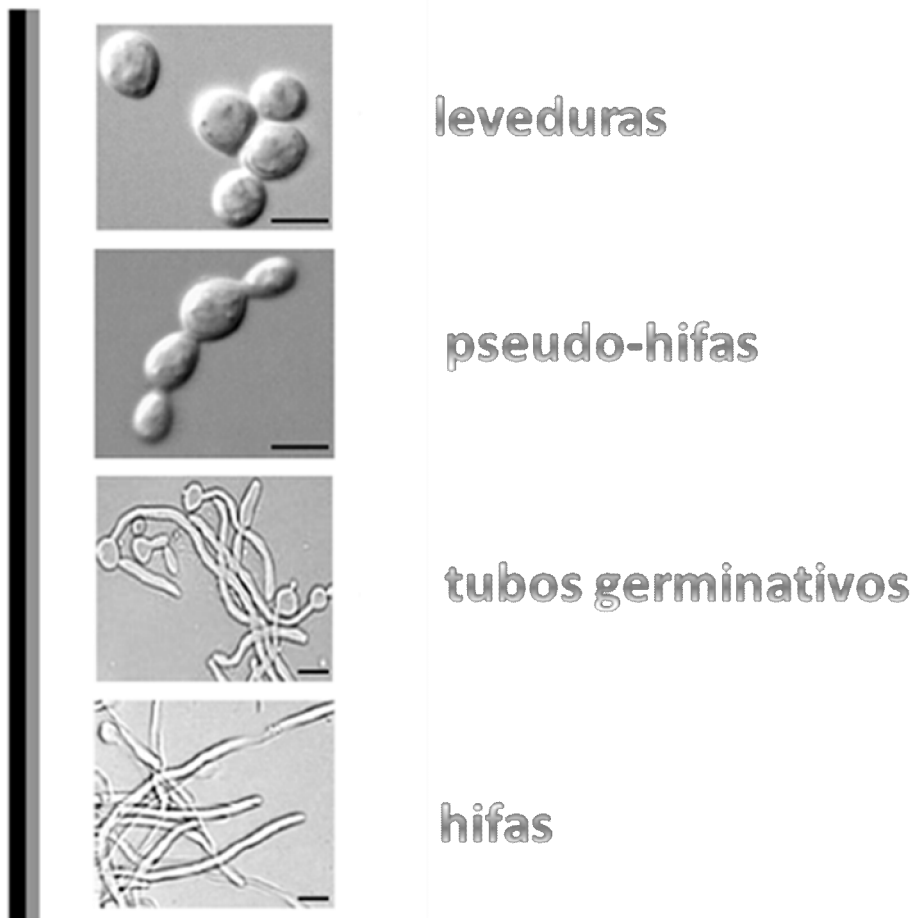


Figura 2. Diferentes morfologias de *Candida albicans*. Barras: 1 μm . Adaptado de BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011.

Outra característica importante de *C. albicans* é sua capacidade de formar biofilme, quando células viáveis livres são semeadas em uma superfície sólida. Inicialmente, as leveduras aderem a esta superfície e sofrem morfogênese para produzir uma camada densa de células, com morfologia mista, em uma matriz extracelular rica em β -1,3-glucana. *In vivo*, o biofilme protege as células contra as defesas do hospedeiro. Porém, os biofilmes constituem um problema na prática médica, porque podem se formar na parede de cateteres intravenosos, o que promove a introdução direta de células fúngicas na corrente sanguínea do paciente. Os biofilmes podem ser formados também em válvulas cardíacas artificiais e em dentaduras (KIM & SUDBERY, 2011).

Atualmente existe um interesse exacerbado no estudo dos fatores de virulência deste microrganismo, pois constituem importantes alvos de desenvolvimento de fármacos para tratamento. Entre tais fatores, é de extrema importância a produção de enzimas hidrolíticas. Em *C. albicans*, os principais grupos de enzimas hidrolíticas

são: aspártico peptidases secretadas (SAPs), fosfolipase B e lipases (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003).

1.3.1 Fatores de virulência

Os fatores de virulência são essenciais para determinar o papel de patógenos oportunistas nas infecções. *C. albicans* interage com as células epiteliais em termos de adesão, invasão e dano celular (Figura 3), sendo os seus principais fatores de virulência:

- dimorfismo;
- fatores de adesão;
- hidrofobicidade de superfície;
- tigmotropismo: capacidade de reconhecer junções intercelulares na superfície de mucosa através de sensoriamento pelo contato, promovendo a penetração;
- secreção de enzimas hidrolíticas, como lipases, fosfolipases e proteases (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003; WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2010).

1.3.1.1 Aspártico peptidases secretadas

C. albicans expressa um grande número de enzimas hidrolíticas, exercendo importantes funções na interação fungo-hospedeiro (YANG, 2003; BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Estas enzimas exercem um papel fisiológico essencial durante a colonização do hospedeiro, iniciando com a degradação das barreiras mucosas e da pele, o que aumenta a adesão do fungo aos tecidos. As proteínas de matriz extracelular são degradadas para suprir a demanda nutricional dos fungos. Também já foi descrita a capacidade destas enzimas de degradar imunoglobulinas e citocinas, importantes para a resposta imune do hospedeiro (YANG, 2003; NAGLIK *et al.*, 2004).

O uso de enzimas extracelulares para degradar as barreiras do hospedeiro parece uma estratégia comum usada por fungos patogênicos para colonizar tecidos, causar a doença e escapar do sistema imunológico (SANTOS, 2011).

As enzimas hidrolíticas de *C. albicans* mais estudadas são as aspártico peptidases secretadas (SAPs), que constituem fatores de virulência importantes para este fungo oportunista. As SAPs estão envolvidas na adesão às células

hospedeiras e degradação de proteínas de matriz extracelular - laminina, fibronectina e colágeno – e de proteínas relacionadas à defesa imunológica do hospedeiro - IgA, IgG, C3 e C3bi (HUBE, 2000; BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Estudos comprovam que a deleção de genes relacionados às SAPs reduz a virulência fúngica, demonstrando a participação direta destas enzimas no processo infeccioso (SANGLARD *et al.*, 1997; HUBE, 2000).

Atualmente são conhecidas dez SAPs (1-10), sendo que as isoformas de SAPs 1-3 estão relacionadas à infecção na mucosa, enquanto as SAPs 4-6 estão envolvidas em infecções sistêmicas (ALBRECHT *et al.*, 2006).

SAPs 1 a 8 são secretadas para o meio extracelular, enquanto SAPs 9 e 10 permanecem ancoradas à membrana ou parede celular através de glicosilfosfatidilinositol (GPI). SAPs 9 e 10 apresentam como funções: atuação na adesão fúngica, garantia da integridade da superfície e atuação durante a separação por brotamento. Estas enzimas são essenciais para a patogenicidade, exercendo papel fundamental durante a interação com o tecido epitelial oral (SCHALLER *et al.*, 2005; ALBRECHT *et al.*, 2006).

A produção de SAPs por leveduras é um processo altamente regulado e é influenciada por parâmetros como temperatura, pH, composição do meio de cultura e tipos de substrato utilizados como fonte nutricional (BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Esta produção é favorecida quando as leveduras de *C. albicans* são cultivadas em meio Base de Carbono para Levedura (*Yeast Carbon Base – YCB*) suplementado com albumina de soro bovino (BSA). A utilização de meio de cultura Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion – BHI*) é capaz de reprimir a expressão de SAP 1-3 (SANTOS *et al.*, 2006).

1.3.2 Interação de *Candida albicans* com células do hospedeiro

A interação primária fungo-hospedeiro ocorre através da parede celular. A adesão ao hospedeiro, a evasão do sistema imune e a integridade estrutural das proteínas envolvidas constituem peças-chave para a infecção. A parede celular dos fungos apresenta moléculas que podem ser alvos para o desenvolvimento de antifúngicos, como proteínas ligadas covalentemente a GPI e outras não ligadas covalentemente, que podem eventualmente ser secretadas (EKKEHARD *et al.*, 2011).

C. albicans apresenta proteínas específicas, as adesinas, responsáveis pela formação de biofilme. Um grupo importante é composto por proteínas ALS (*agglutinin-like sequence*), que funcionam como aglutininas em diferentes condições experimentais. As proteínas ALS são ancoradas a GPI e sua função é mediar a adesão entre células e substratos do hospedeiro. ALS 3 é a principal enzima desta família, sendo normalmente detectada *in vivo* em infecções vaginais e *in vitro* em células de epitélio oral. Também são conhecidas proteínas específicas relacionadas à adesão de *C. albicans* ao epitélio, o que demonstra a eficiência deste fungo em colonizar superfícies do hospedeiro (EKKEHARD *et al.*, 2011; NAGLIK *et al.*, 2011).

A infecção oral por *C. albicans* é dividida em três fases: adesão, invasão e destruição do tecido. Normalmente o fungo se encontra na forma de leveduras, mas quando estas aderem, rapidamente formam tubos germinativos após o contato com células epiteliais e ocorre a diferenciação em hifas, que penetram no epitélio. A interação resulta em uma reorganização do citoesqueleto mediada por receptor/ligante, envolvimento da hifa por estruturas semelhantes a pseudópodes provenientes da membrana e captação da célula fúngica. Tal processo é conhecido como endocitose induzida, descrito também para bactérias patogênicas, como ocorre nos gêneros *Salmonella* e *Shigella*. Pode ocorrer também a penetração ativa do fungo nas células do hospedeiro. A fase inicial de formação de hifas, adesão e endocitose induzida é seguida pela fase de invasão, que resulta em morte de células do hospedeiro por necrose ou apoptose, esta última em fase tardia de infecção, com consequente dano tissular (NAGLIK *et al.*, 2011).

O dano no tecido aumenta com o tempo, na medida em que as hifas penetram nas camadas epiteliais mais profundas. Durante a colonização, *C. albicans* suprime a expressão de TLR4 pelo epitélio e não induz a produção de citocinas. A infecção, particularmente em pacientes predispostos gera aumento da secreção de citocinas, o que atrai células polimorfonucleares (PMNs) para o sítio de infecção (Figura 3). Posteriormente, ocorre a formação de TNF (fator de necrose tumoral) no local, que favorece a expressão de TLR4, protegendo a mucosa oral da invasão fúngica e promovendo a produção de peptídeos antimicrobianos (WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2000).

Estão sendo desenvolvidos diversos modelos para estudo de interação patógeno-hospedeiro, como:

- Modelos *in vivo*: camundongos, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*;
- Modelos *in vitro*: linhagens celulares de macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e neutrófilos (EKKEHARD *et al.*, 2011).

Os modelos *in vitro* e *ex vivo* têm a vantagem de permitir o estudo de aspectos moleculares relacionados à infecção, apesar de nestes sistemas faltarem componentes essenciais para a compreensão total da infecção, como a presença do sistema imune e o meio fisiológico (EKKEHARD *et al.*, 2011).

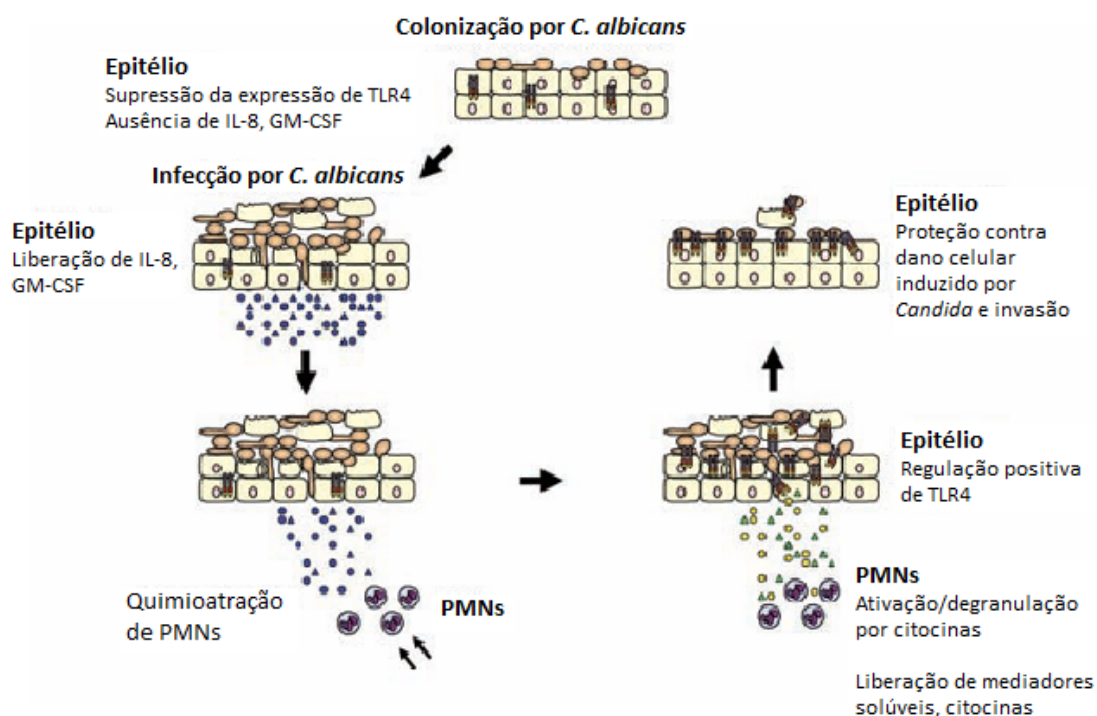


Figura 3. Representação das três fases da infecção oral por *C. albicans*: adesão, invasão e destruição do tecido. Adaptado de WEINDL, WAGENER & SCHALLER, 2000.

1.4 Tratamento da candidíase

Um importante alvo para os antifúngicos é o ergosterol e sua biossíntese, pois é um constituinte da membrana celular de fungos, sendo um alvo seletivo para fármacos. As classes terapêuticas que apresentam mecanismo de ação relacionado ao ergosterol são: polienos, azóis e alilaminas. Os polienos se complexam com o ergosterol na membrana celular do fungo e comprometem sua integridade. Estes fármacos apresentam ação fungicida e apresentam amplo espectro de ação. O único

fármaco desta classe utilizado sistemicamente é a anfotericina B, que apresenta efeitos colaterais agudos e crônicos (COWEN, ANDERSON & KOHN, 2002).

Os azóis, além de inibirem enzimas do citocromo P450, também são capazes de inibir a enzima lanosterol 14- α -demetilase, da via de biossíntese de ergosterol. A depleção de ergosterol, com conseqüente acúmulo de intermediários da via, rompe a estrutura da membrana celular, alterando a atividade de enzimas ali presentes. Os azóis são fungistáticos e apresentam amplo espectro de ação, porém apresentam toxicidade em humanos. Nesta classe estão incluídos os imidazóis – cetoconazol e miconazol – e triazóis – fluconazol, intraconazol e voriconazol. Os azóis utilizados sistemicamente são bem tolerados (AHMAD *et al.*, 2010; COWEN, ANDERSON & KOHN, 2002).

As alilaminas inibem a enzima esqualeno oxidase da via biossintética de ergosterol. Estas substâncias apresentam um amplo espectro de ação *in vitro*, mas a sua eficácia clínica é limitada por problemas relacionados à farmacocinética. A terbinafina é o único antifúngico sistêmico em uso deste grupo (COWEN, ANDERSON & KOHN, 2002).

As equinocandinas, que inibem a síntese de β -(1,3)-glucana, componente essencial da parede celular e não encontrado em mamíferos, estão disponíveis apenas para uso intravenoso e não são metabolizadas por enzimas do citocromo P450. São normalmente bem toleradas e ativas contra diversas espécies de fungos, como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*. Podem atuar como fungicida, contra *C. albicans* por exemplo, ou como fungistático contra *Aspergillus* spp. As equinocandinas são consideradas o tratamento de escolha para candidíase sistêmica, devido ao amplo espectro de ação. A caspofungina está sendo utilizada para este fim. A Figura 4 demonstra uma estratégia terapêutica para tratamento de candidíase sistêmica (PAUW & PICAZO, 2008; EKKEHARD *et al.*, 2011).

O tratamento de candidíase varia de acordo com a forma na qual se apresenta no organismo do hospedeiro (oral, vaginal ou sistêmica). Os principais antifúngicos tópicos para tratamento de candidíase oral são: clotrimazol, miconazol, nistatina, anfotericina B e cetoconazol. Tais medicamentos podem se apresentar em diferentes formas farmacêuticas, como suspensão, creme, pastilhas e comprimidos bucais (AGUIAR *et al.*, 2010).

Também podem ser utilizados agentes antifúngicos sistêmicos para o tratamento da forma oral da doença, como fluconazol, cetoconazol, miconazol e intraconazol, todos sob a forma de cápsulas ou comprimidos (GIANNINI & SHETTY, 2011). Para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, os principais antifúngicos utilizados incluem: anfotericina B, fluconazol e intraconazol. A anfotericina B é desvantajosa pela sua toxicidade; o fluconazol está limitado por um espectro estreito de ação, enquanto o intraconazol apresenta problemas de absorção (PAUW & PICAZO, 2008).

Atualmente são utilizados também triazóis de amplo espectro, que constituem a segunda geração: voriconazol e posaconazol. Estes normalmente são bem tolerados, mas podem interagir com outros fármacos que são metabolizados por enzimas do citocromo P450. Estes dois fármacos são bastante eficazes contra *Candida* spp. Voriconazol está disponível para uso intravenoso e oral, enquanto posaconazol só está disponível para utilização por via oral. Ambos apresentam características adequadas de biodisponibilidade. O posaconazol está sendo utilizado como profilaxia de infecções causadas por espécies de *Candida* e *Aspergillus* em pacientes imunocomprometidos de alto risco. Este medicamento apresenta eficácia similar ao fluconazol na candidíase orofaríngea (PAUW & PICAZO, 2008).

Seleção de fármacos anti-*Candida*

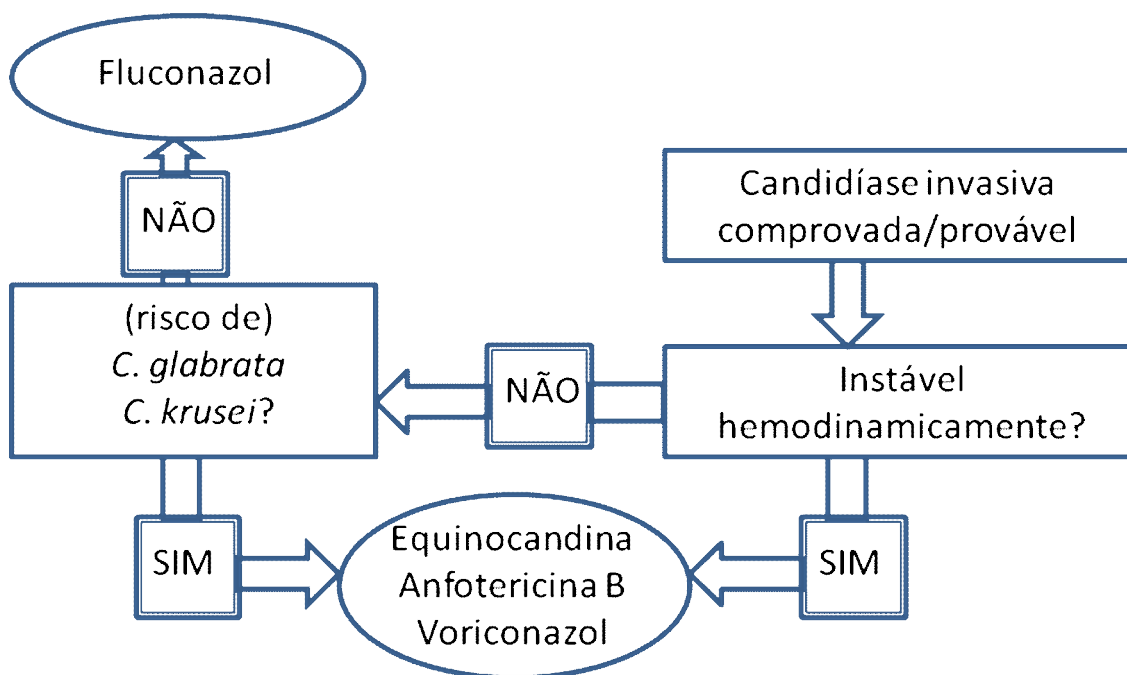


Figura 4. Esquema terapêutico para candidíase invasiva e candidemia. Adaptado de PAUW & PICAZO, 2008.

As limitações dos tratamentos atuais abrem novos caminhos para a busca de outras terapias para o tratamento de infecções fúngicas. Na Figura 5 está representada a via biossintética de ergosterol, na qual estão destacadas as enzimas alvo para novos fármacos.

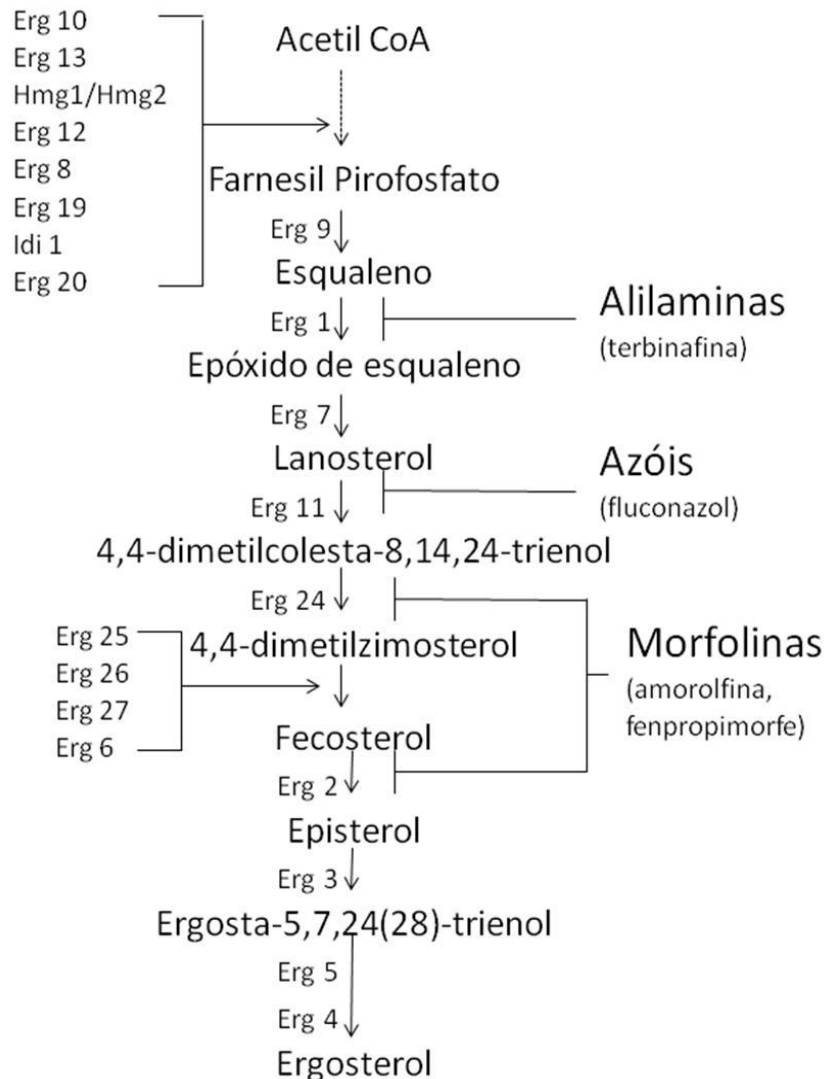


Figura 5. Via biossintética de ergosterol, adaptada de *Saccharomyces cerevisiae*, na qual são apresentados os intermediários e as enzimas envolvidas. Os inibidores enzimáticos estão representados à direita. CoA – Coenzima A. Erg, Hmg e Idi correspondem aos genes que codificam as enzimas desta via biossintética. Adaptado de ONYEWU *et al.*, 2003.

Apesar dos vários tratamentos existentes, vários relatos na literatura citam o aumento de casos de resistência aos agentes antifúngicos utilizados, principalmente da classe dos azóis (ALANGADEN, 2011). A anfotericina B, um antifúngico classicamente utilizado, também é desvantajosa porque apresenta efeitos colaterais graves, como: problemas renais e distúrbios eletrolíticos, podendo resultar em

parada cardio-respiratória. Desta forma, seu uso é restrito, inclusive em ambiente hospitalar. Novas formulações farmacotécnicas para a administração de fármacos já existentes, como as preparações lipossomais, estão sendo utilizadas na clínica (CORNELLY *et al.*, 2011).

Além disso, a utilização de azóis como profilaxia contra espécies de *Candida* coincide com o aumento da incidência de outras infecções, como aspergilose sistêmica e infecções causadas por fungos filamentosos pertencentes à ordem Mucorales. A profilaxia com fluconazol, por exemplo, reduziu a candidíase sistêmica em pacientes transplantados, porém propiciou o aumento de infecções por espécies não-*albicans* (CASTÓN-OSORIO, RIVERO & TORRE-CISNEROS, 2008).

Portanto, considerando a crescente resistência aos antifúngicos clássicos, como azólicos e anfotericina B, é extremamente necessária a busca de novas terapêuticas para o tratamento destas patologias (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

1.5 Efeitos biológicos de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade

Existem diversos estudos relacionados à utilização de correntes elétricas (CE) contínuas na área de saúde, pois se sabe que os sistemas biológicos estão sujeitos à aplicação de correntes, diretamente aplicadas ou geradas por campo magnético. No século XVIII, Luigi Galvani realizou os primeiros estudos que verificaram a presença de eletricidade em organismos vivos. Este trabalho envolvia rãs e Galvani verificou que os músculos e nervos destes animais geravam eletricidade (HAAS, 1993).

A partir dos estudos de Galvani, há vários relatos de interação de CE com organismos vivos, dentre os quais, estudos de Dineur (1891) e Verwon (1896), que registraram a galvanotaxia de leucócitos e amebas, respectivamente. Além destes, outros trabalhos vêm sendo desenvolvidos evidenciando o potencial antitumoral de CE *in vitro* e *in vivo* (SCHAUBLE, HABAL & GULLICK, 1977; SAMUELSSON, JÖNSSON & STAHL, 1983; GRIFFIN *et al.*, 1994; XIN *et al.*, 1997; NORDENSTRÖM, 1994; CHOU *et al.*, 1997; BERGUES *et al.*, 1998; YEN *et al.*, 1999; HOLLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000, 2005; TELLÓ *et al.*, 2004; CAMPOS, 2008; CAMPOS *et al.*, 2010).

Também já foram demonstrados os efeitos bacteriostático e bactericida de CE (BOLTON *et al.*, 1980; CHU *et al.*, 1988; LIU *et al.*, 1993), assim como a aceleração

da cicatrização de úlceras de perna (GAULT & GATENS, 1976; LEE, CANADAY & DOONG, 1993). Recentemente, Gomes e colaboradores evidenciaram importantes danos celulares e ultracelulares induzidos por CE em *Herpetomonas samuelpessoai*, como formação de projeções na membrana citoplasmática, formação de vacúolos e autofagossomos no citoplasma (GOMES *et al.*, 2011).

Na área de traumatologia e fisioterapia, a CE tem sido utilizada para cicatrização de fraturas ósseas (BRIGHTON *et al.*, 1995) e melhoria da mineralização do calo ósseo (IJIRI *et al.*, 1995).

Dentro da prática clínica vem se observando que os efeitos de CE estão diretamente relacionados ao tipo de polaridade (positiva ou negativa) utilizada na estimulação (Tabela 1), seja no órgão ou no tecido (GRIFFIN *et al.*, 1994). Baseado nestes estudos, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental *in vitro*, visando estudar separadamente os efeitos induzidos pelos pólos positivo e negativo, após a estimulação elétrica de células tumorais (VEIGA *et al.*, 2000). Neste modelo, observou-se que o pólo positivo (anodo) induz preferencialmente morte celular programada – apoptose –, enquanto o pólo negativo (catodo) induz necrose e destruição completa das células (VEIGA *et al.*, 2005).

Tabela 1. Alterações induzidas no organismo pelos diferentes pólos (BASTOS, 1993)

Pólo positivo	Pólo negativo
Acidez local	Alcalinidade local
Desidratação dos tecidos	Hidratação dos tecidos
Vasoconstrição local	Vasodilatação local
Captação de oxigênio	Captação de íons hidrogênio
Atividade Germicida	-

A formação de produtos de eletrólise induzidas pela corrente elétrica, na presença dos eletrodos, demonstra a formação de radicais específicos em cada pólo, conduzindo a diferentes efeitos. Na Tabela 2 estão as reações conhecidas para os dois pólos:

Tabela 2. Reações eletrolíticas

Anodo (pólo positivo)	Catodo (pólo negativo)
$2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	$2 \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2 + 2 \text{OH}^-$
$2 \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{Cl}_2 + 2\text{e}^-$	
$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HClO} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	
$\text{RCHNH}_2\text{CO}_2\text{H} + \text{HClO} \leftrightarrow \text{RCCINH}_2\text{CO}_2\text{H} + \text{H}_2\text{O}$	
Diminuição do pH (acidificação do meio eletrolítico)	Aumento do pH (alcalinização do meio eletrolítico)

O principal efeito atualmente abordado e utilizado clinicamente em alguns países, como China e Cuba, consiste no efeito antitumoral de correntes elétricas contínuas. Diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos têm demonstrado a alta eficácia da eletroterapia para a remissão de tumores sólidos localizados (NILSSON *et al.*, 2000). Este efeito também está sendo amplamente estudado pelo Professor Dr Marcos Telló (PUC – RS), cujo foco é a área veterinária, tendo este pesquisador e seu grupo tratado até os dias de hoje cerca de 150 animais domésticos com eletroterapia (TELLÓ *et al.*, 2004).

1.5.1 Efeitos biológicos de correntes elétricas contínuas descritos em fungos

Existem evidências que demonstram o efeito antimicrobiano de correntes elétricas sobre determinados fungos. Os primeiros relatos de ação antifúngica promovida por correntes elétricas foram atribuídos a íons liberados pelos eletrodos. Em 1976, BERGER e colaboradores estudaram os efeitos de íons metálicos gerados por correntes elétricas de baixa intensidade. Verificaram, portanto, que íons prata (Ag^+), liberados em baixas concentrações pelo eletrodo do pólo anódico, induziam a morte celular de *C. albicans*, promovendo uma ação mais acentuada quando comparada a outros compostos de prata.

DEVIRIM SEÇINTI e colaboradores (2009) também demonstraram que *C. albicans* e algumas bactérias, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, eram suscetíveis à presença de íons prata liberados pelo pólo anódico após estimulação com corrente elétrica. Como este pólo é capaz de aumentar a liberação destes íons, o efeito de inibição de crescimento foi atribuído à presença destes íons, que está reduzida no pólo catódico.

Existem estudos relacionados às alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com corrente elétrica em *C. albicans*, como a formação de vacúolos citoplasmáticos e alterações na membrana celular e no citoplasma, atribuídas ao desequilíbrio osmótico gerado após submeter as leveduras a um estímulo elétrico de 15 μ A por 24 horas em meio de cultura (ágar Sabouraud), utilizando eletrodos de prata. Este efeito também foi atribuído à presença dos íons, já que alguns íons atuam como inibidores enzimáticos (AYDIN *et al.*, 1997). O pólo positivo (anodo) tem sido utilizado de forma segura em ortopedia para o tratamento de infecções ósseas profundas persistentes, onde eletrodos de prata são utilizados (AYDIN *et al.*, 1997).

GUILLOU & MURR (2002) sugeriram que a corrente elétrica e a temperatura agem sinergicamente para a inativação de microrganismos. Neste trabalho, o fungo *Saccharomyces cerevisiae* foi submetido à corrente elétrica (0,1 a 1,0 A), em tampão fosfato, utilizando eletrodos de platina. Foi verificada redução de viabilidade celular com o aumento do tempo de tratamento, o que é de extrema importância para a indústria alimentícia, visando a conservação de alimentos.

Dessa forma, considerando o potencial terapêutico de CE, a facilidade de utilização desta terapia, os inúmeros relatos na literatura, dentre outros aspectos importantes e benéficos, o presente trabalho foi focado na avaliação do potencial antifúngico de CE em *C. albicans*. A partir dos resultados obtidos, será possível expandir o estudo da terapia contra outros fungos patogênicos ao homem, por exemplo, *Paracoccidioides brasiliensis* (agente etiológico da paracoccidioidomicose) e *Fonsecaea pedrosoi* (agente etiológico da cromoblastomicose) (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007), que causam infecções cutâneas e subcutâneas de difícil tratamento e que muitas vezes induzem o aparecimento de úlceras.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade no fungo *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade de *C. albicans* a diferentes intensidades de CE e analisar a influência da polaridade de CE nos danos induzidos neste fungo;
- Analisar as possíveis alterações morfológicas induzidas por CE em *C. albicans* por microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar alterações na atividade de aspártico peptidases secretadas e nos níveis de ergosterol em leveduras de *C. albicans* tratadas com CE;
- Verificar a interação entre leveduras de *C. albicans* tratadas com CE e células epiteliais Ma104.

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e utensílios

- Agitador digital Heidolph – Unimax 2010;
- Autoclave – FABBE – Modelo: 103;
- Balança analítica – Mettler Toledo – AG 204;
- Capela de Fluxo Laminar – VECO – ULFS 12;
- Câmara de Neubauer *Bright Line* - BOECO Germany;
- Centrífuga – Bio 101 – Thermo Electron Corporation;
- Citômetro de fluxo – FACScan – Becton Dickinson;
- Cuba de eletroforese – Amersham Biosciences®;
- Estufa de cultura – FANEM – 002CB;
- Espectrofotômetro – Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech;
- Estufas de esterilização – Modelo 315SE – FANEM;
- Fonte de Corrente elétrica – Instrutherm FA-3050;
- Garrafas para cultura de células – TPP;
- Micropipetas – Labmate e Eppendorf;
- Microscópio eletrônico de transmissão – Morgagni 265/ FEI;
- Microscópio invertido – Olympus;
- Microscópio óptico - Axioplan II / Zeiss;
- Placas de 24 poços – TPP;
- Placas de Petri descartáveis (90 x 15 mm);
- Ultramicrótomo – Laica EM UC6 50.

3.1.2 Reagentes

- Acetona - MERCK®;
- Ácido acético – VETEC;
- Ágar nutriente – Himedia;
- Albumina de soro bovino (BSA) – SIGMA®;
- APS (persulfato de amônio) – SIGMA®;

- Azul de tripan – VETEC[®];
- Base de Carbono para Levedura (*Yeast Carbon Base* – YCB) – Sigma-Aldrich;
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) – GIBCO[®];
- Bis-acrilamida – SIGMA[®];
- Bouin;
- Cloreto de sódio (NaCl) – USB[®];
- Clorofórmio (CHCl₃) – ISO FAR;
- Dodecilsulfato de sódio (SDS) – SIGMA[®];
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) – GIBCO[®];
- Giemsa - MERCK[®];
- Glutamina – GIBCO[®];
- HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietil piperazina] N- 2 etanossulfônico – SIGMA[®];
- Hidróxido de sódio (NaOH) – GIBCO[®];
- Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) – BD (Becton, Dickson and Company);
- Iodeto de propídio (PI) – SIGMA[®];
- Metanol (CH₃OH) – ISO FAR;
- Nitrato de prata (AgNO₃) – VETEC;
- Paraformaldeído - SIGMA[®];
- Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO[®];
- Tampão Salina Fosfatado (PBS);
- Tetrametiletilenodiamina (TEMED) – SIGMA[®];
- Tripsina - GIBCO[®];
- Triton X-100 - VETEC;
- Xilol – VETEC[®].

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo de soluções

3.2.1.1 Preparo de meio YCB (*Yeast Carbon Base*)

Para o preparo de meio de cultura YCB, 2,35 g deste meio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. O pH final da solução ficou entre 5,3 e 5,7. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

3.2.1.2 Preparo de meio BHI (*Brain Heart Infusion*)

Para o preparo de meio de cultura BHI foram dissolvidos 37 g em 1000 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.1.3 Preparo de BSA (*Bovine Serum Albumin*)

A solução estoque de BSA utilizada foi preparada na concentração final de 1%: 1 g de BSA em 100 mL de água purificada. Em seguida, a solução foi esterilizada em filtro preparado com membrana esterilizante (poro de 0,22 µm), aliquotada em eppendorfs e armazenada a -20°C.

3.2.1.4 Preparo de ágar nutriente

O ágar nutriente foi preparado a partir de 28 g do meio dissolvidos em 1000 mL de água purificada. Em seguida, a solução foi aquecida até fervura, para completa solubilização do meio, e vertida em recipientes de vidro adequados para esterilização em autoclave. Posteriormente, na capela de fluxo laminar, o ágar nutriente foi vertido em placas de Petri descartáveis. Após gelificação do ágar, as placas foram armazenadas em geladeira, a 4°C.

3.2.1.5 Preparo de meio de cultura DMEM

O meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) foi preparado para um volume final de 900 mL. As seguintes substâncias foram pesadas: 3,0 g de HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), 0,2 g de NaHCO₃, 0,3 g de glutamina e 10 g de DMEM. Tais substâncias foram dissolvidas em água milliQ e posteriormente, o pH do meio foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. A solução foi avolumada a 900 mL e filtrada com membrana esterilizante com poro de 0,22 µm em capela de fluxo laminar. A solução foi aliquotada em frascos de vidro e armazenada em geladeira a 4°C. Para cultivar as células, o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.2.1.6 Preparo de tripsina

A solução contendo tripsina foi preparada da seguinte forma: 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 0,1 g de dextrose, 0,58 g de NaHCO₃, 0,5 g de tripsina, 0,2 g de EDTA e 0,45 mL de vermelho de fenol a 1%. Estes componentes foram dissolvidos em água purificada, o pH foi ajustado para 8,0 e a solução foi avolumada a 1000 mL.

Posteriormente, esta solução foi filtrada em membrana esterilizante (poro de 0,22 μm), distribuída em recipientes de vidro fechado e estocada em congelador a -20°C até o momento da utilização, durante o qual era armazenada a 4°C .

3.2.1.7 Preparo de tampão salina fosfato (PBS)

O tampão salina fosfato (PBS) foi preparado através da dissolução dos seguintes componentes em água purificada: 0,2 g de KH_2PO_4 , 8,0 g de NaCl , 0,2 g de KCl e 1,44 g de Na_2HPO_4 . O pH foi ajustado para 7,4 e o volume final do preparo foi 1000 mL. Esta solução foi distribuída em recipientes fechados de vidro e esterilizada em autoclave durante 20 minutos a 121°C . Após o resfriamento, à temperatura ambiente, os frascos foram armazenados em geladeira a 4°C .

3.2.1.8 Preparo do corante azul de tripan

A solução estoque de corante a 0,4% foi preparada a partir de 400 mg de azul de tripan em 90 mL de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de K_2HPO_4 . A solução foi aquecida para solubilização do corante e o pH foi ajustado para 7,2, utilizando NaOH 1 N. Em seguida, o volume da solução foi ajustado para 100 mL. Para utilização do corante, a solução estoque foi diluída em água purificada para a concentração final de azul de tripan de 0,08% e armazenada em geladeira.

3.2.1.9 Preparo de gel para SDS-PAGE

Para preparo do gel a 15% utilizado em eletroforese por SDS-PAGE, foram utilizadas as seguintes substâncias: 5,0 mL de bis-acrilamida a 30%; 2,5 mL de tampão Tris pH 8,8; 2,3 mL de água purificada; 100 μL de SDS (dodecilsulfato de sódio). Após mistura destes componentes, foram adicionados 80 μL de APS (persulfato de amônio) a 10% e 8 μL de TEMED, imediatamente antes de verter a mistura no aparato de eletroforese, já que estes componentes são os responsáveis pela polimerização do gel.

3.2.1.10 Preparo de gel de empacotamento para SDS-PAGE

Para o preparo do gel de empacotamento a 3%, as seguintes substâncias foram utilizadas: 0,5 mL de bis-acrilamida a 30%; 0,75 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8; 1,7 mL de água purificada; 30 μL de SDS (dodecilsulfato de sódio). Após mistura destes componentes, foram adicionados 30 μL de APS (persulfato de

amônio) a 10% e 3 µL de TEMED. Esta mistura é vertida sobre o *Running gel* após polimerização deste.

3.2.2 Microrganismo e cultivo

Nos experimentos realizados foi utilizada *Candida albicans* cepa 11, isolada do sangue de um homem de 46 anos (BRAGA-SILVA *et al.*, 2009). As leveduras foram cultivadas em 1,2% de YCB suplementado com 0,1% de BSA, pH 5,5, a 25°C, por 48 horas, sob agitação (WHITE & AGABIAN, 1995; SANTOS *et al.*, 2006).

3.2.3 Modelo experimental para a estimulação elétrica

O modelo experimental utilizado (Figura 6) consiste em um sistema adaptado a uma placa de 24 poços, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e previamente validado (TEIXEIRA *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2010; BRITO, 2009; GOMES *et al.*, 2011). As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer (Bright Line/ BOECO Germany) e posteriormente transferidas neste sistema na concentração de 1×10^6 células/mL em um volume final de 2,5 mL de PBS. Estas leveduras foram submetidas ao tratamento com CE em três condições distintas: pólo positivo (Fluxo Anódico - FA), intermediário (Fluxo Eletroiónico - FEI) e pólo negativo (Fluxo Catódico - FC). Neste sistema, foram utilizados eletrodos de platina e as três situações citadas ficam interligadas por pontes de papel de filtro. Posteriormente, a suspensão de leveduras foi estimulada, *in vitro*, com 0,5 mA; 1,0 mA; 1,5 mA e 2,0 mA de corrente elétrica contínua por tempos determinados (entre 1 e 20 minutos) para avaliação dos efeitos sobre estas células. As células controle correspondem àquelas não submetidas ao tratamento com CE.

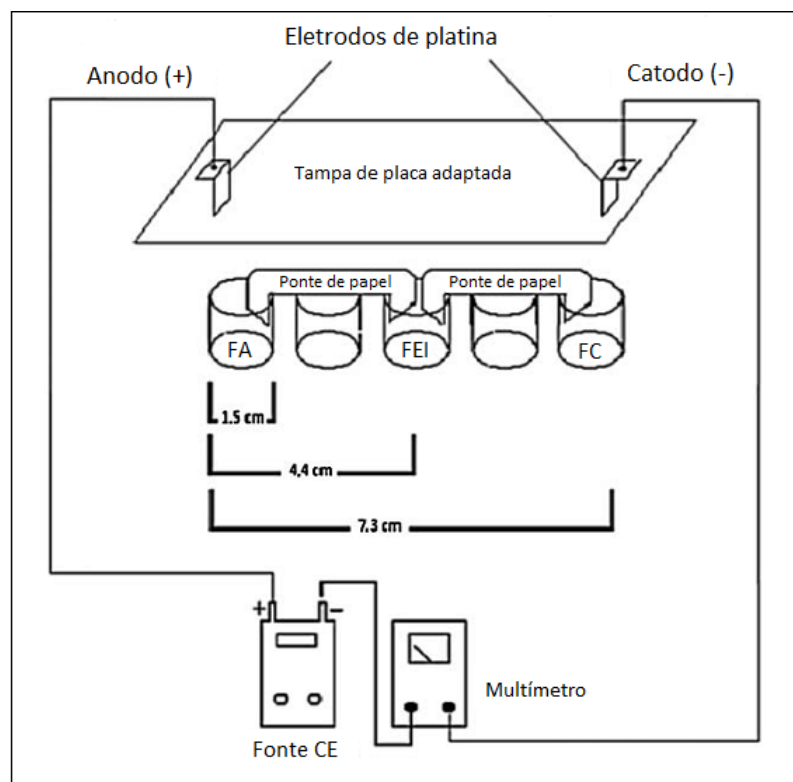


Figura 6. Esquema do sistema experimental utilizado para o tratamento de *Candida albicans* com correntes elétricas contínuas de baixa intensidade. Adaptado de GOMES *et al.*, 2011.

3.2.4 Avaliação do efeito da CE na viabilidade celular

3.2.4.1 Método de plaqueamento para avaliação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Inicialmente, foi verificado o efeito da CE sobre a viabilidade de *C. albicans* utilizando a metodologia de plaqueamento a fim de avaliar as UFCs. Após tratamento com CE, as leveduras foram lavadas com PBS e inoculadas em placas de Petri com ágar nutriente, em triplicata e incubadas a 25°C, por 48 horas para posterior contagem de UFC (BRAGA-SILVA *et al.*, 2010). O mesmo procedimento foi realizado para as leveduras controle, ou seja, não tratadas com CE.

Os primeiros ensaios realizados consistiram na análise do efeito da CE em diferentes concentrações de leveduras. A intensidade de CE utilizada foi 1,0 mA durante 5 minutos. Para isso, foram preparadas suspensões de *C. albicans* contendo 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 leveduras/mL, em um volume final de 2,5 mL. Após tratamento, alíquotas de 30 μ L foram retiradas, lavadas em PBS e diluídas 100

vezes para plaqueamento em ágar nutriente. Após incubação por 48 horas à temperatura ambiente, o número de UFC foi determinado para cada situação experimental.

Após a definição da melhor concentração de leveduras para os ensaios, foram utilizadas diferentes intensidades de CE – 0,5 mA; 1,0 mA; 1,5 mA e 2,0 mA – em um tempo de exposição que variou entre 1 e 20 minutos, para obtenção das curvas dose-resposta.

3.2.4.2 Método de incorporação de Iodeto de propídio (PI)

Outro método utilizado para avaliação da viabilidade celular foi a incorporação de iodeto de propídio (concentração 10 µg/mL). Este corante fluorescente penetra apenas em leveduras não-viáveis e se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA. O resultado do percentual de viabilidade celular em relação às células não tratadas foi obtido após leitura em citômetro de fluxo FACScan (FL-2).

Após o tratamento com CE de 10^6 leveduras/mL, as leveduras de cada situação experimental (controle, FA, FEI e FC) foram lavadas com PBS e posteriormente ressuspensas em 500 µL deste tampão para avaliação por citometria de fluxo.

Para o FA foi utilizada a intensidade de 0,5 mA nos tempos de 1, 2, 4 e 5 minutos, assim como para o FC e o FEI no tempo de 5 minutos. Adicionalmente, para as três situações experimentais, foi utilizada a intensidade de 2,0 mA de CE por 20 minutos a fim de avaliar a viabilidade celular pelo método de incorporação de iodeto de propídio.

3.2.5 Alterações induzidas no meio eletrolítico

De acordo com dados já descritos previamente (VEIGA *et al.*, 2000), a CE é capaz de induzir alterações de pH no meio eletrolítico. Portanto, em todos os tempos e intensidades de CE testados, o pH foi avaliado utilizando papel indicador de pH (Merck).

3.2.6 Avaliação do efeito de eletrólitos na viabilidade celular

No modelo experimental de 24 poços descrito no item 3.2.3, as leveduras foram submetidas ao estímulo anódico de 0,5 mA por 5 minutos. Em seguida, estas leveduras foram centrifugadas (6200 rpm/10 minutos) para separação das células, que foram lavadas e plaqueadas em ágar nutriente, e recuperação do sobrenadante (volume de 2,5 mL). O sobrenadante foi incubado com 1×10^6 leveduras não submetidas ao estímulo elétrico, durante 5 minutos, a fim de avaliar o efeito dos eletrólitos gerados em PBS pelo Fluxo Anódico. Posteriormente, foram centrifugadas, lavadas com PBS e plaqueadas em ágar nutriente, para verificar as UFCs.

Foi utilizado outro método para avaliação do efeito dos produtos de eletrólise: somente o tampão PBS foi submetido ao estímulo elétrico, na ausência de leveduras. Este tampão, correspondente ao Fluxo Anódico (0,5mA/5 minutos), no volume final de 2,5 mL, foi recolhido após exposição à CE e incubado com 1×10^6 leveduras isentas de tratamento com CE. Uma alíquota de 30 μ L foi retirada em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos), centrifugada, diluída em PBS e plaqueada em ágar nutriente. A verificação da viabilidade celular foi realizada após 48 horas.

3.2.7 Alterações ultraestruturais

As leveduras tratadas com CE (0,5 mA por 2 minutos para o FA e 2,0 mA por 20 minutos para o FC e FEI) e as não tratadas (grupo controle) foram processadas a fim de avaliar alterações ultraestruturais, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, descrita por VEIGA e colaboradores (2000). Primeiramente, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1%. A seguir, o material foi desidratado em banhos de acetona ou etanol e impregnado em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram realizados em ultramicrotomo, colhidos em grades de 200 a 300 mesh. A etapa de contrastação foi realizada utilizando acetato de uranila e citrato de chumbo (ISHIDA *et al.*, 2009) e, em seguida, os cortes foram observados ao microscópio eletrônico (MORGANI/FEI) por Venício Feo da Veiga,

Biólogo responsável pelo Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes.

3.2.8 Efeito da CE na atividade de aspártico peptidases secretadas para o sobrenadante celular

Após tratamento com CE (0,5 mA/1 minuto para o FA; 2,0 mA/ 20 minutos para FC e FEI), as leveduras tratadas em um volume de 2,5 mL de tampão PBS foram reincubadas em meio de cultura YCB-BSA. Após 48 horas, as células fúngicas foram contadas em câmara de Neubauer, para obtenção do mesmo número de células em todas as situações experimentais. Posteriormente, as leveduras foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados para avaliação de aspártico peptidases secretadas (SAPs).

O perfil de degradação de BSA foi avaliado através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A atividade proteolítica de aspártico peptidases secretadas para o sobrenadante foi avaliada pelo método de clivagem do substrato BSA. A reação foi realizada adicionando o substrato BSA 1% (20 µL) ao sobrenadante da amostra (20 µL) em tampão citrato pH 4,0 (55 µL), com incubação a 37°C por 3 horas.

Em seguida, foram preparados o gel de corrida e o gel de empacotamento, de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.1. O volume de 30 µL de cada amostra foi aquecido (5 minutos/100°C) e a este foram adicionados 5 µL de tampão de amostra com 10% de β-mercaptoetanol para promover a desnaturação das proteínas. A eletroforese foi realizada a 120 V. As proteínas foram reveladas realizando a coloração dos géis com nitrato de prata (GONÇALVES *et al.*, 1984). O mesmo procedimento foi realizado com as leveduras controle, não submetidas ao estímulo elétrico. As bandas formadas no gel foram analisadas por densitometria, utilizando o programa ImageJ®.

3.2.9 Avaliação dos níveis de ergosterol após tratamento com CE

As leveduras de *C. albicans* tratadas com CE foram reincubadas em meio BHI por 48 horas. Em seguida, foram contadas em câmara de Neubauer para padronização do número de células, utilizando 10⁸ leveduras para o início do

procedimento. Tais leveduras foram submetidas a sucessivas extrações com metanol-clorofórmio para a extração de lipídeos, conforme descrito a seguir:

- clorofórmio : metanol, na proporção 2:1 v/v, por 2 horas;
- clorofórmio : metanol, na proporção 1:1 v/v, por 2 horas;
- clorofórmio : metanol, na proporção 1:2 v/v, por 2 horas.

Entre as etapas, as misturas foram vigorosamente agitadas em vórtex e centrifugadas para remoção de precipitados. O sobrenadante foi recolhido e seco utilizando nitrogênio. Em seguida, foi realizada a partição de Folk para retirar o conteúdo protéico ainda presente, utilizando para isso a mistura de CHCl_3 : CH_3OH : KCl (0,75%) na proporção 8:4:3 v/v/v.

A porção hidrofóbica foi recolhida e os esteróis foram secos utilizando nitrogênio. O extrato lipídico foi submetido à cromatografia em camada fina (HPTLC) em placa de sílica, utilizando como sistema solvente uma mistura de hexano-éter-ácido acético (80:40:2 v/v/v). Nas placas também foram aplicados 4 μL de uma solução padrão de ergosterol e lanosterol (Sigma[®]), na concentração de 1 mg/mL. A revelação foi realizada através de uma solução contendo 50 mg de cloreto férrico (FeCl_3), água (90 mL), ácido acético (5 mL) e ácido sulfúrico (5 mL). As placas foram aquecidas a 100°C por 3 a 5 minutos para visualização das bandas de esteróis, identificadas por coloração vermelho-violeta. Para quantificar as bandas no cromatograma, as placas foram digitalizadas e a análise densitométrica foi realizada utilizando o programa ImageJ[®].

3.2.10 Cultura de células epiteliais de rim de macaco (Ma104)

3.2.10.1 Cultivo das células da linhagem Ma104

As células epiteliais de rim de macaco Ma104 foram cultivadas em garrafas de cultura, em estufa a 37°C. O meio utilizado como nutrição para as células foi DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB - GIBCO) a 10%. Os inóculos iniciais nas garrafas foram $3,5 \times 10^5$ células, sendo a confluência atingida em 4 dias. O procedimento de repique consistia na lavagem das garrafas com PBS e posterior incubação com tripsina por 3 minutos a 37°C, para que as células não permanecessem mais aderidas à superfície das garrafas. A viabilidade e a concentração celular, necessárias para o repique e para o preparo dos experimentos

de interação, foram avaliadas pelo método de exclusão com azul de tripan na concentração de 0,08% (diluído na proporção de 1:1 em relação à suspensão celular) e posterior contagem em câmara de Neubauer (HOLANDINO *et al.*, 2000).

3.2.10.2 Interação de *Candida albicans* com células epiteliais

As células epiteliais Ma104 foram cultivadas em placas de 24 poços utilizando meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C, durante 24 horas. O inóculo inicial de células Ma104 em lamínulas, em placas de 24 poços, foi 5×10^4 células/mL. Após o tratamento com CE (0,5 mA por 2 min para o FA; 2,0 mA por 20 minutos para FC e FEI), 5×10^5 células fúngicas/mL de *C. albicans* foram submetidas à interação com as células epiteliais, durante 90 minutos, a 37°C, em meio DMEM. As demais leveduras, tratadas e controle, foram incubadas em meio BHI para os experimentos e interação em 24 e 48 horas após tratamento com CE, nas mesmas condições descritas neste item.

Posteriormente, após cada ensaio de interação, os microrganismos não aderidos foram removidos através de lavagem com PBS. As lamínulas contendo as células epiteliais e leveduras foram fixadas com Bouin e coradas pelo método de Giemsa. O índice de adesão, para cada situação avaliada, foi determinado através da contagem de células fúngicas aderidas em um total de 400 células epiteliais (KNEIPP *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009; BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011).

3.2.11 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados através do método ANOVA (análise de variância). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Influência da concentração de leveduras para os efeitos citotóxicos da CE

Inicialmente foi avaliado o efeito da corrente elétrica em diferentes concentrações de células fúngicas, conforme descrito no item 3.2.4.1. Para tanto, diferentes suspensões de *C. albicans* contendo 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 leveduras/mL, em um volume final de 2,5 mL de PBS, foram utilizadas. Após tratamento, a viabilidade foi avaliada através de UFC (Figura 7).

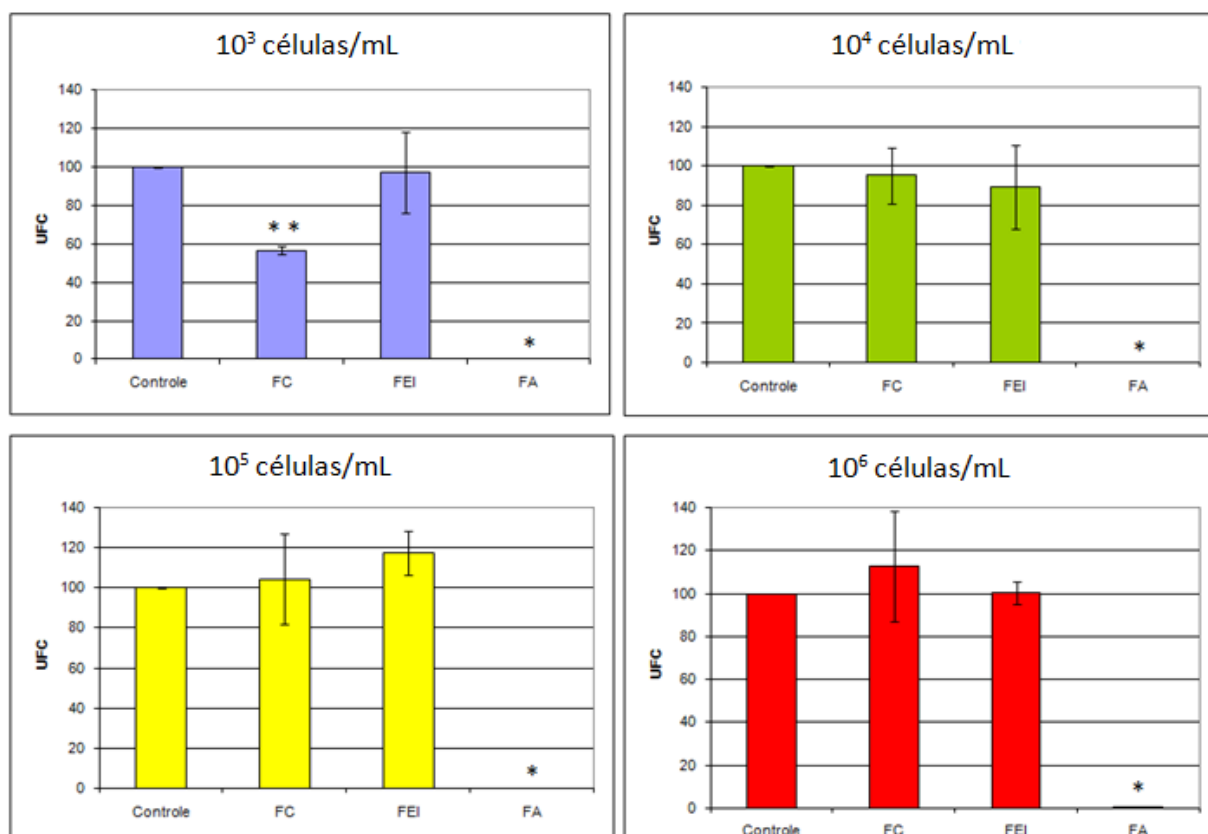


Figura 7. Viabilidade celular de *Candida albicans*, pelo método UFC, após estímulo com corrente elétrica contínua de baixa intensidade (1,0 mA; 5 minutos) e posterior incubação das leveduras em meio de cultura fresco durante 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. O asterisco demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao sistema controle: *p < 0,001 e **p < 0,05 (ANOVA).

A análise dos resultados indicou que não houve diferença estatisticamente significativa do FEI em relação ao controle. Para o FC, observa-se diferença estatisticamente significativa somente na menor concentração de células (10^3 leveduras/mL), sugerindo um efeito dependente da concentração de células no pólo

negativo, já que existe uma quantidade menor de leveduras exposta à mesma quantidade de produtos de eletrólise gerados nas concentrações celulares mais altas.

Entretanto, as leveduras tratadas pelo FA não foram capazes de formar colônias após 48 horas de incubação, em todas as concentrações de células testadas, demonstrando uma elevada sensibilidade das leveduras exclusivamente ao pólo positivo.

A partir destes dados, foi padronizada a concentração de 10^6 leveduras/mL para os demais experimentos, a fim de obter massa celular adequada para as análises posteriores.

4.2 Viabilidade celular de *Candida albicans* após tratamento com diferentes intensidades de corrente elétrica

4.2.1 Método UFC

A viabilidade de *C. albicans* foi avaliada após tratamento com 0,5 mA; 1,0 mA; 1,5 mA e 2,0 mA de corrente elétrica. Os tempos de tratamento utilizados foram: 1, 2, 3, 4 e 5 minutos para o FA; 5, 10, 15 e 20 minutos para FC e FEI. As Figuras 8, 9 e 10 ilustram os resultados obtidos para o FA, FC e FEI, respectivamente, após tratamento com CE e contagem de UFC.

4.2.1.1 UFC após estímulo anódico

Para o estímulo anódico, os tempos utilizados foram: 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. A escolha destes períodos de tratamento foi baseada na Figura 7, onde verifica-se que ao utilizar 1,0 mA de CE por 5 minutos, as leveduras não são capazes de formar colônias. Portanto, foram utilizados tempos inferiores e igual a 5 minutos para avaliação da curva dose-resposta.

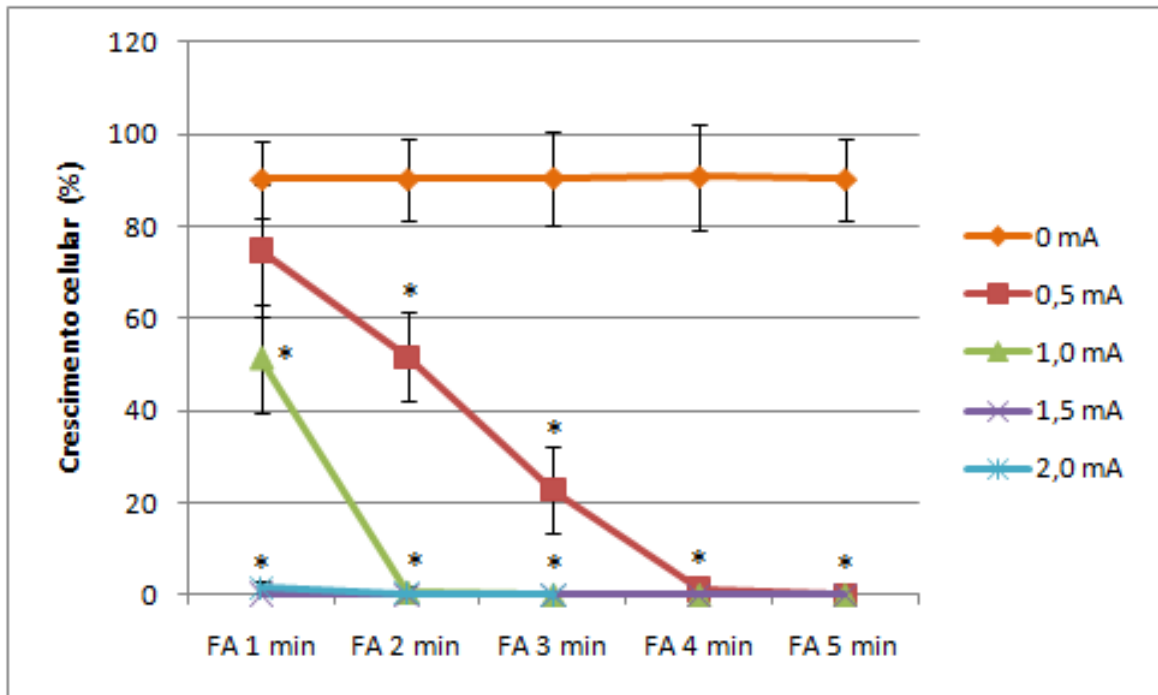


Figura 8. Percentual de viabilidade celular de *Candida albicans* avaliado por UFC, após estímulo anódico e plaqueamento em ágar nutriente por 48 horas. As células controle (10^6 leveduras/mL), representadas como 0 mA, foram submetidas às mesmas condições experimentais, excetuando o estímulo elétrico. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3). O * indica que $p < 0,001$ (ANOVA) em relação ao controle.

A Figura 8 indica o efeito acentuado que o FA apresenta sobre a viabilidade deste fungo, pois na menor intensidade avaliada (0,5 mA) foi possível observar a ausência de colônias após 5 minutos de tratamento. O mesmo efeito foi observado na maior intensidade testada, correspondente a 2,0 mA, em apenas 1 minuto de tratamento com CE. Portanto, foi observado um efeito dependente do tempo e da dose de corrente elétrica sobre a capacidade de *C. albicans* formar colônias.

4.2.1.2 UFC após estímulo catódico

Para o estímulo catódico, foram aumentados os tempos de tratamento, pois, de acordo com a Figura 7, uma CE de 1,0 mA por 5 minutos não foi capaz de alterar a viabilidade na concentração utilizada (10^6 leveduras/mL). Portanto, foi utilizado o tempo de tratamento de 5 minutos para as demais intensidades de CE e também tempos superiores: 10, 15 e 20 minutos.

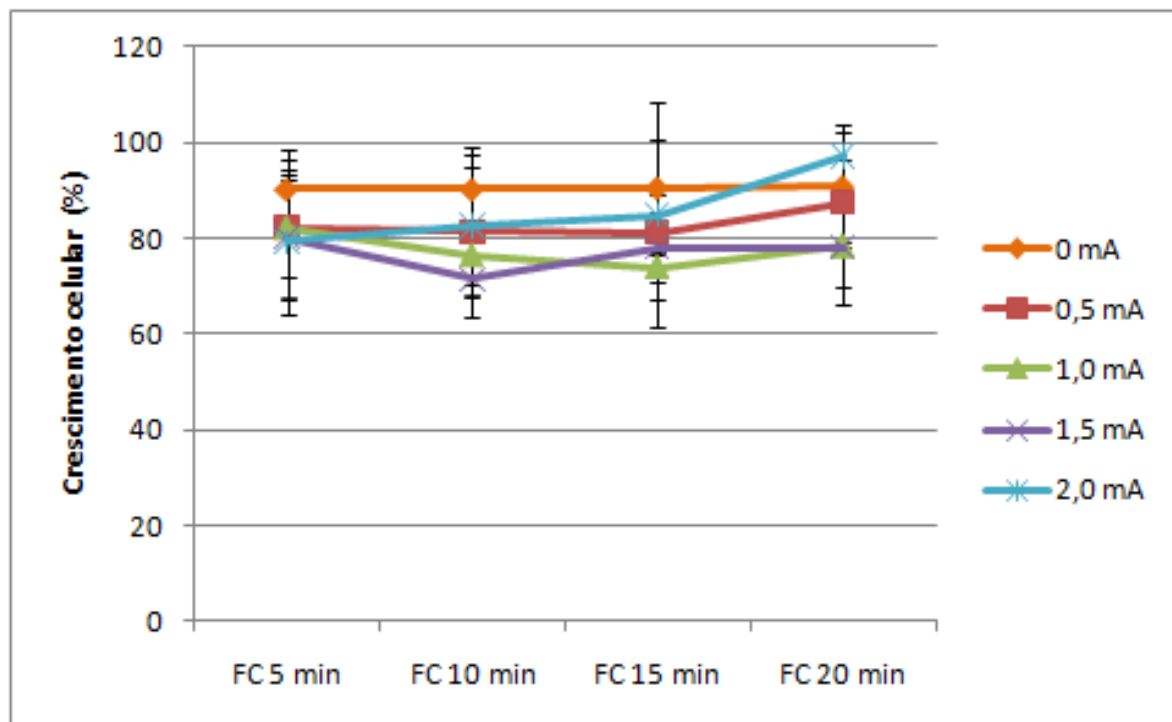


Figura 9. Percentual de viabilidade celular de *Candida albicans* avaliado por UFC, após estímulo catódico e plaqueamento em ágar nutriente por 48 horas. Células controle (10^6 leveduras/mL), representadas pela linha de 0 mA, foram submetidas às mesmas condições experimentais, excetuando o estímulo elétrico. Os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$). Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das situações experimentais testadas (ANOVA).

Os resultados obtidos na Figura 9 indicam que *C. albicans* tratada pelo FC apresenta viabilidade celular similar ao controle nas condições testadas, indicando que as leveduras não sofrem danos decorrentes dos produtos de eletrólise gerados em PBS, como íons hidroxila.

4.2.1.3 UFC após estímulo com Fluxo Eletroiônico

Semelhante ao FC, o FEI também não apresentou diferença estatisticamente significativa de viabilidade quando comparado ao controle, conforme a Figura 7. Portanto, também foram aumentados os tempos de tratamento, sendo utilizados 5, 10, 15 e 20 minutos, nas intensidades de CE descritas anteriormente (0,5 mA; 1,0 mA; 1,5 mA e 2,0 mA).

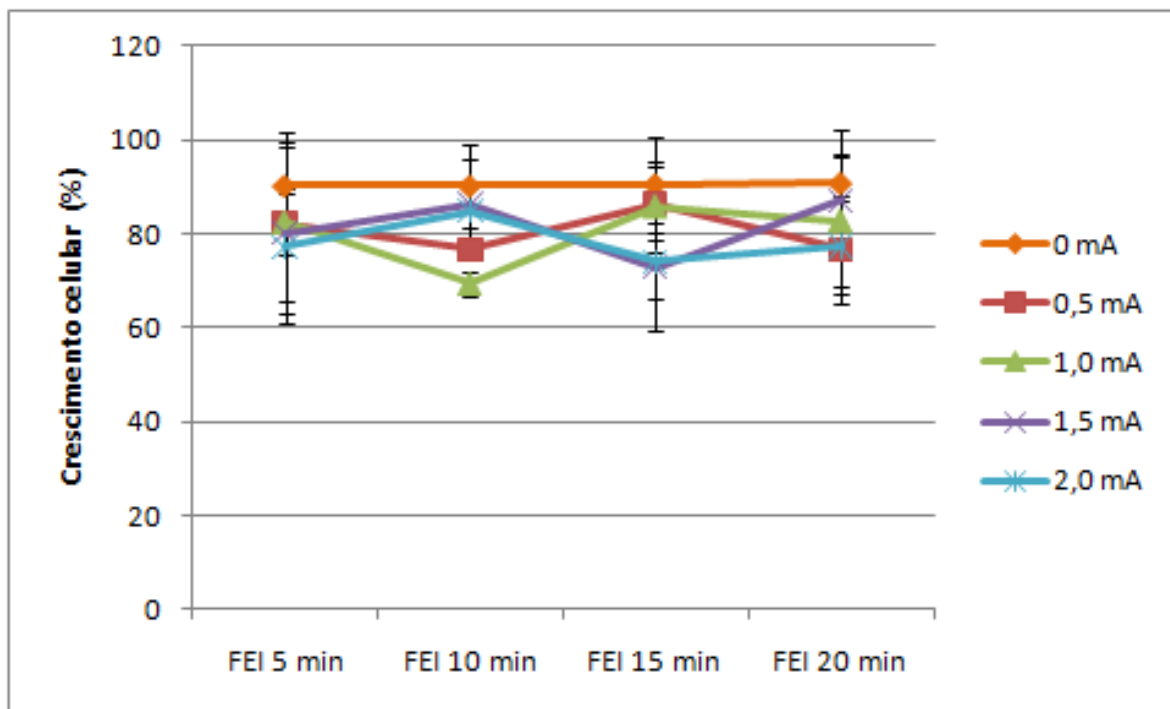


Figura 10. Percentual de viabilidade celular de *Candida albicans* avaliado por UFC, após estímulo com FEI e plaqueamento em ágar nutriente. Células controle (10^6 leveduras/mL) foram submetidas às mesmas condições experimentais, excetuando o estímulo elétrico. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3). Não houve diferença estatística significativa após análise por ANOVA.

Dessa forma, as Figuras 9 e 10 demonstram que não houve diferença significativa entre as leveduras tratadas nas várias intensidades de corrente utilizadas quando comparadas ao controle. Tal efeito foi observado para o FC e FEI. Em contrapartida, no FA, foi observada redução significativa de viabilidade celular a partir da menor intensidade de CE avaliada (0,5 mA) em 2 minutos. Estes resultados indicam o efeito diferenciado e dependente da polaridade da CE sobre as leveduras de *C. albicans*, com destaque especial para a alta sensibilidade que estas células apresentam ao estímulo anódico, o qual induziu a morte de 100% das leveduras.

Como o método de avaliação de viabilidade por UFC fornece um dado após 48 horas de tratamento com CE, foi necessário utilizar outro método para analisar a viabilidade imediatamente após a CE. No caso, foi utilizada a incorporação de iodeto de propídio pelas leveduras.

4.2.2 Avaliação da viabilidade celular com iodeto de propídio

A viabilidade de leveduras de *C. albicans* também foi analisada com iodeto de propídio, imediatamente após o tratamento com CE (0,5 mA/5 minutos). Um padrão de resposta semelhante aos dados obtidos por UFC foi verificado após análise por citometria de fluxo, a qual indicou que as células controle e tratadas com o FC e o FEI não apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto que o FA induziu o aparecimento de cerca de 55% de células não-viáveis imediatamente após o tratamento com CE, conforme apresentado na Figura 11.

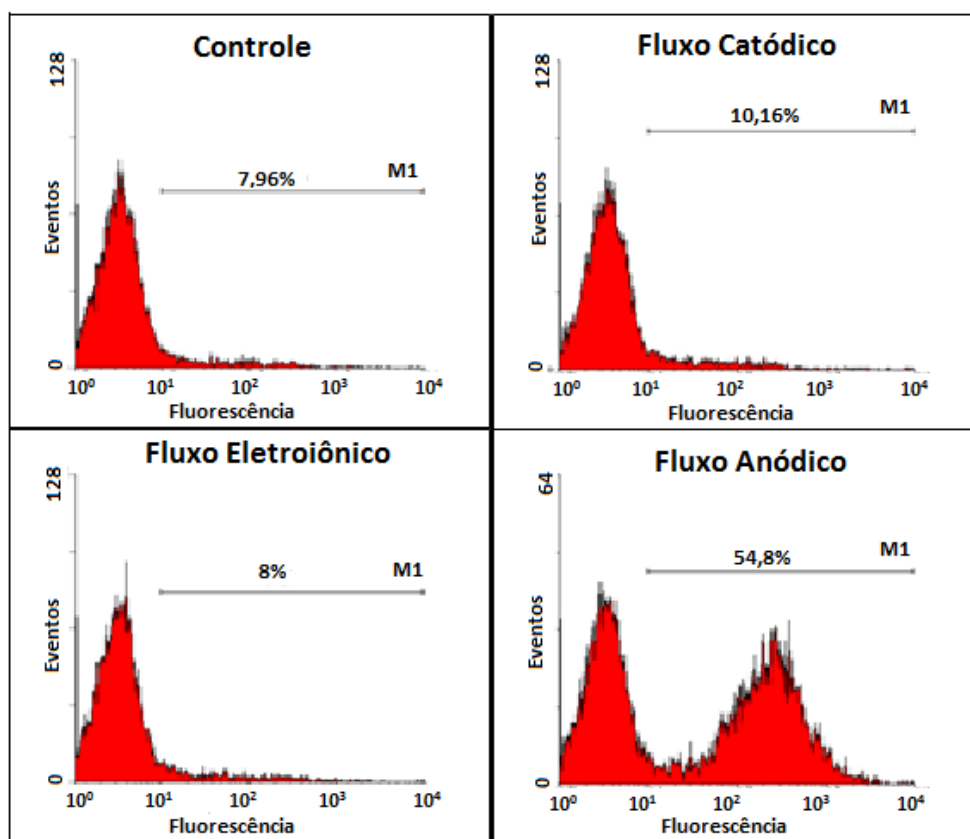


Figura 11. Citometria de fluxo representativa de leveduras de *C. albicans* tratadas com corrente elétrica (0,5mA/5min) e marcadas com iodeto de propídio 10µg/mL. Células controle foram submetidas às mesmas condições experimentais, excetuando o estímulo elétrico.

Posteriormente, esta análise foi realizada em outros tempos de exposição à CE: 1, 2, 4 e 5 minutos, para a intensidade de 0,5 mA; e 20 minutos para a intensidade de 2,0 mA, conforme demonstrado na Figura 12.

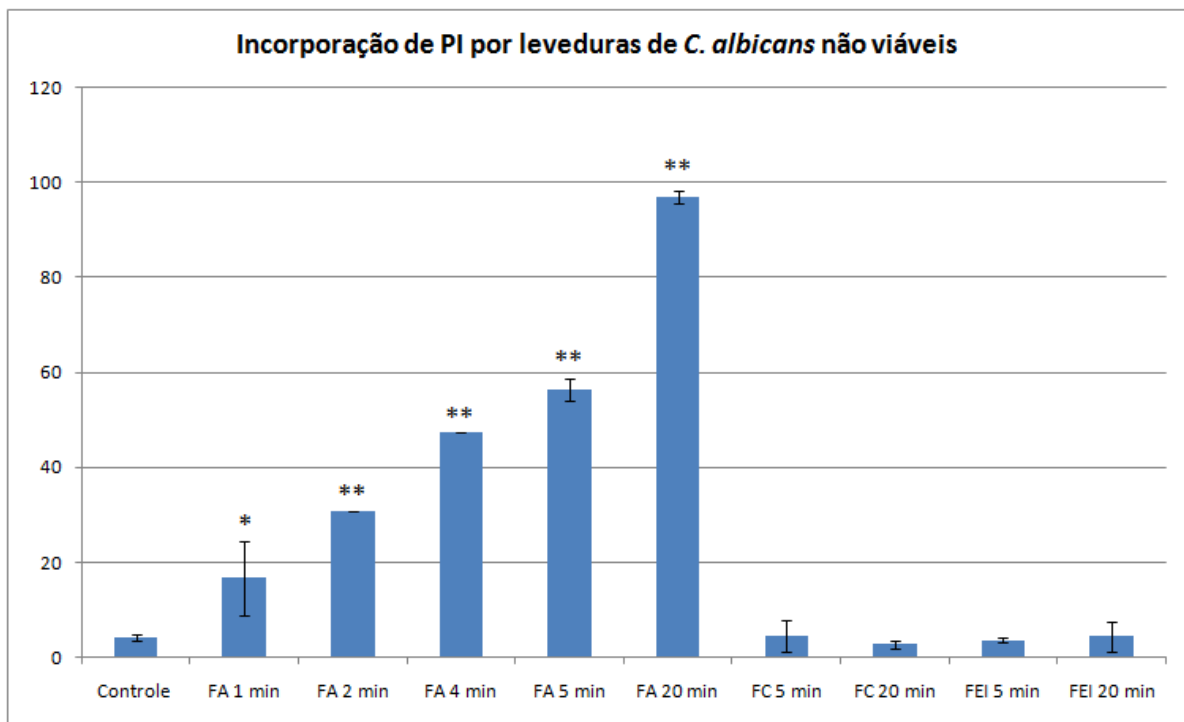


Figura 12. O gráfico indica o percentual de incorporação de iodeto de propídio por leveduras de *C. albicans* imediatamente após o tratamento com CE (valor representado no eixo da ordenada). As leveduras foram submetidas a uma intensidade de CE de 0,5 mA nos tempos de 1 a 5 minutos para o FA. Para o FC, FEI e FA, no tempo de 20 minutos, a intensidade de CE utilizada foi 2,0 mA. No tempo de 5 minutos representado para o FC e FEI, a intensidade de CE foi 0,5 mA. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,001$ (ANOVA) em relação ao controle.

O percentual de incorporação de iodeto de propídio aumenta ao longo do tempo para o FA e é indiferente para o FC e FEI, quando comparados ao controle. No FA é verificada uma resposta dependente da dose: quanto maior o tempo de exposição das leveduras à CE, maior a incorporação de iodeto de propídio. Isto demonstra a perda da integridade da membrana plasmática e corrobora os dados obtidos através da contagem de UFC. A partir dos dados de viabilidade celular obtidos, o tempo de 2 minutos e a intensidade de 0,5 mA foram selecionados para os demais experimentos com o FA, a fim de garantir um percentual de células viáveis para os demais experimentos. Para o FC e o FEI, foi utilizado 2,0 mA de CE por 20 minutos, já que não foram observadas alterações de viabilidade.

4.3 Alterações induzidas pela CE no meio eletrolítico e sua influência sobre leveduras de *C. albicans*

Em seguida, foram avaliados os fatores aos quais poderiam ser atribuídos os efeitos de morte celular observados no Fluxo Anódico. Dentre os fatores, dois foram destacados: pH e produção de eletrólitos no meio eletrolítico.

4.3.1 Variação dos valores de pH no meio eletrolítico

Relatos na literatura (VEIGA *et al.*, 2000) indicam que a corrente elétrica contínua induz variações de pH no meio eletrolítico. Baseado nisso, foram realizadas medidas de pH, em todas as intensidades e tempos testados, conforme dados das Figuras 13 e 14.

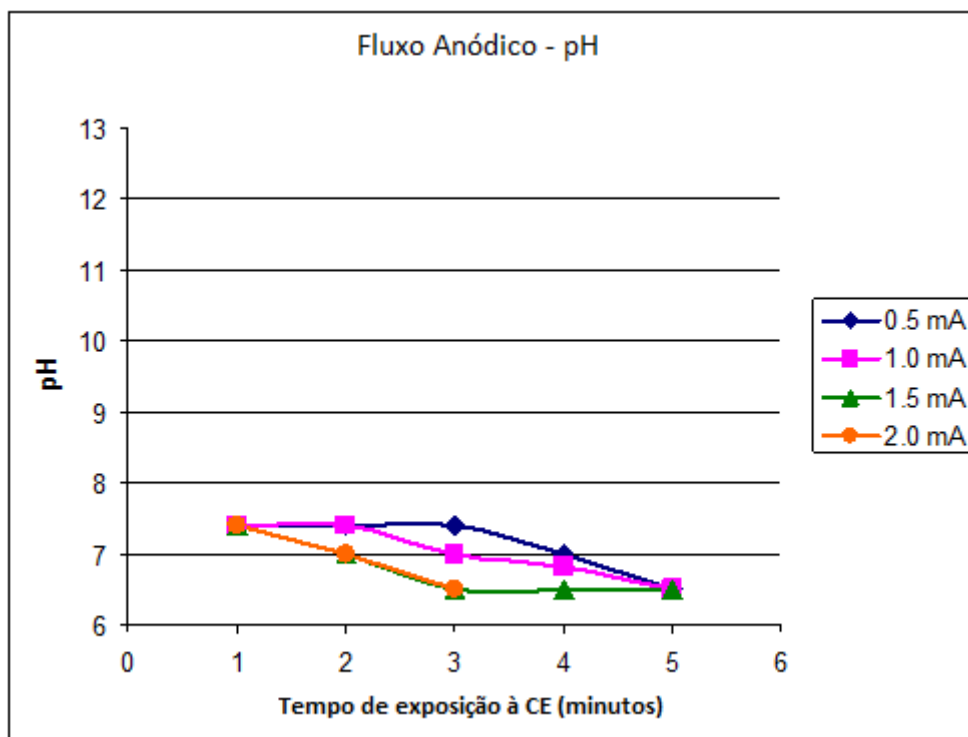


Figura 13. Variação de pH no FA imediatamente após estímulo elétrico com diferentes tempos e intensidades de CE. Os tempos utilizados foram de 1 a 5 minutos e as intensidades de CE foram de 0,5 a 2,0 mA.

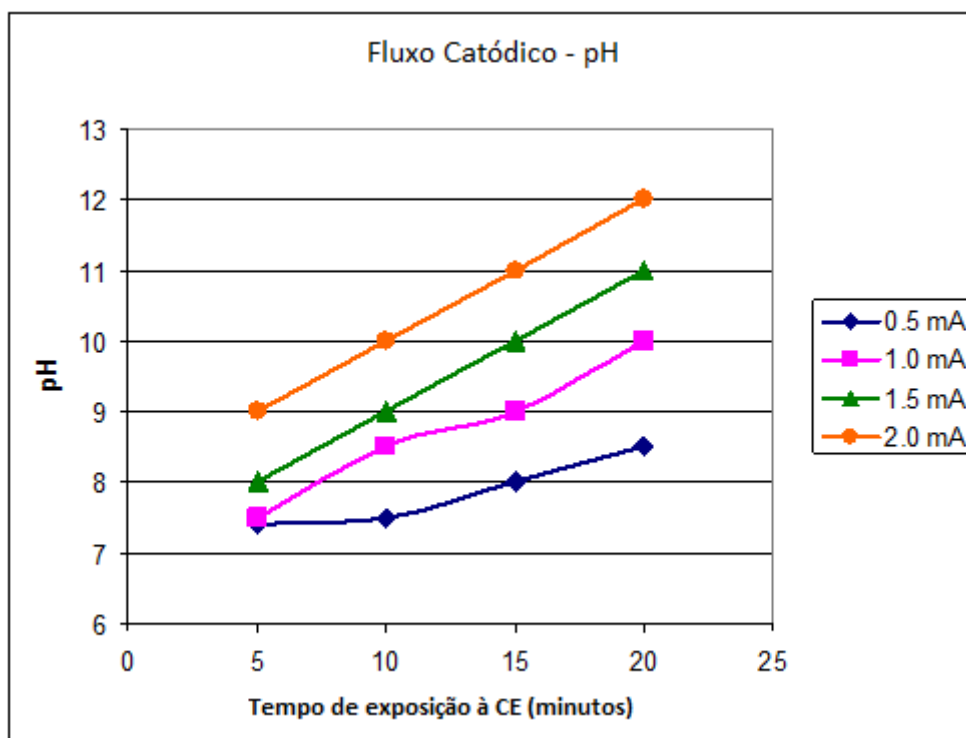


Figura 14. Variação de pH no FC imediatamente após estímulo elétrico com diferentes tempos e intensidades de CE. Os tempos utilizados foram de 1 a 5 minutos e as intensidades de CE foram de 0,5 a 2,0 mA.

Nas condições testadas, o FA apresentou uma ligeira redução do pH, sendo 6,5 o menor valor de pH obtido com 2,0 mA de CE por 3 minutos. Entretanto, no FC observa-se o efeito inverso: aumento do pH. Este atingiu o valor de 12,0 no meio eletrolítico submetido a 2,0 mA de CE por 20 minutos. Estas mesmas alterações já foram detectadas em estudos prévios (VEIGA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2011).

No FEI não foi observada alteração de pH, o qual se manteve 7,4, pH correspondente ao tampão PBS. Nesta situação experimental não existe contato direto com os produtos de eletrólise, por isso este valor se mantém constante.

4.3.2 Viabilidade celular de *Candida albicans* após incubação com produtos de eletrólise gerados em tampão PBS

O efeito dos produtos de eletrólise gerados por CE na viabilidade celular de *C. albicans* foi avaliado utilizando FA de 0,5 mA. Para tanto, duas situações experimentais foram avaliadas, conforme descrito no item 3.2.6. As Figuras 15 e 16 indicam os efeitos dos produtos de eletrólise gerados no FA, contidos em um volume

de 2,5 mL, sobre leveduras de *C. albicans* isentas de tratamento com corrente elétrica.

4.3.2.1. Efeito dos produtos de eletrólise gerados na presença de leveduras e incubados com leveduras não submetidas ao estímulo elétrico

O tampão PBS, na presença de leveduras, foi tratado com o FA de 0,5 mA/5 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 10 minutos/6200 rpm, para a separação entre as leveduras e o sobrenadante. Estas leveduras foram plaqueadas em ágar nutriente (representado pelo Fluxo Anódico na Figura 15). O sobrenadante foi colocado em contato com novas leveduras, não submetidas ao estímulo elétrico, durante 5 minutos (Eletrólitos, na Figura 15). Posteriormente, o número de UFC foi quantificado.

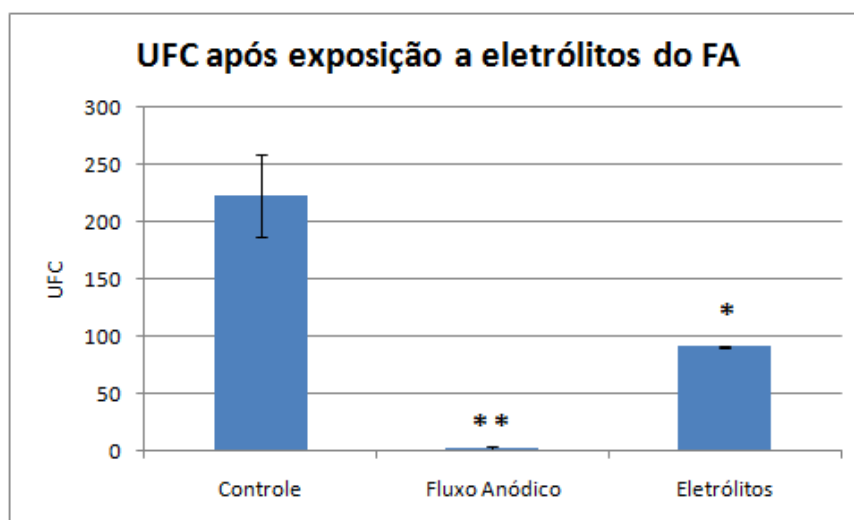


Figura 15. Viabilidade celular de *C. albicans* em duas condições experimentais: (A) Fluxo Anódico: leveduras submetidas ao FA (0,5 mA por 5 minutos); (B) Eletrólitos – Sobrenadante de (A) em contato por 5 min com *Candida albicans* isentas de tratamento com CE. A análise estatística realizada por ANOVA indicou diferença significativa em relação ao controle: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A Figura 15 representa o efeito dos produtos de eletrólise sobre a viabilidade celular, indicando que o Fluxo Anódico (0,5 mA/5min) induz aproximadamente 100% de morte celular imediatamente após o tratamento. A incubação com o sobrenadante (Eletrólitos) induziu a morte de cerca de 60% das leveduras quando comparado ao controle.

4.3.2.2. Efeito dos produtos de eletrólise gerados na ausência de leveduras e incubados com *C. albicans* em diferentes tempos

A Figura 16 representa o efeito do tampão PBS submetido ao FA (0,5mA/5 min) e reincubado posteriormente com leveduras não submetidas ao tratamento elétrico. Para isso, um volume total de 2,5 mL de PBS foi exposto ao FA e em seguida transferido para um poço contendo apenas leveduras isentas de tratamento com CE. Posteriormente, alíquotas de 30 μ L de uma suspensão de *C. albicans* foram retiradas em diferentes tempos (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) para avaliação do efeito ao longo do tempo. Após incubação, as leveduras foram centrifugadas para a retirada dos produtos de eletrólise, diluídas e plaqueadas em ágar nutriente. Observou-se que a partir de 5 minutos não foram detectadas colônias, quando as leveduras são incubadas com tampão submetido ao estímulo elétrico.

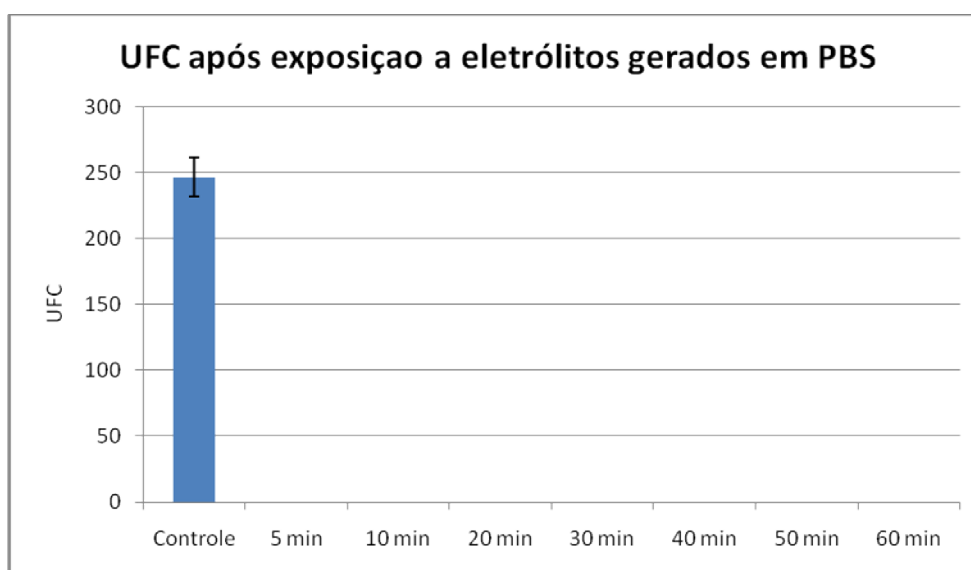


Figura 16. Viabilidade celular de *Candida albicans* após incubação com tampão PBS submetido ao Fluxo Anódico com 0,5 mA por 5 minutos. Após incubação das leveduras neste PBS a viabilidade celular foi avaliada no intervalo de 0 a 60 minutos. Não foram detectadas UFCs em nenhum dos tempos testados.

Estes resultados sinalizam a importância dos produtos de eletrólise gerados pela corrente elétrica, tais como ácido hipocloroso e íons H^+ , para a citotoxicidade observada, ocorrendo uma produção suficiente destes em intensidades e tempos relativamente pequenos. Em contrapartida, foi verificada uma diferença de sensibilidade das leveduras aos produtos de eletrólise gerados pelo FC, uma vez

que após 20 minutos de exposição a uma CE de 2 mA, quando os valores de pH estão próximos a 12,0, a capacidade das leveduras de formar colônias está mantida (Figura 9). Da mesma forma, o FEI que não gera produtos de eletrólise capazes de modificar o pH do meio eletrolítico, não altera a capacidade de *C. albicans* formar colônias (Figura 10).

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Com a finalidade de avaliar possíveis alterações ultraestruturais decorrentes do estímulo elétrico, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão.

Para o controle e o FEI, no qual não foi observada alteração de viabilidade celular, foram realizados ensaios apenas para as leveduras imediatamente tratadas com CE. Para o FEI foi utilizada a intensidade de 2,0 mA por 20 minutos.

Como no FC ocorre a formação de produtos de eletrólise e variação exacerbada de pH, as leveduras foram analisadas imediatamente após o estímulo com CE, reincubadas em meio BHI e analisadas após 48 horas também.

No FA ocorrem evidentes alterações de viabilidade imediatamente após o estímulo com CE, por isso foi avaliado o tempo de 0 hora utilizando 0,5 mA de CE por 2 minutos, no qual cerca de 50% das leveduras se apresentam viáveis, de acordo com a Figura 8. Também foi utilizado 2,0 mA de CE por 20 minutos, no qual todas as células incorporaram o iodeto de propídio imediatamente após a CE, indicando perda de viabilidade celular (Figura 12).

As Figuras 17, 18 e 19 representam os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão.

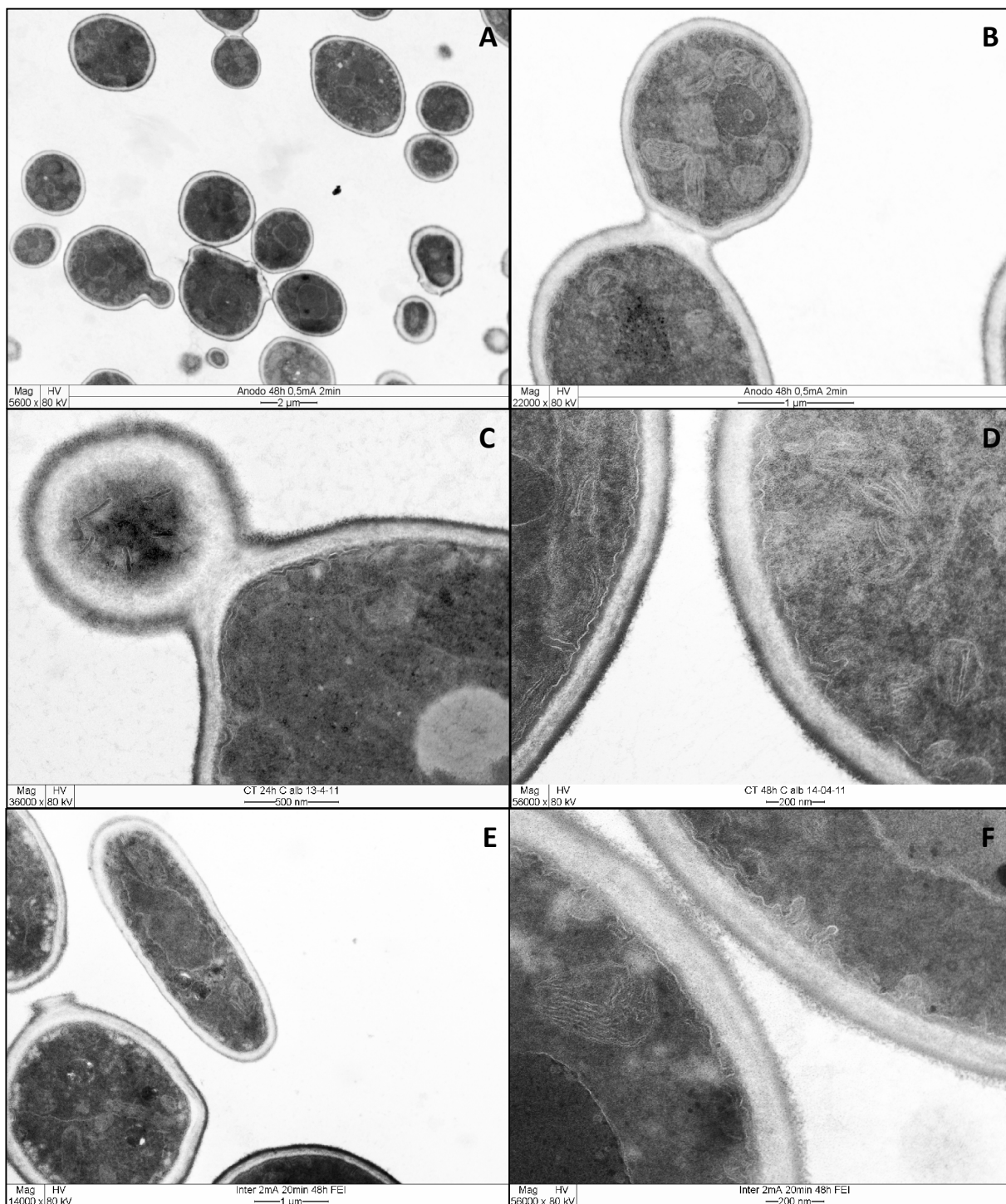


Figura 17. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células controle de *C. albicans* (A, B, C, D) e de células tratadas pelo FEI (E, F) imediatamente após o estímulo com CE.

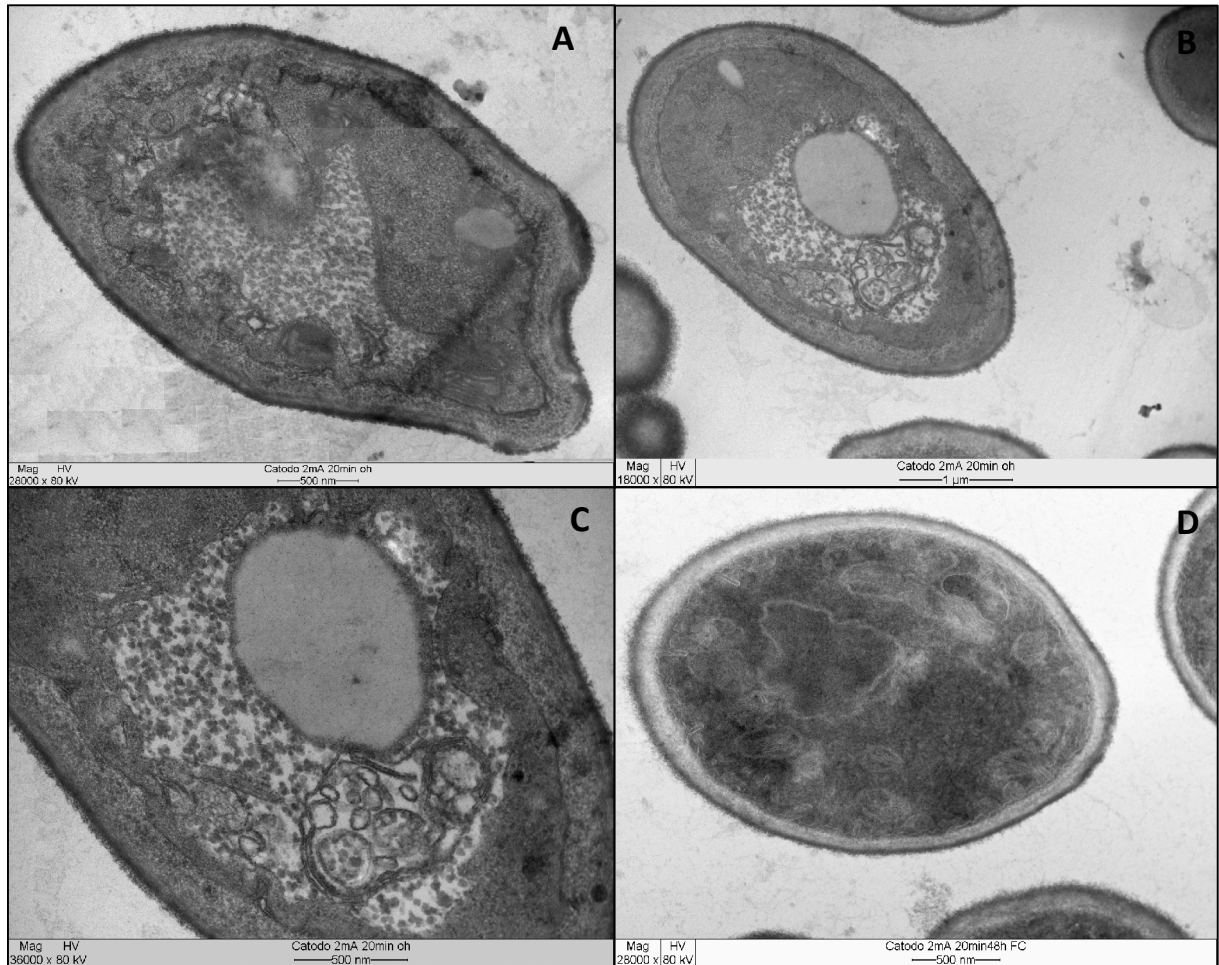


Figura 18. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas pelo FC imediatamente (A, B, C) e 48 horas após o estímulo elétrico (D).

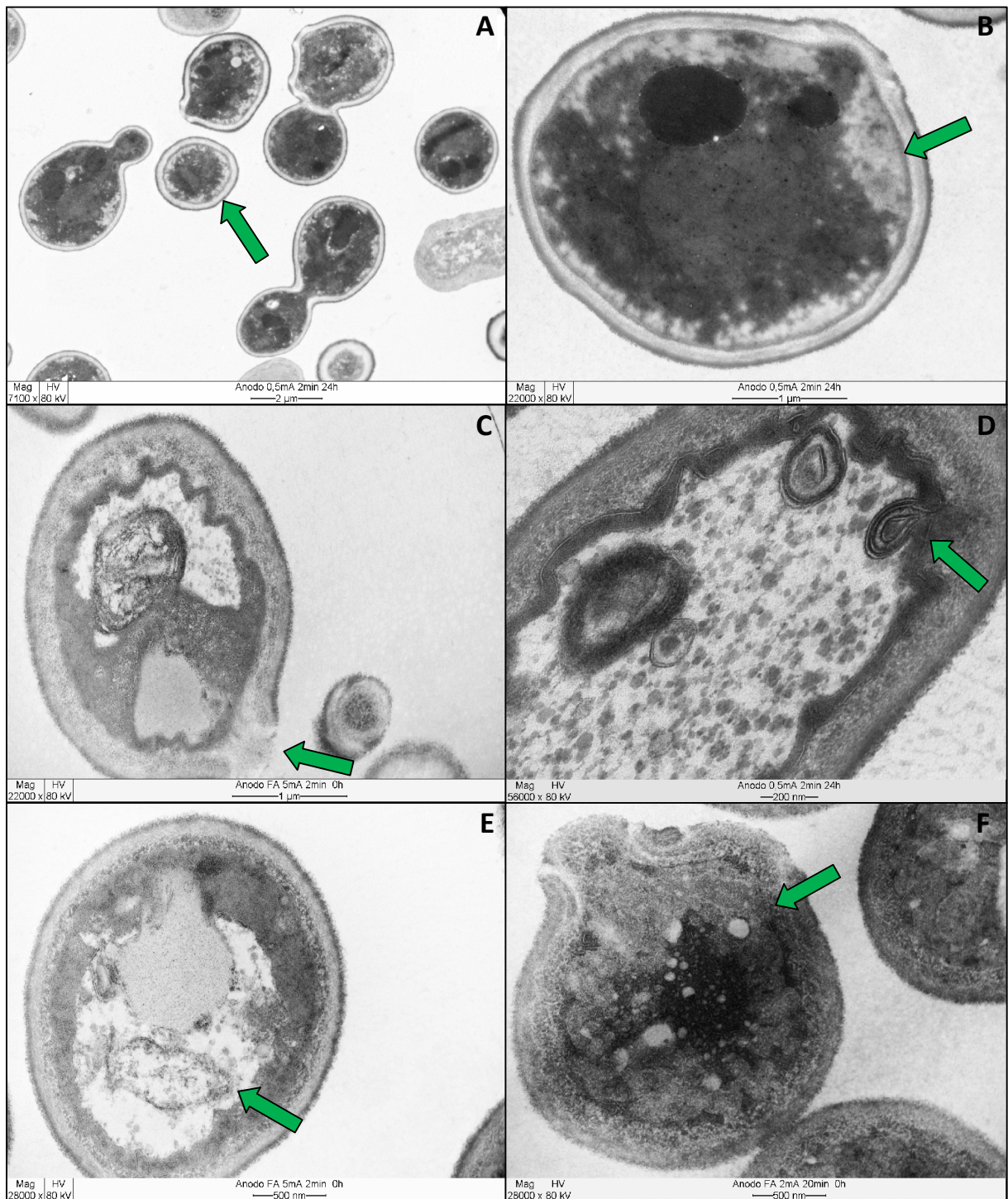


Figura 19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas pelo FA imediatamente após o estímulo elétrico com 0,5 mA/2 minutos (A, B, C, D, E) e 24 horas após tratamento com CE de 2,0 mA/20 minutos (F).

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão demonstram que as leveduras controle de *C. albicans* (Figura 17 A-D) apresentam integridade de membrana e parede celular, com preservação de organelas citoplasmáticas.

Na Figura 17 (E-F), as células tratadas pelo FEI também apresentam membrana e parede celular preservadas, assim como a estrutura de organelas citoplasmáticas. Portanto, o FEI não é capaz de promover alterações na estrutura celular, pois nesta situação experimental as células entram em contato apenas com os elétrons gerados pela CE, já que a formação de eletrólitos ocorre somente nos pólos positivo e negativo, onde estão presentes os eletrodos. A Figura 17C demonstra uma levedura em processo de brotamento, indicando que as células conseguem se replicar normalmente.

Porém, as leveduras tratadas com correntes elétricas de baixa intensidade demonstraram a presença de importantes alterações morfológicas no FC e no FA. É possível observar desorganização e rarefação citoplasmática em ambas situações (Figura 18 A-C e Figura 19 C-E). No FC foi observado que a membrana e parede celular permanecem íntegras, apesar dos danos internos. Tais danos aparentemente são reversíveis após 48 horas no FC (Figura 18 D), no qual as células recuperam a morfologia, apresentando citoplasma, membrana e parede íntegros.

Imediatamente após o tratamento, as células submetidas ao estímulo anódico (0,5 mA/2 minutos) também sofreram um processo de desorganização celular (Figura 19 C-E) e rarefação citoplasmática margeando a membrana plasmática (Figura 19 A-B). Tal processo pareceu ser irreversível para o FA 2,0 mA/20 minutos, pois as células não se recuperaram após 24 horas de reincubação em meio de cultura. Na Figura 19 C, foi observada ruptura de parede celular, sugerindo que este pode ser um alvo para a CE, já que é o contato primário estabelecido entre elétrons e produtos de eletrólise e as células.

A Figura 19 F (CE de 2,0 mA/20 minutos) demonstrou a presença de uma célula com ruptura de membrana celular, presença de vacúolos e desorganização citoplasmática. Provavelmente isso é decorrente do fato de esta intensidade ser capaz de reduzir a viabilidade celular em um valor próximo à totalidade (acima de 95%), de acordo com os dados experimentais obtidos com iodeto de propídio. Também foi observada a formação de figuras de mielina, presentes na Figura 19 D.

As alterações morfológicas poderiam explicar a sobrevida de cerca de 50% quando as leveduras foram tratadas pelo FA de 0,5 mA por 2 minutos. Da mesma forma, os danos detectados na morfologia de células tratadas pelo FA, com 2,0 mA de CE por 20 minutos, corroboram as alterações na viabilidade de *C. albicans* detectadas pela quantificação de UFC e pela citometria de fluxo.

4.5 Atividade de aspártico peptidases secretadas no sobrenadante de leveduras tratadas

Para este experimento, foram selecionados intensidades e tipos de polaridade diferentes, uma vez que a sensibilidade das leveduras é diferente. Por isso, para o FA foram escolhidos a intensidade de 0,5 mA e o tempo de estimulação de 1 minuto. Em contrapartida, para FC e FEI foram escolhidos a intensidade de 2,0 mA por 20 minutos de tratamento.

Os resultados indicaram que o padrão de degradação de BSA para todas as situações testadas é bastante semelhante, exceto para o FC que apresentou uma degradação quantitativamente menor quando comparado às demais situações testadas (Figura 20B) após análise densitométrica, na qual as bandas correspondentes à degradação de BSA estão indicadas por uma seta na Figura 20A.

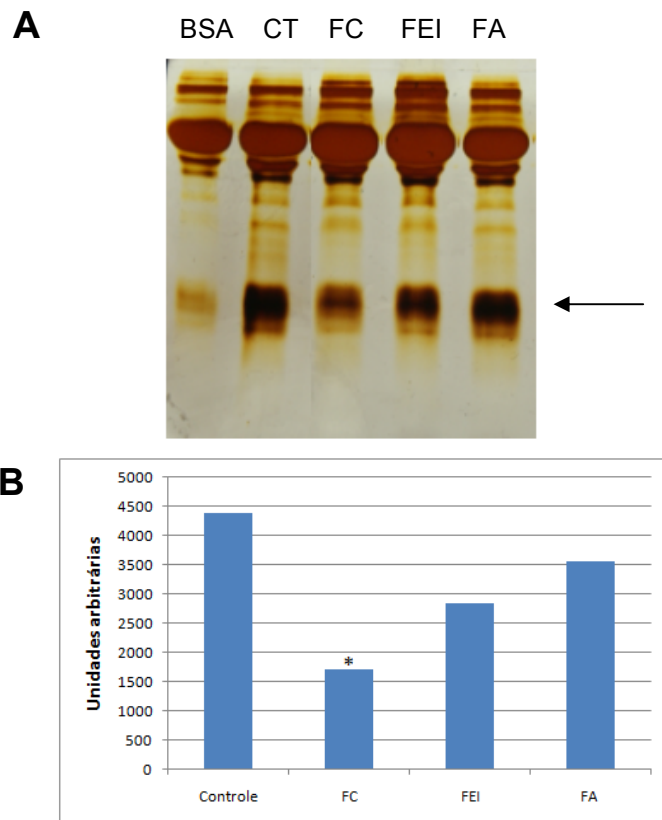


Figura 20. Atividade proteolítica do sobrenadante obtido 48 horas após incubação de leveduras em meio YCB após tratamento com corrente elétrica. **(A)** Avaliação da atividade proteolítica de SAPs através de SDS-PAGE. **BSA** - controle BSA; **CT** - sobrenadante das células controle; **FC** - sobrenadante de leveduras submetidas ao estímulo catódico, 2,0 mA durante 20 minutos; **FEI** - sobrenadante de leveduras submetidas ao fluxo eletroionico, 2,0 mA durante 20 minutos; **FA** - sobrenadante de leveduras submetidas ao estímulo anódico, 0,5 mA durante 1 minuto. **(B)** Densitometria das bandas correspondentes à degradação de BSA, indicadas por uma seta em (A). * denota diferença estatisticamente significativa com relação ao controle ($p < 0,05$).

Estes resultados indicam que o estímulo elétrico não modifica de forma significativa a atividade proteolítica de SAPs, exceto no FC, onde existe redução de degradação de SAPs, provavelmente por existir uma quantidade menor destas enzimas secretadas para o sobrenadante.

4.6 Avaliação dos níveis de ergosterol em leveduras tratadas com CE

Foi avaliada a quantidade de ergosterol de leveduras tratadas com CE: 2,0 mA/20 minutos para o FC e FEI; e 0,5 mA/2 minutos para o FA. A técnica utilizada para esta análise foi a cromatografia em camada fina, demonstrada na Figura 21A.

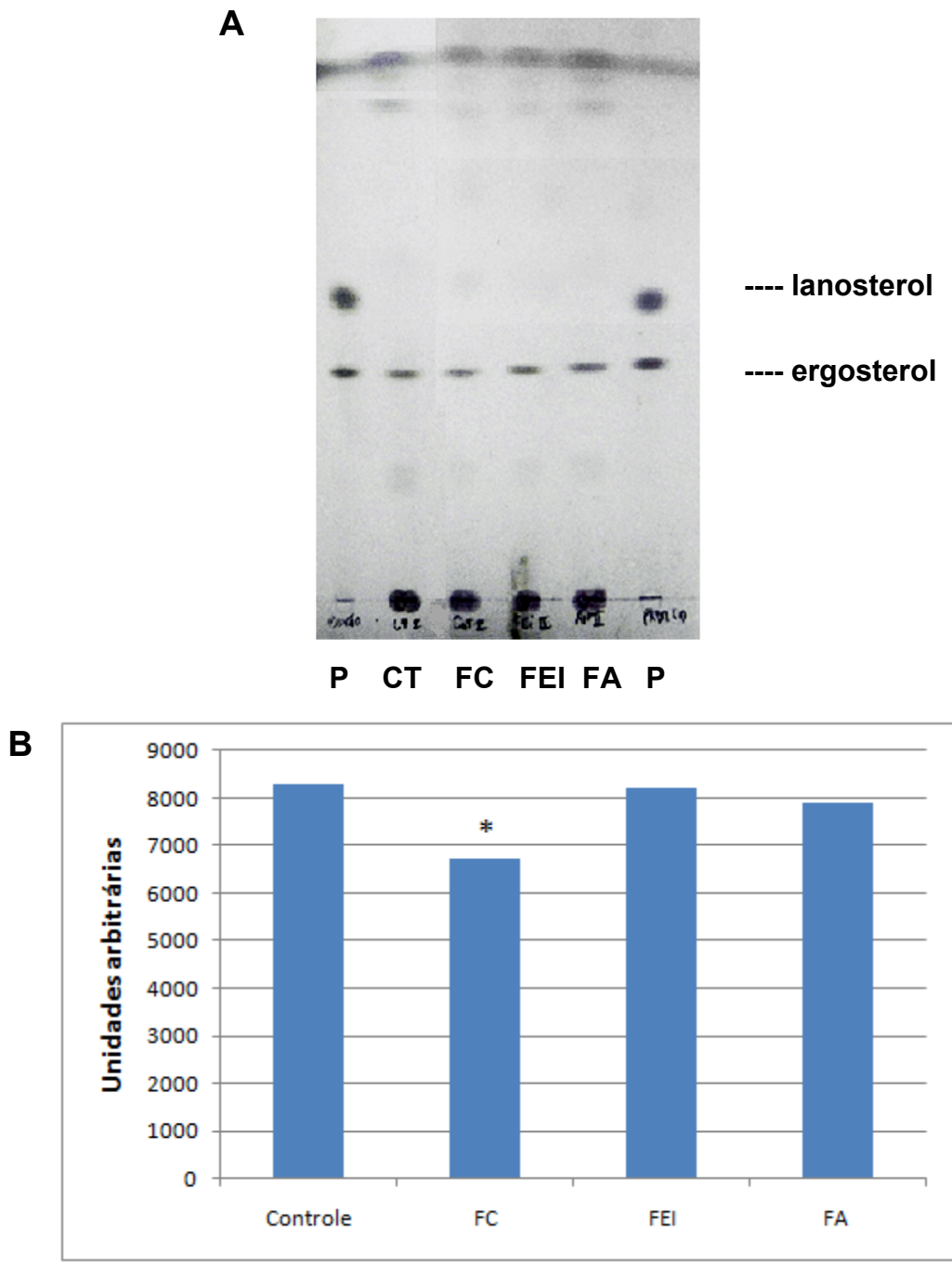


Figura 21. Avaliação da expressão de ergosterol por cromatografia em camada fina, em placa de sílica. **(A)** Representação do cromatograma. (P) representa o padrão de ergosterol e lanosterol. (CT): extrato lipídico correspondente ao controle, ou seja, células não tratadas. (FC) e (FEI): extrato lipídico correspondente ao FC e FEI (20 minutos/2,0 mA), respectivamente. (FA): extrato lipídico correspondente ao FA (2 minutos/0,5 mA). **(B)** Densitometria das bandas correspondentes à expressão de ergosterol. * denota diferença estatisticamente significativa com relação ao controle ($p < 0,01$, ANOVA).

A análise da expressão de ergosterol (Figura 21) demonstrou que as células submetidas ao tratamento pelo FC (2,0 mA/20 minutos) apresentam uma expressão menor deste lipídeo. Entretanto, no FA (0,5 mA/2 minutos) e no FEI (2,0 mA/20

minutos) não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. De acordo com os dados de viabilidade obtidos por UFC, a taxa de sobrevivência celular é de 50% na intensidade de CE testada para o FA.

4.7 Interação com células epiteliais Ma104

De acordo com o item 3.2.10.2, as leveduras foram tratadas com CE e posteriormente 5×10^5 leveduras foram colocadas em contato com 5×10^4 células epiteliais para avaliação do índice de adesão (Figura 22). Para o FA foi utilizada a intensidade de 0,5 mA por 2 minutos; enquanto que para o FC e FEI foi utilizada a intensidade e 2,0 mA por 20 minutos. Estes tempos e intensidades foram escolhidos, pois não há alteração significativa de viabilidade, exceto para o FA, que apresenta 50% de células viáveis nesta intensidade. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 23.

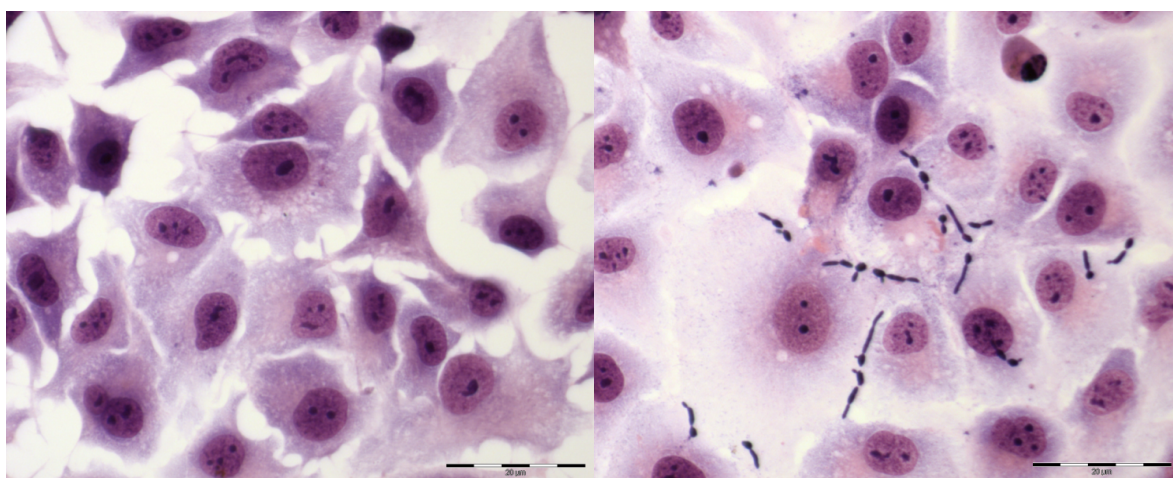


Figura 22. Fotografias representando a adesão de *Candida albicans* a células epiteliais Ma104. Fotografado por Venício Feo da Veiga (Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ).

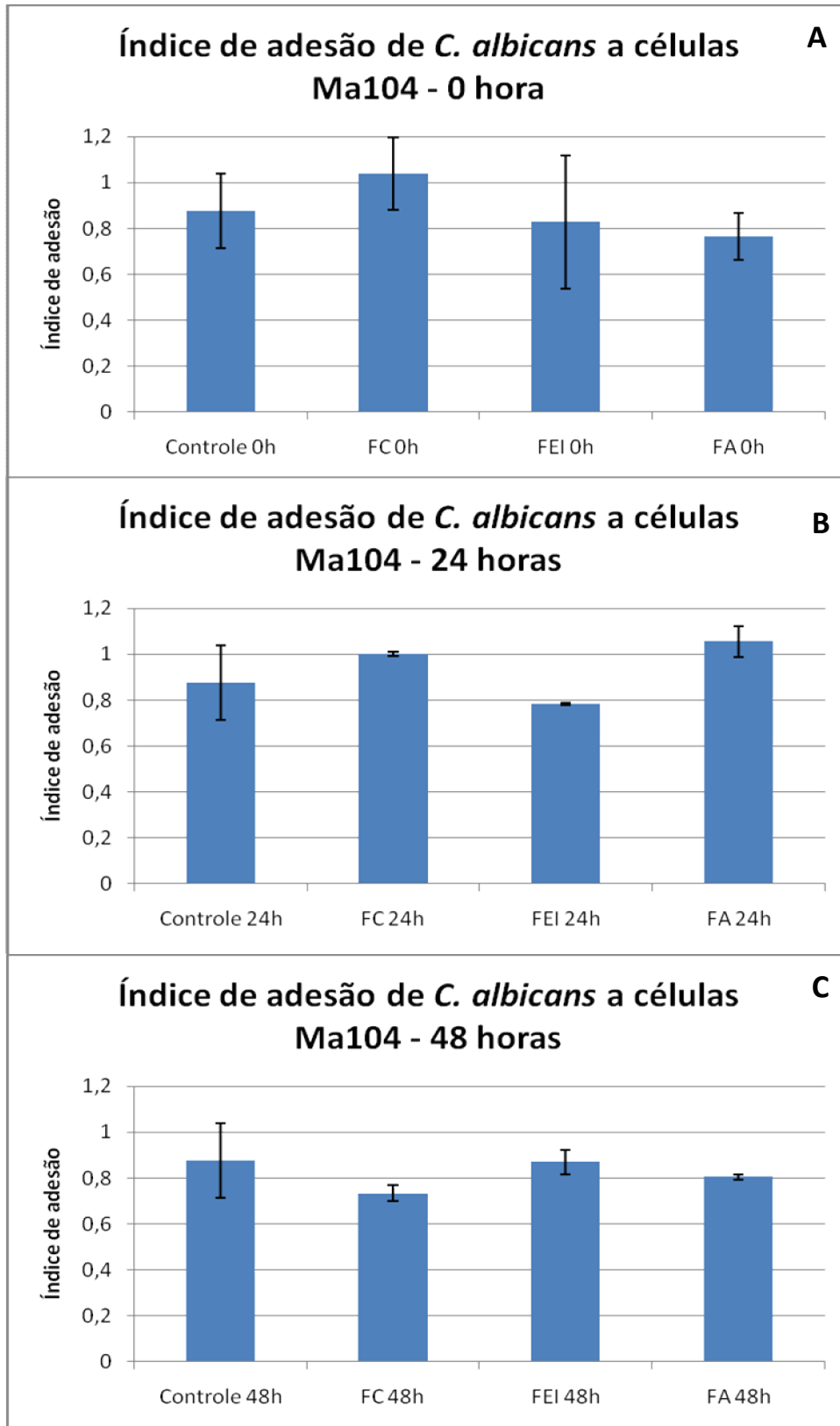


Figura 23. Índice de adesão entre leveduras de *C. albicans* e células epiteliais Ma104 imeditamente (A), 24 horas (B) e 48 horas (C) após tratamento com CE. Para o FC e FEI as células foram submetidas a um estímulo de 2,0 mA por 20 minutos; enquanto para o FA, a intensidade foi 0,5 mA por 2 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (ANOVA).

De acordo com os dados obtidos por este método (Figura 23), não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, demonstrando que a CE não foi capaz de alterar a interação fungo-hospedeiro nas condições avaliadas.

5 Discussão

Devido à extensa literatura relacionada à eletroterapia tumoral, principalmente em relação a estudos clínicos, verifica-se que os efeitos citotóxicos da CE são dependentes da polaridade, da intensidade e do tempo de exposição a este agente físico (GAULT & GATENS, 1976; NORDENSTRÖM, 1994; BRIGHTON *et al.*, 1995; HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001). Atualmente ainda não existe um protocolo clínico padronizado para utilização da terapia com corrente elétrica, o que aponta para a necessidade de estudos mais detalhados sobre os mecanismos relacionados às alterações celulares induzidas por este agente físico. A literatura evidencia que corrente elétrica contínua de baixa intensidade, na faixa de microampères, apresenta um efeito regenerativo e cicatrizante, podendo ser utilizada para a cicatrização de úlceras de pele e de fraturas ósseas (BRIGHTON *et al.*, 1995). Entretanto, quando o foco da terapêutica objetiva a destruição celular são utilizadas intensidades de CE maiores, na faixa do miliampère (NILSSON *et al.*, 2000).

Em modelos de células tumorais foi observado que existe diferença nos tipos de morte celular promovidos pelas diferentes polaridades geradas por correntes elétricas. Estudos *in vitro* demonstram que o pólo negativo – Fluxo Catódico – induz a morte celular principalmente pelo processo de necrose, devido à geração de radicais hidroxila no meio eletrolítico, com consequente aumento de pH. Como células animais são altamente suscetíveis ao meio alcalino, estas apresentam redução de viabilidade, ocorrendo a morte celular por necrose (VEIGA *et al.*, 2000). Já no pólo positivo – Fluxo Anódico – são gerados íons H^+ , que promovem a acidificação do meio eletrolítico, e também radicais oxidantes, como ácido hipocloroso (HClO). Nesta polaridade é observada a ocorrência tanto de necrose quanto de apoptose (VEIGA *et al.*, 2005), sendo que o último é o tipo de morte celular preferencial em tumores, pois não gera resposta inflamatória e não causa danos aos tecidos adjacentes. Dependendo da intensidade de CE aplicada, a redução de pH pode não ser significativa e, portanto o efeito citotóxico da CE é provavelmente decorrente da geração destes radicais oxidantes, como HClO, cloraminas e outros (VEIGA *et al.*, 2005).

Existem vários parâmetros a serem avaliados quando se considera a aplicação de correntes elétricas em sistemas biológicos. Um parâmetro importante é a variação de pH, como citado anteriormente: no Fluxo Anódico (FA) é verificada

redução do valor de pH, enquanto o inverso ocorre no Fluxo Catódico (FC). Neste trabalho foi observado que não ocorre alteração de viabilidade celular de *C. albicans* após tratamento com o FC, indicando que *C. albicans* não é sensível a estas alterações de pH no meio eletrolítico, pois os fungos são naturalmente mais resistentes a este tipo de oscilação, devido à parede celular. Em contrapartida, as leveduras de *C. albicans* se mostraram extremamente sensíveis ao FA, como avaliado através do número de UFC e pela incorporação com PI. O FA induziu uma redução drástica na viabilidade celular a partir de 0,5 mA e 2 minutos de exposição. Uma vez que *C. albicans* é capaz de sobreviver em pH ligeiramente ácido, como é visto em seu cultivo em meio YCB (Base de Carbono para Levedura), cujo pH é 5,5, a diminuição da viabilidade celular induzida pelo FA não parece ser dependente de pH (BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Comportamento similar foi verificado por Veiga e colaboradores em estudo realizado com mastocitomas de camundongo, sendo a diminuição da viabilidade celular induzida por 2 mA de corrente elétrica atribuída a espécies oxidantes geradas pelo FA, tais como: gás cloro, íons hidrogênio e cloraminas (VEIGA *et al.*, 2000).

A formação de produtos de eletrólise no meio mantido em contato com os eletrodos foi igualmente avaliada neste estudo com *C. albicans* (Tabela 2). Através dos experimentos realizados *in vitro*, a formação de espécies oxidantes constitui uma hipótese plausível para justificar a redução de viabilidade celular detectada após estímulo com o FA.

ENGLERT & SHACTER descreveram os efeitos distintos de morte celular gerados por radicais oxidantes em células tumorais. Eles observaram que células de linfoma de Burkitt humano, ao serem expostas ao ânion superóxido morreram por necrose, semelhante ao que ocorre quando as células são tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Quando foi utilizado outro agente oxidante, ácido hipocloroso (HClO), a morte celular programada ou apoptose foi induzida, devido à formação de aminoacil cloraminas no meio. Portanto, o tipo de radical oxidante gerado influencia diretamente no processo de morte celular. Sob condições inflamatórias, que também ocorrem em infecções, nas quais é gerado HClO, a morte é preferencialmente por apoptose (ENGLERT & SHACTER, 2002).

Em processos inflamatórios, que também são observados em infecções, são geradas espécies reativas de oxigênio (ROS) por fagócitos ativados, como neutrófilos, macrófagos e monócitos. ROS constituem um importante elemento de

defesa do hospedeiro contra microrganismos (bactérias e fungos) e tumores. Porém, podem causar danos ao tecido e contribuir para a progressão de outras doenças. Monócitos e neutrófilos, por exemplo, apresentam altos níveis da enzima mieloperoxidase, que catalisa a formação de ácido hipocloroso a partir de H_2O_2 e cloreto (ENGLERT & SHACTER, 2002).

HClO pode induzir necrose ou apoptose, dependendo do ambiente celular: em salina tamponada a morte normalmente é por necrose; enquanto em meio de crescimento, a morte celular primariamente é apoptótica. A concentração de HClO necessária para induzir morte em células de mamífero está entre 50 e 100 μM . O ácido hipocloroso reage com aminoácidos extracelulares, gerando as cloraminas, que mantêm em parte o potencial oxidante do HClO, mas não são tão potentes nem amplamente reativas. As cloraminas formadas possuem diferentes estabilidades, dependendo da estrutura química do grupo amino modificado. Cloraminas geradas por HClO são citotóxicas para microrganismos como bactérias e para células de mamíferos, induzindo apoptose. Estas espécies são altamente instáveis, o que foi verificado pela queda brusca no pico formado durante a identificação espectrofotométrica, a 252 nm (ENGLERT & SHACTER, 2002).

CAMPOS e colaboradores observaram que os efeitos da corrente elétrica em modelo de melanoma eram potencializados ao utilizar nanopartículas de L-tirosina, pois a disponibilidade de aminoácidos no meio eletrolítico, liberados de forma controlada por estas formulações, favorece a formação de cloraminas, induzindo a morte celular (CAMPOS *et al.*, 2010).

Como já foi descrito anteriormente, no FA ocorre a formação de ácido hipocloroso, que é capaz de gerar dano oxidativo às células, sendo provavelmente um dos principais responsáveis pelo efeito de redução da viabilidade celular. Na Figura 16 é possível observar que quando as leveduras são incubadas com os produtos de eletrólise, sem o estímulo com corrente elétrica, as células não são capazes de formar colônias, após 48 horas de incubação em ágar nutriente. Porém, ao incubar leveduras não submetidas à CE com o sobrenadante proveniente do FA, que teve contato com outras leveduras durante o estímulo com CE (Figura 15), foi verificado que as primeiras são capazes de formar colônias quando devolvidas ao meio de cultivo e sob condições ideais de crescimento. Desta forma, algumas hipóteses podem ser consideradas:

- Os produtos de eletrólise foram consumidos pelas células submetidas à corrente elétrica e, desta forma, a incubação desta solução com novas leveduras teria uma quantidade insuficiente de eletrólitos para promover a morte celular total;
- A centrifugação (6200 rpm/10 minutos) realizada para remoção dos produtos de eletrólise pode ter promovido difusão do gás Cl₂, com conseqüente redução na formação de HClO. A redução de espécies oxidantes pode ter promovido o aumento da sobrevivência celular;
- Os produtos de eletrólise gerados, por serem instáveis, foram degradados antes de causarem danos às células.

As três hipóteses são bastante plausíveis, podendo existir um efeito aditivo entre elas.

Na Figura 16, as leveduras foram incubadas com o meio eletrolítico até 60 minutos. Isto se deve ao fato de que, caso não ocorresse morte celular total em 5 minutos, seria esperada uma queda crescente de viabilidade celular ao longo do tempo. Como o tempo de 5 minutos foi suficiente para induzir uma ausência de UFC, este efeito não foi observado. Isto sugere que os produtos de eletrólise gerados no FA interferem significativamente com as taxas de sobrevivência celular, sendo de extrema importância o estudo e a compreensão dos mecanismos associados.

Os resultados obtidos com iodeto de propídio – substância fluorescente que intercala em moléculas de DNA de células com permeabilidade alterada da membrana plasmática –, para verificação da viabilidade de *C. albicans* após o estímulo elétrico se mostraram semelhantes àqueles obtidos pela metodologia de quantificação de UFC para as situações experimentais dos FC e FEI, ou seja, nenhuma alteração significativa foi detectada na viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo. Entretanto, após o estímulo anódico (5 minutos/0,5 mA) foi observada a incorporação de iodeto de propídio por 50% das células imediatamente após tratamento com CE, indicando morte celular. Nas mesmas condições experimentais para o FA, de acordo com a metodologia de quantificação de UFC, houve redução de 100% da viabilidade após 48 horas de pós-tratamento e incubação em novo meio de cultura. Este resultado nos permite formular duas hipóteses preliminares: (i) o FA faz com que grande parte das células, mas não todas, morra por necrose imediata; entretanto, aquelas leveduras que não foram danificadas imediatamente disparam o mecanismo de apoptose, resultando na ausência de colônias após 48 h; (ii) as diluições podem ter mascarado o resultado

de quantificação de UFC. A primeira hipótese é a mais provável e é confirmada pelos estudos morfológicos (microscopia eletrônica) discutidos posteriormente. A segunda hipótese foi descartada, uma vez que estes experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes em duplicata, sendo os erros de diluição minimizados.

A Figura 12 demonstra o efeito dependente de dose de morte celular no FA, através da incorporação de iodeto de propídio imediatamente após o estímulo com CE. Tais dados confirmam o efeito dos produtos de eletrólise, pois a quantidade destes aumenta no meio eletrolítico na medida em que aumenta a intensidade e o tempo de CE (dose) utilizados. Como já foi demonstrado, a não geração destes produtos em ensaios *in vitro*, realizados em tampão cuja composição não inclui íons cloreto, não promove a morte celular no FA (VEIGA *et al.*, 2000).

A intensidade de 0,5 mA durante 2 minutos para o FA reduz a viabilidade celular em cerca de 50%, segundo os dados obtidos por UFC, e em 30%, através da incorporação de PI. Isto demonstra que um percentual de células apresenta alteração imediata de permeabilidade de membrana após o estímulo anódico, enquanto cerca de 20% das células sofrem danos posteriores, sendo incapazes de formar colônias após 48 horas. Na Figura 12 foi verificada a presença de um efeito dependente de dose no FA: na intensidade de 2,0 mA/20 minutos, o PI foi incorporado por 100% das células fúngicas, indicando perda de viabilidade celular. As células, portanto, não são capazes de crescer nem renovar seus componentes metabólicos para a produção de enzimas, nas condições testadas. Portanto, a partir destes experimentos de viabilidade, foi selecionada a intensidade de CE de 0,5 mA por 2 minutos para os experimentos posteriores: análise de expressão de moléculas alvo para o tratamento de fungos e interação com células epiteliais.

Com relação às alterações morfológicas induzidas pelo tratamento anódico de fungos com eletrodos de prata, existem relatos de formação de vesículas, danos na membrana citoplasmática e lise de células. Estes efeitos já foram descritos anteriormente ao utilizar um antifúngico do grupo de lipopeptídeos, extraído de *Bacillus subtilis*: iturina A (THIMON *et al.*, 1995). O uso desta substância em *C. albicans* demonstrou que as invaginações da membrana citoplasmática desapareceram e ocorreu a formação de vesículas, efeitos similares aos descritos por AYDIN e colaboradores ao tratarem as células fúngicas com corrente elétrica (AYDIN *et al.*, 1997).

Através de microscopia eletrônica de transmissão, foi verificado que as células controle e células tratadas com FEI apresentam integridade de parede celular e membrana plasmática, assim como apresentam organização e preservação de organelas citoplasmáticas. Portanto, o FEI não induz alterações na estrutura das células fúngicas, pois estas ficam em contato apenas com os elétrons gerados pela CE.

Nos FC e FA foram observadas alterações imediatamente após o estímulo elétrico com CE contínuas de baixa intensidade, provavelmente devido à presença de produtos de eletrólise gerados no meio em contato com os eletrodos de platina. Foram observadas desorganização e rarefação citoplasmática em ambas situações (Figura 18 A-C e Figura 19 C-E). No FC a membrana e parede celular permanecem íntegras, apesar dos danos internos. De acordo com a Figura 18D, obtida 48 horas após o tratamento, as células são capazes de recuperar a morfologia, apresentando citoplasma, membrana e parede íntegros. Estes dados corroboram os dados de viabilidade celular, já que em 48 horas as células formam colônias. Existem duas situações prováveis neste caso: ou um percentual extremamente reduzido de leveduras apresenta as alterações morfológicas indicativas de morte celular; ou as alterações não são letais às células e estas se recuperam. A primeira hipótese parece mais coerente, já que os danos apresentados indicam um processo de morte irreversível. Portanto, as células não danificadas pelos efeitos da CE são capazes de crescer e manter a maquinaria celular necessária para exercer as funções fisiológicas adequadamente.

No FA também foram observados danos imediatamente após o tratamento com CE de 0,5 mA/2 minutos, nos quais as leveduras apresentaram desorganização celular (Figura 19 C-E), rarefação citoplasmática margeando a membrana plasmática (Figura 19 A-B), ruptura de parede celular (Figura 19C e 19F), presença de vacúolos (Figura 19F) e figuras de mielina (Figura 19D). As leveduras também foram submetidas ao tratamento com a maior intensidade de CE utilizada, 2,0 mA/ 20 minutos, como apresentado na Figura 19F, cujas alterações presentes evidenciam o efeito de morte celular. A ruptura de parede celular sugere que esta pode ser um importante alvo para a CE, porque representa o primeiro contato dos produtos de eletrólise com as células.

A análise de fatores de virulência também é de extrema importância. Neste estudo foram avaliadas as SAPs, fator de virulência essencial em *C. albicans*, sendo

um grupo de enzimas bastante pesquisado como alvo terapêutico. A diminuição da expressão de SAPs ou a utilização de substâncias inibidoras destas proteases é capaz de reduzir a virulência dos fungos. Além disso, podem interferir diretamente na adesão e na interação fungo-hospedeiro (BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011).

Os dados obtidos após o tratamento com CE se mostraram bastante promissores, na medida em que houve evidente redução da expressão de enzimas hidrolíticas (SAPs) para o sobrenadante de leveduras tratadas pelo FC, após estímulo com 2,0 mA/20 minutos, de acordo com a Figura 20B. Este efeito não foi observado para o FEI na mesma intensidade e tempo de corrente elétrica testados, nem para o FA na intensidade de 0,5 mA por 1 minuto. Estes dados demonstram que, apesar de não ocorrer redução de viabilidade, o estímulo catódico pode interferir em outras vias importantes relacionadas à infecção por *C. albicans*, como a expressão de enzimas hidrolíticas.

A expressão de ergosterol foi reduzida no FC no resultado preliminar apresentado na Figura 21, no qual as leveduras de *C. albicans* foram submetidas ao tratamento com 2,0 mA por 20 minutos no FC e FEI; e com 0,5 mA por 2 minutos no FA. O ergosterol representa um importante lipídeo localizado na membrana plasmática de fungos, sendo um alvo altamente seletivo. A redução do conteúdo de ergosterol afeta propriedades importantes da membrana, aumentando a sua fluidez e permeabilidade.

Estes dados foram obtidos 48 horas após o tratamento das células, pois estas foram reincubadas em meio de cultura para posterior análise. Neste período, os fungos são capazes de regenerar moléculas e constituintes de parede celular. Uma alternativa para a confirmação dos dados seria realizar o ensaio imediatamente após o tratamento com CE ou após um período inferior de reincubação em meio de cultura, como 12 ou 24 horas, por exemplo. Utilizando períodos de reincubação menores, não haveria tempo hábil para as células se recuperarem dos danos promovidos pela CE; pois apesar de ter sido observada uma redução significativa para o FC, não foi verificada uma diminuição acentuada nesta expressão; e nos FEI e FA não foi possível detectar nenhuma alteração nas condições experimentais avaliadas.

Outras técnicas também podem ser utilizadas para a avaliação de ergosterol, como a cromatografia gasosa, técnica quantitativa e mais sensível para a análise. Este tipo de cromatografia pode fornecer resultados mais precisos que a

cromatografia em camada fina, pois esta última, em determinados casos, não fornece a separação total dos lipídeos presentes, podendo existir um conjunto desta classe de substâncias que apresente o mesmo fator de retenção (ZHANG *et al.*, 2011). Métodos utilizando espectrofotometria por UV também podem ser utilizados para quantificar o conteúdo de ergosterol de uma amostra (ARTHINGTON SKAGGS *et al.*, 1999).

A interação de leveduras de *C. albicans* com células epiteliais Ma104 não foi alterada pela corrente elétrica através da técnica utilizada. Ensaio mais sensível, como citometria de fluxo, serão realizados para confirmar estes dados, pois já foi descrito que ao inibir SAPs com pepstatina A, a capacidade de infecção pelo fungo fica reduzida (NAGLIK *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2006). Como os dados apresentados demonstram a redução da expressão de SAPs secretadas por leveduras tratadas no FC, seria esperada uma consequente redução destas enzimas na superfície celular e também na taxa de adesão. Porém, não foi detectada influência na interação fungo-hospedeiro por esta técnica neste modelo celular.

Portanto, os resultados obtidos indicam que a eletroterapia é uma terapia bastante promissora e provavelmente constituirá uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções fúngicas locais, cutâneas e subcutâneas; principalmente devido à possibilidade de gerar localmente produtos de eletrólise capazes de inibir o crescimento celular e alterar outras vias metabólicas, modificando as características necessárias à adesão e à invasão do fungo no tecido hospedeiro. Adicionalmente, características importantes da eletroterapia, como uso tópico ou local, baixo custo e facilidade de aplicação corroboram as vantagens terapêuticas deste agente físico.

6 Conclusões

- Leveduras de *C. albicans* apresentam alta sensibilidade ao Fluxo Anódico, com redução de até 100% na viabilidade celular após 5 minutos de tratamento com 0,5 mA.
- Leveduras de *C. albicans* apresentam alta resistência aos Fluxos Catódico e Eletrooiônico, sem alterações de viabilidade celular capazes de serem detectadas pelo método UFC e através da incorporação de PI, analisada por citometria de fluxo.
- Os Fluxos Anódico e Catódico induziram importantes alterações ultraestruturais em leveduras de *C. albicans*.
- O Fluxo Catódico induz uma redução significativa na expressão de aspártico peptidases secretadas para o sobrenadante celular.
- A expressão de ergosterol de leveduras de *C. albicans* foi reduzida significativamente no Fluxo Catódico.
- O estímulo elétrico não modifica as taxas de adesão de leveduras de *C. albicans* às células epiteliais Ma104.

7 Referências

- AGUIAR, M.M.G.B.; ALBUQUERQUE, R.P.; MARINHO, D.S. *et al.* Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 36, n. 5, p. 594-600, 2010.
- AHMAD, A., KHAN, A., MANZOOR, N. *et al.* Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, v. 48, p. 35-41, 2010.
- ALANGADEN, G.J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 25, p. 201-225, 2011.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICHOVA, I. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 688-694, 2006.
- ARTHINGTON SKAGGS, B.A.; JRADI, H.; DESAI, T. *et al.* Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3332-3337, 1999.
- AYDIN, M.; YARKIN, F.; SERIN, M.S. *et al.* Morphological changes in *Candida albicans* induced by a silver anode. *Annals of Medical Sciences*, v. 6, n. 2, p. 88-92, 1997.
- BARON, S. Medical Microbiology. 4^a edição, University of Texas Medical Branch. 1996.
- BASTOS, S. R. C. Tratado de Eletroacupuntura: Princípios Básicos de Eletroterapia. Rio de Janeiro, Editora Numen Brasil, p. 77-124, 1993.
- BERGER, T.J.; SPADARO, J.A.; BIERMAN, R. Antifungal properties of electrically generated metallic ions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 10, n. 5, p. 856-860, 1976.
- BERGUES, L. *et al.* Antitumoral effect of the direct electric current on subcutaneous tumours. In: *17th International Cancer Congress*, v. 1, p. 35-39, 1998.
- BOLTON, L.; FOLENO, B.; MEANS, B. *et al.* Direct-current bactericidal effect on intact skin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 18, n. 1, p. 137-141, 1980.
- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BRAGA-SILVA, L.A.; MESQUITA D.G.A.; RIBEIRO M.D. *et al.* Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, n. 8, p. 765-770, 2009.

_____ ; MOGAMI S.S.V.; VALLE, R.S. *et al.* Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, v. 10, p. 221-224, 2010.

_____ ; SANTOS, A.L.S. Aspartic Protease Inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 16, p. 2401-2419, 2011.

BRIGHTON, C.T. ; SHAMAN, P. ; HEPPENSTALL, R.B. *et al.* Tibial nonunion treated with direct current, capacitive coupling, or bone graft. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 321, p. 223-234, 1995.

BRITO, L.M. *Alterações celulares e bioquímicas induzidas por corrente elétrica contínua de baixa intensidade em células humanas leucêmicas*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

CAMPOS, V. E. B. *Estudo da potencialidade de aminoácidos encapsulados em nanopartículas de poli-&-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

_____ ; TEIXEIRA, C.A.A.; VEIGA, V.F. *et al.* L-Tyrosine-loaded nanoparticles increase the antitumoral activity of direct electric current in a metastatic melanoma cell model. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, n. 1, p. 961-971, 2010.

CASTÓN-OSORIO, J.J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 32, Suppl. 2, p. S103-S109, 2008.

CHOU, C-K.; McDOUGALL, J.A. ; AHN, C. *et al.* Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics*, v. 18, n. 1, p. 14-24, 1997.

CHU, C. S.; McMANUS, A.T.; PRUITT Jr., B.A. *et al.* Therapeutic effects of silver-nylon dressing with weak direct current on *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds. *Journal of Trauma*, v. 28, n. 10, p. 1488-1492, 1988.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 500-607, 2003.

CORNELY, O. A.; MARTY, F. M., STUCKER, F. *et al.* Efficacy and safety of micafungin for treatment of serious *Candida* infections in patients with or without malignant disease. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, v. 54, p. e838-e847, 2011.

COSTA, B. G. B.; SIQUEIRA, C.M.; VEIGA, V.F. *et al.* Desenvolvimento e avaliação dos efeitos *in vitro* de um novo bioterápico do tipo Roberto Costa para candidíase oral. *Brazilian Homeopathic Journal*, v. 11, n. 1, p. 15 – 16, 2009.

COWEN L.E., ANDERSON J.B., KOHN L.M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 139-165, 2002.

DEVIRIM SEÇINTI, K.; ÖZGURAL, O; TUNA, H. *et al.* Antibacterial and antifungal effects of weak direct current and silver ions. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, v. 29, n. 3, p. 577-583, 2009.

EKKEHARD, H.; ZAVREL, M., HAUSER, N. *et al.* Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host – Focus on the function of cell wall proteins. *International Journal of Medical Microbiology* v. 301, p. 384-389, 2011.

ENGLERT, R. P. & SHACTER, E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 23, p. 20518–20526, 2002.

FIRINU, D.; MASSIDDA, O.; LORRAI, M.M. *et al.* Successful treatment of chronic mucocutaneous candidiasis caused by azole-resistant *Candida albicans* with posaconazole. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2011, article ID 283239, 4 pages, 2011.

GARCÍA-RUIZ, J. C.; AMUTIO, E.; PONTÓN, J. Invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 55-62, 2004.

GAULT, W. R.; GATENS, P.F. Use of low intensity direct current in management of ischemic skin ulcers. *Physical Therapy*, v. 56, p. 265-269, 1976.

GIANNINI, P.J.; SHETTY, K.V. Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngologic Clinics of North American*, v. 44, p. 231-240, 2011.

GOMES, M.N.; TEIXEIRA, C.A.A.; BARBOSA, G.M. *et al.* Effects of direct electric current on *Herpetomonas samuelpeçoi*: an ultrastructural study. *Bioelectromagnetics*, 2011. (Artigo aceito para publicação)

GONÇALVES, A. M.; NEHME, N.S.; MOREL, C.M. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel, C. M., editor, *Genes and Antigens of Parasites – A Laboratory Manual*. 2ª edição, Rio de Janeiro, p. 106-107, 1984.

GRIFFIN, D.T.; DODD, N.J.F.; MOORE, J.V. *et al.* The effects of low-level direct-current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumor regression and systemic biochemical sequelae. *British Journal of Cancer*, v. 69, n. 5, p. 875-878, 1994.

GUILLOU, S.; EL MURR N. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in solution by low-amperage electric treatment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 5, p. 860–865, 2002.

HAAS, L.F. Luigi Galvani (1737-98). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 56, n. 10, p. 1084, 1993.

HOLANDINO, C.; VEIGA V.F.; CAPELLA M.M. *et al.* Damage induction by direct electric current in tumoral target cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 38, n.6, p. 554-607, 2000.

_____; VEIGA, V.F.; RODRIGUES, M.L. *et al.* Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. *Bioelectromagnetics*, v. 22, n. 7, p. 470-478, 2001.

HUBE, B. Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contributions to Microbiology*, v. 5, p. 126-37, 2000.

IJIRI, K.; MATSUNAGA, S.; FUKUDA, T. *et al.* Indomethacin inhibition of ossification induced by direct current stimulation. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 13, n. 1, p. 123-131, 1995.

ISHIDA, K.; RODRIGUES, J.C.F; RIBEIRO, M.D. *et al.* Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 74, p. 1-12, 2009.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KNEIPP, L.F.; RODRIGUES, M.L.; HOLANDINO,C. *et al.* Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology*, v. 150, p. 3355-3362, 2004.

LEE, R.C.; CANADAY, D.J.; DOONG, H. A review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair. *Journal of Burn Care and Rehabilitation*, v. 14, n. 3, p. 319-335, 1993.

LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., MURGUI, A. *et al.* Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* v. 41, p.187-196, 2004.

LIU, W-K.; TEBBS, S.E., BYRNE, P.O. *et al.* The effects of electric current on bacteria colonising intravenous catheters. *Journal of Infection*, v. 27, n. 3, p. 261-269, 1993.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

_____ ; ALBRECHT, A.; BADER, O. *et al.* *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, v. 6, p.915-926, 2004.

_____ ; MOYES, D.L.; WÄCHTLER, B. *et al.* *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity, *Microbes and Infection*, 2011. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.009.

NILSSON, E.; VON EULER, H.; BERENDSON J. *et al.* Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*, v. 51, n. 1, p. 1-11, 2000.

NORDENSTRÖM, B. E. Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer. *The European Journal of Surgery. Supplement*, v. 574, p. 93-109, 1994.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J.R.; DEL POETA, M. *et al.* Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 3, p.956-964, 2003.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, v. 34, n. 3, p. 857-863, 2006.

PAUW, B.E.; PICAZO, J.J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 32, Suppl. 2, p.S167-S171, 2008.

RENTZ, A.M.; HALPERN M.T.; BOWDEN, R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 4, p. 781-788, 1998.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, Suppl. 1, p. i5-i11, 2005.

SAMUELSSON, L.; JÖNSSON, L.; STAHL, E. Percutaneous treatment of pulmonary tumors by electrolysis. *Radiologe*, v. 23, n. 6, p. 284-287, 1983.

SANGLARD, D.; HUBE, B.; MONOD, M. *et al.* A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infection & Immunity*, v. 65, n. 9, p. 3539-3546, 1997.

SANTOS, A.L.S.; CARVALHO, I.M.; SILVA, B.A. *et al.* Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 46, n.2, p. 209-220, 2006.

_____ ; PALMEIRA, V.F.; ROZENTAL,S. *et al.* Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 5, p. 570-591, 2007.

_____. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 2,n. 3, p. 48-58, 2011.

SCHAUBLE, M. K. ; HABAL, M.B. ; GULLICK, H.D. Inhibition of experimental tumor growth in hamsters by small direct currents. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 101, n. 6, p. 294-297, 1977.

SCHALLER M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C. *et al.* Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.

SEIDER K.; HEYKEN A.; LÜTTICH A. *et al.* Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010.

TEIXEIRA, C.A.A. *et al.* Alterações ultraestruturais e do perfil proteico de células humanas leucêmicas são dependentes da polaridade de corrente elétrica aplicada. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003.

TELLÓ, M. *et al.* O uso da corrente elétrica no tratamento do câncer. Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, cap. 1 e 4, 2004.

THIMON L.; PEYPOUX F.; WALLACH, J. *et al.* Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 2, p. 101-106, 1995.

VEIGA, V.F.; HOLANDINO, C. ; RODRIGUES, M.L. *et al.* Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an *in vitro* analysis. *Bioelectromagnetics*, v. 21, n. 8, p. 597-607, 2000.

_____ ; NIMRICHTER, L. ; TEIXEIRA, C.A.A. *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 42, n. 1, p. 61-74, 2005.

WEINDL, G.; WAGENER J.; SCHALLER M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 7, p. 666-675, 2010.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 18, p. 5215-5221, 1995.

XIN, Y.; XUE, F.; ZHAO, F. *et al.* Electrochemical treatment of lung cancer. *Bioelectromagnetics*, v. 18, n.1, p. 8-13, 1997.

YANG Y.L. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 36, n. 4, p.223-228, 2003.

YEN, Y.; LI, J.R.; ZHOU, B.S. *et al.* Electrochemical treatment of human KB cells *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, v. 20, n. 1, p. 34-41,1999.

ZHANG, Z.; TAN, W.; HU, Y. *et al.* Simultaneous determination of trace sterols in complicated biological samples by gas chromatography-mass spectrometry coupled with extraction using β -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer beads. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 4275-4283, 2011.