



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E
CATALASE DE *Candida albicans* E *Candida dubliniensis* EXPOSTAS
A ANTINEOPLÁSICOS, ÍONS METÁLICOS E ANTIFÚNGICOS**

Carlos Eduardo Blanco Linares

PPGCBB

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE DE *Candida albicans* E *Candida dubliniensis* EXPOSTAS A ANTINEOPLÁSICOS, ÍONS METÁLICOS E ANTIFÚNGICOS

por

Carlos Eduardo Blanco Linares

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTORADO em Ciências Biológicas – Bioquímica.**

PPGCBB

Porto Alegre, RS, Brasil

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
DOUTORADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE
DE *Candida albicans* E *Candida dubliniensis* EXPOSTAS A
ANTINEOPLÁSICOS, ÍONS METÁLICOS E ANTIFÚNGICOS

Elaborada por
Carlos Eduardo Blanco Linares

Como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTORADO em**
Ciências Biológicas – Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)

Prof^o. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Prof^a. Dra. Maria Ester Pereira

Prof^o. Dr. Juliano Ferreira

Porto Alegre, 28 de agosto de 2009.

**Dedico este trabalho à minha família pelo
constante incentivo e a minha esposa e filha
pela compreensão, apoio e amor.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Rosa C. Schetinger pela oportunidade, ensinamentos, paciência e compreensão com que orientou este trabalho.

Ao Prof. Sydney Hartz Alves pelas idéias e ensinamentos.

A Universidade Regional Integrada pelo apoio e investimento realizado em meus estudos.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Antonieta, por me incentivarem sempre, pelo carinho, pelos ensinamentos e por acreditarem sempre em meus sonhos.

Ao meu irmão por ser um exemplo em minha vida.

A minha esposa, Deizi, e filha, Luísa, pelo amor e compreensão.

A colega Denise, a minha esposa Deizi e a aluna Glaucia pelo auxílio em experimentos laboratoriais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar este trabalho de pesquisa.

A Deus, pela saúde, força e pela oportunidade de viver.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A atividade de catalase em *Candida albicans* tem sido sugerida como um mecanismo de resistência ao antifúngico anfotericina B. Neste contexto, poucos são os estudos de enzimas como catalase e superóxido dismutase em leveduras do gênero *Candida* expostas a diferentes situações. Assim, este estudo teve por objetivo investigar o efeito da exposição de *Candida* a antineoplásicos, íons metálicos e antifúngicos como fluconazol e anfotericina B sobre a atividade dessas enzimas. Os resultados apontaram que o antineoplásico metotrexato aumentou a atividade da catalase em *C. albicans*, que íons metálicos como cobre, zinco, manganês e ferro produzem um efeito variável na atividade de superóxido dismutase, bem como, um efeito variável de um íon no acúmulo de outro. Também verificamos através de nossos resultados que a indução de resistência ao fluconazol e anfotericina B aumentam a atividade de catalase e superóxido dismutase em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Esses resultados sugerem que o antineoplásico metotrexato e a indução de resistência a anfotericina B e fluconazol podem gerar um estresse oxidativo em leveduras do gênero *Candida* que possivelmente se adaptam a esse estresse aumentando seus mecanismos de defesa antioxidante. Esse efeito pode induzir a uma maior resistência desses organismos ao ataque de células fagocíticas do hospedeiro.

Palavras chaves: superóxido dismutase, catalase, candida, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Catalase is an enzyme that has been suggested to be involved in resistance mechanisms to antifungal drug such as amphotericin B. There are few studies focusing on catalase and superoxide dismutase in yeasts, such as *Candida*, exposed to different situations. Thereby, the aim of the present study was to investigate the effect of exposing *Candida* to antineoplastic drugs, metallic ions and antifungal drugs, namely fluconazole and amphotericin B, on catalase and superoxide dismutase activities. Results show that methotrexate induced catalase activity in *C. albicans* and that metallic ions, such as copper, zinc, manganese and iron produced a variable effect on superoxide dismutase activity of *C. albicans*, as well as a variable effect in the uptake of one ion on another. We also showed that fluconazole and amphotericin B resistance increased catalase and superoxide dismutase activity in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. These results suggest that methotrexate as well as the induction of fluconazole- and amphotericin B-resistance may induce oxidative stress in yeasts such as *Candida*, which may adapt by increasing antioxidant defense mechanisms. This effect may induce a major resistance of this yeast to phagocytic cell attack.

Keywords: superoxide dismutase, catalase, candida, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do metotrexato.....	13
Figura 2. Estrutura química da citarabina.....	14
Figura 3. Estrutura química da ciclofosfamida.....	15
Figura 4. Estrutura química da dacarbazina.....	16
Figura 5. Papel da Superóxido dismutase na detoxificação de ROS.....	19
Figura 6. Cu/Zn SOD isolada de <i>Candida albicans</i>.....	20
Figura 7. Estrutura da Catalase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	22
Figura 8. Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutatona peroxidase.....	23

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. <i>Candida</i>	01
1.2. Candidiase em pacientes com câncer.....	02
1.3. Terapia antifúngica.....	04
1.3.1. Azólicos.....	05
1.3.2. Poliênicos.....	06
1.3.3. Inibidores da síntese de glucana.....	07
1.4. Resistência de <i>Candida spp</i> aos agentes antifúngicos.....	08
1.4.1. Resistência aos antifúngicos azólicos.....	09
1.4.2. Resistência aos antifúngicos poliênicos.....	09
1.5. Antineoplásicos.....	11
1.5.1. Metotrexato.....	11
1.5.2. Citarabina.....	13
1.5.3. Ciclofosfamida.....	14
1.5.4. Dacarbazina.....	15
1.5.5. Antineoplásicos e resistência a poliênicos.....	16
1.6. Espécies reativas do oxigênio em leveduras.....	17
1.6.1. Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1).....	18
1.6.2. Catalase (E.C. 1.11.1.6).....	20
1.6.3. Glutationa peroxidase (E.C. 1.11.1.19).....	22
1.7. Íons metálicos e SOD.....	24

II. OBJETIVOS.....	26
Objetivo Geral.....	26
Objetivos específicos.....	26
Capítulo I.....	26
Capítulo II.....	27
Capítulo III.....	27
III. RESULTADOS E METODOLOGIAS.....	28
Capítulo I – Artigo – Catalase activity in <i>Candida albicans</i>	
exposed to antineoplastic drugs.....	28
Capítulo II – Manuscrito I – The effect of Cooper, manganese, iron	
and zinc on <i>Candida albicans</i> SOD activity.....	33
Capítulo II – Manuscrito II – Catalase and Superoxide dismutase	
activity in fluconazole- and amphotericin B-resistant <i>Candida</i>	
<i>dublinsiensis</i> and <i>Candida albicans</i>	64
IV. DISCUSSÃO.....	86
4.1. Influência de Antineoplásicos na Atividade da Catalase	
de <i>Candida albicans</i>	86
4.2. Influência de Íons Metálicos na Atividade da SOD	
de <i>Candida albicans</i>	91
4.2.1. Íons Cobre.....	92
4.2.2. Íons Zinco.....	94
4.2.3. Íons Manganês.....	97
4.2.4. Íons Ferro.....	98

4.3. Superóxido Dismutase em <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. albicans</i> resistentes a anfotericina B e fluconazol.....	99
4.4. Catalase em <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. albicans</i> Resistentes a anfotericina B e fluconazol.....	102
V. CONCLUSÕES.....	104
VI. PERSPECTIVAS.....	106
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, divisão Fungi Imperfecta, classe dos Blastomicetos, família Cryptococcaceae. Nesse gênero estão catalogadas aproximadamente 200 espécies, sendo que a espécie *C. albicans* é a mais prevalente como patógeno ao homem (Bodey *et al.*, 1992).

No homem, a *Candida albicans* é participante da microbiota endógena e habita a boca, o intestino e a vagina. Essa espécie, em determinadas condições, tais como, em carências vitamínicas, prematuridade, diabetes, gravidez, tratamentos prolongados com antibióticos, corticóides, quimioterápicos, radioterápicos, uso de próteses dentárias ou cardíacas e em indivíduos imunocomprometidos, desempenha papel de fungo oportunista. Nessas condições, invade os tecidos e provoca quadros clínicos que variam desde processos infecciosos superficiais até infecções profundas envolvendo vísceras (Fonseca, 1980; Sidrim & Moreira 1999).

Segundo dados do “National Nosocomial Infections Surveillance” (NNIS), nos Estados Unidos, no final da década de 80 e início de 90, 7% de todas as infecções nosocomiais eram causadas por alguma espécie de *Candida* (Shaberg *et al.*, 1991), sendo que, no início da década de 80, essa espécie apresentava-se como o sétimo patógeno mais frequente entre as infecções nosocomiais. No período de 1986 a 1990, a *Candida spp* encontrava-se entre os cinco primeiros agentes mais comumente identificados em hemoculturas de pacientes internados em hospitais americanos. Na década de 90, em 50 hospitais dos

Estados Unidos da América, *Candida spp* respondeu por 8% dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea documentados naquelas instituições, sendo considerada a quarta principal causa de infecção em hospitais americanos (Colombo & Guimarães, 2003). Nas últimas décadas, as candidemias tiveram o surpreendente aumento de 487% (Rex *et al.*, 1995), sendo que, entre os pacientes com SIDA, as candidíases atingem percentuais de 43 – 93% da população com significativa morbidade e frequentes recidivas (Le Guenec *et al.*, 1995).

1.2. Candidíase em Pacientes com Câncer

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas invasivas foram consideradas a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com neoplasias, particularmente leucemias, linfomas, síndromes mielodisplásicas e nos transplantados de medula óssea (Rex *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1994). Esse espectro começou a mudar a partir dos anos 1950, pois, até então, a terapia antineoplásica era incomum e pouco diversificada. Com o avanço das drogas citotóxicas, agravaram-se os quadros de imunossupressão em pacientes com câncer e neles, as doenças fúngicas emergiram como importante causa de morbidade e mortalidade (Wingard, 1994).

Entre 1973 e 1980, as infecções fúngicas foram encontradas em 27 % de 32 pacientes com leucemia aguda, estando *Candida* envolvida na maioria dessas infecções (DeGregorio *et al.*, 1982). De acordo com Bodey (1984), as candidíases são causa de morte em 75% dos pacientes com leucemia aguda,

51% dos pacientes com linfoma e 47% dos pacientes com tumores sólidos. Alguns autores estimam que a frequência das candidíases disseminadas chegue a atingir 60% dos pacientes com câncer e, entre esses, a mortalidade é de, aproximadamente, 95% (Karabinis *et al.*, 1988). Em um estudo realizado em um hospital Universitário de Frankfurt no período de 1978 a 1992 apontou uma incidência de infecções fúngicas invasivas em indivíduos com leucemia mielóide aguda de 25% e entre pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), de 19% (Groll *et al.*, 1996).

Nas últimas décadas, observou-se uma diminuição das infecções causadas por *Candida albicans*. No entanto, ela ainda é reconhecida como a mais patogênica e frequente espécie de *Candida*, causadora de infecções em indivíduos imunocomprometidos ou imunocompetentes (Sullivan & Coleman, 1998). Essa tendência pode ser observada em estudos com swabs orais de pacientes com câncer, onde apesar da espécie *Candida albicans* ser a mais freqüentemente isolada, as espécies não *albicans* aumentaram consideravelmente, atingindo percentuais de aproximadamente 25% dos casos (Davies *et al.*, 2006). Outro estudo com pacientes com câncer avançado, apontam 49% de isolados de *Candida albicans*, 24% de *Candida glabrata* e 4,6% de *Candida dubliniensis* (Bagg *et al.*, 2003). Mais recentemente os mesmos autores obtiveram a espécie *Candida albicans* em 59% dos isolados e as espécies não *albicans* mais frequentes foram *Candida glabrata* 19% e *Candida dubliniensis* 7% (Bagg *et al.*, 2005).

Alguns pesquisadores vinculam a mudança no perfil de espécies isoladas em paciente com câncer à terapia profilática com fluconazol (Bodey *et al.*, 2002). Nesses pacientes, a candidíase está associada à alta mortalidade, a qual aumenta com a presença de neutropenia (Anaissie *et al.*, 1998).

1.3. Terapia Antifúngica

Historicamente, as infecções fúngicas invasivas estão associadas à alta morbidade e mortalidade, devido, em parte, às limitações da terapia antifúngica disponível e às dificuldades em se fazer um diagnóstico rápido e acurado. Desde os anos de 1950, o tratamento padrão de infecções fúngicas graves é feito com anfotericina B e com triazólicos como fluconazol e itraconazol. Apesar de vantajosos em relação à anfotericina B, os compostos triazólicos apresentam limitações devido às suas formulações, espectro de atividade e ou desenvolvimento de resistência. Frente a tais limitações surgiram, na última década, novos fármacos com amplo espectro de ação, entre eles os triazólicos voriconazol e posaconazol e a nova classe equinocandina caspofungina e micafungina que apresenta atividade perante diversas espécies fúngicas (Sable *et al.*, 2008; Sidrim & Rocha, 2004). Contudo, alguns destes novos fármacos ainda estão sendo estudados quanto a sua eficiência no tratamento de pacientes com câncer que desenvolvem candidíase. Entre os fármacos que apresentam eficácia similar no tratamento de candidíases, em pacientes com câncer, estão a anfotericina B, o fluconazol e a caspofungina (Mays *et al.*, 2006). A escolha da terapia antifúngica no tratamento da candidíase, depende, então, da gravidade

do caso, da ocorrência de neutropenia, bem como da possível ocorrência de cepas naturalmente resistentes ao fluconazol, como no caso de *Candida krusei*, ou com potencial capacidade de resistência como no caso de *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis* (Moran *et al.*, 1997; Spellberg *et al.*, 2006). O uso de candidas, anfotericina B ou voriconazol está recomendado nas infecções graves, como em situações de neutropenia ou risco de *Candidas* resistentes ao fluconazol. Nas demais situações, o fluconazol poderá ser o fármaco de escolha (Mensa *et al.*, 2008).

1.3.1. Azólicos

Os compostos azólicos compreendem os imidazóis e os triazóis, que se constituem na segunda maior classe de agentes antifúngicos disponíveis, utilizados com considerável sucesso no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (Bodey *et al.*, 1992). Inicialmente, somente o cetoconazol foi disponibilizado para o tratamento sistêmico, tendo sido posteriormente disponibilizado os triazólicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Os três últimos foram os mais recentemente aprovados pelo “US Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da candidíase invasiva (Mathew & Nath, 2009).

O principal mecanismo de ação dos compostos azólicos dá-se pela inibição da enzima citocromo P-450 demetilase (P-450_{DM}), uma importante enzima envolvida na biossíntese do ergosterol fúngico. A célula fúngica tratada com azóis apresenta acúmulo de lanosterol, 3,6-diol esterol e ausência de

ergosterol, sendo que o excesso de esteróis metilados alteram a fluidez e permeabilidade da membrana plasmática prejudicando o crescimento dos fungos (Sidrim & Moreira, 1999; Bodey *et al.*, 1992; Hitchcock, 1991).

Outros importantes sítios de ação dos azóis compreendem as alterações nas enzimas localizadas na membrana fúngica (Surarit & Shepered, 1987), na síntese de quitina (Vanden Bossche *et al.*, 1987), como também alterações nas enzimas citocromo c oxidase, peroxidase e catalase (De Nollin *et al.*, 1977; Thomas, 1986)

1.3.2. Poliênicos

Essa família se constitui na maior classe de antibióticos antifúngicos e, embora muitos poliênicos tenham sido isolados de espécies de *Streptomyces*, somente a anfotericina B e a nistatina apresentam aplicação terapêutica (Mathew & Nath, 2009). A nistatina utilizada no tratamento da candidíase oral e a anfotericina B em casos mais severos, como nas candidíases sistêmicas (Bodey *et al.*, 1992; Sidrim & Moreira, 1999).

Apesar de muitas décadas de uso, a anfotericina B permanece como um dos mais importantes recursos terapêuticos, sobretudo pela letal ação contra diversos fungos causadores de micoses profundas em pacientes imunocomprometidos (Bodey *et al.*, 1992; Böhme *et al.*, 2009).

Em doses fungistáticas, tal classe de antifúngicos age diretamente sobre membranas contendo ergosterol. A interação é complexa, influenciada pela natureza dos esteróis da membrana, assim como pelos ácidos graxos

constituintes dos fosfolípidios, e resulta em aumento da permeabilidade da membrana. Essa condição determina a inativação das ATPases da membrana que conduz ao efluxo de íons K^+ e Mg^{++} , e influxo de prótons que produzirão acidificação interna com conseqüente inibição do crescimento do microrganismo (Thomas, 1986).

Em doses fungicidas, as moléculas dos poliênicos se agregam intensamente com os esteróis da membrana fúngica e formam poros aquosos, por mecanismo de peroxidação de lipídios, através dos quais os componentes celulares de baixo peso molecular, principalmente íons potássio, extravasam destruindo o gradiente de próton da membrana (Thomas, 1986; Sokol-Anderson *et al.*, 1986).

1.3.3. Inibidores da síntese de glucana

Nas últimas duas décadas, uma nova classe de antifúngicos, os inibidores da β -1,3- glucana sintetase, despertou o interesse dos pesquisadores. Neste grupo está a classe das echinocandinas e dos glicolipídios papulocandinas (Onishi *et al.*, 2000). Os principais representantes das equinocandinas são caspofungina, micafungina e anidulafungina, esta última, a mais recentemente aprovada pelo FDA (Mathew & Nath, 2009). Estes antifúngicos inibem irreversivelmente a enzima β -1,3- glucana sintetase, codificada pelos genes FKS1 e FKS2, cuja ausência impede a formação dos polímeros de glucana que compõe a parede celular. Desta forma, a integridade da parede celular fica

prejudicada em decorrência da ação fungicida sobre espécies que possuam quantidades consideráveis de β -1,3- glucana em sua parede.

1.4. Resistência de *Candida spp* aos agentes antifúngicos

As constantes falhas nos tratamentos de infecções micóticas têm chamado a atenção de pesquisadores para o grave problema da resistência aos agentes antifúngicos, bem como para os mecanismos envolvidos neste fenômeno (Vanden Bossche *et al.*, 1994; Bedini *et al.*, 2006).

Com o advento da SIDA e com a expansão na terapia do câncer, a imunossupressão passou a ser um problema destes pacientes, uma vez que infecções por *Candida*, principalmente as formas oral e esofágica, passaram a ser mais frequentes e de difícil tratamento. A terapêutica com o fluconazol, considerado o menos tóxico e com melhores níveis de tolerância e absorção do que o cetoconazol, passou a ser rotineiramente utilizada, porém, requer longos períodos de tratamento (Johnson *et al.*, 1995). Desta nova situação, emergiu o fenômeno de resistência de *Candida* ao fluconazol (Rex *et al.*, 1995). A marcada resistência ao fluconazol envolve, principalmente, as espécies *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e mais recentemente *C. dubliniensis* que possui a capacidade de desenvolver rápida resistência a esse antifúngico triazólico (Moran *et al.*, 1997; Sullivan & Coleman, 1998; Sullivan *et al.*, 1999; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Hajjeh *et al.*, 2004; Pfaller & Diekema, 2004).

1.4.1 Resistência aos antifúngicos azólicos

Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos envolvem características enumeradas por Sanglard *et al.* (1995) e Vanden Bossche *et al.* (1994) como:

- Redução da suscetibilidade da enzima 14- α -demetilase;
- Amplificação do gene 14DM, codificando a superprodução da enzima 14- α -demetilase e, conseqüentemente, requerendo maiores doses do azólico para inibição do fungo;
- Redução da atividade da enzima δ -5-6-dessaturase;
- Alteração na relação fosfolípido/esterol não esterificado. O aumento dos esteróis não esterificados reduz a permeabilidade da membrana fúngica;
- Aumento da esqualeno-epoxidase que é acompanhada do aumento da 14- α -demetilase com conseqüente aumento na biossíntese do ergosterol;
- Modificações estruturais na proteína citocromo do fungo;
- Efluxo da droga, o que consiste na saída do antifúngico do interior das células fúngicas através de transporte ativo. Proteínas transportadoras, como as MFS (major facilitator superfamily) e a glicoproteína P estão envolvidas nesse processo. O efluxo ocorre em *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol (Parkinson *et al.*, 1995).

1.4.2 Resistência aos antifúngicos poliênicos

Os primeiros relatos de resistência decorrente de tratamento com poliênicos ocorreram em 1962 por Larsh e colaboradores. Tais pesquisadores

constatarem que cepas de *C. albicans*, isoladas de pacientes tratados com anfotericina B para histoplasmose, eram menos sensíveis aos poliênicos do que as isoladas anteriormente ao tratamento. Mais tarde, Bodenhoff (1968) relatou dois casos que demonstravam a indução de resistência em leveduras a poliênicos “*in vivo*”, confirmando que essa resistência não era apenas um fenômeno de laboratório.

Diversos pesquisadores estudaram o fenômeno de resistência aos poliênicos “*in vivo*” (Athar & Winner, 1971; Bodenhoff, 1968; Patel & Johnston, 1968). Em 1972, Hamilton-Miller e colaboradores verificaram que o fenômeno de resistência a essas drogas podia ser obtido “*in vitro*”, através de agentes mutagênicos como N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina.

A resistência das células fúngicas a poliênicos está relacionada à alteração do conteúdo de ergosterol celular, com significativa redução da afinidade pelo antifúngico. A enzima citocromo P₄₅₀ demetilase (P-450_{DM}), importante enzima envolvida na biossíntese do ergosterol, tem sido estudada, pois, demonstrou-se que mutantes resistentes à anfotericina B são deficientes nesta enzima, conseqüentemente, apresentam menores níveis de ergosterol (Espinel-Ingroff *et al.*, 2000). Outros mecanismos de resistência envolvem: aumento da atividade da catalase intracelular do fungo, o que impede a formação de radicais livres responsáveis pelos “poros” (Kerridge & Nicholas, 1986) e alterações nas enzimas δ -5-6-dessaturase e δ -8-7-isomerase que determinam acúmulo de 14-metil-fecosterol na membrana plasmática do fungo,

composto que não se constitui em alvo para poliênicos, resultando em cepas resistentes (Vanden Bossche *et al.*, 1994).

Entre os relatos de leveduras do gênero *Candida* que se tornaram resistentes após o tratamento com poliênicos, destacam-se os relacionados a *C. tropicalis* (Drutz & Woods, 1973; Dick *et al.*, 1980), *C. lusitaniae* (Guinet *et al.*, 1983), *C. albicans* (Martin & Dindsdale, 1982; Fischer & Henson, 1985; Jakab *et al.*, 1990; Conly *et al.*, 1992) e *C. guilliermondii* (Dick *et al.*, 1985).

1.5. Antineoplásicos

As drogas antineoplásicas são utilizadas a mais de cinco décadas no tratamento do câncer. Este grupo engloba um diversificado número de compostos classificados em quimioterápicos (alquilantes, antibióticos, antimetabólitos, inibidores de topoisomerasas, inibidores da mitose e outros), terapia hormonal (antiestrógenos, antiandrógenos, análogos LH-RH, inibidores de aromatase) e imunoterapia (interferon, interleucina 2 e vacinas) (Espinosa *et al.*, 2003). A seguir, serão expostos resumidamente os mecanismos de ação nas células tumorais, as indicações e reações adversas mais significativas dos quimioterápicos utilizados neste estudo.

1.5.1. Metotrexato

O metotrexato pertence ao grupo de medicamentos conhecidos como antimetabólitos. O composto é um quimioterápico análogo ao ácido fólico mas, impede a síntese de purinas e pirimidinas através da inibição de enzimas chaves

do processo de síntese de bases nitrogenadas. Sua ação inibitória sobre a enzima diidrofolato redutase (DHFR) leva a um decréscimo nos níveis de tetraidrofolato (THF), o qual resulta numa redução da metilação do DNA, proteínas e lipídios. Esse composto apresenta outras duas ações: inibe a enzima timidilato sintase (TS), interferindo na síntese de DNA e bloqueia a síntese de nova purina ao agir sobre o 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) (Tian & Cronstein, 2007). O metotrexato tem ampla utilização em Oncologia, sendo importante no tratamento da leucemia linfocítica em crianças e, em combinação com outros antineoplásicos, na terapêutica do carcinoma de mama, micose fungóide, no câncer de pulmão, carcinoma epidemóide da cérvix e de alguns tumores sólidos. Também é empregado como coadjuvante no tratamento de condições não malignas, como psoríase, granulomatose de Wegener, lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e polimiosite. Além dos efeitos adversos, comuns a maioria dos antineoplásicos, apresenta marcada toxicidade para a medula óssea e para o endotélio da orofaringe e do trato gastrointestinal. O dano renal é uma complicação freqüente da terapêutica com doses elevadas. A droga é eliminada inalterada pelos rins, onde o baixo pH permite que ocorra a deposição de cristais, lesivo a esse órgão, sendo que a alcalinização do filtrado glomerular previne esta condição. Mais raramente, pode ocorrer hepatotoxicidade com fibrose portal, quadro pulmonar, erupções cutâneas, alopecia e osteoporose (Moore & Erlichman, 1987; Grosflam & Weinblatt, 1991; Brunton *et al.*, 2007).

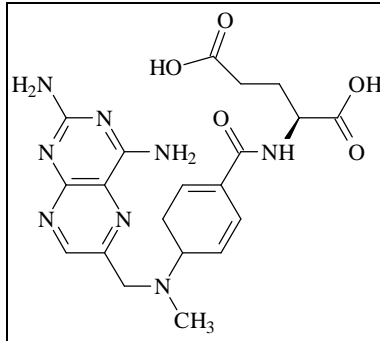


Figura 1. Estrutura química do metotrexato

Fonte: Brunton *et al.* (2007)

1.5.2. Citarabina

Assim como o metotrexato, a citarabina também pertence à classe dos antimetabólitos, sendo uma molécula análoga da pirimidina. É uma molécula similar a citosina, diferenciando-se apenas quanto a orientação do grupo OH do carbono 2, que é invertida. O exato mecanismo de ação não está bem conhecido, mas sabe-se que a citarabina é convertida, intracelularmente, no nucleotídeo Citarabina-Trifosfato (Ara-CTP, Citosina Arabinosideo Trifosfato), que parece inibir a DNA-polimerase por competição, em relação ao substrato fisiológico, deoxicitidina trifosfato, resultando na inibição da síntese de DNA. Ainda que limitada, a incorporação de Citarabina-Trifosfato no DNA e RNA pode também contribuir para os efeitos citotóxicos da droga. Esta droga tem potente ação mielossupressora, sendo utilizada primariamente para o tratamento de leucemia mielocítica aguda e, ocasionalmente, da leucemia linfocítica aguda e

leucemia mielocítica crônica. Seus efeitos adversos incluem leucopenia, anemia e trombocitopenia, com possível hepatotoxicidade (Brunton *et al.*, 2007).

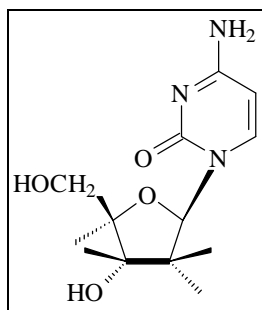


Figura 2. Estrutura química da citarabina

Fonte: Brunton *et al.* (2007)

1.5.3. Ciclofosfamida

A ciclofosfamida é uma pró-droga com um complexo metabolismo de ativação. Após a administração, aproximadamente 70 – 80% da droga é ativada pelo sistema enzimático citocromo P-450 (CYP) (de Jonge *et al.*, 2005).

Uma característica dos agentes alquilantes é sua capacidade de estabelecer reações químicas eletrofílicas, formando intermediários de íon carbônio ou complexos de transição com as moléculas alvo. Essas reações resultam na formação de ligações covalentes (alquilação) com várias substâncias nucleofílicas, incluindo grupos biologicamente importantes, como fosfato, amino, hidroxila, sulfidrila, carboxila e imidazólico. O efeito citotóxico desse agente está diretamente relacionado à alquilação de componentes do DNA (McCune *et al.*, 2009; Pratt & Ruddon, 1979).

A ciclofosfamida é comumente utilizada no tratamento do câncer e, às vezes, também é útil em condições não neoplásicas, como na artrite reumatóide

severa. De modo preferencial, é indicada no tratamento de leucemia linfocítica crônica, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda e linfoma de Burkitt. Também é utilizada para tratar diversos tumores sólidos como o sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma, neuroblastoma e carcinomas de mama, pulmão e ovário. No entanto, provoca marcada imunodepressão, acompanhada de náuseas, vômitos, alopecia, anemia, trombocitopenia, amenorréia e, mais raramente, atrofia testicular, hepatotoxicidade e fibrose pulmonar (Brunton *et al.*, 2007).

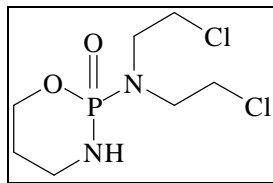


Figura 3. Estrutura química da ciclofosfamida

Fonte: Brunton *et al.* (2007)

1.5.4. Dacarbazina

Inicialmente considerado um antimetabólito, a dacarbazina é um agente capaz de metilar o DNA com um amplo espectro de atividade antitumoral. A utilidade clínica desse composto é restrita ao melanoma, doença de Hodgkin e sarcoma (Reide *et al.*, 1999). Para que o composto tenha atividade, requer a prévia ativação pelo sistema enzimático do citocromo P450, através de uma reação de N-desmetilação. Na célula alvo, a clivagem espontânea do metabólito libera um componente alquilante, o diazometano (Chabner & Calabresi, 1995).

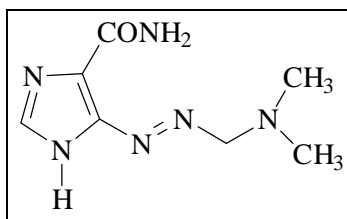


Figura 4. Estrutura química da dacarbazina

Fonte: Brunton *et al.* (2007)

1.5.5. Antineoplásicos e resistência a poliênicos

Achados de cepas de *Candida spp.* resistentes à anfotericina B, em pacientes com câncer e em tratamento com antineoplásicos, têm sido registrados a quase três décadas na literatura. O primeiro caso registrado ocorreu no ano de 1978, e desde então, foram registrados mais de 50 casos de *Candida spp.* resistentes à anfotericina B, sendo a maioria em pacientes com câncer (Wingard, 1995; Kovacicova *et al.*, 2001). Não ao acaso, alguns autores têm hipotetizado que o tratamento com drogas citotóxicas possa contribuir para o desenvolvimento de resistência fúngica aos poliênicos (Conly *et al.*, 1992; Dick *et al.*, 1980; Pappagianis *et al.*, 1979). Este efeito foi observado em estudos realizados por Dick e colaboradores (1980), que verificaram que 7% das cepas isoladas de pacientes com câncer apresentavam resistência à terapia com o poliênico anfotericina B, sendo que, entre cepas isoladas de pacientes internados em um hospital geral, a resistência não era observada.

A interferência de drogas antineoplásicas como a carmustina e a lomustina, duas drogas com forte poder alquilante, induzindo resistência a anfotericina B em *Candida albicans*, foram bem estudadas por Brajtburg e

colaboradores em 1988. Os pesquisadores descreveram como um dos possíveis mecanismos para a indução de resistência o efeito que as nitrosouréias exercem ao aumentar a atividade de catalase fúngica. Esta enzima tem sido associada como um mecanismo adicional de resistência a poliênicos (Sokol-Anderson *et al.*, 1986), e assim sendo, sua atividade aumentada pode estar vinculada ao poder oxidante gerado pelos antineoplásicos, que por sua vez, aumenta a resistência de leveduras à ação oxidativa da anfotericina B.

1.6. Espécies Reativas do Oxigênio em leveduras

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são compostos naturalmente formados em todos os organismos aeróbios eucariontes como subprodutos da respiração mitocondrial (Carmel-Harel *et al.*, 2001). Como fonte primária de íons superóxido (O_2^-) está a cadeia transportadora de elétrons, na membrana interna da mitocôndria, onde aproximadamente 2% do oxigênio consumido durante a respiração celular não é completamente reduzido a H_2O (Halliwell & Gutteridge; 1999). A elevada reatividade das espécies químicas geradas nesse processo pode provocar danos celulares como oxidação de proteínas, inativação enzimática, peroxidação lipídica e mutações em nível do DNA que, em situações extremas, podem conduzir à morte celular (Grant, 2001; Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Cabiscol *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas normais, a célula consegue evitar os danos provocados pelas EROs recorrendo à ação de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase

(GPx), e os sistemas glutathiona (GSH) e tioredoxina (Jamieson, 1998; Davidson *et al.*, 1996; Halliwell & Gutteridge, 2004). No entanto, esse tipo de resposta, característico de cada espécie, pode ser alterado quando as células são expostas a condições de estresse como a presença de metais pesados, agentes antioxidantes e xenobióticos. A imposição deste tipo de condições leva à produção excessiva de EROs que, ao ser detectada pela célula, induz respostas descritas na literatura como repostas secundárias ao estresse oxidativo, e que, em muitos casos, permite a sobrevivência da população (Franca *et al.*, 2005; Lushchak & Gospodaryov, 2005; Dumond *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999).

De acordo com alguns autores, as principais enzimas constituintes em todos os organismos aeróbicos na prevenção ou atenuação dos efeitos deletérios promovidos por EROs são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). É através delas que as células tentam manter níveis aceitáveis de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , para evitar a formação do HO^{\cdot} , que é extremamente danoso às células (Wilhelm *et al.*, 2000).

1.6.1. Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos (Fridovich, 1995). Constitui-se numa enzima capaz de catalisar a conversão de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de dois passos reacionais. O primeiro passo consiste na reação do ânion superóxido com o grupo prostético

da SOD na sua forma oxidada. Essa ligação conduz à aquisição de um próton e, conseqüente, liberação de oxigênio molecular. A forma reduzida da enzima liga, então, um segundo ânion superóxido e próton, para liberar H₂O₂ e retornar à sua forma oxidada (Johnson & Giulivi, 2005).

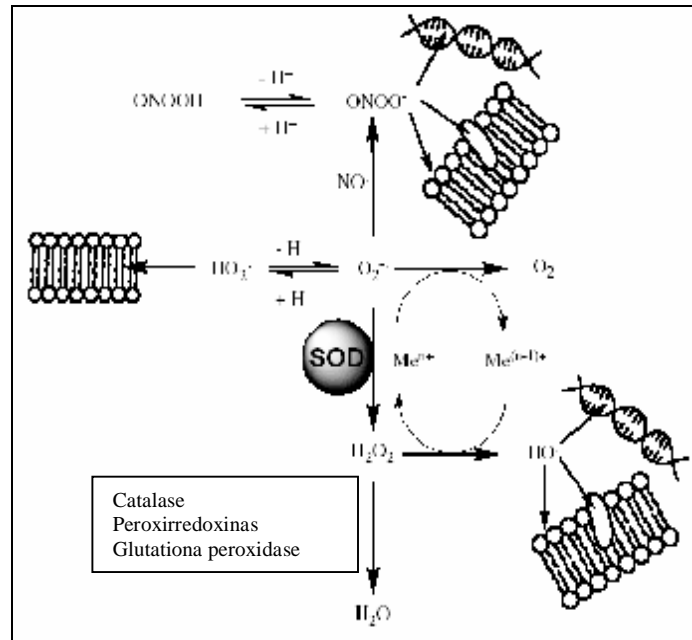


Figura 5. Papel da Superóxido dismutase (SOD) na detoxificação de EROs

Fonte: Johnson & Giulivi (2005)

As isoformas da SOD são classificadas de acordo com o cofator inorgânico ligado a região protéica, podendo, assim, serem encontradas mais de três tipos de SODs (Johnson & Giulivi, 2005). Atualmente, são descritas quatro isoformas: ferro (FeSOD), manganês (MnSOD), cobre e zinco (CuZnSOD) e níquel (NiSOD) (Martchenko *et al.*, 2004).

Em organismos eucariontes, como *Candida albicans*, foram descritos dois tipos de SOD: Cu/ZnSOD e MnSOD. A Cu/ZnSOD é uma enzima citosólica e a MnSOD é uma enzima mitocondrial (Lamarre *et al.*, 2001). Nesses organismos, a SOD desempenha um papel de proteção contra o ataque fungicida de macrófagos e neutrófilos que produzem ânion superóxido (Vázquez *et al.*, 1998). Comprovou-se que as leveduras, ao sofrerem exposição às espécies reativas de oxigênio, sofrem influência no seu tempo de vida. Isso pode ser comprovado através de ensaios com mutantes deficientes de cobre/zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase e metalotioneína, que apresentaram uma viabilidade baixa durante a fase estacionária (Longo *et al.*, 1996).

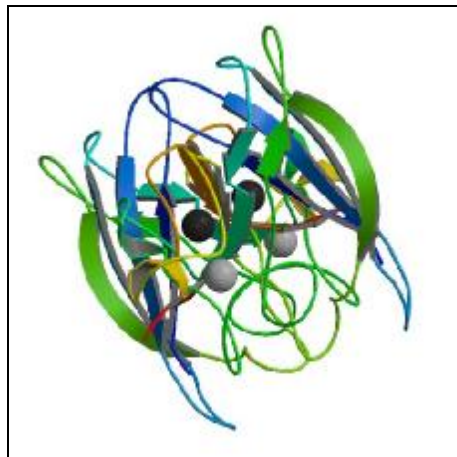


Figura 6. Cu/Zn SOD isolada de *Candida albicans*

Fonte: Protein Data Bank (2009)

1.6.2. Catalase (E.C. 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima encontrada em todos os organismos vivos, sendo que, nas células eucarióticas, ela está presente no peroxissomo celular. A

enzima possui um grupamento heme que é o responsável pela atividade catalítica da enzima, convertendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas de água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Michiels *et al.*, 1994). A reação se dá quando H_2O_2 entra no centro ativo da enzima e interage com dois aminoácidos da cadeia polipeptídica: uma histidina e uma asparagina. Um dos átomos de hidrogênio do H_2O_2 (sob a forma de próton) é transferido de um oxigênio para o segundo. Como consequência, a ligação entre os dois átomos de oxigênio sofre uma distensão e quebra-se heteroliticamente, sendo que os elétrons responsáveis pela ligação química O-O deslocam-se para a molécula de água formada. O átomo de oxigênio restante liga-se, então, ao átomo de ferro (+3), formando a espécie Fe(IV)=O e liberando uma molécula de água. A espécie Fe(IV)=O (+4 ligado ao oxigênio) tem alto poder oxidante, reagindo facilmente com uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio. Nesse passo reacional é removido um átomo de oxigênio do peróxido, formando-se, assim, o O_2 que é liberado do íon ferro concomitantemente com a formação de uma segunda molécula de água. Os íons ferro retornam ao seu estado de oxidação +3, estando prontos para mais uma catálise (Chelikani *et al.*, 2004). A ação desta enzima procede a da SOD no sistema de destoxificação de espécies reativas do oxigênio, e assim como a SOD, a catalase também pode ser induzida quando exposta a um estresse oxidativo (Coursin *et al.*, 1985; Sokol-Anderson *et al.*, 1986).

Em microrganismos patogênicos, a catalase desempenha uma importante função na destoxificação de EROs liberadas por células fagocíticas de defesa do

hospedeiro (Hampton *et al.*, 1998). Soma-se a ela a participação da catalase no processo de formação de hifas em *Candida albicans* (Nakagawa, 2008) e no mecanismo de resistência a antifúngicos poliênicos (Sokol-Anderson *et al.*, 1986).

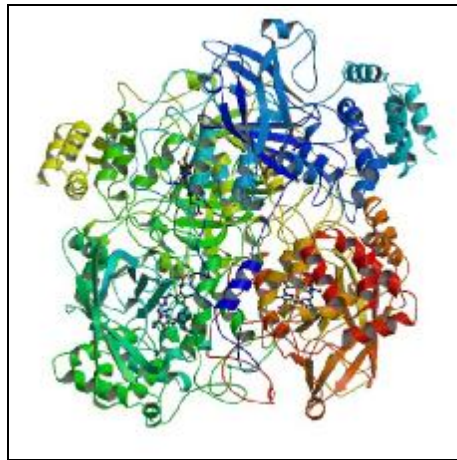


Figura 7. Estrutura da Catalase de *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Protein Data Bank (2009)

1.6.3. Glutathione Peroxidase (E.C. 1.11.1.19)

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água. Talvez, a mais importante das peroxidases seja a glutathione peroxidase, uma enzima selênio-dependente, tetramérica, com quatro subunidades idênticas de aproximadamente 22 kD. Essa enzima utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione reduzida (GSH) como substrato para a decomposição de peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela glutathione Peroxidase, ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas

moléculas de glutatona reduzida (GSH) que se oxidam (GSSG) (Kelling & Smith, 1982; Michiels *et al.*, 1994).

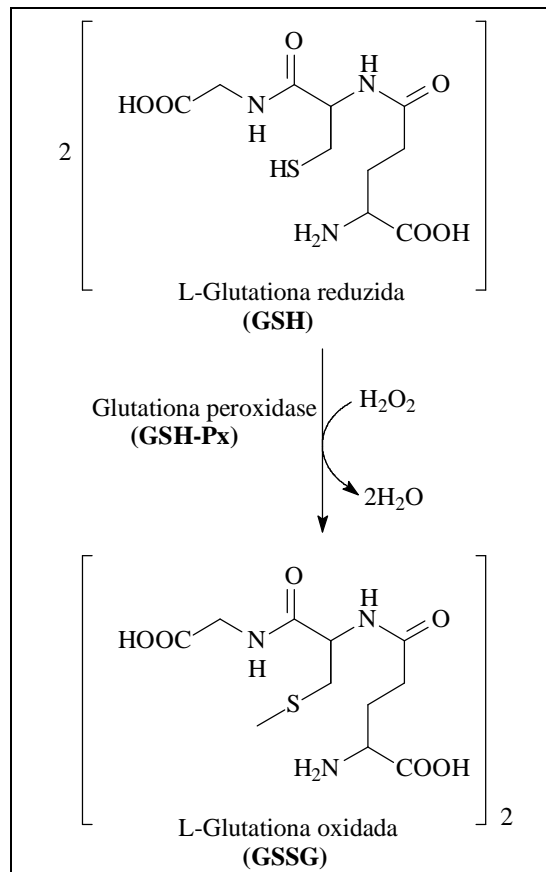


Figura 8. Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px)

Fonte: Adaptado de Júnior *et al.* (2001)

São escassos os estudos da atividade da glutatona peroxidase na espécie *Candida albicans*. Contudo, destacam-se os realizados por Manavathu *et al.* (1996) e Gunasekaran *et al.* (1995), que estudaram a relação da glutatona peroxidase e glutatona reduzida na conversão da fase leveduriforme para filamentosa em *Candida albicans*.

1.7. Íons metálicos e SOD

Os íons metálicos divalentes como cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e manganês (Mn^{3+}) são elementos nutricionais que desempenham funções importantes como cofatores da enzima SOD em *Candida albicans*, bem como, em várias outras enzimas desse e de todos os organismos vivos (Hwang *et al.*, 1999; Rhie *et al.*, 1999; Lamarre *et al.*, 2001). A inserção do metal representa o passo chave no controle da atividade *in vivo* das diferentes formas de SOD (Luk *et al.*, 2005).

Contudo, em excesso, os íons adquirem um efeito tóxico frente às enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos, com a possibilidade de perda funcional dessas estruturas. Alguns íons podem, inclusive, afetar funcionalmente as células devido à participação em ciclos redox com formação de radicais livres (Romandini *et al.*, 1992; Fujs *et al.*, 2005). Nesse contexto o íon cobre tem sido estudado devido a capacidade do mesmo poder gerar radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e provocar danos na membrana celular (Ito *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual esse dano ocorre pode ser explicado pela Reação de Fenton, onde o radical livre hidroxil ($\text{OH}\cdot$) é gerado a partir de H_2O_2 . Acoplado a essa reação pode estar a de Haber-Weiss, que envolve a forma oxidada de metais redox e anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), gerando a forma reduzida do metal que, por sua vez, pode ser utilizado pela Reação de Fenton para gerar radical hidroxil (Romandini *et al.*, 1992; Jamnik & Raspor, 2003).

Como mecanismo de defesa, as células, leveduriformes, possuem sistemas de destoxificação de íons e de espécies reativas do oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 2004). Entre os mecanismos propostos estão: redução de entrada

de íons metálicos na célula, pela ligação de metais a metalotioneínas e a compostos com grupamentos tióis; compartimentalização em vesículas de membrana; formação de precipitados insolúveis como sais de cálcio e magnésio, ou grânulos de cálcio e compostos sulfúricos (Stephen & Jamieson, 1996, Presta & Stillman, 1997; Viarengo & Nott, 1993).

Mais recentemente, foi descrito um sistema que consiste em transportadores de baixa e alta afinidade. Os de alta afinidade são seletivos para metais específicos sendo sensivelmente regulados de acordo com a necessidade do metal pelo meio intracelular. Os de baixa afinidade são menos seletivos aos íons e tem uma resposta mais lenta na regulação de acordo com as necessidades dos mesmos no meio intracelular. Este último sistema permite a manutenção da homeostase em condições de excesso e de escassez de metais no meio intracelular (Radisky & Kaplan, 1999).

Estudos com íons metálicos afetando a atividade enzimática de SOD em *Candida albicans* são raros, tendo sido a maioria realizados em *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Fusarium*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida intermedia*, *Candida famata* (Romandini *et al.*, 1992; Fujs *et al.*, 2005; Luk *et al.*, 2005; Kayali-Ayar & Tarhan, 2003; Manzano *et al.*, 2000). Estes estudos objetivaram estudar principalmente o efeito de íons metálicos na atividade da SOD de diferentes espécies exposta a diferentes íons.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo tem por **objetivo geral**, investigar o efeito de agentes antineoplásicos, íons metálicos e da resistência a anfotericina B e fluconazol sobre a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo de leveduras do gênero *Candida*.

Este trabalho está dividido em três capítulos como segue:

Capítulo I

Objetivos específicos

1. Investigar a influência dos agentes antineoplásicos metotrexato, dacarbazina, citarabina e ciclofosfamida, na concentração terapêutica, sobre a atividade da catalase de *C. albicans*.
2. Investigar o efeito de diferentes concentrações do metotrexato sobre a V_{max} e K_m da catalase de *C. albicans*.
3. Verificar o tipo de alteração cinética que o metotrexato exerce sobre a catalase fúngica.

Capítulo II

Objetivos específicos

1. Verificar o efeito de concentrações crescentes de íons cobre, manganês, ferro e zinco sobre a atividade da SOD em cepas de *C. albicans*.
2. Determinar o acúmulo celular de íons metálicos em cepas expostas as concentrações crescentes de cada um dos íons testados.
3. Investigar o efeito dos íons metálicos sobre a geração de massa fúngica.
4. Verificar separadamente o efeito de cada um dos íons metálicos no acúmulo dos outros três.

Capítulo III

Objetivos específicos

1. Verificar diferenças na atividade de catalase entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
2. Verificar diferenças na atividade de SOD entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* sensíveis e resistentes a anfotericina B.

CAPÍTULO I – ARTIGO 01

Catalase activity in *Candida albicans* exposed to antineoplastic drugs

Carlos E B Linares, Deizi Griebeler, Denise Cargnelutti, Sydney H Alves, Vera M
Morsch, Maria R C Schetinger

Periódico: Journal of Medical Microbiology
Status: Publicado

Catalase activity in *Candida albicans* exposed to antineoplastic drugs

Carlos E. B. Linares,¹ Deizi Griebeler,² Denise Cargnelutti,¹
Sydney H. Alves,³ Vera M. Morsch¹ and Maria R. C. Schetinger¹

Correspondence
Maria R. C. Schetinger
mariarosa@small.ufsm.br

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas¹, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde² and Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde³, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

An increased catalase activity in *Candida* spp. has been suggested as a mechanism that reduces amphotericin B activity. Furthermore, resistance to antifungal agents like amphotericin B has been reported in some cancer patients undergoing chemotherapy treatment. In this study we analysed the influence of chemotherapy agents on catalase activity in *Candida albicans*, the major species involved in yeast infections. Eight strains of *C. albicans* isolated from HIV-positive patients were exposed to cyclophosphamide, cytarabine, dacarbazine and methotrexate antineoplastic drugs at the concentrations used during therapy. Catalase activity was measured and compared to the control group. Very significant differences ($P < 0.01$) were found when *C. albicans* was exposed to methotrexate ($2 \mu\text{g ml}^{-1} = 4 \mu\text{M}$). For cyclophosphamide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), cytarabine ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) and dacarbazine ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$), no differences were found ($P > 0.05$) between the control and drug-exposed groups. Although more extensive studies are necessary, these data do suggest that the antineoplastic drug methotrexate contributes to the resistance to antifungal drug therapy by varying catalase activity.

Received 27 July 2005
Accepted 10 November 2005

INTRODUCTION

Candida albicans is a commensal organism found in the human gastrointestinal tract and vaginal mucosa, and is one of the major human pathogenic fungi. It is recovered frequently from immunocompromised hosts such as AIDS, cancer or organ transplant patients. Previous studies on the susceptibility of yeast isolated from cancer patients being treated with antineoplastic drugs suggested that these agents can reduce the susceptibility to polyenic drugs (Dick *et al.*, 1980; Ahearn & McGlohn, 1984; Brajtburg *et al.*, 1988; Sarachek & Henderson, 1991; Abrahamsen *et al.*, 1992; Conly *et al.*, 1992; Vanden Bossche *et al.*, 1994; Salonen *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2002).

Among the biochemical mechanisms that must be studied to explain the low susceptibility to amphotericin B is the increased catalase activity. Catalase is an important enzymic mechanism against oxidative damage (Sokol-Anderson *et al.*, 1988). The target structure for amphotericin B is the plasma membrane ergosterol, where the polyenic drug forms a channel. Through this channel the fungal cell leaks potassium ions, resulting in a disruption of the proton gradient. It is hypothesized that rings of 8–10 polyene molecules form aqueous pores within the membrane bilayer structure, and amphotericin B causes oxidative damage to plasma membranes (Sokol-Anderson *et al.*, 1986; Kerridge & Nicholas, 1986; Nakagawa *et al.*, 2003).

The treatment of candidiasis in cancer and/or transplant patients is difficult, and frequently is a failure. The emergence of *Candida* resistance in this context requires new evaluations, like the study of determinant factors in the emergence of resistance, among them antineoplastic therapy. Studies aiming to evaluate the catalase activity with regard to antineoplastic agents are either scarce or not complete. In view of this, we have analysed *C. albicans* catalase activity when the yeast is exposed to antineoplastic drugs at the same therapeutic concentrations as are used in human plasma. The catalase activity of *C. albicans* exposed to the drugs was compared to the same group not exposed to drugs. To demonstrate the kinetics of antineoplastic drugs capable of changing the catalase activity of *C. albicans*, K_m and V_{max} were determined by Lineweaver–Burk analyses.

METHODS

Strains. *C. albicans* strains used in this study are listed in Table 1. Cultures of *C. albicans* were isolated from patients treated at University Hospital of Santa Maria, Santa Maria, Brazil who had no previous contact with the antineoplastic drugs. HIV-positive patients were chosen due to the ease of isolating opportunist fungi without invasive methods. The identification of the species was based on their phenotypic characteristics. Only numbers were used to identify the yeast strains, shown in Tables 1 and 2. *C. albicans* from the American Type Culture Collection, ATCC 44373, was used as the control strain. The protocol used was approved by the Bioethics

Table 1. Yeast strainsData are the means \pm SD of triplicate experiments.

Yeast*	Mean catalase activity [AE min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]				
	Drug-free yeast†	Yeast exposed to dacarbazine‡§	Yeast exposed to cyclophosphamide §	Yeast exposed to cytarabine¶§	Yeast exposed to methotrexate#
10	3.6 \pm 1.1	5.9 \pm 0.1	5.5 \pm 1.7	6.1 \pm 1.6	14.9 \pm 3.6
172	5.2 \pm 1.9	9.5 \pm 3.1	9.6 \pm 2.8	6.7 \pm 0.8	21.0 \pm 10.4
119	13.9 \pm 1.1	9.3 \pm 1.8	10.3 \pm 3.3	7.7 \pm 1.2	13.1 \pm 4.1
170	2.6 \pm 1.1	4.0 \pm 0.4	12.8 \pm 5.4	4.1 \pm 0.7	11.3 \pm 1.5
59	4.2 \pm 1.6	13.8 \pm 2.3	15.0 \pm 3.8	5.5 \pm 2.2	10.8 \pm 0.7
124	5.3 \pm 1.1	9.7 \pm 1.4	7.4 \pm 0.6	10.0 \pm 0.6	32.0 \pm 6.1
81	9.8 \pm 3.0	9.6 \pm 2.9	8.5 \pm 0.4	4.5 \pm 1.1	22.8 \pm 2.2
ATCC 44373	6.7 \pm 2.2	5.4 \pm 2.5	4.0 \pm 1.6	3.0 \pm 0.6	8.1 \pm 1.1

**C. albicans* isolated from HIV-positive patients assisted in the University Hospital of Santa Maria.†*C. albicans* not exposed to antineoplastic drug.‡*C. albicans* exposed to dacarbazine (8 μ g ml⁻¹).§Statistical analysis did not demonstrate significant differences between *C. albicans* exposed and not exposed to the drugs ($P > 0.05$).||*C. albicans* exposed to cyclophosphamide (50 μ g ml⁻¹).¶*C. albicans* exposed to cytarabine (1 μ g ml⁻¹).#*C. albicans* exposed to methotrexate (2 μ g ml⁻¹). Statistical analysis showed very significant differences between *C. albicans* exposed and not exposed ($P < 0.01$).

Committee of the Integrated Regional University of High Uruguay and the Missions from Frederico Westphalen, RS, Brazil, under registration number 061-2/PIH/04.

Table 2. Effect of methotrexate on *C. albicans* catalase activity

Yeast*	Methotrexate†	K _m ‡ (mM)	V _{max} § [AE min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]
124	0 μ M	1.96	3.08
	2 μ M	2.15	4.77
	4 μ M	2.28	5.61
	8 μ M	2.77	7.07
170	0 μ M	1.75	1.83
	2 μ M	1.94	2.59
	4 μ M	2.2	2.88
	8 μ M	3.48	6.82
172	0 μ M	1.59	2.3
	2 μ M	2.03	3.26
	4 μ M	2.15	3.77
	8 μ M	2.55	4.62

**C. albicans* that presented the highest differences between yeasts exposed and not exposed to methotrexate.†Antineoplastic drug that produced significant differences in catalase activity in *C. albicans*.

‡Substrate concentration.

§Maximum velocity.

Antineoplastic exposition. The selection of the drugs was based on the most frequently used antineoplastic drugs for cancer treatment at the University Hospital of Santa Maria. The concentrations of cyclophosphamide (50 μ g ml⁻¹) [genuxal - 2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-amine, *N,N*-bis(2-chloroethyl)-tetrahydro-2-oxide monohydrate], cytarabine (1 μ g ml⁻¹) [aracytin - 4-amino-1- β -D-arabino-furanosyl-2(1H)-pyrimidinone], methotrexate (2 μ g ml⁻¹ = 4 μ M) [litrexate - *N*-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinyloxy)methyl]methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid] and dacarbazine (8 μ g ml⁻¹) [DTI - 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide] used in the tests were mimicking the therapeutic plasma concentrations of these drugs, which were obtained from other studies (Egorin *et al.*, 1989; Liliemark & Peterson, 1991; Morikawa *et al.*, 1997; Batey *et al.*, 2002). The strains were grown for 24 h in glucose Sabouraud agar and then were cultivated in 6 ml YNB (Yeast Nitrogen Base without amino acids; Difco), supplemented with the appropriate antineoplastic drug, for 48 h at 35 °C. The tests were performed in triplicate.

Preparation of cell-free extracts. A crude extract was prepared by glass-bead lysis. Cells cultured in YNB supplemented with drug were washed three times with 0.85% saline and then resuspended in lysis buffer (50 mmol l⁻¹ potassium phosphate pH 7.0) containing 0.5 g 500 μ m diameter glass beads. The mixture was homogenized in a Teflon-glass homogenizer by 4–6 cycles of 20 s alternating with cooling. Then, the mixture was centrifuged for 20 min in a refrigerated centrifuge to remove cell debris and glass beads. The supernatant was used for enzyme assays.

Catalase activity. Catalase activity was determined in cell-free extracts by the method of Aebi (1984). The readings were performed in triplicate.

Protein analysis. Protein was measured by the Bradford method using Coomassie blue, and serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

Kinetic analysis. The kinetics of the interaction between the antineoplastic drug and catalase were determined using a

Lineweaver–Burk double reciprocal plot (Lineweaver & Burk, 1934), by plotting $1/v$ against $1/S$ analysed over a range of hydrogen peroxide concentrations ($1.5\text{--}30\text{ mmol l}^{-1}$) in the absence and in the presence of methotrexate ($2\text{--}8\text{ }\mu\text{M}$). K_m values were obtained by two different estimates, $1/v$ vs $1/S$ and $1/v$ vs v/S .

Statistics. In order to compare the means obtained for catalase activity in the groups exposed and not exposed to antineoplastic drug, the *t*-test was used, using the GraphPad InStat statistical program.

RESULTS AND DISCUSSION

The emergence of fluconazole and amphotericin B resistant strains of *C. albicans* in cancer patients is a troubling new development (Nolte *et al.*, 1997). Though over the last decade fluconazole-resistant *Candida* sp. infections in cancer patients were more studied than amphotericin B resistant infections, currently, the increasing incidence of development of amphotericin B resistance in patients with *Candida* sp. infection, and receiving antineoplastic and antifungal therapy, is a reality.

In this context, the increased fungal catalase activity has been suggested as a mechanism that not only reduces the amphotericin B activity, but also protects against oxidative damage, favouring the survival of fungal cells. This may be related to the resistance mechanism for amphotericin B (Sokol-Anderson *et al.*, 1988). However, since 1990, very few complete studies have demonstrated the influence of antineoplastic drugs on catalase activity, a fact that impelled this study, especially considering the failure of systemic mycosis treatment in cancer patients.

To verify the antineoplastic drug influence on catalase activity, non-exposed *C. albicans* was used as a control in this study. Table 1 shows the levels of catalase in *C. albicans* not exposed to drugs and exposed to dacarbazine [$8\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$], cyclophosphamide [$50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$], cytarabine [$1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$] and methotrexate [$2\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}=4\text{ }\mu\text{M}$]. Statistical analysis demonstrated no significant differences ($P>0.05$) between the groups of *C. albicans* exposed and not exposed to dacarbazine, cyclophosphamide and cytarabine. The mean catalase activity in yeast exposed to dacarbazine [$8.4\pm 3.14\text{ }\Delta\text{E min}^{-1}\text{ (mg protein)}^{-1}$] or cyclophosphamide [$9.137\pm 3.6\text{ }\Delta\text{E min}^{-1}\text{ (mg protein)}^{-1}$] was only slightly higher than in the non-exposed yeast [$6.412\pm 3.73\text{ }\Delta\text{E min}^{-1}\text{ (mg protein)}^{-1}$]. The mean catalase activity in yeast exposed to cytarabine [$5.95\pm 2.2\text{ }\Delta\text{E min}^{-1}\text{ (mg protein)}^{-1}$] was slightly lower than that in the drug-free yeast.

Although no statistical differences were found in the groups exposed and not exposed to dacarbazine, cyclophosphamide and cytarabine, we observed that when we took *C. albicans* ATCC 44373 catalase activity as a standard, the yeasts with catalase activity lower than *C. albicans* ATCC 44373 increased their levels of catalase, and the yeasts with levels of catalase activity higher than *C. albicans* ATCC 44373 decreased their levels after exposure. Extensive investigations are necessary to demonstrate the real influence of

dacarbazine, cyclophosphamide and cytarabine on *C. albicans* catalase activity and resistance to antifungal therapy.

The effect of methotrexate on catalase activity in *C. albicans*, shown in Table 1, was a significant difference ($P<0.01$) in

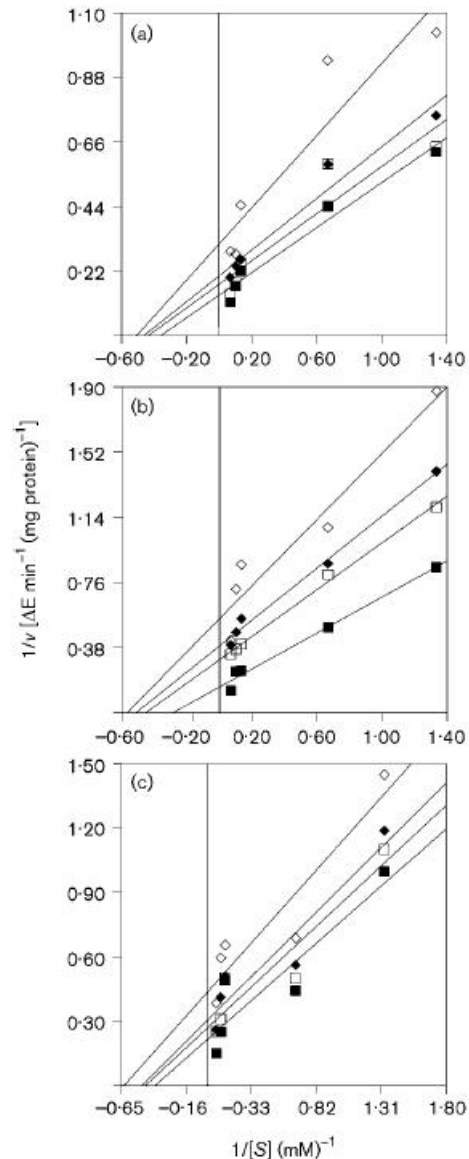


Fig. 1. Kinetic analysis of the catalase activation by methotrexate in yeast 124 (a), 170 (b) and 172 (c). The graphs show double reciprocal plots of the catalase experiments in the absence and in the presence of methotrexate concentrations ranging from 2 to 8 mM (\diamond , 0 μM ; \blacklozenge , 2 μM ; \square , 4 μM ; \blacksquare , 8 μM). Catalase activity (v) was measured at various concentrations of substrate (S) ($1.5\text{--}30\text{ mM}$) in 2 ml assay solutions with 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) using 200 μl lysed fungal cells. Experiments were repeated three times.

activity when compared to the drug-free yeast. The activity found in yeasts exposed to the drug [$16.75 \pm 7.96 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$] was higher than that in the drug-free yeasts [$6.412 \pm 3.73 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]. In view of these catalase activity alterations, a kinetic study was performed for the yeasts that presented more alterations when exposed to this antineoplastic drug. The effects of methotrexate on K_m and V_{max} , shown in Table 2, were determined by Lineweaver–Burk plots (Fig. 1). The kinetic study showed K_m and V_{max} increased when yeast 124 (Fig. 1a), 170 (Fig. 1b) and 172 (Fig. 1c) were exposed to increasing levels of methotrexate. For these yeasts the V_{max} was more than double compared to that of yeasts exposed to $8 \mu\text{M}$ methotrexate (twice plasma concentration). Increasing K_m values were found for the three yeasts when exposed to increasing methotrexate concentrations compared to the same group not exposed. The Lineweaver–Burk kinetic study with the three yeasts showed an uncompetitive pattern. Probably, the concentration of the reactants produced a large rate of interaction between the enzyme and the substrate causing an elevation of the catalase V_{max} and consequently of the formation of the product. This fact may contribute to the appearance of amphotericin B resistance in cancer patients undergoing antineoplastic drug treatment.

In accordance with our results, Brajtburg *et al.* (1988) found an increased level of catalase was induced by 2-chloroethyl-L-nitrosourea, an important drug in the therapy of cancer. Ahearn & McGlohn (1984) suggested that cytotoxic drugs might be responsible for mutations capable of producing resistance to polyenic drugs and consequent treatment failure in cancer patients with candidiasis.

Other studies involving *Candida* spp. and the antimetabolic agent methotrexate have been carried out by Ghannoum (1986), who observed that this antineoplastic agent elicited pseudomycelial formation in *Candida glabrata*. It was surprising because the inability of *C. glabrata* to form pseudomycelia is used as an important criterion in its identification. The formation of pseudohypha suggested a blockage of the cellular division mechanism in this yeast. However, a real interference of methotrexate in the antioxidant activity of *C. albicans* is being shown here for what is believed to be the first time.

REFERENCES

- Abrahamsen, T. G., Widing, E., Glomstein, A. & Gaustad, P. (1992). Disseminated fungal disease resistant to fluconazole treatment in a child with leukemia. *Scand J Infect Dis* 24, 391–393.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 105, 121–126.
- Ahearn, D. G. & McGlohn, M. S. (1984). *In vitro* susceptibilities of sucrose-negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole and ketoconazole. *J Clin Microbiol* 19, 412–416.
- Batey, M. A., Wright, J. G., Azzabi, A., Newell, D. R., Lind, M. J., Calvert, A. H. & Boddy, A. V. (2002). Population pharmacokinetics of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF). *Eur J Cancer* 38, 1081–1089.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Kobayashi, G. S. & Medoff, G. (1988). Interference with effects of amphotericin B on *Candida albicans* cells by 2-chloroethyl-1-nitrosourea. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 327–330.
- Conly, J., Rennie, R., Johson, J., Farah, S. & Hellman, L. (1992). Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *J Infect Dis* 165, 761–764.
- Davies, A., Brailsford, S., Broadley, K. & Beighton, D. (2002). Resistance amongst yeasts isolated from the oral cavities of patients with advanced cancer. *Palliat Med* 16, 527–531.
- Dick, J. D., Merz, W. G. & Saral, R. (1980). Incidence of polyene resistant yeast recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 18, 158–163.
- Egorin, M. J., Forrest, A., Belani, C. P., Ratain, M. J., Abrams, J. S. & Van Echo, D. A. (1989). A limited sampling strategy for cyclophosphamide pharmacokinetics. *Cancer Res* 49, 3129–3133.
- Ghannoum, M. A. (1986). Effects of antineoplastic agents on growth, morphology and metabolism of *Torulopsis glabrata*. *Mycopathologia* 95, 175–181.
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *J Am Chem Soc* 116, 688.
- Kerridge, D. & Nicholas, R. D. (1986). Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 18, 39–49.
- Lillemark, J. & Peterson, C. (1991). Pharmacokinetic optimization of anticancer therapy. *Clin Pharmacokinet* 21, 213–231.
- Morikawa, N., Mori, T., Abe, T., Ghoda, M., Takeyama, M. & Hori, S. (1997). Pharmacokinetics of methotrexate in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Pharmacother* 31, 1153–1156.
- Nakagawa, Y., Kanbe, T. & Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreased survival in mouse-model infection and elevated susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* 47, 395–403.
- Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. & Wingard, J. R. (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 196–199.
- Salonen, J. H., Richardson, M. D., Gallacher, K., Issakainen, J., Helenius, H., Lehtonen, O. P. & Nikoskelainen, J. (2000). Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy: emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Hosp Infect* 45, 293–301.
- Sarachek, A. & Henderson, L. A. (1991). Modification of responses of *Candida albicans* to cisplatin by membrane damaging antimycotic agents. *Mycoses* 34, 177–182.
- Sokol-Anderson, M., Brajtburg, J. & Medoff, G. (1986). Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 154, 76–83.
- Sokol-Anderson, M., Sligh, J. E., Elberg, S., Brajtburg, J., Kobayashi, G. S. & Medoff, G. (1988). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 702–705.
- Vanden Bossche, H., Marichal, P. & Odds, C. F. (1994). Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol* 2, 393–400.

CAPÍTULO II – MANUSCRITO 01

The effect of copper, manganese, iron and zinc on *Candida albicans* SOD activity

Carlos E B Linares, Érico M M Flores, Lucélia Hoehne, Gláucia Pasini, Sydney H
Alves, Vera M Morsch, Maria R C Schetinger.

Periódico: Cell Biology and toxicology
Status: Submetido

The effect of copper, manganese, iron and zinc on *Candida albicans* SOD activity.

Carlos E B Linares^d, Érico M M Flores^a, Lucélia Hoehne^a, Gláucia Pasini^c,
Sydney H Alves^b, Vera M Morsch^a, Maria R C Schetinger^{a*}.

^a *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

^c *Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, URI, Frederico Westphalen, Av. Assis Brasil, 98400-000. Frederico Westphalen, RS, Brazil*

^d *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: + 55-5532209557

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: mariachitolina@gmail.com

Abstract

Copper, zinc and manganese are important cofactor in Cu/ZnSOD and MnSOD fungal enzyme. In some situations high concentrations of these ions can be toxic to microorganisms, and SOD activity can be affected requiring cell defenses mechanism, once SOD activity plays an important role detoxifying superoxide radicals. In this study we investigated the influences of metal ions on *Candida albicans* (*C.a*) SOD activity, as well as the influence of one ion on the other intracellular accumulation. For this three *C.a* strains (ATCC 44373, 172 and 170) were exposed to increasing metal ion concentrations. *C.a* 172 exposed to copper_(0.173μM) and zinc_(17.2μM) showed the highest SOD activity, to manganese_(2.95μM) and iron_(7.05μM) *C.a* 170 and 172 showed the highest SOD activity, respectively. Our results also indicate that copper exposition induced significant ($P<0.05$) manganese increased accumulations in *C.a* 170 and 172. Zinc exposition induced significant ($P<0.05$) copper and iron increased accumulations to three yeast tested. Manganese exposition induced significant ($P<0.05$) copper and zinc accumulations in *C.a* 44373, and iron to *C.a* 170 and 172, and finally, iron exposition induced significant ($P<0.05$) copper and zinc increased accumulations to three yeast tested. These results are important once it shows the effect that metals can interact and change their concentrations. Our findings show the complex mechanism involved in yeast adaptations to different ion concentrations and how yeasts tested responded to these variations.

Key words: Superoxide dismutase, *Candida albicans*, copper, zinc, iron, manganese.

Introduction

Copper (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}) and manganese (Mn^{3+}) metal ions play an important role in fungal metabolism regulation. They are essential as a cofactor to Cu/ZnSOD and MnSOD (Hwang et al. 1999; Rhie et al. 1999; Lamarre et al. 2001). Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that converts damaging superoxide radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$), a key form of ROS, to the less damaging hydrogen peroxide (H_2O_2), which can be converted into water by catalase action (Martchenko et al. 2004; Johnson and Giulivi 2005). *Candida albicans*, as other eukariotes, is known to express Cu/ZnSOD and MnSOD in the cellular cytosol, and MnSOD is also present in the mitochondria (Lamarre et al. 2001). *Candida albicans* SOD synthesis requires copper, zinc and manganese, however, high concentrations of these ions can be toxic to the microorganism, and SOD activity may be lost or reduced. The toxicity of these ions may be due to complex formations that modify the biological activity of proteins, enzymes, nucleic acid and amino acids (Romandini et al. 1992; Fujs et al. 2005). Cell yeast toxicity defenses are correlated with detoxification of intracellular metals and reactive oxygen species (ROS) generated during metal exposure (Halliwell and Gutteridge 2004). Some mechanisms proposed for cell defense against ion toxicity include: reduced ion level uptake, direct metal binding to metallothioneins and other thiol-containing compounds, compartmentation in membrane vesicles; and the formation of insoluble precipitates (Stephen and Jamieson 1996; Presta and Stillman 1997; Viarengo and Nott 1993). More recently, membrane metal transport systems have been reported to consist of both low and high affinity

transporters. High affinity transporters are selective for their target metals and are tightly regulated according to metal need. Low affinity transporters are less responsive to metal need and are somewhat less selective for metal transport. The latter system allows the maintenance of metal homeostasis in conditions of either metal limitation or excess (Radisky and Kaplan 1999).

Candida albicans, the organism used in this study, is a commensal organism involved in the majority of human fungal infections. These infections range from thrush in immunocompetent hosts, to life-threatening systemic infections in immunocompromised individuals such as AIDS, cancer or organ transplants patients (Abrahmsen et al. 1992; Conly et al. 1992; Corner and Magee, 1997; Davies et al. 2002).

Studies aiming to evaluate metal ions affecting *Candida albicans* SOD activity and metal ions acquired by exposure are scarce in the literature. Therefore the first aim of this study is to examine how copper, zinc, manganese and iron acquired by exposure may affect *Candida albicans* SOD activity. Secondly, this study shows how exposure to one ion can affect accumulation of others.

Material and methods

Yeast Strains

Candida albicans strains used in this study were Ca 172 and Ca 170. Cultures of *Candida albicans* were isolated from patients treated at HUSM (University Hospital of Santa Maria). HIV positive patients were chosen due to the facility of

isolating opportunist fungi without invasive methods. The identification of the species was based on their phenotype characteristics. Only numbers were used to identify the yeast. *Candida albicans* from the American Type Culture Collection ATCC 44373 was used as the growth control strain. The protocol used was approved by the Bioethics Committee from the Integrated Regional University of Alto Uruguai and Missões at Frederico Westphalen – RS, Brazil (Universidade Regional Integrado do Alto Uruguai e das Missões), under registration number 061-2/PIH/04.

Metal ion exposure

Before metal exposure, ions were determined in dextrose Sabouraud broth (20 g dextrose, 5 g peptone, q.s.p. 1000 mL H₂O MilliQ). Copper, zinc, manganese and iron basal concentrations in the medium were 0.00173 µM, 0.0688 µM, 0.00591 µM, 0.0282 µM, respectively. The strains grew for 24 h in dextrose Sabouraud agar and were cultivated in 100 mL of Sabouraud broth supplemented with copper (0.173µM, 0.432 µM, 0.865 µM, 1.297 µM, 1.73 µM), zinc (6.88µM, 17.2 µM, 34.4 µM, 51.6 µM, 68.8 µM), manganese (0.591 µM, 1.479 µM, 2.955 µM, 4.432 µM, 5.91µM), iron (2.82 µM, 7.05 µM, 14.1 µM, 21.15 µM, 28.2 µM). To obtain final ion concentrations in the medium, stock solutions of CuCl₂.2H₂O, MnCl₂.4H₂O, ZnCl₂ and FeCl₃.6H₂O were added. The strains were incubated for 48 h at 35 °C. The tests were performed in triplicate.

Preparation of cell-free extracts

A crude extract was prepared by glass bead lyses. The cells cultured in Sabouraud broth supplemented were washed three times with MilliQ water and then resuspended in the lyses buffer (50 mM potassium phosphate pH 7.0) containing 0.5 g of 500- μ m-diameter glass beads. The mixture was homogenized in a teflon-glass homogenizer for six alternating cycles of 20 s, under cooling. Then, the mixture was centrifuged for 30 min in a refrigerated centrifuge to remove cell debris and glass beads. The supernatant was used for enzyme assays.

Preparation of cell for metal ion determination

Cells cultured in supplemented Sabouraud broth were centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. Sediments were washed three times with MilliQ water and then lyophilized for 24 hours for cell mass determination. Three mL of concentrate HNO₃ and 1 hour boiling was performed for organic phase decomposition. The concentrations were adjusted with 20 mL MilliQ water.

Metal ion determination

An inductively coupled plasma optical emission spectrometer (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany) was used for determination of Cu, Fe, Mn and Zn with an axial view configuration. Nebulization was performed through a crossflow nebulizer coupled to a Scott double pass type nebulization chamber. Plasma operating conditions and selected wavelengths used for element determination are listed in Table 1, and they were

used as recommended by the instrument manufacturer (Spectro Ciros CCD, software version 01/March 2003, Spectro Analytical Instruments GmbH & Co. KG: Kleve, Germany) Argon 99.996% (White Martins-Praxair, São Paulo, Brazil) was used for plasma generation, for nebulization, and as the auxiliary gas. Milli-Q water (18.2 MΩ cm) was used to prepare all solutions. Working analytical solutions for Cu, Fe, Mn and Zn were prepared before use by serial dilution of stock reference solutions containing 1000 mg l⁻¹ in 0.5% (v/v) HNO₃. Concentrated nitric acid (65%) was distilled in a sub-boiling system (Milestone, model DuoPur).

SOD activity

The activity of superoxide dismutase was assayed according to Mc Cord and Fridovich (1969). The assay mixture consisted of a total volume of 1 mL, containing 50 mM glycine buffer (pH 10.5), 60 mM epinephrine and enzyme. Epinephrine was added for adrenochrome formation. Adrenochrome formation was recorded at 480 nm with a UV-Vis spectrophotometer for 4 min. One unit of SOD activity was expressed as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of epinephrine oxidation under the experimental conditions.

Protein analysis

Protein was measured by the procedure of Bradford method using Coomassie Blue and serum albumin as standard (Bradford 1976).

Statistics

ANOVA with Tukey-Kramer post-test was used to compare the influence of each ion on the accumulation of the other ions in *Candida albicans* cells. The operations were performed using the GraphPad InStat® statistical program.

Results

The comparative *Candida albicans* SOD activity was investigated as a function of metal ion exposure and *Candida albicans* ATCC 44373 was used as standard. In general, ion concentrations did not produce a significant effect on *Candida albicans* biomass weight (Data not show). Only zinc concentrations greater than 51.6 μM for *Candida albicans* 170, and 34.4 μM for *Candida albicans* ATCC 44373 produced a significant decrease in biomass weight.

Our results presented in figure 1 show SOD activity in crude extracts and total copper accumulation of *Candida albicans* exposed to copper (II). The initial copper ion concentration in the medium ranged between 0.0017 – 1.73 μM . Increased copper exposure produced an increased accumulation in the three *Candida albicans* yeasts tested. *Candida albicans* 172 showed the highest SOD activity ($561 \pm 89 \text{ UI mg protein}^{-1}$) and copper accumulation ($1765 \pm 80 \mu\text{g g}^{-1}$). High SOD activity was observed in *Candida albicans* ATCC 44373, 172 and 170 in the copper concentrations of 0.432, 0.17 and 1.73 μM , respectively. The assimilation profile of copper in the three yeasts tested seems to be similar, and the peak SOD activity occurred at different copper concentrations. Copper exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in zinc and manganese accumulation in *Candida albicans* 170 (Figure 1B). To *Candida albicans* 172

cooper exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in managanese accumulation (Figure 1C).

Results expressed in Figure 2 show SOD activity in crude extracts and total zinc accumulation of *Candida albicans* exposed to Zinc at concentrations that ranged between 0.069 – 68.8 μM . *Candida albicans* ATCC 44373 showed a greater accumulation of zinc (0.0688 μM exposure = $143 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$; 68.8 μM exposure = $17205 \pm 285 \mu\text{g g}^{-1}$) than the other two yeasts tested. The highest SOD activity observed in *Candida albicans* 172, 170 and ATCC 44373 occurred at concentrations of 17.2, 34.4 and 6.88 μM , respectively, of zinc. Only *Candida albicans* ATCC 44373 showed increased zinc accumulation when exposed to increasing zinc concentrations. No SOD activity was found for *Candida albicans* ATCC 44373 and 170 exposed to zinc concentrations higher than 51.6 and 34.4 μM , respectively, due its severe effects on biomass production. Zinc exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in copper, manganese and iron accumulation in *Candida albicans* 44373 and 170 (Figure 2A, 2B). To *Candida albicans* 172 zinc exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in copper and iron accumulation (Figure 2C).

Figure 3 shows SOD activity in crude extracts and total manganese accumulation of *Candida albicans* exposed to this ion. The manganese accumulation for the three yeasts was increased with increased ion exposure (0.00591 – 5.91 μM). *Candida albicans* ATCC 44373 accumulated more manganese ($2313 \pm 142 \mu\text{g g}^{-1}$) and presented greater variation in SOD activity than the other two yeasts tested. The highest SOD activity in *Candida albicans*

172, 170 and ATCC 44373 was 127 ± 16 , 184 ± 29 and 99 ± 1.9 UI mg protein⁻¹, respectively. These elevations in SOD occurred at 4.4 μ M for *Candida albicans* ATCC 44373, and 2.96 μ M for *Candida albicans* 172 and 170. Manganese exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in copper and zinc accumulation in *Candida albicans* 44373 (Figure 3A), zinc and iron in *Candida albicans* 170 (Figure 3B), and only iron in *Candida albicans* 172 (Figure 3C).

Figure 4 shows SOD activity in crude extracts and total iron accumulation of *Candida albicans* exposed to iron. The initial iron ion concentration in the medium ranged between 0.028 – 28.2 μ M. *Candida albicans* 44373 showed the highest SOD activity (455 ± 26 UI mg protein⁻¹) and *Candida albicans* 170 showed the highest iron accumulation (4528 ± 138 μ g g⁻¹). The highest SOD activity observed in *Candida albicans* 172 and ATCC 44373 occurred at 7.1 μ M iron. For *Candida albicans* 170, SOD activity increased at 2.8 μ M iron. Iron exposure induced significantly ($P < 0.05$) increased in copper and zinc accumulation in *Candida albicans* 44373 and 172 (Figure 4A, 4C). To *Candida albicans* 170 iron exposure induced a significant ($P < 0.05$) increase in copper, manganese and zinc accumulation (Figure 4B).

Discussion

Metal ions play an important role scavenging excess ROS and preventing oxidative damage to important cellular components (Pan and Loo 2000). To reduce superoxide radical damage, cells express detoxifying enzymes such as SOD (Martchenko et al. 2004). Metal ions such as copper, zinc and manganese

play an important role in SOD activity in yeasts (Azevedo et al. 2007). In this study, the assays were performed in triplicate for three yeasts. Concentrations tested were based on metal ion concentrations in culture media and in previous studies (Greco et al. 1990; Romandini et al. 1992; Fujs et al. 2005; Dönmez and Aksu 2001). The comparative *Candida albicans* SOD activity was investigated as a function of metal ion exposure and *Candida albicans* ATCC 44373 was used as standard. By our results only zinc concentrations produced a significant decrease in biomass weight, however the addition of copper, zinc and iron in the culture medium has been reported to produce a weight stimulatory effect, and manganese may have the opposite effect (Griffin 1993). At high concentrations, metals can result in growth inhibition and toxicity and the ability of organisms to survive in environments with high levels of metals depends on their capacity to regulate the intracellular concentration of metal ions (Gadd 1993; Azevedo et al. 2007). Metal ions can be replaced by others in cellular uptake (Kayali-Ayar and Ozer 2002) and this situation can cause alteration in physiological processes, such as the synthesis of many enzymes that include the metal as a prosthetic group.

The profile founded to *Candida albicans* exposed to copper (II) was similar to that found for *Yarrowia lipolytica* (Ito et al. 2007) where increased copper exposure produced an increased metal ion accumulation. By our results yeasts *Candida albicans* 44373 and 172 did not show zinc accumulation when exposed to copper. This result is in accord to that described for *Chlorella* sp. where Cu^{2+} reduced the binding and cellular uptake of Zn^{2+} (Franklin et al. 2002). The

variable effect of copper on *Candida albicans* SOD activity did not allow clear conclusions about toxicologically effect of this metal ion, since SOD activity was either not lost or increased constantly with copper exposure. Another supposition is that the hormetic effect was involved. The hormetic effect is a dose–response phenomenon characterized by low-dose stimulation and high-dose inhibition. This phenomenon occurs independently of species, endpoint and physical or chemical stressor (Calabrese and Baldwin 2000). This effect may occur through different mechanisms, such as organic and inorganic chemical compounds, essential element deficiency or stimulation of defense reactions that activate general metabolism (Calabrese and Blain 2005). The results found for this ion are in accordance with others where high levels of CuZnSOD were observed in yeasts upon copper administration (Manzano et al. 2000; Santovito et al. 2002). SOD activity has been correlated with copper treatment through the co-stimulation of SOD genes (Thiele 1988). Copper concentrations above 100 μM have been associated with a potential to promote the cellular generation of reduced oxygen species, O_2^- , H_2O_2 , and HO^\cdot in yeast (Galiazzo et al. 1988). With the elevation of O_2^- , it is expected that there will be increased SOD activity, which will limit the production of HO^\cdot via the Haber-Weiss reaction of H_2O_2 and O_2^- , which could also be catalyzed by Cu (Halliwell and Gutteridge 1984). In this study, it is clear that copper intracellular concentrations affected SOD activity at low concentrations, with variable effects on SOD activity.

Results founded to zinc exposure showed a negative effect on biomass production and although zinc has been reported to possess antioxidant

properties (Powell 2000), no SOD activity was found for *Candida albicans* ATCC 44373 and 170 exposed to zinc concentrations higher than 51.6 and 34.4 μM , respectively. Azevedo and coworkers (2007) reported that an excess of zinc caused severe effects on biomass production, and oxidative stress in aquatic fungi. The ability of the microorganism to survive in environments with high levels of metals depends on their capacity to regulate intracellular concentrations of metal ions (Gadd 1993; Azevedo et al. 2007). As metallic ions can be substituted for others in the cellular uptake (Kayali-Ayar et al. 2002), this situation may cause alterations in the physiologic processes, such as in synthesis of enzymes which request specific metallic ions for prosthetic groups. The increased accumulation of zinc in *Candida albicans* ATCC 44373 probably occurred due to the ability of this sample to survive in an environment with high concentrations of zinc rather than from its capability to regulate intracellular concentrations of this metal. We believe more strongly in the first hypothesis because *Candida albicans* ATCC 44373 accumulated fifteen fold more zinc when compared to other two yeasts. Results founded to copper, iron and manganese accumulation influenced by zinc exposure is contrary to that found for *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum*, where zinc exposure decreased iron and manganese levels (Kayali-Ayar and Tarhan 2003). Only *Candida albicans* 170 and 172 did not show a linear increase in zinc absorption. In addition, variations in SOD activity and a decrease in biomass were observed. This may be due to the influence of zinc on copper and iron uptake. Possible explanations for the variation of SOD activity at

non-toxic doses include the hormetic effect and the influence of zinc on iron and copper accumulation.

Results founded to manganese exposure showed that manganese accumulation for the three yeasts was increased with increased ion exposure. It has been suggested that manganese cytosol uptake involves a manganese chaperone or an elevated bioavailability of the metal where Smf2p (intracellular vesicles) and Mtm1p (mitochondrial carrier) deliver the metal to SOD2 (Luk et al. 2005). *Candida albicans* is an exception among eukaryotes because of the cytosolic MnSOD (Lamarre et al. 2001) and the system mentioned above may explain the increased manganese accumulation. The results also show that there is no direct relation between ion accumulation and SOD activity. There are several possibilities for this fact, including major or minor stress generated by manganese, as well as activation of cellular defense mechanisms by high manganese concentrations. Some of the defense mechanisms described for high manganese exposure are vacuolar uptake (Li et al. 2001), reducing the toxic character in the cytosol of the yeast; hydrolysis of the Smf1p by proteases; and the efflux of manganese to the cell by vacuoles that transport the ions from Golgi to the cell membrane (Luk et al. 2003). Vacuolar uptake of manganese may be a good explanation for our results.

Results founded to iron show a clear effect of this metal ion on SOD activity and copper and zinc metal ion accumulation in *Candida albicans*. The effect on SOD activity was not linear with iron accumulation, possibly due to the hormetic effect. Differences in the accumulation of this ion in *Candida albicans*

may be due to the fact that iron is a metal that requires reduction for its biological acquisition. In *Candida albicans*, cell surface reductase reduces ferric to ferrous iron prior to uptake (Morrissey et al. 1996). Differences in cells susceptibility and surface reductase activity can be contributed to differences metal ion accumulation in *Candida albicans* tested. Iron excess is potentially toxic to cells, as free iron generates the toxic superoxide anion and hydroxyl radicals in the presence of oxygen (Radisky and Kaplan 1999). Recent research has shown that iron overload is associated with increased risk of infection by many pathogens such as *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Cryptococcus neoformans* (Schaible and Kaufmann 2004; Barluzzi et al. 2002; Jung and Kronstad 2008).

The results shown here demonstrate the real effect of one ion on the uptake of others and the effect on SOD activity in yeast. These results show the complex mechanism involved in yeast adaptations to different ion concentrations and how yeasts tested responded to these variations.

References

- Abrahmsen TG, Winding E, Glomstein A, Gaustad P (1992) Disseminated fungal disease resistant to fluconazole treatment in child with leukemia. Scand J Infect Dis 24:391-393.
- Azevedo M, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cássio F (2007) Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. Sci Total Environ 377:233-243.

Barluzzi R, Saleppico S, Nocentini A, Boelaert JR, Neglia R, Bistoni F, Blasi E (2002) Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. J Neuroimmunol 132:140-146.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Calabrese EJ, Baldwin LA (2000) History of chemical hormesis. Hum Exp Toxicol 19:2-31.

Calabrese EJ, Blain R (2005) The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormetic database: an overview. Toxicol Appl Pharmacol 202:289-301.

Conly J, Rennie R, Johnson J, Farah S, Hellman L (1992) Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. J Infect Dis 165:761-764.

Corner BE, Magee PT (1997) *Candida* pathogenesis: unravelling the threads of infection. Curr Biol 7:R691-R694.

Davies A, Brailsford S, Broadley K, Beighton D (2002) Resistance amongst yeasts isolated from the oral cavities of patients with advanced cancer. Palliat Med 16:527-531.

Dönmez G, Aksu Z (2001) Bioaccumulation of Copper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida sp.* Wat Res 35:1425-1434.

Franklin NM, Stauber JL, Lim RP, Petocz P (2002) Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium and zinc on metal cell binding and uptake. Environ Toxicol Chem 21:2412-2422.

Fujs S, Gazdag Z, Poljsak B, Stibilj V, Milaeie R, Pesti M, Raspor P, Batie M (2005) The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. J Basic Microbiol 45:125-135.

Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. New Phytol 124:25-60.

Galiazzo F, Schiesser A, Rotilio G (1988) Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. *Biochim Biophys Acta* 965:46-51.

Greco MA, Hrab DI, Magner W, Kosman DJ (1990) Cu,Zn Superoxide Dismutase and Copper Deprivation and Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 172:317-325.

Griffin DH (1993) *Fungal physiology*. Wiley-Liss, New York.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2004) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.

Hwang CS, Rhie G, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, Kang SO (1999) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1427:245-255.

Ito H, Inouhe M, Tohoyama H, Joho M (2007) Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *BioMetals* 20:773-780.

Johnson F, Giulivi C (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26:340-352.

Jung WH, Kronstad JW (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 10:277-284.

Kayali-Ayar H, Ozer N, Tarhan L (2002) Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Arch Biochem Biophys* 400:265-272.

Kayali-Ayar H, Tarhan L (2003) Influence of zinc and copper ions on metals transport, antioxidant system responses and membrane LPO levels of *F. equiseti* and *F. acuminatum*. *Microb Technol* 33:828-835.

Lamarre C, LeMay JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y (2001) *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem* 276:43784-43791.

Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 276:29515-29519.

Luk E, Jensen LT, Culotta VC (2003) The many highways for intracellular trafficking of metals. *J Biol Inorg Chem* 8:803-809.

Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC (2005) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280:22715-22720.

Mc Cord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.

Manzano M, Cocolin L, Citterio B, Conte L, Bertoldi M, Comi G, Santovito G, Beltramini M, Salvato B (2000) Biochemical responses in a *Candida famata* strain adapted to high copper concentrations. *BioMetals* 13:251-259.

Martchenko M, Alarco A, Hargus D, Whiteway M (2004) Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced *SOD5* Gene. *Mol Biol Cell* 15:456-467.

Morrissey JA, Williams PH, Cashmore AM (1996) *Candida albicans* has a cell-associated ferric-reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. *Microbiology* 142:485-492.

Pan YJ, Loo G (2000) Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-Lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 28:824-30.

Powell SR (2000) The antioxidant properties of Zn. *J Nutr* 130:1447S-1458S.

Presta A, Stillman MJ (1997) Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu(I)-metallothionein in intact yeast cells. *J Inorg Biochem* 66: 231-240.

Radisky D, Kaplan J (1999) Regulation of Transition Metal Transport across the Yeast Plasma Membrane. *J Biol Chem* 274:4481-4484.

Rhie GE, Hwang CS, Brady MJ, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, Lee BH, Lee JS, Kang SO (1999) Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1426:409-419.

Romandini P, Tallandini L, Beltramini M, Salvato B, Manzano M, De Bertoldi M, Rocco GP (1992) Effects of Copper and Cadmium on Growth, Superoxide

Dismutase and catalase activities in different yeast strains. *Comp Biochem Physiol* 103C:255-262.

Santovito G, Salvato B, Manzano M, Beltramini M (2002) Copper adaptation and methylotrophic metabolism in *Candida boidinii*. *Yeast* 19:631-640.

Schaible UE, Kaufmann SH (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2:946-953.

Stephen DWS, Jamieson DJ (1996) Glutathione is an important molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141:207-212.

Thiele D (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8:2745-2752.

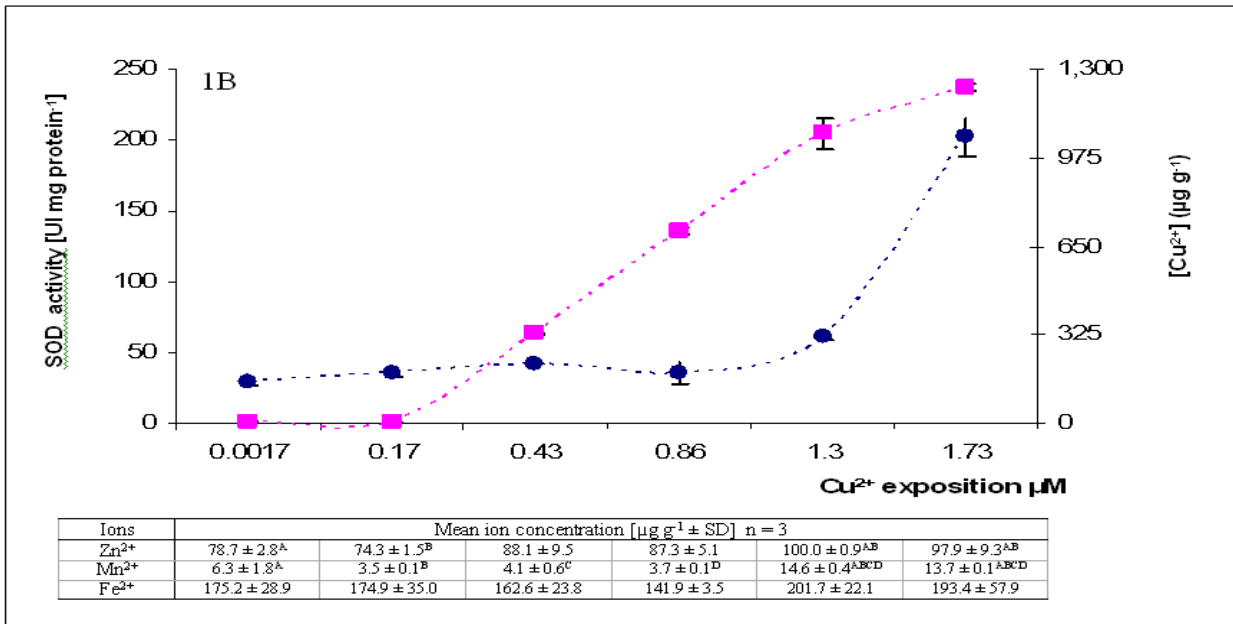
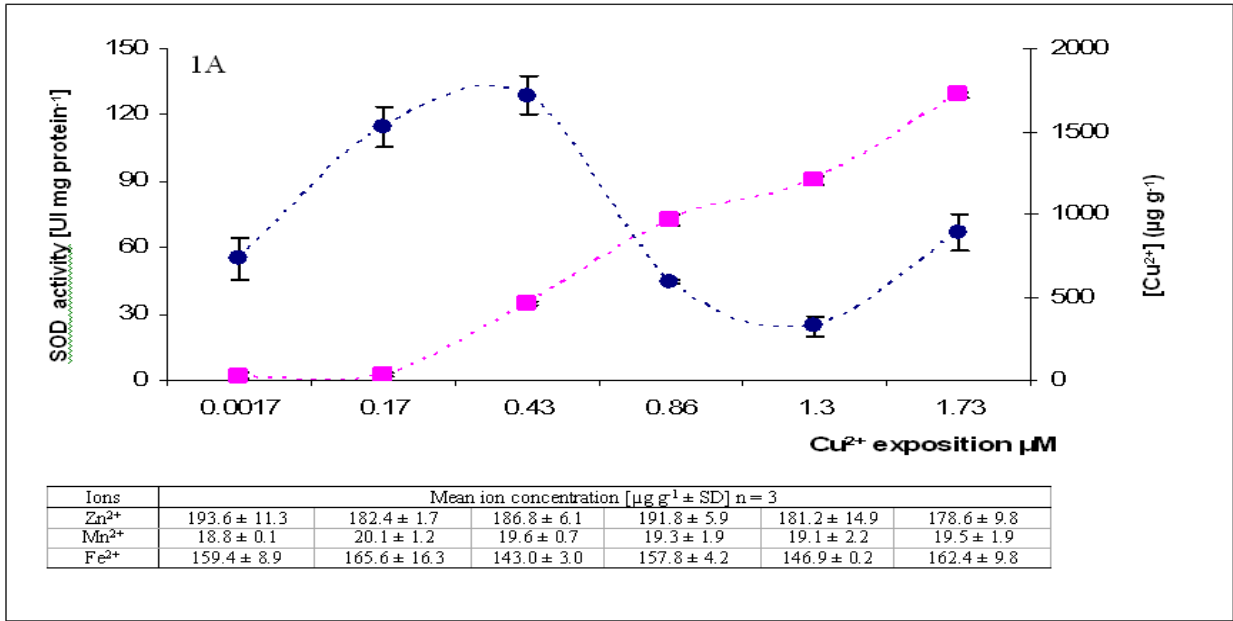
Viarengo A, Nott JA (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 104(C):355-372.

Fig.1. (●) SOD activity in crude extracts and (■) total copper accumulation in *C. albicans* (A) ATCC 44373, (B) 170, (C) 172 exposed to copper (0.0017 – 1.73 μM). SOD activity was measured in 1 ml assay solution with 10 μl , 15 μl and 20 μl of lysed fungal and 17 μl of epinephrine. Metal ions were measured in ICP-OES by nebulization performed through a crossflow nebulizer coupled to Scott double pass cells. SOD activity was expressed in $\text{UI mg protein}^{-1}$ and copper determination in $\mu\text{g g}^{-1}$.

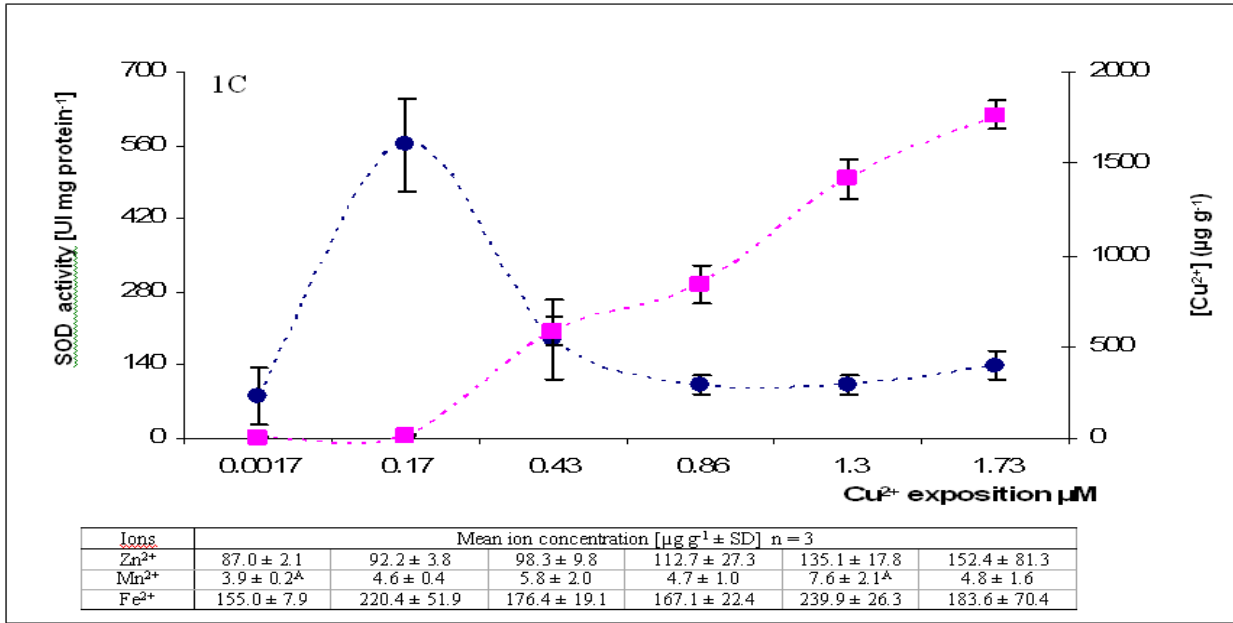
Fig. 2. (●) SOD activity in crude extracts and (■) total zinc accumulation in *C. albicans* (A) ATCC 44373, (B) 170, (C) 172 exposed to zinc (0.069 – 68.8 μM). SOD activity was measured in 1 ml assay solution with 10 μl , 15 μl and 20 μl of lysed fungal and 17 μl of epinephrine. Metal ions were measured in ICP-OES by nebulization performed through a crossflow nebulizer coupled to Scott double pass cells. SOD activity was expressed in $\text{UI mg protein}^{-1}$ and zinc determination in $\mu\text{g g}^{-1}$.

Fig. 3. (●) SOD activity in crude extracts and (■) total manganese accumulation in *C. albicans* (A) ATCC 44373, (B) 170, (C) 172 exposed to manganese (0.0059 – 5.9 μM). SOD activity was measured in 1 ml assay solution with 10 μl , 15 μl and 20 μl of lysed fungal and 17 μl of epinephrine. Metal ions were measured in ICP-OES by nebulization performed through a crossflow nebulizer coupled to Scott double pass cells. SOD activity was expressed in $\text{UI mg protein}^{-1}$ and manganese determination in $\mu\text{g g}^{-1}$.

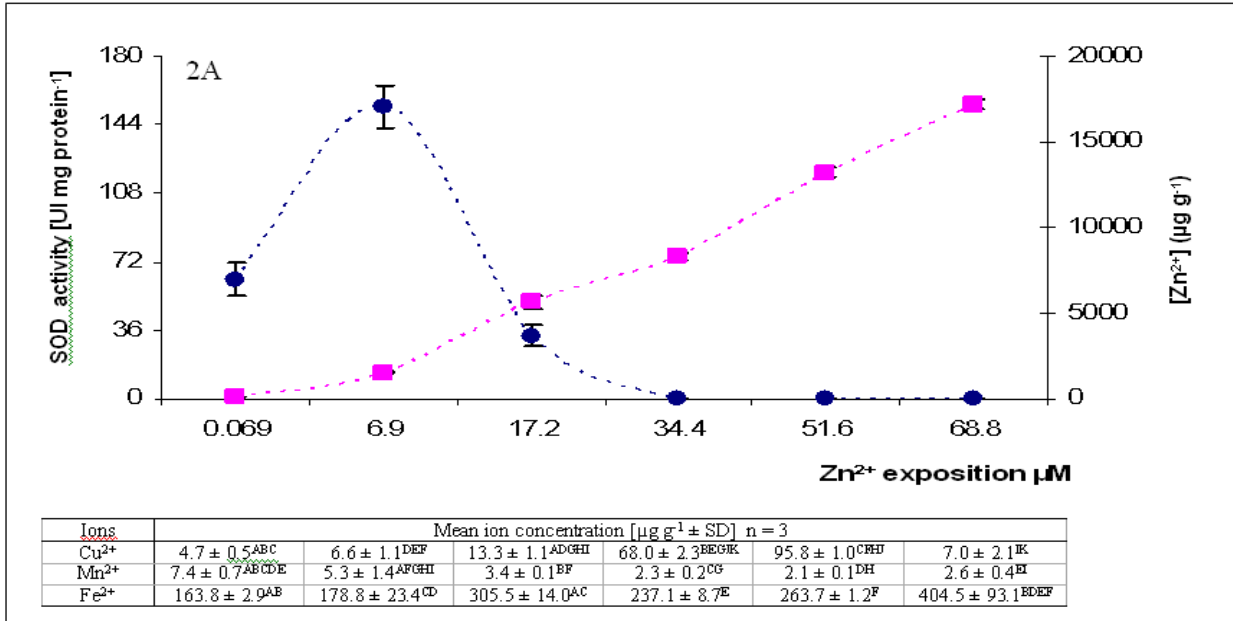
Fig. 4. (●) SOD activity in crude extracts and (■) total iron accumulation in *C. albicans* (A) ATCC 44373, (B) 170, (C) 172 exposed to iron (0.028 – 28.2 μM). SOD activity was measured in 1 ml assay solution with 10 μl , 15 μl and 20 μl of lysed fungal and 17 μl of epinephrine. Metal ions were measured in ICP-OES by nebulization performed through a crossflow nebulizer coupled to Scott double pass cells. SOD activity was expressed in UI mg protein^{-1} and iron determination in $\mu\text{g g}^{-1}$.



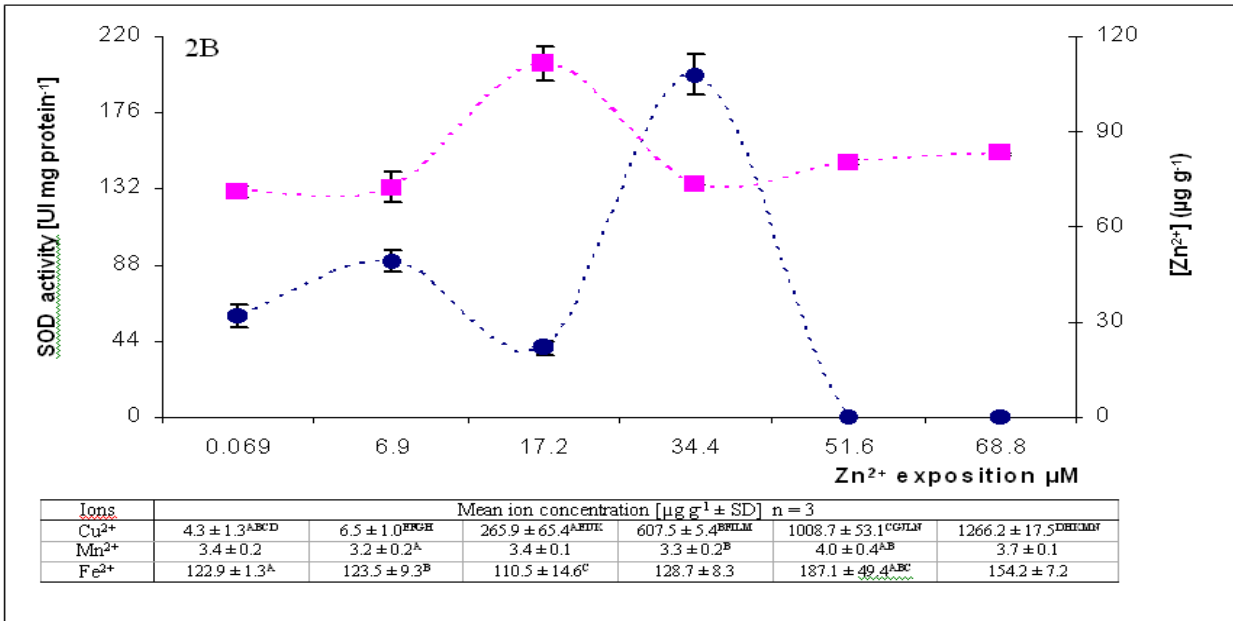
^{ABCD} Copper exposition induced significant ($P < 0.05$) zinc and manganese accumulation.



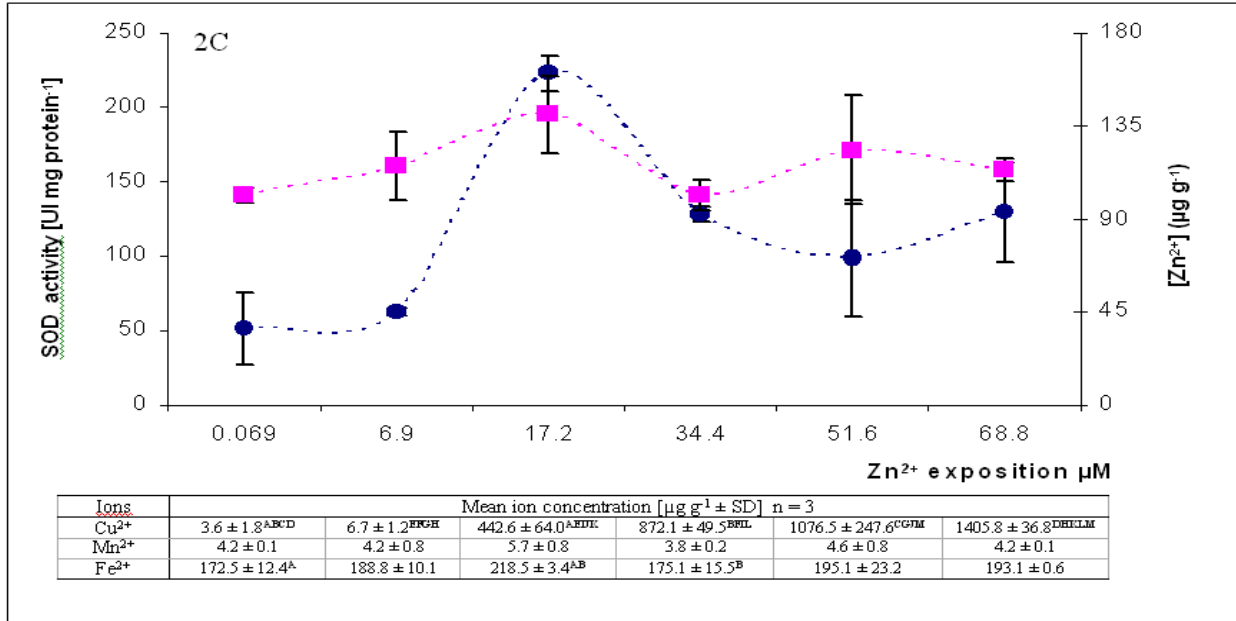
^A Copper exposition induced significant ($P < 0.05$) manganese accumulation.



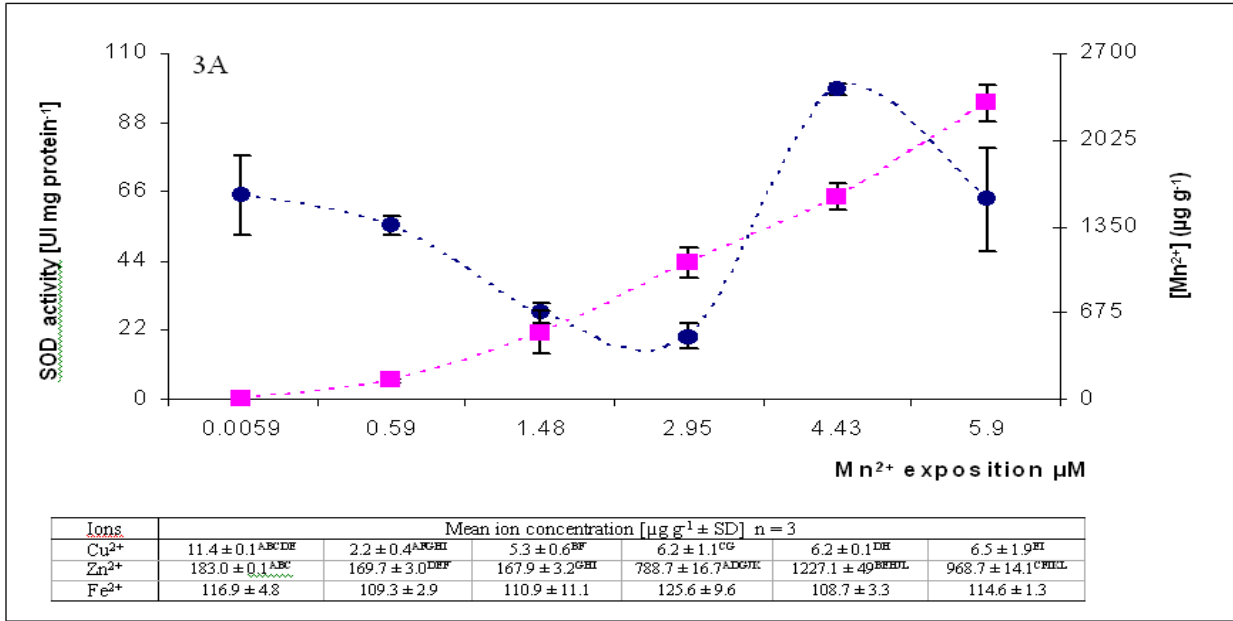
ABCDEFGHI Zinc exposition induced significant (P<0.05) copper, manganese and iron accumulation.



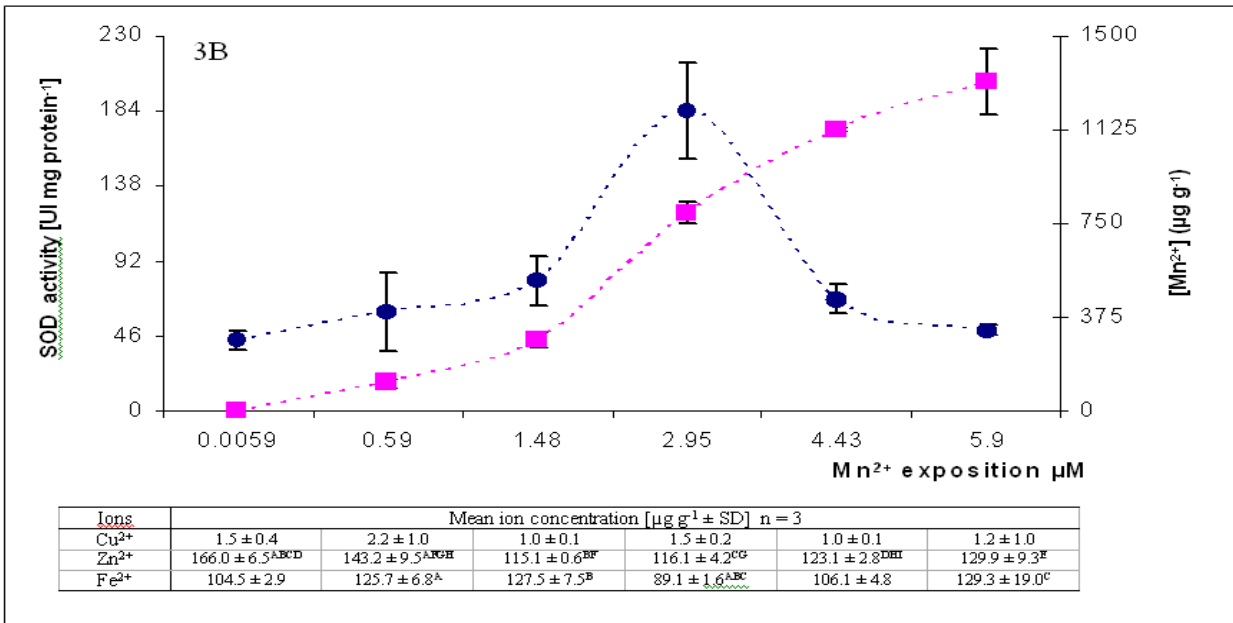
ABCDEFGHIJKLMN Zinc exposition induced significant (P<0.05) copper, manganese and iron accumulation.



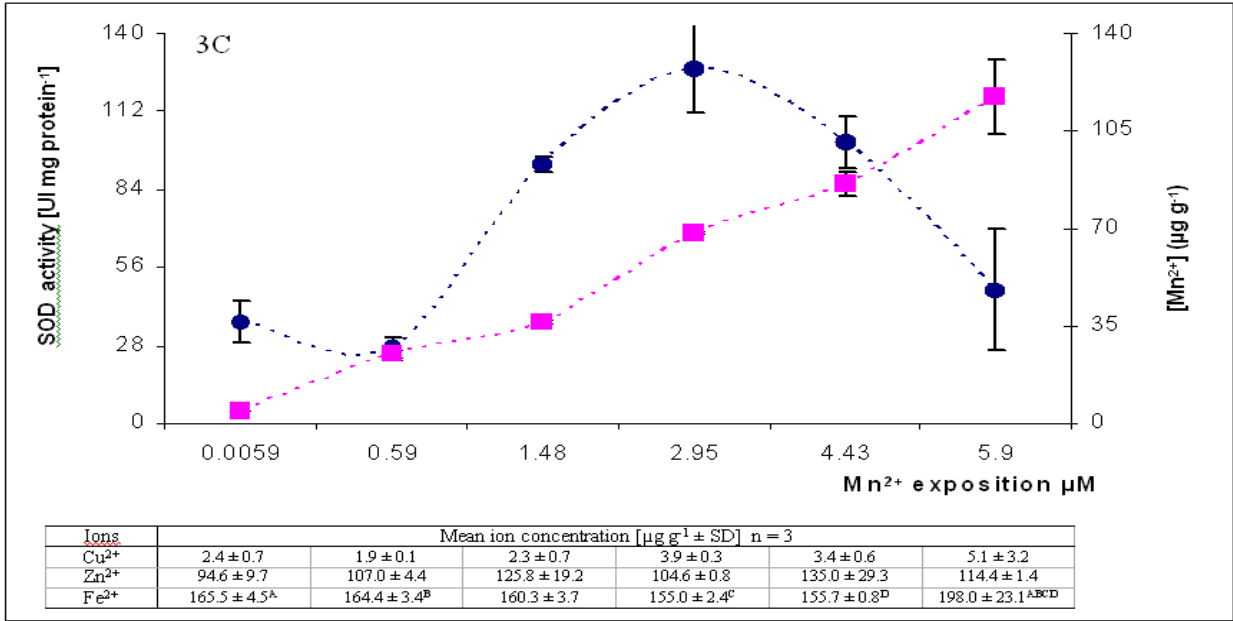
ABCDEFHGHIJKLM Zinc exposition induced significant ($P < 0.05$) copper and iron accumulation.



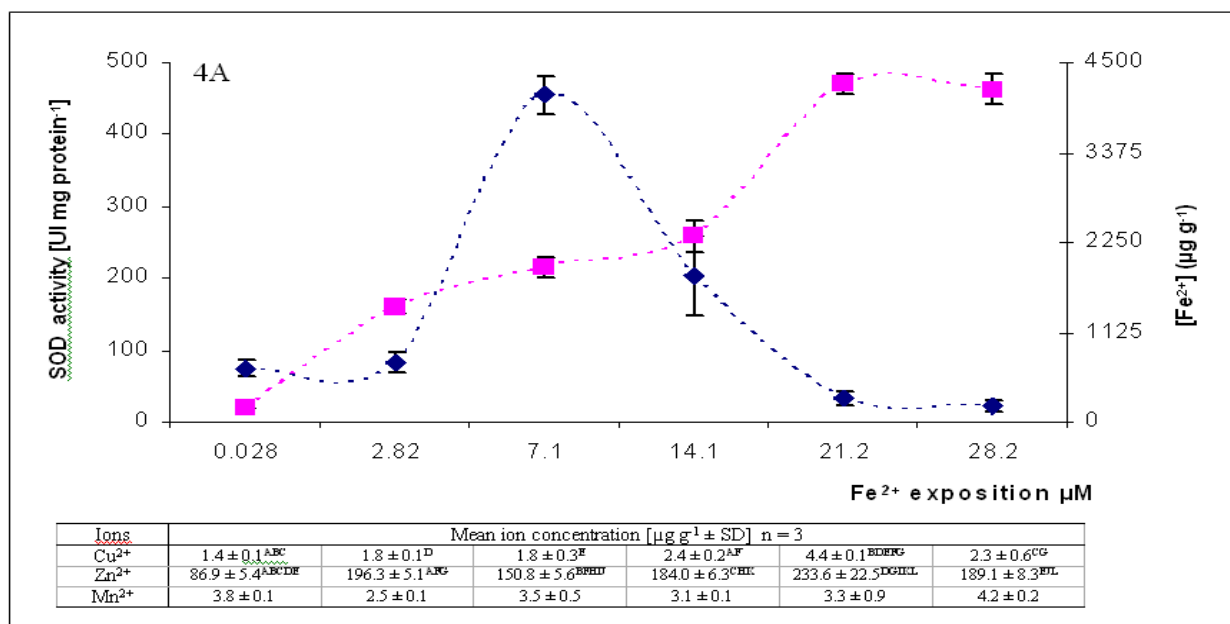
ABCDEF GHIJKL Manganese exposure induced significant ($P < 0.05$) copper and zinc accumulation.



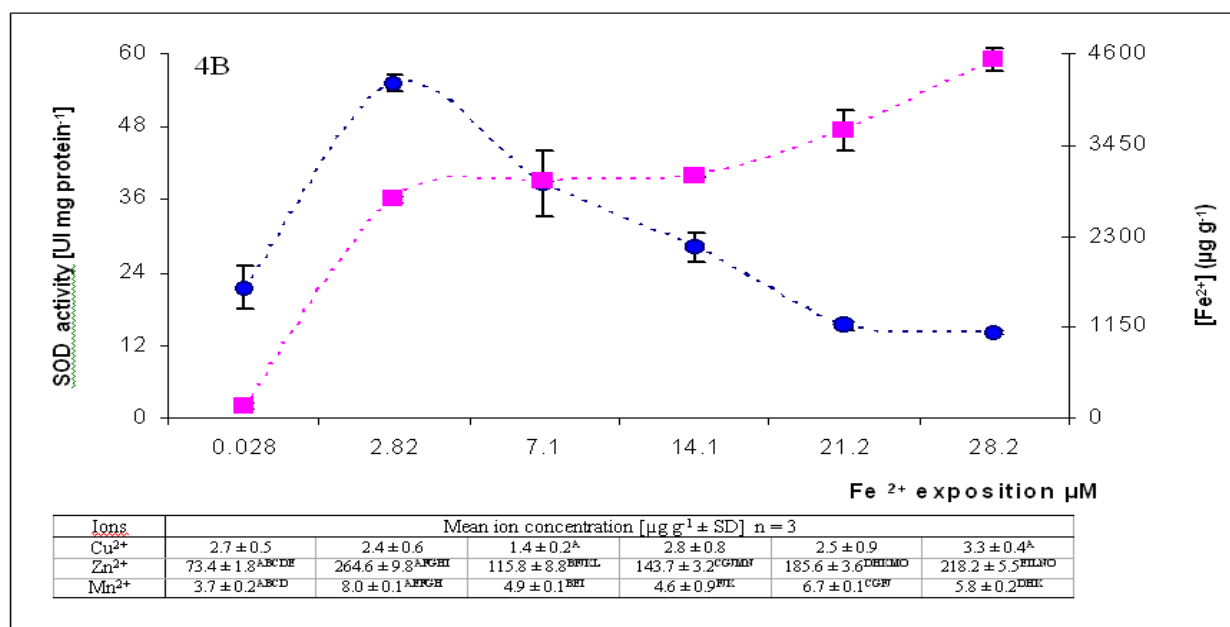
ABCDEF GHI Manganese exposure induced significant ($P < 0.05$) zinc and iron accumulation.



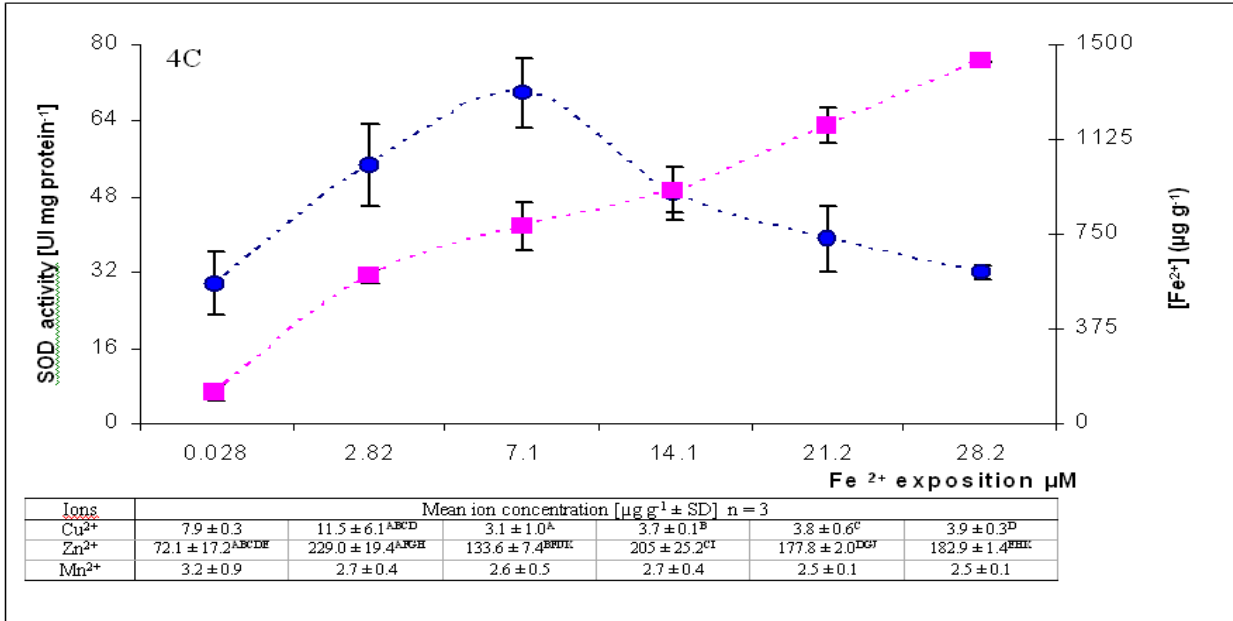
ABCD Manganese exposure induced significant ($P < 0.05$) iron accumulation.



ABCDEFGHIJKL Iron exposition induced significant ($P < 0.05$) copper and zinc accumulation.



ABCDEFGHIJKLMNO Iron exposition induced significant ($P < 0.05$) copper, zinc and manganese accumulation.



ABCDEFGHIJK Iron exposition induced significant (P<0.05) copper and zinc accumulation.

Table 1. Operational parameters for Cu, Fe, Mn and Zn determinations by ICP-OES.

rf power (W)	1400
plasma gas flow rate (L min ⁻¹)	14.0
auxiliary gas flow rate (L min ⁻¹)	1.0
nebulizer gas flow rate (L min ⁻¹)	1.0
spray chamber	double pass, Scott type
Nebulizer	crossflow
View	axial
wavelength (nm)	Cu 327.393 I
	Fe 238.204 II
	Mn 257.610 II
	Zn 206.200 II

CAPÍTULO III – MANUSCRITO 02

Catalase and Superoxide dismutase activity in fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*

Carlos E B Linares, Gláucia Pasini, Sydney H Alves, Vera Morsch, Maria R C Schetinger

Periódico: Journal of Medical Microbiology
Status: A ser submetido

Catalase and Superoxide dismutase activity in fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*

Carlos E B Linares^d, Gláucia Pasini^c, Sydney H Alves^b, Vera Morsch^a, Maria R C Schetinger^{a*}

^a *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil*

^c *Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, URI, Frederico Westphalen, Av. Assis Brasil, 98400-000. Frederico Westphalen, RS, Brazil*

^d *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Fax: + 55-5532209557

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: mariachitolina@gmail.com

ABSTRACT

Candida dubliniensis is new species of *Candida* that has been recovered from several body sites in healthy people. In AIDS and HIV-infected patients it has been associated with recurrent episodes of oral candidiasis. Although studies based on phenotype characteristics and resistance to antifungals have been performed to characterize the new species and detect differences from *C. albicans*, little is known about enzymatic activity involved in the oxidative stress related to *C. dubliniensis*. In this study we show that superoxide dismutase and catalase activity in fluconazole- and amphotericin B-resistant strains of *C. dubliniensis* and *C. albicans* were significantly ($P < 0.05$) higher than in sensitive cells. Our results also indicate that catalase and SOD were significantly ($P < 0.001$) higher in sensitive and resistant *C. albicans* cells than in the respective *C. dubliniensis* group. These data suggest that *C. albicans* is more greatly protected against oxidative stress than *C. dubliniensis*, and that fluconazole, like amphotericin B, can produce an oxidative stress in *Candida* inducing an adaptive response that results in a coordinated increase of catalase and SOD activities.

Keywords: *Candida dubliniensis*, fluconazole-resistance, amphotericin-resistance, SOD, catalase.

1. INTRODUCTION

Candida dubliniensis is new species of *Candida* discovered by Sullivan *et al.* (1993) in Dublin, Ireland during observations in germ tube- and chlamydospore-positive isolates, identified at that time as 'atypical' *Candida albicans*. Later analysis of these isolates showed that the observations constituted a new species different from *C. albicans* and it was named *C. dubliniensis* (Sullivan *et al.*, 1995). *C. dubliniensis* is primarily associated with recurrent episodes of oral candidiasis in AIDS and HIV-infected patients, the most common clinical presentation being oral erythematous candidiasis. However, it has also been implicated in cases of superficial and disseminated candidiasis in patients with and without HIV infection (Gutiérrez *et al.*, 2002; Sullivan & Coleman, 1998). Since the discovery of *C. dubliniensis* many studies based on phenotype characteristics and resistance to antifungals have been performed to characterize the new species and detect differences from *C. albicans* (Sullivan *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 1995; Coleman *et al.*, 1997; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Pinjon *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1999; Staib & Morschhäuser, 1999; Al Mosaid *et al.*, 2001; Staib & Arasteh, 2001; Alves *et al.*, 2002; Cardenes-Perera *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2004; Sahand *et al.*, 2005; Eraso *et al.*, 2006; Loreto *et al.*, 2006; Marot-Leblond *et al.*, 2006; Sahand *et al.*, 2006).

In terms of resistance, *C. dubliniensis* generally shows higher susceptibility to polyenes and azoles than *C. albicans*, however, a remarkable feature of *C. dubliniensis* compared to *C. albicans* is the speed at which it produces *in vitro* stable strains resistant to fluconazole (Moran *et al.*, 1997). Azoles, such as fluconazole, act on the pathway of ergosterol membrane biosynthesis by inhibiting the enzyme C14- α -demethylase, a cytochrome P450-dependent enzyme (Bodey, 1992). Amphotericin B has been reported to bind to sterols, such as ergosterol, disrupting the osmotic integrity of the fungal membrane and resulting in the leakage of intracellular ions and metabolites (Thomas, 1986). Despite a number of studies with *C. dubliniensis* in the last

years, the superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymatic activity in fluconazole-resistant and amphotericin B-resistant *C. dubliniensis* is unknown. In *Candida*, SOD plays an important protective role against fungicidal attack of macrophages and neutrophils that produce the superoxide radical (Vázquez *et al.*, 1998). SOD is an enzyme that converts damaging superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$), a reactive oxygen species (ROS), to less damaging hydrogen peroxide (H_2O_2) that can be converted into water by catalase (Martchenko *et al.*, 2004; Johnson & Giulivi, 2005). Catalase is an important enzymatic mechanism that has been suggested to be involved in amphotericin B resistance through inhibition of the oxidative damage produced by this antifungal drug (Sokol-Anderson *et al.*, 1998). The fungal plasma membrane ergosterol is the target of amphotericin B, which produces potassium ion leak channels, resulting in disruption of the proton gradient (Sokol-Anderson *et al.*, 1986; Nakagawa *et al.*, 2003). SOD and catalase antioxidant enzymes may act cooperatively and in synergism to protect cells against oxidative damage (Michiels *et al.*, 1994). Some authors have suggested that a coordinated inactivation of ROS by a combination of both a superoxide- and hydrogen peroxide-inactivating enzyme in a sequential manner is essential for an effective cellular protection of cells against ROS toxicity (Lortz & Tiedge, 2003).

Based on the lack of knowledge available about antioxidant enzymatic activity and the coordinated inactivation of ROS by SOD and catalase in *C. dubliniensis* and *C. albicans*, the aim of this study is to show the behavior of SOD and catalase activity in strains of *C. dubliniensis* and *C. albicans* both sensitive and resistant to fluconazole and amphotericin B.

2. METHODS

Strains: *Candida albicans* (Ca) and *Candida dubliniensis* (Cd) strains used in this study were, Ca 10, Ca 81, Ca 119, Ca 170, Ca ATCC 44373, Cd 1, Cd 2, Cd 3, Cd 4, Cd 5, Cd 7, Cd 9, Cd 11, Cd 13. Cultures were isolated from patients

treated at HUSM (University Hospital of Santa Maria) and from different cities in Brazil. The identification of the species was based on phenotype and genotype characteristics of *Candida dubliniensis*. *C. dubliniensis* genotype was confirmed by randomly amplified polymorphic DNA using the primers CDU (5' GCG ATC CCC A 3') (Sullivan *et al.*, 1995) and B-14 (5' GAT CAA GTC C 3') (Bauer *et al.*, 1993). Only numbers were used to identify the yeast. *Candida albicans* from American Type Culture Collection ATCC 44373 was used as the growth control strain. The protocol used was approved by the Bioethics Committee from the Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões at Frederico Westphalen – RS, Brazil, under registration number 061-2/PIH/04.

Fluconazole resistance induction: Fluconazole resistance induction was performed according to Fekete-Forgács *et al.* (2000). Firstly fluconazole MIC points for *C. albicans* and *C. dubliniensis* clinical isolates were determined in accordance with the CLSI M27-A2 document. Then, MIC determination cells were cultured overnight in Sabouraud glucose broth (SDB) containing 4% glucose and 1% mycological peptone. The cells were then added to flasks containing 20 ml of SDB to achieve a final absorbance of 0.1 ($\lambda=640$ nm). The culture was incubated at 30 °C for 10 h, and then fluconazole was added at a final concentration of 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (higher than the MIC). After 14 h of further incubation the cells of the fluconazole-containing culture were subcultured three times consecutively into fresh SDB containing 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fluconazole and in each case were incubated at 30 °C with shaking for 24 h. After the third incubation, cells were added to flasks containing 20 ml of SDB containing 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fluconazole to achieve a final absorbance of 0.1. After 10 h incubation, fluconazole was added at a final concentration of 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and after 14 h of further incubation the cells of this culture were subcultured three times into fresh SDB containing fluconazole 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and incubated in each case at 30 °C with shaking for 24 h. The concentration of fluconazole was always duplicated under the procedure; the final concentration was 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cells obtained from these concentrations were used for SOD and Catalase assays.

Amphotericin B resistance induction: Amphotericin B resistance induction was assayed according to Fekete-Forgács *et al.* (2000) with some modifications. Time needed for cell growth between exposure to different amphotericin B concentrations was 48 hours. Cells obtained from these concentrations were used for SOD and catalase assays.

***C. albicans* and *C. dubliniensis* culture:** The strains grew for 48 h in Sabouraud glucose agar containing fluconazole 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or amphotericin B 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cells were added in sterile saline 0.85 % to achieve a final concentration of 0.1 ($\lambda = 625 \text{ nm}$). 1 ml of this suspension was added to 50 ml of Sabouraud glucose broth (SDB) containing 4 % glucose and 1 % mycological peptone at 30 °C with shaking for 24 h for fluconazole and 48 h for amphotericin B exposure. Cells were washed three times with sterile water and a crude extract was prepared.

Preparation of cell-free extracts: A crude extract was prepared by glass bead lyses. The cells cultured in the supplemented Sabouraud broth were washed three times with MilliQ water and then resuspended in the lyses buffer (50 mmol l^{-1} potassium phosphate pH 7.0) containing 0.5 g of 500- μm -diameter glass beads. The mixture was homogenized in a teflon-glass homogenizer for six cycles of 20 s alternating and under cooling. Then, the mixture was centrifuged for 30 min in a refrigerated centrifuge to remove cell debris and glass beads. The supernatant was used for enzyme assays.

SOD activity: Superoxide dismutase activity was assayed according to McCord and Fridovich (1969). The assay mixture consisted of a total volume of 1 mL, containing 50 mmol l^{-1} glycine buffer (pH 10.5), 60 mmol l^{-1} epinephrine and enzyme. Epinephrine was added and adrenochrome formation was recorded at 480 nm with a UV- Vis spectrophotometer by 4 min. One unit of SOD activity is expressed as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of

epinephrine oxidation under the experimental conditions. The readings were performed in triplicate.

Catalase activity: Catalase activity was determined in cell-free extracts by the method of Aebi (1984). H₂O₂ solution (10mM), enzyme extract, and 50 mM phosphate buffer pH 7 were pipetted into a cuvette. The reduction of H₂O₂ was followed at a wavelength of 240 nm for 4 min against a blank containing 50 mM phosphate buffer and enzyme extract. Catalase activity was expressed in $\Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$. The readings were performed in triplicate.

Protein analysis: Protein was measured by the Bradford method using Coomassie Blue and serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Statistics: Statistical analyses were made with a paired T test to compare sensitive versus resistant cells. Comparisons among *C. albicans* and *C. dubliniensis* groups were made with unpaired T test. The operations were performed on GraphPad InStat® statistical program.

3. RESULTS

To induce fluconazole and amphotericin B stable resistance, mutant *C. dubliniensis* and *C. albicans* strains were developed using fluconazole and amphotericin B sensitive cells exposed to increasing fluconazole and amphotericin B concentrations. Cells were exposed to fluconazole at 64 $\mu\text{g/mL}$ and to amphotericin B at 2 $\mu\text{g/mL}$.

Results in **table 1** show the SOD and catalase activity in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis*. *C. dubliniensis* 13 ($83.2 \pm 5.8 \text{ UI mg protein}^{-1}$) and 5 ($130.2 \pm 33.7 \text{ UI mg protein}^{-1}$) showed the highest SOD activity among sensitive and resistant cells, respectively. The lowest SOD activity among sensitive and resistant cells was found for *C. dubliniensis* 4 ($5.1 \pm 2.9 \text{ UI mg protein}^{-1} / 10.3 \pm 2.5 \text{ UI mg protein}^{-1}$). Mean SOD activity found for fluconazole-resistant *C.*

dublinsiensis was 1.97 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.01$) between fluconazole-resistant and sensitive *C. dublinsiensis* SOD activity. For catalase activity, *C. dublinsiensis* 11 ($1.9 \pm 0.6 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) and 2 ($3.7 \pm 0.1 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) showed the highest catalase activity among sensitive and resistant cells, respectively. *C. dublinsiensis* 1 ($0.5 \pm 0.2 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) and 4 ($0.6 \pm 0.1 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) showed the lowest catalase activity between fluconazole-resistant and sensitive. Mean catalase activity for the fluconazole-resistant group was 1.58 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between fluconazole-resistant and sensitive *C. dublinsiensis* catalase activity.

Table 2 shows SOD and catalase activity in *Candida dublinsiensis* resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B. The highest SOD activity among sensitive and resistant cells was found, respectively, for *C. dublinsiensis* 11 ($57.9 \pm 33.2 \text{ UI mg protein}^{-1}$) and 9 ($101.1 \pm 24.1 \text{ UI mg protein}^{-1}$). *C. dublinsiensis* 3 ($13.5 \pm 0.4 \text{ UI mg protein}^{-1}$) and *C. dublinsiensis* 2 ($22.6 \pm 3.0 \text{ UI mg protein}^{-1}$) showed the lowest SOD activity for sensitive and resistant cells. Mean SOD activity for *C. dublinsiensis* resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B was 1.97 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between *C. dublinsiensis* SOD activity in cells resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B and sensitive cells. For catalase activity, *C. dublinsiensis* 11 ($1.7 \pm 0.2 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) / $3.6 \pm 0.6 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) showed the highest catalase activity among sensitive and resistant cells. *C. dublinsiensis* 1 ($0.6 \pm 0.1 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) and *C. dublinsiensis* 2 ($0.9 \pm 0.1 \Delta E \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) showed the lowest catalase activity among sensitive and resistant cells, respectively. Mean catalase activity for the group resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B was 2 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between *C. dublinsiensis* catalase activity in cells resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B and sensitive cells.

SOD and catalase activity in fluconazole-sensitive and resistant *Candida albicans* cells are shown in **table 3**. The highest SOD activity among sensitive

and resistant cells was found, respectively, for *C. albicans* 119 (269.6 ± 5.9 UI mg protein⁻¹) and 10 (300.5 ± 2 UI mg protein⁻¹). The lowest SOD activity in these groups was found, respectively, for *C. albicans* 170 (139.2 ± 6.2 UI mg protein⁻¹) and *C. albicans* ATCC 44373 (205.3 ± 7 UI mg protein⁻¹). Mean SOD activity for fluconazole-resistant *C. albicans* was 1.3 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between SOD activity in fluconazole-resistant and sensitive *C. albicans*. For catalase activity, *C. albicans* 10 (2.8 ± 0.2 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) and 170 (4.1 ± 0.2 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) showed the highest catalase activity among sensitive and resistant cells, respectively. *C. albicans* 119 (1.5 ± 0.2 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) and 81 (2.3 ± 0.4 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) showed the lowest catalase activity for the same groups. Mean catalase activity for the fluconazole-resistant group was 1.57 times greater than that found for sensitive cells. For catalase, statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between *C. albicans* catalase activity in the fluconazole-resistant and sensitive groups.

Table 4 shows the SOD and catalase activity in *Candida albicans* sensitive and resistant to 2 μ g/mL of amphotericin B. The highest SOD activity among sensitive and resistant cells, was found, respectively, for *C. albicans* 170 (186.1 ± 3.2 UI mg protein⁻¹) and 119 (298.2 ± 21.3 UI mg protein⁻¹). The lowest SOD activity in these groups was found, respectively, for *C. albicans* 10 (22.1 ± 8.5 UI mg protein⁻¹) and *C. albicans* 81 (93 ± 4.8 UI mg protein⁻¹). Mean SOD activity for *C. albicans* resistant to 2 μ g/mL of amphotericin B was 1.97 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses showed significant differences ($P < 0.001$) between *C. albicans* SOD activity in cells resistant to 2 μ g/mL of amphotericin B and the sensitive group. For catalase activity, *C. albicans* 10 (3.1 ± 0.3 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) and ATCC 44373 (4.8 ± 1.1 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) showed the highest catalase activity among sensitive and resistant cells, respectively. *C. albicans* 170 (1.3 ± 0.4 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) and 119 (2.9 ± 0.8 ΔE min⁻¹ (mg protein)⁻¹) showed the lowest catalase activity in the same groups. Mean catalase activity for cells resistant to 2 μ g/mL of amphotericin B was 1.77 times greater than that found for sensitive cells. Statistical analyses for

catalase showed significant differences ($P < 0.05$) between *C. albicans* catalase activity in cells resistant to 2 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B and the sensitive group.

4. DISCUSSION

Since the discovery of *Candida dubliniensis* in 1995 studies have been made in order to investigate differences between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. Studies aiming to detect the behavior of these two species under the same conditions have led to the understanding of phenotype and genotype differences. Enzymes involved in the virulence factor, such as aspartyl proteinases, phospholipases, chondroitin sulphatase and hyaluronidase, have been thoroughly studied. De Bernardis *et al.* (2001) and Linares *et al.* (2007) showed that aspartyl proteinase was significantly higher in *C. albicans* than in *C. dubliniensis* (De Bernardis *et al.*, 2001; Linares *et al.*, 2007). Studies using phospholipase, chondroitin sulphatase and hyaluronidase revealed no differences between these species (Linares *et al.*, 2007; Kothavade & Panthaki, 1998; De Bernardis *et al.*, 2001). In this study, we investigate the effect of resistance to fluconazole and amphotericin B on *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* SOD and catalase activity. These enzymes are not related with virulence factors, but play an important role in the oxidative stress response in both species (Lee *et al.*, 1999). SOD activity has been involved in the detoxification of the free superoxide radical, as that produced by phagocyte NADPH oxidase (Giró *et al.*, 2006). Phagocytic cells have two antimicrobial systems responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). On the other hand, microorganisms such as *Candida* have multiple defense responses that can be adjusted according to the nature and amount of ROS produced by the host or environment (Ikner & Shizaki, 2005). Our results show significantly increased SOD activity in *C. dubliniensis* and *C. albicans* resistant to amphotericin B and fluconazole when compared to the sensitive group. For amphotericin B, this result may be due to the fact that amphotericin B can

produce oxidative damage in *Candida* through lipid peroxidation (Sokol-Anderson *et al.*, 1986). In our study, yeasts were exposed to an increasing concentration of amphotericin B at 2 µg/mL. Normally, amphotericin B at this concentration kills *Candida* by the mechanism cited above, but in this study we found that *Candida* SOD activity was activated in response to amphotericin B exposure. Mean SOD activity found for *C. dubliniensis* and *C. albicans* resistant to 2 µg/mL of amphotericin B was 1.97 times greater than that found for sensitive cells. This SOD activation probably occurred because when *Candida* is exposed to sub lethal concentrations of peroxide or superoxide an adaptive response is induced resulting in a several fold increase in expression of specific activities of the enzymes catalase, SOD and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (Jamieson *et al.*, 1992; Turton *et al.*, 1997). In addition, we can presume that this elevation of SOD activity in yeasts resistant to amphotericin B may contribute to an increased resistant to phagocytic cell attack, making yeast cells more resistant to host defenses. Our results also show that SOD activity among *C. albicans* sensitive to fluconazole and amphotericin B was significantly ($P < 0.0001$) higher than SOD activity in *C. dubliniensis* sensitive to these drugs. When SOD activity was compared in the resistant groups, *C. albicans* also expressed significantly ($P < 0.0001$) higher levels of SOD than *C. dubliniensis*. As found for proteinases, SOD activity is higher in *C. albicans* than in *C. dubliniensis*. As for fluconazole, this study has shown for the first time the effect of resistance to this antifungal drug on SOD activity from *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Our results suggest that fluconazole has an oxidant effect on *Candida*, activating its antioxidant system like SOD. Mean SOD activity found for fluconazole-resistant *C. albicans* and *C. dubliniensis* was 1.93 and 1.97 higher, respectively, than that found for the sensitive group. If fluconazole induced SOD activity, like amphotericin B, this would contribute to increased resistance to phagocytic cell attack.

Catalase, like SOD, was increased in fluconazole- and amphotericin-resistant *C. albicans* and *C. dubliniensis* cells when compared to sensitive cells. Catalase is an enzyme that converts hydrogen peroxide (H_2O_2) to oxygen (O_2)

and water (H₂O) (Michiels *et al.*, 1994). In *Candida*, it has been cited as a resistance mechanism for amphotericin B (Sokol-Anderson *et al.*, 1986) and as involved in hypha formation (Nakagawa, 2008). No relation has been cited in the literature between fluconazole resistance and catalase activity. From our results, catalase activity in amphotericin B-resistant *C. dubliniensis* and *C. albicans* was, respectively, 2 and 1.77 times higher than that found in the sensitive group. In the fluconazole-resistant groups, it was, 1.58 and 1.57 times higher, respectively, than that found for the sensitive group. These findings show a similar behavior between catalase and SOD activity when the yeast cells were exposed to the same conditions and corroborate with the hypothesis that when *Candida* is exposed to an oxidative stress an adaptive response occurs (Turton *et al.*, 1997). Based on the literature, a similar behavior was expected for these enzymes, since the SOD product is a substrate for catalase (Johnson & Giulivi, 2005). Here we confirmed this for *C. albicans* and *C. dubliniensis*. As was found for SOD, catalase activity was significantly ($P < 0.0001$) higher in *C. albicans* sensitive and resistant groups than the respective *C. dubliniensis* groups. This suggests that *C. albicans* is better protected against oxidative stress than *C. dubliniensis*.

The results obtained in this study also demonstrate a synergism between SOD and catalase in *C. dubliniensis* and *C. albicans* resistant to fluconazole and amphotericin B, where protection by SOD probably generates hydrogen peroxide and not other ROS, such as lipid hydroperoxides and the reactive nitric intermediate (RNI) peroxynitrite, which would be more detrimental to cells due to the absence of defenses against these types of compounds. Since hydrogen peroxide generated by SOD activity is still toxic to the cell, it must be eliminated by catalase which converts this toxic compound to water (Nakagawa *et al.*, 2003).

In conclusion, this study has shown for the first time the effect of fluconazole and amphotericin B resistance on catalase and SOD activity in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Although a stressor effect of fluconazole on *Candida*, has not been described in the literature, here we have shown that catalase and SOD activity were affected in fluconazole-resistant cells and we

confirmed that *C. albicans* expresses greater catalase and SOD activity than *C. dubliniensis*.

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Method Enzymol* **105**, 121–126.
- Al Mosaid, A., Sullivan, D., Salkin, I. F., Shanley, D. & Coleman, D. C. (2001). Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J Clin Microbiol* **39**, 323–327.
- Alves, S. H., Milan, E. P., De Laet Sant'Ana, P., Oliveira, L. O., Santurio, J. M. & Colombo A. L. (2002). Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**, 85–86.
- Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkeil, V., Warthoe, P. & Strauss, M. (2003). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nuc Acids Res* **21**, 4272–4280.
- Bodey, G. P. (1992). Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis* **14**, 161–169.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Cardenes-Perera, C. D., Torres-Lana A., Alonso-Vargas, R., Moragues-Tosantas, M. D., Ponton-San Emeterio, J., Quindos-Andres, G. & Arévalo-Morales, M. P. (2004). Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**, 219–21.
- Coleman, D., Sullivan, D. J., Bennett, D. E., Moran, G. P., Barry, H. J. & Shanley, D. B. (1997). Candidiasis: the emergence of a novel specie, *Candida dubliniensis*. *AIDS* **11**, 557–567.
- De Bernardis, F., Sullivan, P. A. & Cassone, A. (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* **39**, 303–13.
- Eraso, E., Sahand, I. H., Villar-Vidal, M., Marcos, C., Dolores, M. M, Madariaga, L., Pontón, J. & Quindós, G. (2006). Usefulness of Candida ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med Mycol* **44**, 611–5.

- Fekete-Forgács, K., Gyüre, L. & Lenkey, B. (2000). Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* **43**, 273–9.
- Giro, M., Carrillo, N. & Krapp, A. R. (2006). Glucose- 6- phosphate dehydrogenase and ferredoxin- NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli* . *Microbiol* **152**, 1119–1128.
- Gutiérrez, J., Morales, P., González, M. A. & Quindós, G. (2002). *Candida dubliniensis* a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* **42**, 207–227.
- Ikner, A. & Shizaki, K. (2005). Yeast signalling pathways in the oxidative stress response. *Mut Res* **569**, 13–17.
- Jabra-Rizk, M. A., Falker W. A., Merz, W. G., Kelley, J. I., Baqui, A. M. & Meiller, T. F. (1999). Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J Clin Microbiol* **37**, 1464–1468.
- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* **174**, 6678–6681.
- Johnson, F. & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* **26**, 340–352.
- Khan, Z. U., Ahmad, S., Mokaddas, E. & Chandy, R. (2004). Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **42**, 4796–8.
- Kirkpatrick, W. R.; Revankar, S. G.; McAtee, R. K.; Lopez-Ribot, J. L., Fothergill, A. W., McCarthy, D. I., Sanche, S. E., Cantu, R. A., Rinaldi, M. G. & Patterson, T. F. (1998). Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 3007–3012.
- Koehler, A. P., Chu, K. C., Houang, E. T. S. & Cheng, A. F. B. (1999). Simple, reliable and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **37**, 1464–1468.

- Kothavade, R. J. & Panthaki, M. H. (1998). Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. *J Med Microbiol* **47**, 99–102.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garini, J., Labarre, J. & Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. *J Biol Chem* **274**, 16040–16046.
- Linares, C. E. B., Loreto, E. S., Silveira, C. P., Pozzatti, P., Scheid, L. A., Santurio, J. M. & Alves, S. H. (2007). Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* **49**, 203–206.
- Loreto, E. S., Bolzan, A. R., Linares, C. E., Boff, E., Santurio, J. M. & Alves, S. H. (2006). Evaluation of 5 new media containing extracts of seeds applied to *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**, 191–193.
- Lortz, S., Tiedge, M. (2003). Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* **34**, 683–688.
- Marot-Leblond, A., Beucher, B., David, S., Nail-Billaud, S. & Robert, R. (2006). Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. *J Clin Microbiol* **44**, 138–142.
- Mc Cord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055.
- Martchenko, M., Alarco, A., H Marcus, D. & Whiteway, M. (2004). Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced *SOD5* Gene. *Mol Biol Cell* **15**, 456–467.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. & Remacle, J. (1994). Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **17**, 235–248.
- Moran, G. P., Sullivan, D. J., Henman, M. C., McCreary, C. E., Harrington, B. J., Shanley D. B. & Coleman, D. C. (1997). Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected

and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 617–623.

Nakagawa, Y., Kanbe, T. & Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreased survival in mouse-model infection and elevated susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* **47**, 395–403.

Nakagawa, Y. (2008). Catalase gene disruptant of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is defective in hyphal growth, and a catalase-specific inhibitor can suppress hyphal growth of wild-type cells. *Microbiol Immunol* **52**, 16–24.

Pinjón, E., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D. & Coleman, D. (1998). Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **36**, 2093-2095.

Sahand, I. H., Moragues, M. D., Eraso, E., Villar-Vidal, M., Quindos, G. & Ponton, J. (2005). Supplementation of CHROMagar® *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* **43**, 5768–5770.

Sahand, I. H., Moragues, M. D., Robert, R., Quindos, G. & Ponton, J. (2006). Evaluation of Bichro-dubli® Fumouze to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**, 165–167.

Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J. & Medoff, G. (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* **154**, 76–83.

Sokol-Anderson, M., Sligh, J. E. Jr, Elberg, S., Brajtburg, J., Kobayashi, G. S. & Medoff, G. (1998). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 702–705.

Staib, P. & Morschhauser, J. (1999). Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**, 521–524.

Staib, F. & Arastéh, K. (2001). Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* **44**, 23-27.

Sullivan, D., Bennett, D., Henman, M., Harwood, S., Flint, S., Mulcahy, F., Shanley, D. & Coleman, D. (1993). Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol* **31**, 2124–2133.

Sullivan, D. & Coleman, D. (1998). *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* **36**, 329–334.

Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E. & Coleman, D. C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141**, 1507–21.

Thomas, A. H. (1986). Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. *J Antimicrob Chemother* **17**, 269–279.

Turton, H. E., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol* **179**, 1096–1101.

Vázquez, N., Walsh, T. J., Friedman, D., Chanock, S. J. & Lyman, C. A. (1998). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**, 145–150.

Table 1. Superoxide dismutase (SOD) and catalase activity in fluconazole-sensitive and resistant *Candida dubliniensis*.

Yeast *	Mean SOD activity [UI mg protein ⁻¹]		Mean catalase activity [Δ E min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	
	Sensitive ¥	Resistant §†	Sensitive ¥	Resistant §‡
01	13.4 ± 6.0	48.8 ± 2.8	0.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1
02	56.4 ± 17.7	113.6 ± 23.6	1.9 ± 0.4	3.7 ± 0.1
03	27.1 ± 3.6	21.9 ± 5.2	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1
04	5.1 ± 2.9	10.3 ± 2.5	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
05	17.2 ± 11.8	130.2 ± 33.7	1.5 ± 0.3	3.4 ± 0.5
07	14.0 ± 2.2	17.7 ± 3	1.1 ± 0.05	1.7 ± 0.4
09	28.2 ± 2.9	38.8 ± 12.2	0.6 ± 0.05	0.9 ± 0.2
11	7.4 ± 1.2	47.2 ± 6.1	1.9 ± 0.6	1.6 ± 0.7
13	83.2 ± 5.8	67.9 ± 6.2	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.7

Data are the means ± SD of triplicate experiments.

* *C. dubliniensis* isolated from HIV-positive patients.

¥ fluconazole-sensitive *C. dubliniensis*.

§ fluconazole-resistant *C. dubliniensis* (64 µg/mL).

† Statistical analysis showed significant differences between *C. dubliniensis* SOD activity in fluconazole-resistant and sensitive groups (P<0.01).

‡ Statistical analysis showed significant differences between *C. dubliniensis* catalase activity in fluconazole-resistant and sensitive groups (P<0.001).

Table 2. Superoxide dismutase (SOD) and catalase activity in amphotericin B-sensitive and resistant *Candida dubliniensis*.

Yeast *	Mean SOD activity [UI mg protein ⁻¹]		Mean catalase activity [ΔE min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	
	Sensitive ¥	Resistant §†	Sensitive ¥	Resistant §‡
01	15.5 ± 0.4	69.7 ± 20.7	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.5
02	15 ± 1.5	22.6 ± 3.0	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
03	13.5 ± 0.4	37.8 ± 6.8	0.9 ± 0.01	2.1 ± 0.1
04	27.2 ± 1.8	50.7 ± 5.0	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.01
05	22.1 ± 3.2	37.3 ± 3.5	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2
07	15.7 ± 1.9	44.1 ± 13.3	1.1 ± 0.01	3.1 ± 0.01
09	47.2 ± 12.6	101.1 ± 24.1	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.3
11	57.9 ± 33.2	69.3 ± 4.7	1.7 ± 0.2	3.6 ± 0.6
13	35.5 ± 10.2	57.8 ± 8.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1

Data are the means ± SD of triplicate experiments.

* *C. dubliniensis* isolated from HIV-positive patients.

¥ amphotericin B-sensitive *C. dubliniensis*.

§ *C. dubliniensis* resistant to 2 µg/mL of amphotericin B.

† Statistical analysis showed significant differences between *C. dubliniensis* SOD activity in cells resistant to 2 µg/mL of amphotericin B and the sensitive group (P<0.001).

‡ Statistical analysis showed significant difference between *C. dubliniensis* catalase activity in cells resistant to 2 µg/mL of amphotericin B and the sensitive group (P<0.001).

Table 3. Superoxide dismutase (SOD) and catalase activity in fluconazole-sensitive and resistant *Candida albicans*.

Yeast *	Mean SOD activity [UI mg protein ⁻¹]		Mean catalase activity [Δ E min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	
	Sensitive ¥	Resistant §†	Sensitive ¥	Resistant §‡
Ca 10	177.4 ± 22.1	300.5 ± 2	2.8 ± 0.2	3.5 ± 0.6
Ca 81	230.4 ± 5.1	273.1 ± 2.8	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.4
Ca 119	269.6 ± 5.9	289.7 ± 21.3	1.5 ± 0.2	2.6 ± 0.3
Ca 170	139.2 ± 6.2	238.3 ± 16.9	1.6 ± 0.4	4.1 ± 0.2
Ca ATCC 44373	188 ± 2.5	205.3 ± 7	2.3 ± 0.2	3.8 ± 0.9

Data are the means ± SD of triplicate experiments.

* *C. albicans* isolated from HIV-positive patients assisted in the University Hospital of Santa Maria.

¥ fluconazole-sensitive *C. albicans*.

§ fluconazole-resistant *C. albicans* (64 µg/mL).

† Statistical analysis showed significant differences between *C. albicans* SOD activity in fluconazole-resistant and sensitive groups (P<0.001).

‡ Statistical analysis showed significant differences between *C. albicans* catalase activity in fluconazole-resistant and sensitive groups (P<0.001).

Table 4. Superoxide dismutase (SOD) and catalase activity in amphotericin B-sensitive and resistant *Candida albicans*.

Yeast *	Mean SOD activity [UI mg protein ⁻¹]		Mean catalase activity [ΔE min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	
	Sensitive ¥	Resistant §†	Sensitive ¥	Resistant §‡
Ca 10	22.1 ± 8.5	178.4 ± 15	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.3
Ca 81	116.2 ± 6.4	93 ± 4.8	2 ± 0.2	2.9 ± 0.3
Ca 119	106.6 ± 11.7	298.2 ± 21.3	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.8
Ca 170	186.1 ± 3.2	195 ± 6.9	1.3 ± 0.4	3.9 ± 0.1
Ca ATCC 44373	82.4 ± 4	269.3 ± 10.1	2.8 ± 0.1	4.8 ± 1.1

Data are the means ± SD of triplicate experiments.

* *C. albicans* isolated from HIV-positive patients assisted in the University Hospital of Santa Maria.

¥ amphotericin B-sensitive *C.albicans*.

§ *C. albicans* resistant to 2 µg/mL of amphotericin B..

† Statistical analysis showed significant differences between *C. albicans* SOD activity in cells resistant to 2 µg/mL of amphotericin B and sensitive group (P<0.001).

‡ Statistical analysis showed differences between *C. albicans* catalase activity in cells resistant to 2 µg/mL of amphotericin B and sensitive group (P<0.05).

IV. DISCUSSÃO

4.1. Influência de Antineoplásicos na Atividade da Catalase de *Candida albicans*

A emergência de *C. albicans* resistente aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B em pacientes com câncer aumentou consideravelmente nas últimas décadas e tornou-se um problema grave (Nolte *et al.*, 1997). Nesse mesmo período, observa-se que a resistência de *Candida sp.*, isoladas de pacientes com câncer, foi mais estudada frente ao fluconazol do que à anfotericina B; contudo, o desenvolvimento de resistência a poliênicos, entre pacientes com câncer e em tratamento com antineoplásicos, é uma realidade.

A hipótese de que os antineoplásicos possam afetar células fúngicas em diversos níveis e graus foi levantada a partir da década de 80 (Land *et al.*, 1980). Diversos autores relataram achados de cepas de *Candida sp.* resistentes à terapia antifúngica em pacientes com câncer, e sugeriram que drogas citotóxicas utilizadas no tratamento desses pacientes poderiam contribuir decisivamente para o desenvolvimento de fungos resistentes a anfotericina B (Conly *et al.*, 1992; Dick *et al.*, 1980; Kovacicova *et al.*, 2001; Pappagianis *et al.*, 1979; Wingard, 1995). Neste contexto, Fekete-Forgács *et al.* (1999) também observaram que o agente citotóxico metotrexato poderia causar uma redução no efeito inibitório do fluconazol sobre o crescimento e aderência de *C. albicans*.

Como mecanismo adicional de resistência a poliênicos, Sokol-Anderson e colaboradores (1986), sugeriram o aumento da atividade da catalase fúngica. De

acordo com esses autores, o aumento da atividade dessa enzima pode estar vinculado ao poder oxidante gerado pelos antineoplásicos que, por sua vez, aumenta a resistência de leveduras à ação oxidativa da anfotericina B.

O presente estudo objetivou verificar a influência de quatro agentes antineoplásicos - amplamente utilizados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria - sobre a atividade da catalase de *C. albicans*. Cada antineoplásico foi testado na concentração plasmática descrita na literatura (Egorin *et al.*, 1989; Liliemark & Peterson, 1991; Morikawa *et al.*, 1997; Batey *et al.*, 2002).

A análise estatística dos resultados obtidos não apontou diferenças entre os grupos de *C. albicans* expostos à dacarbazina, ciclofosfamida e citarabina quando comparados ao grupo controle, sem exposição prévia aos antineoplásicos. Contudo, observou-se que a atividade média da catalase entre as cepas expostas a dacarbazina e ciclofosfamida foi levemente mais elevada que a encontrada para as amostras controles e, a atividade média de catalase para as cepas expostas a citarabina foi levemente mais baixa que a encontrada para o grupo controle. Quanto ao metotrexato, a análise estatística demonstrou que a atividade da catalase entre as cepas expostas a esse antineoplásico foi mais alta quando comparado ao grupo controle.

Quando observadas as classes as quais os antineoplásicos testados pertencem, pode-se verificar que a dacarbazina, citarabina e metotrexato são agentes antimetabólitos, enquanto que a ciclofosfamida é um agente alquilante (Brunton *et al.*, 2007). Em relação à ciclofosfamida, demonstrou-se que a

mesma pode ser utilizada como única fonte de carbono por *C. albicans* (Ghannoum *et al.*, 1986) e que, em altas concentrações, essa droga pode inibir o crescimento da mesma (Hamilton-Miller, 1984). Apesar de não ter sido verificada a influência da ciclofosfamida na atividade de catalase em *C. albicans*, estudos com carmustina e lomustina, duas drogas com forte poder alquilante, demonstraram uma ação indutora dessas duas drogas na atividade da catalase em *C. albicans* (Brajtburg *et al.*, 1988). Supõe-se que o efeito não encontrado para a ciclofosfamida deve-se aos diferentes mecanismos de ação descritos para essas drogas. A ciclofosfamida é ativada pelo sistema enzimático citocromo P-450 (CYP) para formar 4-hidroxíciclofosfamida, que entra em equilíbrio com seu tautômero aldofosfamida. O composto 4-hidroxíciclofosfamida é muito instável e decompõe-se em mostarda fosforamida, um agente alquilante. Devido à sua impermeabilidade, a mostarda fosforamida considerada citotóxica é aquela formada no meio intracelular a partir de 4-hidroxíciclofosfamida (de Jonge *et al.*, 2005). O efeito citotóxico desse agente está diretamente relacionado à alquilação de componentes do DNA, com o qual mostarda fosforamida se liga covalentemente (McCune *et al.* 2009; Pratt & Ruddon, 1979). Já a carmustina e lomustina exercem ação citotóxica através da desagregação espontânea a um intermediário alquilado, o íon 2-cloro-etil-diazonium. Esse íon, com forte ação eletrofílica, pode alquilar uma variedade de substâncias como: guanina, citidina e adenina. Como consequência, ocorre a ação mutagênica sobre o DNA (Brunton *et al.*, 2007).

Apesar da dacarbazina, citarabina e metotrexato pertencerem à mesma classe - agentes quimioterápicos antimetabólitos – tais drogas agem através de diferentes mecanismos sobre células eucarióticas, fato que pode ter influenciado na atividade da catalase de maneira desigual.

Quanto ao mecanismo de ação da dacarbazina, a mesma requer uma ativação prévia pelo sistema citocromo P450 hepático através de uma reação de N-desmetilação. Os produtos gerados formam um agente capaz de metilar o DNA com um amplo espectro de atividade. Para a citarabina, o mecanismo descrito envolve a formação de um nucleotídeo Citarabina-Trifosfato, que parece ter a capacidade de inibir a DNA-polimerase. Diferentemente dos dois anteriores, o metotrexato, um antifolato, apresenta um mecanismo de ação inibitório sobre a enzima diidrofolato redutase (DHFR), levando a um decréscimo nos níveis de tetraidrofolato (THF), o qual resulta numa redução da metilação do DNA, proteínas e lipídios (Brunton *et al.*, 2007).

Recentemente, foi demonstrado que o metotrexato tem baixa permeabilidade pela membrana de células leveduriformes de *C. albicans*. Contudo, o mesmo pode causar a inibição da biossíntese de ergosterol devido à redução celular de S-adenosilmetionina (SAM), um composto requerido como doador de metil para síntese de fecosterol, precursor do ergosterol fúngico. A redução de SAM bloqueia a via de síntese do ergosterol através da inibição da esterol C-24 metiltransferase (24-SMT), a enzima que catalisa a transmetilação da SAM com zimosterol (Navarro-Martínez *et al.*, 2006). Assim, além do efeito do metotrexato sobre a atividade da catalase em *C. albicans*, pode somar-se o

efeito do mesmo sobre a síntese de ergosterol fúngico, o que pode contribuir para a multiplicidade de mecanismos de resistência descrito para a anfotericina B. Estudos mais específicos devem ser conduzidos no sentido de comprovar *in vivo* esses achados.

Apesar dos resultados com a dacarbazina, a citarabina e a ciclofosfamida não terem apresentado efeito sobre a atividade da catalase em *C. albicans*, estudos mais aprofundados são necessários, uma vez que vários são os mecanismos de resistência aos poliênicos descritos para essa espécie.

Tendo em vista o efeito do metotrexado sobre a catalase em *C. albicans*, um estudo cinético foi realizado com as amostras que apresentaram alterações mais acentuadas quando expostas a esse agente antineoplásico. O efeito do metotrexato sobre os valores de K_m e V_{max} para as três cepas testadas e analisadas pelo gráfico de Lineweaver Burk, apontaram um padrão gráfico de inibição incompetitiva. Descreve-se como padrão de inibição incompetitiva a ação de um inibidor sobre o K_m e V_{max} , onde a crescente concentração de inibidor promove uma diminuição do K_m e V_{max} (Lehninger *et al.*, 2007). Contudo, os resultados demonstraram um aumento crescente de K_m e V_{max} entre as cepas expostas às diferentes concentrações de metotrexato. Baseando-se em conhecimentos literários prévios, o fenômeno observado para o metotrexato pode contribuir para o surgimento de resistência a antifúngicos poliênicos em pacientes com câncer sob tratamento com essa droga (Conly *et al.*, 1992). Estes resultados demonstram, pela primeira vez, o efeito de antineoplásicos sobre a atividade da catalase de *C. albicans*.

4.2. Influência de Íons Metálicos na Atividade da SOD de *Candida albicans*

A presença de íons metálicos como o cobre, o zinco e o manganês tem sido associada a um importante papel na atividade de SOD em leveduras como *C. albicans* (Azevedo *et al.*, 2007). Esses íons metálicos desempenham suas funções participando da remoção de espécies reativas do oxigênio e prevenindo o dano oxidativo a componentes celulares importantes como: DNA e proteínas (Pan & Loo, 2000). Contudo, um efeito contrário pode ser observado quando os íons atingem concentrações muito altas, desempenhando, assim, um efeito tóxico frente às células (Fujs *et al.*, 2005).

Embora grandes avanços ocorreram com respeito ao entendimento da homeostasia de íons metálicos na última década, muito pouco é conhecido a respeito dos fatores que contribuem para a toxicidade dos mesmos (Liang & Zhou, 2007), bem como, a influência de um íon sobre o acúmulo de outros.

Por outro lado, sabe-se que em situações de estresse nas quais é gerado radical superóxido por diferentes vias, há um aumento da atividade da enzima SOD, que atua como um mecanismo de defesa para minimizar o dano oxidativo produzido por esses radicais. Essa enzima destoxifica os radicais superóxidos (O_2^-) através da formação de peróxido de hidrogênio (Martchenko *et al.*, 2004).

Para o presente estudo, a determinação das concentrações dos íons testados foi feita baseada em publicações prévias, sendo a concentração mais baixa testada a encontrada no meio de cultivo utilizado (Greco *et al.*, 1990; Romandini *et al.*, 1992; Fujs *et al.*, 2005; Dönmez & Aksu, 2001).

4.2.1. Íons Cobre

Com referência aos resultados encontrados para o efeito da exposição a íons cobre sobre a atividade de SOD e no acúmulo do metal em *C. albicans*, pode-se observar que a atividade máxima da SOD ocorreu em concentrações diferentes de exposição ao cobre para as três cepas testadas, e o acúmulo do íon ocorreu de acordo com a exposição crescente ao mesmo. A exposição a íons cobre induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) no acúmulo de zinco e manganês na cepa de *Candida albicans* 170, e somente manganês na cepa 172.

De acordo com Krauter e colaboradores (1996), os íons cobre podem afetar a permeabilidade da membrana de células leveduriformes causando uma perda de íons potássio e magnésio. Assim sendo, uma vez que este íon afeta a membrana biológica de fungos, o mesmo pode influenciar o trânsito de outros íons através da mesma. Além disso, tem-se descrito que o cobre pode ser transportado via transportadores específicos e não específicos de baixa afinidade em células leveduriformes. A entrada de cobre, via transportadores de baixa afinidade, ocorre principalmente quando o meio ao qual a célula está exposta é suplementado com concentrações elevadas e não tóxicas do íon (Luk *et al.*, 2003). Valendo-se de que transportadores de baixa afinidade não são específicos ao cobre, podendo também transportar outros íons metálicos divalentes, é que esse íon pode ter causado o acúmulo de manganês em *C. albicans*.

Apesar de ter sido observado no presente estudo que somente uma cepa sofreu a influência de íons cobre sobre o acúmulo de zinco, em microalgas como *Chlorella sp.*, o efeito do cobre demonstra reduzir a ligação e a captação celular de zinco (Franklin *et al.*, 2002).

Estudos demonstrando o acúmulo de cobre em cepas de *C. albicans* expostas a íons metálicos são escassos. Contudo, pode-se observar que os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os encontrados para *Yarrowia lipolytica* (Ito *et al.*, 2007) e *Candida intermedia* (Fujs *et al.*, 2005). O crescente acúmulo do metal pode ter sido observado devido à capacidade das cepas em regular a concentração do mesmo no meio intracelular (Azevedo *et al.*, 2007). Outra hipótese pertinente é que espécies de *Candidas* apresentem resistência aumentada a íons cobre (Cu^{2+}), sendo esta mediada pela maior síntese de metalotioneína e proteínas ligadas ao cobre (Dönmez & Aksu, 2001).

De acordo com os resultados obtidos, foi encontrado um efeito variável do cobre na atividade da SOD. Esse efeito pode não ter sido toxicologicamente claro, uma vez que a atividade da enzima não foi constantemente aumentada ou totalmente perdida. As variações observadas na atividade da SOD exposta às diferentes concentrações de íons podem sugerir um envolvimento do efeito hormético. O efeito hormético pode ser definido como um efeito estimulatório que acontece quando concentrações altas de uma substância têm efeitos negativos, e concentrações baixas produzem efeitos positivos (Calabrese & Baldwin, 2000; Stebbing, 1998). Este efeito pode dever-se a diferentes fatores, como: compostos químicos orgânicos e inorgânicos, deficiência de um elemento

essencial ou estimulação de reações de defesa que levam a ativação geral do metabolismo (Calabrese & Blain, 2005).

A influência dos íons cobre sobre a atividade da SOD encontrado neste estudo vai ao encontro aos achados por outros pesquisadores, que também observaram um aumento na atividade de CuZnSOD em leveduras expostas a íons cobre (Manzano *et al.*, 2000; Santovito *et al.*, 2002). A atividade da SOD tem sido correlacionada com o tratamento do cobre através de co-estimulação dos genes da SOD (Thiele, 1988). Em leveduras, concentrações de cobre superiores a 100 μM podem promover a geração de espécies reduzidas do oxigênio, como: O_2^- , H_2O_2 , e HO^\cdot (Galiazzo *et al.*, 1988). Com a elevação de O_2^- é esperado um aumento da atividade da SOD, pois esta enzima limitará a produção de HO^\cdot via reação de Haber-Weiss, que gera o radical livre HO^\cdot a partir de H_2O_2 e O_2^- catalisado por íons Cu^{2+} (Halliwell & Gutteridge, 1984). Neste estudo ficam claros os efeitos que diferentes concentrações de íons cobre podem exercer sobre a atividade da SOD.

4.2.2. Íons Zinco

Com base nos resultados dos testes de exposição de *C. albicans* a diferentes concentrações de íons zinco, verificou-se que concentrações de zinco superiores a 51,6 μM para *C. albicans* 170, e 34.4 μM para *C. albicans* ATCC 44373 produziram um efeito significativamente negativo no crescimento dessas amostras, inviabilizando as análises de SOD. O efeito inibitório do zinco encontrado neste estudo opõe-se ao descrito na literatura para *Penicillium*

glaucum, no qual cobre, zinco e ferro estimulam o crescimento e formação de biomassa fúngica, tendo somente o manganês um efeito inibitório (Griffin, 1993). Por outro lado, vai ao encontro aos achados de: Azevedo *et al.* (2007), que constataram que o excesso de zinco causa efeitos severos na produção de biomassa e no estresse oxidativo de fungos aquáticos; e Odds (1988) que descreveu que o zinco estimula o crescimento de *C. albicans* até 3 μM , contudo, concentrações superiores a 10 μM podem exercer um efeito contrário. Os resultados obtidos frente à exposição ao zinco podem ser devido ao fato de que, em altas concentrações, esses íons metálicos podem exercer um efeito tóxico, inibindo o desenvolvimento de leveduras. A habilidade do microrganismo em sobreviver em ambientes com altas concentrações desses íons depende da capacidade do mesmo em regular a concentração dos íons no meio intracelular (Gadd, 1993; Azevedo *et al.*, 2007). Como os íons metálicos podem ser substituídos por outros na captação celular (Kayali-Ayar *et al.*, 2002), essa situação pode causar alterações nos processos fisiológicos, como na síntese de enzimas as quais requerem íons metálicos específicos como grupos prostéticos.

Quando observado o acúmulo de metal, pode-se verificar que somente a cepa ATCC 44373 apresentou um acúmulo crescente quando exposto à concentrações também crescentes do metal. Esse fenômeno deve ter ocorrido mais provavelmente devido à habilidade dessa cepa em sobreviver em ambiente com alta concentração desse íon, do que, a capacidade da mesma em regular a concentração do íon no meio intracelular (Gadd, 1993; Azevedo *et al.*, 2007). Esta segunda hipótese é menos viável uma vez que essa cepa acumulou mais

de 15 vezes a concentração do íon quando comparado as outras duas cepas testadas.

A exposição ao zinco induziu a um significativo ($P < 0,01$) aumento nos níveis de cobre, manganês e ferro nas cepas 44373 e 170, e cobre e ferro na cepa 172. Este resultado opõe-se aos achados para *Fusarium equiseti* e *Fusarium acuminatum* na qual a exposição ao zinco influenciou negativamente os níveis de ferro e manganês (Kayali-Ayar & Tarhan, 2003). Diferenças no acúmulo de íons metálicos podem ser atribuídas, entre outros motivos, a eletronegatividade, carga elétrica e raio iônico (Dönmez & Aksu, 2001). Contudo, estudos mais específicos devem ser realizados no sentido de explicar o real efeito de um íon no acúmulo de outro.

Quanto à influência da exposição a íons zinco na atividade de SOD de *C. albicans*, pode-se observar que esse íon promoveu um aumento na atividade da SOD em concentrações diferentes para as três cepas investigadas. As variações e até mesmo a perda da atividade da SOD para as cepas ATCC 44373 e 170 provavelmente ocorreram devido ao efeito tóxico do íon em concentrações superiores a 10 μM (Odds, 1988), uma vez que se observou uma perda significativa de biomassa fúngica e atividade enzimática quando *C. albicans* foi exposta a esse íon. Para as oscilações de SOD observadas nas concentrações que não influenciaram na biomassa fúngica, pode-se citar como possível fator o efeito hormético.

4.2.3. Íons Manganês

Os resultados obtidos para a exposição de *C. albicans* ao manganês apontaram: um crescente acúmulo do íon nas três cepas expostas a ele; uma atividade de SOD significativamente variável de acordo com a exposição ao manganês, tendo o pico máximo de atividade ocorrido na exposição a 4,4 µM de manganês para *C. albicans* ATCC 44373, e 2,96 µM para *C. albicans* 172 e 170. A exposição de *Candida albicans* ao manganês levou a um acúmulo significativo ($P < 0.05$) de cobre e zinco na cepa 44373, zinco e ferro na cepa 170 e somente ferro na cepa de *Candida albicans* 172.

Pode ter favorecido ao crescente acúmulo do íon metálico, nas três cepas testadas, a presença de transportadores específicos e não específicos à captação do mesmo. Entre as proteínas descritas envolvidas na captação do manganês citam-se: Smf1p, localizada na membrana celular, Smf2p, localizada em vesículas intracelulares, Mtm1p, carreador mitocondrial, e mais recentemente, Pho84p, responsável pela captação de manganês ou complexo manganês/fosfato sob condições de toxicidade desse metal (Luk *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003).

Como cofator da MnSOD, esperava-se que o manganês pudesse influenciar na atividade da SOD, uma vez que *C. albicans* é uma exceção entre os eucariontes referente a presença de MnSOD citosólica (Lamarre *et al.*, 2001). As variações encontradas para atividade de SOD demonstram que não há relação direta entre acúmulo do metal e aumento da atividade enzimática. Isto pode ter ocorrido devido ao maior ou menor estresse gerado por esse íon, bem

como, pela ativação de mecanismo de defesa celular a altas concentrações de manganês. Entre os mecanismos de defesa ou de destoxificação descritos para o manganês tem-se: o seqüestro do íon metálico em vacúolos, minimizando, assim, a elevação do mesmo no citosol celular (Li *et al.*, 2001), fato que reduz o caráter tóxico do íon as células leveduriformes; a hidrólise de transportadores de membrana Smf1p por proteases; e o maior efluxo de manganês das células através de vacúolos que transportam os íons do complexo de Golgi até a membrana celular (Luk *et al.*, 2003). Para os resultados obtidos no presente estudo, aplica-se melhor o mecanismo de seqüestro de íons manganês em vacúolos celulares, que minimiza a elevação e a disponibilidade do mesmo no citosol celular.

4.2.4. Íons Ferro

Os resultados para exposição de *C. albicans* a íons ferro demonstraram que: esse metal foi acumulado pelas cepas, sendo que o acúmulo nem sempre foi significativo entre as concentrações de ferro testadas; as crescentes concentrações de ferro testadas promoveram uma influência variável sobre a atividade da SOD; e, os íons ferro influenciaram significativamente ($P < 0,01$) no acúmulo de íons cobre e zinco em *C. albicans* 44373 e 172, e cobre, manganês e zinco na cepa 170.

Para a captação biológica de íons ferro faz-se necessário a redução do mesmo. Em leveduras como *C. albicans*, essa redução é feita por redutases ligadas à membrana celular, que reduzem o ferro na forma férrico (Fe^{+3}) a ferro

na forma ferroso (Fe^{+2}), para posteriormente o íon reduzido ser captado pelas células por uma proteína oxidase complexa e por permease a íon ferroso (Morrissey *et al.*, 1996; Knight *et al.*, 2005). Esse sistema de redução requerido para captação de ferro por *C. albicans* pode ter contribuído para um perfil de acúmulo de ferro diferenciado dos demais íons testados. Contudo, neste estudo fica claro o acúmulo de ferro em cepas de *C. albicans*.

Quanto à atividade da SOD frente as diferentes concentrações de ferro testadas, pode-se sugerir que, em excesso, o ferro livre é potencialmente tóxico para as células, uma vez que o mesmo tem a capacidade de gerar ânion superóxido e radical hidroxil na presença de oxigênio (Radisky & Kaplan, 1999). Como resposta ao estresse oxidativo gerado pelos radicais superóxidos formados, as células de *C. albicans* aumentaram a atividade da SOD. Contudo, o aumento da atividade da SOD não foi linear conforme o acúmulo do metal nas leveduras testadas. Este fenômeno pode ter ocorrido, mais provavelmente, a um efeito hormético do que a um efeito tóxico do metal sobre as cepas.

4.3. Superóxido dismutase em *C. dubliniensis* e *C. albicans* resistentes a anfotericina B e fluconazol

Desde a descoberta da espécie de *C. dubliniensis*, em 1995, diversos estudos fenotípicos e genotípicos foram realizados no sentido de se detectar diferenças entre essa espécie e a de *C. albicans*. Dentre os estudos fenotípicos, pode-se ressaltar os que envolvem fatores de virulência como as enzimas aspartil proteinases, fosfolipases, condroitin sulfatase e hialuronidases. Neste

campo, estudos realizados por De Bernardis *et al.* (2001) e Linares *et al.* (2007), demonstraram que *C. albicans* apresenta uma maior atividade de proteinases que a espécie *C. dubliniensis*. Entretanto, em relação as fosfolipases, condroitin sulfatase e hialuronidases, os estudos anteriormente citados, bem como de outros autores, não apontaram diferenças entre as duas espécies (Linares *et al.*, 2007; Kothavade & Panthaki, 1998; De Bernardis *et al.*, 2001). Em nosso estudo, investigou-se o efeito da resistência ao fluconazol e anfotericina B na atividade da SOD e catalase de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Apesar dessas enzimas não serem consideradas fatores de virulência nos fungos, elas desenvolvem um importante papel na resposta ao estresse oxidativo nas duas espécies estudadas (Lee *et al.*, 1999). A enzima SOD desempenha um importante papel na destoxificação de radical superóxido produzido por NADPH oxidase de células fagocíticas (Giró *et al.*, 2006). A atividade antimicrobiana dessas células deve-se à produção de espécies reativas do oxigênio e espécies reativas do nitrogênio, sendo que a *Candida* possui sistemas de defesa que podem ser ajustados de acordo com a natureza do estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro ou meio (Ikner & Shizaki, 2005). Os resultados encontrados neste estudo demonstraram um aumento significativo na atividade da SOD em *C. dubliniensis* and *C. albicans* resistente a anfotericina B e fluconazol comparado às respectivas células sensíveis aos antifúngicos. Provavelmente, o resultado encontrado para anfotericina B deve-se à peroxidação lipídica produzida por esse antifúngico sobre *Candida* (Sokol-Anderson *et al.*, 1986), que foi exposta a concentrações crescentes do mesmo até atingir resistência a 2 µg/mL.

Normalmente, a anfotericina B nessas concentrações mata as células de *Candida*, entretanto, em condições de resistência induzida, essas células expressam uma maior atividade de SOD. A atividade de SOD foi 1,97 vezes maior nas células resistentes a 2 µg/mL de anfotericina B que nas células sensíveis. Essa ativação provavelmente ocorreu devido ao fato de que, quando *Candida* é exposta a concentrações subletais de peróxido ou superóxido, há uma indução de resposta adaptativa nas células leveduriformes que leva ao aumento da atividade específica de enzimas como catalase, SOD e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Jamieson *et al.*, 1992; Turton *et al.*, 1997). Adicionalmente, podemos pressupor que esse aumento na atividade da SOD, nas cepas resistentes a anfotericina B, possa contribuir para uma maior resistência fúngica ao ataque de células fagocíticas do hospedeiro.

Nossos resultados também apontaram que a atividade de SOD em *C. albicans* sensível e resistente a anfotericina B e fluconazol foi significativamente ($P < 0,0001$) maior que a atividade da SOD encontrada para a espécie de *C. dubliniensis* nos respectivos grupos e fármacos. Este resultado vai ao encontro dos observados para a atividade de proteinases nas mesmas espécies, em que espécie *C. albicans* apresenta maior atividade enzimática que a espécie *C. dubliniensis*.

Para o fluconazol, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito da resistência a esse antifúngico na atividade da SOD de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Nossos resultados indicam que o fluconazol tem um efeito oxidante sobre *Candida* capaz de ativar o sistema antioxidante das células através da

enzima SOD. Esse efeito pode ser verificado uma vez que encontramos uma atividade média de SOD em *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol 1,93 e 1,97 vezes maior que os respectivos grupos sensíveis. De acordo com esse resultado pode-se sugerir, assim como para a anfotericina B, que esse aumento da atividade da SOD contribui para uma maior resistência ao ataque de células fagocíticas.

4.4. Catalase em *C. dubliniensis* e *C. albicans* resistentes a anfotericina B e fluconazol

De acordo com os resultados encontrados em nosso estudo para a catalase, pode-se verificar que, assim como o encontrado para SOD, a atividade da catalase em *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol e anfotericina B foram maiores que os encontrados para os respectivos grupos sensíveis. A catalase é uma enzima capaz de converter peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (Michiels *et al.*, 1994). Em *Candida*, essa enzima tem sido citada como um mecanismo de resistência a anfotericina B (Sokol-Anderson *et al.*, 1986), bem como, envolvida no processo de conversão da fase leveduriforme para fase filamentosa (Nakagawa, 2008). Apesar de seu reconhecimento nos processos citados, a mesma não foi estudada, até o presente momento, em células de *Candida albicans* e *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol. Nossos resultados demonstraram que a atividade da catalase em *Candida albicans* e *C. dubliniensis* resistentes a anfotericina B foi, respectivamente, 2 e 1,77 vezes maior que a encontrada para seus grupos

sensíveis. No grupo de *C. dubliniensis* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol foram encontrados, respectivamente, 1,58 e 1,57 vezes mais atividade de catalase que nos respectivos grupos sensíveis. Esses resultados demonstram um comportamento similar na atividade da catalase e SOD quando as cepas de *Candida* sofrem indução de resistência ao fluconazol e anfotericina B, bem como, contribuem para o fato de que, quando essas leveduras são expostas a um dano oxidativo, as mesmas demonstram uma resposta adaptativa ao estresse (Turton *et al.*, 1997). Levando-se em consideração dados da literatura, espera-se um aumento da atividade da catalase quando ocorrido um aumento na atividade da SOD, uma vez que o produto da SOD é substrato para a enzima catalase (Johnson & Giulivi, 2005). Neste estudo, confirmamos a ocorrência desse efeito para *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Assim como o encontrado para SOD, a atividade da catalase foi significativamente ($P < 0,0001$) maior nos grupos de *C. albicans* sensível e resistente ao fluconazol e anfotericina B quando comparados aos respectivos grupos de *C. dubliniensis*. Esse fato sugere que as cepas de *C. albicans* apresentam uma maior resistência ao estresse oxidativo que as de *C. dubliniensis* e assemelham-se aos encontrados para atividade de proteinases nas mesmas espécies (Linares *et al.*, 2007).

V. CONCLUSÕES

Capítulo 1: Quanto à influência dos quatro antineoplásicos testados sobre a atividade da catalase de *C. albicans*, somente o metotrexato provocou um aumento da atividade dessa enzima. A análise cinética indicou um aumento do K_m e a V_{max} da catalase, demonstrando que esse fármaco merece especial atenção devido a uma maior possibilidade de resistência cruzada a anfotericina B.

Capítulo 2: A exposição de *C. albicans* a diferentes concentrações de íons metálicos como cobre, zinco, manganês e ferro promoveu um efeito variável na atividade da SOD dessa espécie. As variações observadas na atividade da SOD sugerem o envolvimento de um mecanismo hormético. O efeito de um íon sobre o acúmulo dos demais ficou claro, contudo, estudos mais aprofundados e específicos são necessários para o entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo. Apenas para a exposição a íons zinco foi observado uma influência na produção de biomassa em *Candida albicans*.

Capítulo 3: A indução de resistência aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol em *C. albicans* e *C. dubliniensis* induziu a um aumento equivalente na atividade de catalase e SOD nas duas espécies estudadas. Esse resultado sugere a indicação de estresse oxidativo gerado pelas duas drogas, e é importante uma vez que o aumento na atividade dessas enzimas podem refletir em uma maior

resistência dessas células ao ataque de células do hospedeiro. Os resultados também apontaram que *C. albicans* apresenta maior atividade dessas enzimas que *C. dubliniensis*, o que sugere que *C. albicans* é mais resistente ao estresse oxidativo.

VI. PERSPECTIVAS

A partir dos conhecimentos gerados neste trabalho tem-se como perspectivas:

1. Verificar o efeito de antineoplásicos na atividade da catalase em *C. albicans* na fase filamentosa.
2. Verificar o efeito de antineoplásicos na atividade da glutathione peroxidase em *C. albicans* na fase filamentosa.
3. Verificar o efeito de associações de antineoplásicos na atividade de catalase de *C. albicans*.
4. Verificar se a atividade da catalase, SOD e glutathione peroxidase são semelhantes em *C. albicans* cultivada na fase leveduriforme, filamentosa e esferoplastos.
5. Investigar o efeito de antineoplásicos na proteína carbonil e NTPDase de esferoplastos.
6. Investigar o efeito de íons ferro na atividade de catalase em *Candida albicans*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anaissie, E.J., Rex, J.H., Uzun, O., Vartivarian, S. (1998). Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. *Am. J. Med.* 104: 238–245.

Athar, M.A., & Winner, H.I. (1971). The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics *in vitro*. *J. Med. Microbiol.* 4: 505-507.

Azevedo, M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rodrigues, F., Cássio, F. (2007). Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Sci. Total Environ.* 377: 233-243.

Bagg, J., Sweeney, M.P., Lewis, M.A., Jackson, M.S., Coleman, D., Al, M.A., Baxter, W., McEndrick, S., McHugh, S. (2003). High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat. Med.* 17: 477-481.

Bagg, J., Sweeney, M.P., Davies, A.N., Jackson, M.S., Brailsford, S. (2005). Voriconazole susceptibility of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *J. Med. Microbiol.* 54: 959-964.

Batey, M.A., Wright, J.G., Azzabi, A., Newell, D.R., Lind, M.J., Calvert, A.H., Boddy, A.V. (2002). Population pharmacokinetics of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF). *Eur. J. Cancer.* 38: 1081-1089.

Bedini, A., Venturelli, C., Mussini, C., Guaraldi, G., Codeluppi, M., Borghi, V., Rumpianesi, F., Barchiesi, F., Esposito, R. (2006). Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 75-80.

Bodenhoff, J. (1968). Resistance studies of *Candida albicans* with special reference to two patients subjected to prolonged antimycotic treatment. *Odontol. Tidskr.* 76: 279-294.

Bodey, G.P. (1984). Candidiasis in cancer patients. *Am. J. Med.* 77: 13-19.

Bodey, G., Bueltmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., Mall, G., Martino, P., Meunier, F., Milliken, S., Naoe, S., Okudaira, M., Scevola, D., Van't Wout, J. (1992). Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 99-109.

Bodey, G.P., Mardani, M., Hanna, H.A., Boktour, M., Abbas, J., Girgawy, E., Hachem, R.Y., Kontoyiannis, D.P., Raad, I.I. (2002). The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am. J. Med.* 112: 380-385.

Böhme, A., Ruhnke, M., Buchheidt, D., Cornely, O.A., Einsele, H., Enzensberger, R., Hebart, H., Heinz, W., Junghanss, C., Karthaus, M., Krüger, W., Krug, U., Kubin, T., Penack, O., Reichert, D., Reuter, S., Silling, G., Südhoff, T., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G. (2009). Treatment of invasive fungal infections in cancer patients-recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann. Hematol.* 88: 97-110.

Brajtburg, J., Elberg, S., Kobayashi, G.S., Medoff, G. (1988). Interference with effects of amphotericin B on *Candida albicans* cells by 2-chloroethyl-1-nitrosoureas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 327-30.

Brunton, L.L., Lazo, J.S., & Parker, K.L. (2007). GOODMAN & GILMAN As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11^a ed, Mcgraw Hill.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave P., Herrero E., Ros J. (2000). Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 27393-27398.

Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A. (2000). History of chemical hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 19: 2-31.

Calabrese, E.J., Blain, R. (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormetic database: an overview. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202: 289-301.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A.P., Botstein, D., Brown, P.O., Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 39: 595-605.

Chabner, B.A., Calabresi, P. (1995). Em *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 192-208.

Colombo, A.L., Guimarães, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 599-607.

Conly, J., Rennie, R., Johnson, J., Farah, S., Hellman, L. (1992). Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 165: 761-764.

Costa, V., Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22: 217-246.

Coursin, D.B., Cihla, H.P., Will., J.A., McCreary., J.L. (1985). Adaptation to chronic hyperoxia. Biochemical effects and the response to subsequent lethal hyperoxia. *Am Rev Respir Dis* 135: 1002-1006.

Cuenca-Estrella, M., Rodriguez, D., Almirante, B., Morgan, J., Planes, A.M., Almela, M., Mensa J., Sanchez, F., Ayats, J., Gimenez, M., Salvado, M., Warnock, D.W., Pahissa, A., Rodriguez-Tudela, J.L. (2005). In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 194-199.

Davidson, J.F., Whyt, B., Bissinger, P.H., Schiestl, R.H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5116-5121.

Davies, A.N., Brailsford, S.R., Beighton, D. (2006). Oral candidosis in patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 42: 698-702.

Davies, A.N., Brailsford, S.R., Beighton, D., Shorthose, K., Stevens, V.C. (2008). Oral Candidosis in Community-Based Patients with Advanced Cancer. *J. Pain Symptom Manage.* 35: 508-514.

De Bernardis, F., Sullivan, P. A. & Cassone, A. (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 39: 303-313.

De Gregorio, M.W., Lee, W.M.F., Linker, C.A., Jacobs, R.A., Ries, C.A. (1982). Fungal infections in patients with acute leukemia. *Am. J. Med.* 73: 543-548.

De Jonge, M.E., Huitema, A.D., van Dam, S.M., Rodenhuis, S., Beijnen, J.H. (2005). Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites 4-hydroxycyclophosphamide, 2-dechloroethylcyclophosphamide, and phosphoramidate mustard in a high-dose combination with Thiotepa and Carboplatin. *Ther. Drug Monit.* 27: 756-65.

De Nollin, S., Van Belle, H., Goossens, F., Thone, F., Borgers, M. (1977). Cytochemical and biochemical studies of yeasts after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 11: 500-513.

Dick, J.D., Merz, W.G., Saral, R. (1980). Incidence of polyene resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 158-163.

Dick, J.D., Rosengard, B.R., Merz, W.G., Stuart, R.K., Hitchins, G.M., Saral, R. (1985). Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. *Ann. Intern. Med.* 102: 67-68.

Dönmez, G., & Aksu, Z. (2001). Bioaccumulation of Copper (II) and Nickel (II) by the non-adapted growing *Candida sp.* *Wat. Res.* 6: 1425-1434.

Drutz, D.J., Woods, R.A. (1973). Development of ergosterol – deficient amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* during therapy of *Candida pyelonephritis*. *Clin. Res.* 21: 270.

Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M., Bolotin-Fukuhara, M. (2000). A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol. Microbiol.* 36: 830-845.

Egorin, M.J., Forrest, A., Belani, C.P., Ratain, M.J., Abrams, J.S., Van Echo, D.A. (1989). A limited sampling strategy for cyclophosphamide pharmacokinetics. *Cancer Res.* 49: 3129-3133.

Espinel-Ingroff, A., Warnock, W.D., Vazquez, J.A., Arthington-Skaggs, B.A. (2000). *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med. Mycol.* 38: 293-304.

Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., Barón, M.G. (2003). Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat. Rev.* 29: 515-523.

Fekete-Forgács, K., Kis., B., Nagy, G., Lenkey B. (1999). Effect of fluconazole on the growth and adhesion of *Candida albicans* in the presence of antineoplastic agents. *J. Basic Microbiol.* 39: 305-310.

Fischer, J.F., Henson, D.M. (1985). Amphotericin B resistance in *Candida*. *Ann. Intern. Méd.* 102: 563-564.

Fonseca, J.B. (1980). Candidíase: Aspectos de interesse odontológico. USP Ed., São Paulo, 130-146.

Franca, M.B., Panek, A.D., & Eleutherio, E.C. (2005). The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones.* 10: 167-70.

Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim R.P., Petocz, P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 2412-2422.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

Fujs, S., Gazdag, Z., Poljsak, B., Stibilj, V., Milaeie, R., Pesti, M., Raspor, P., Batie, M. (2005). The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *J. Basic. Microbiol.* 45: 125-135.

Gadd, G.M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60.

Galiazzo, F., Schiesser, A. & Rotilio G. (1988). Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. *Biochim. Biophys. Acta.* 965: 46-51.

Ghannoum, M.A., Janini, G., Khamis, L., Radwan, S.S. (1986). Dimorphism-associated variations in the lipid composition of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2367-2375.

Giro, M., Carrillo, N. & Krapp, A.R. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin- NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 152: 1119-1128.

Grant, C.M. (2001). Role of glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* 39: 533-541.

Greco, M.A., Hrab, D.I., Magner, W., Kosman, D.J. (1990). Cu,Zn Superoxide Dismutase and Copper Deprivation and Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172: 317-325.

Griffin, D.H. (1993). *Fungal physiology*. 2nd Ed. Wiley-Liss.

Groll, A.H., Shah, P.M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Nübling, G., Hübner, K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* 33: 23–32.

Grosflam, J., Weinblatt, M.E. (1991). Methotrexate: mechanism of action, pharmacokinetics, clinical indications, and toxicity. *Curr. Opin. Rheumatol.* 3: 363-8.

Guinet, R., Chasnas, J., Goullier, A., Bonnefoy, G., Ambroise-Thomas, P. (1983). Fatal septicemia due to amphotericin B resistant *Candida lusitanae*. *J. Clin. Microbiol.* 18: 443-444.

Gunasekaran, S., Imbayagwo, M., McDonald, L., Gunasekaran, M., Manavathu, E. (1995). Influence of carbon and nitrogen sources on glutathione catabolic enzymes in *Candida albicans* during dimorphism. *Mycopathologia.* 131: 93-97.

Hajjeh, R.A., Sofair, A.N., Harrison, L.H., Lyon, G.M., Arthington-Skaggs, B.A., Mirza, S.A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Benjamin, L.E., Sanza, L.T., Huie, S., Yeo, S.F., Brandt, M.E., Warnock, D.W. (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1519-27.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2004). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford University Press, New York.

Hamilton-Miller, J.M. (1972). Physiological properties of mutagen-induced variants of *Candida albicans* resistant to polyene antibiotics. *J. Med. Microbiol.* 5: 425-40.

Hamilton-Miller, J.M. (1984). Antimicrobial activity of 21 anti-neoplastic agents. *Br. J. Cancer.* 49: 367-369.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., & Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 92: 3007-3017.

Hitchcock, C.A. (1991). Cytochrome-P-450 dependent 14- α -sterol demethylase of *Candida albicans* and its interactions with azole antifungals. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 782-787.

Hwang, C.S., Rhie, G., Kim, S.T., Kim, Y.R., Huh, W.K., Baek, Y.U., Kang, S.O. (1999). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1427: 245-255.

Ikner, A. & Shizaki, K. (2005). Yeast signalling pathways in the oxidative stress response. *Mut. Res.* 569: 13-17.

Ito, H., Inouhe, M., Tohyama, H., Joho, M. (2007). Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *BioMetals.* 20: 773-780.

Jakab, K., Kelemen, E., Prinz, G., Török, I. (1990) Amphotericin – resistant invasive hepatosplenic candidiasis controlled by fluconazole. *Lancet.* 335: 473-474.

Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 1511-1527.

Jamieson, D.J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174: 6678-6681.

Jamnik, P., & Raspor, P. (2003). Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 316-323.

Jensen, L.T., Ajua-Alemanji, M., & Culotta, V.C. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278: 42036-42040.

Johnson, F. & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.* 26: 340-352.

Johnson, E.M., Warnock, D.W., Lucker, J., Porter, S.R., Scully, C. (1995). Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 103-114.

Júnior, L.R., Höehr, N.F., Vellasco, A.P., Kubota, L.T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova.* 24: 112-119.

Kayali-Ayar, H., Ozer, N. & Tarhan, L. (2002). Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Arch. Biochem. Biophys.* 400: 265-272.

Kayali-Ayar, H., & Tarhan, L. (2003). Influence of zinc and copper ions on metals transport, antioxidant system responses and membrane LPO levels of *F. equiseti* and *F. acuminatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 828-835.

Karabinis, A., Hill, C., Leclercq, B., Tancredi, C., Baume, D., Andremont, A. (1988). Risk factors for candidemia in cancer patients: a case-control study. *J. Clin. Microbiol.* 26: 429-432.

Kerridge, D., Nicholas, R.D. (1986). Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *C. glabrata*. J. Antimicrob. Chemother. 18: 39-49.

Kelling, P.L., Smith, L.L. (1982). Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. Biochem. Pharmacol. 31: 3243-3249.

Knight, S.A., Vilaire, G., Lesuisse, E., Dancis, A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. Infect. Immun. 73: 5482-5492.

Kothavade, R.J., & Panthaki, M.H. (1998). Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. J. Med. Microbiol. 47: 99-102.

Kovacicova, G., Hanzen, J., Pisarcikova, M., Sejnova, D., Horn, J., Babela, R., Svetlansky, I., Lovaszova, M., Gogova, M., Krcmery, V. (2001). Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida spp.* in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. J. Infect. Chemother. 7: 45-8.

Krauter, P., Martinelli, R., Williams, K., Martins, S. (1996). Removal of Cr(VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. Biodegradation 7: 277-286.

Lamarre, C., LeMay, J.D., Deslauriers, N., Bourbonnais, Y. (2001). *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. J. Biol. Chem. 276: 43784-43791.

Land, G.A., Hulme, K.L. Graffin, W.L. (1980). The effect of selected antineoplastic agents on the morphology of *Candida albicans* 5865. *Can. J. Microbiol.* 26: 812-818.

Larsh, H.W. (1962). The prevalence and the drug resistance of *H. capsulatum* and *C. albicans* with pulmonary histoplasmosis. *Lab. Invest.* 11: 1140-1145.

Le Guenec, R., Reynes, J., Mallié, M., Pujol, C., Janbon, F., Bastide, J.M. (1995). Fluconazole and itraconazole resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis and antifungal susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2732-2737.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garini, J., Labarre, J., Toledano, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. *J. Biol. Chem.* 274: 16040–16046.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2007). *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 4^a ed.

Li, L., Chen, O.S., McVey Ward, D., Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* 276: 29515-29519.

Liang, Q., & Zhou, B. (2007). Copper and Manganese Induce Yeast Apoptosis via Different Pathways. *Mol. Biol. Cell.* 18: 4741-4749.

Liliemark, J. & Peterson, C. (1991). Pharmacokinetic optimization of anticancer therapy. *Clin. Pharmacokinetic.* 21: 213-231.

Linares, C.E.B., Loreto, E.S., Silveira, C.P., Pozzatti, P., Scheid, L.A., Santurio, J.M., Alves, S.H. (2007). Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 49: 203-206.

Longo, V.D., Gralla, E.B., & Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* 271: 12275-12280.

Luk, E., Jensen, L.T., & Culotta, V.C. (2003). The many highways for intracellular trafficking of metals. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8: 803-809.

Luk, E., Yang, M., Jensen, L.T., Bourbonnais, Y., Culotta, V.C. (2005). Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280: 22715-22720.

Lushchak, V.I., and Gospodaryov, D.V. (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Int.* 29: 187-92.

Manavathu, M., Gunasekaran, S., Porte, Q., Manavathu, E., Gunasekaran, M. (1996). Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 42: 76-79.

Manzano, M., Cocolin, L., Citterio, B., Conte, L., Bertoldi, M., Comi, G., Santovito, G., Beltramini, M., Salvato, B. (2000). Biochemical responses in a *Candida famata* strain adapted to high copper Concentrations. *BioMetals.* 13: 251-259.

Martchenko, M., Alarco, A., Harcus, D., Whiteway, M. (2004). Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced *SOD5* Gene. *Mol. Biol. Cell.* 15: 456-467.

Martin, M.V., Dindsdale, R.C.W. (1982). Nystatin resistance of *Candida albicans* from 2 cases of oral candidiasis. *Br. J. Oral Surg.* 20: 294-298.

Mathew, B.P., and Nath, M. (2009). Recent Approaches to Antifungal Therapy for Invasive Mycoses. ChemMedChem. **[In Press]**.

Mays, S.R., Bogle, M.A., Bodey, G.P. (2006). Cutaneous Fungal Infections in the Oncology Patient: Recognition and Management. Am. J. Clin. Dermatol. 7: 31-43.

McCune, J.S., Salinger, D.H., Vicini, P., Oglesby, C., Blough, D.K., Park, J.R. (2009). Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: a report from the children's oncology group. J. Clin. Pharmacol. 49: 88-102.

Mensa, J., Pitart, C., & Marco, F. (2008). Treatment of critically ill patients with candidemia. Int. J. Antimicrob. Agents. 32: S93-S97.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 17: 235-248.

Moore, M.J., & Erlichman, C. (1987). Therapeutic drug monitoring in Oncology problems and potential in antineoplastic therapy. Clin. Pharmacokinet. 13: 205-227.

Moran, G.P., Sullivan, D.J., Henman, M.C., McCreary, C.E., Hassington, B.J., Shanley, D.B., Coleman, D.C. (1997). Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 617-623.

Morikawa, N., Mori, T., Abe, T., Ghoda, M., Takeyama, M., Hori, S. (1997). Pharmacokinetics of methotrexate in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann. Pharmacother.* 31: 1153-6.

Morrissey, J.A., Williams, P.H. & Cashmore, A.M. (1996). *Candida albicans* has a cell-associated ferric-reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. *Microbiology* 142: 485-492.

Nakagawa, Y. (2008). Catalase gene disruptant of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is defective in hyphal growth, and a catalase-specific inhibitor can suppress hyphal growth of wild-type cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 16-24.

Navarro-Martínez, M.D., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2006). Antifolates as antimycotics? Connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28: 560-567.

Nolte, F.S., Parkinson, T., Falconer, D.J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R., Wingard, J.R. (1997). Isolation and Characterization of Fluconazole- and Amphotericin B-Resistant *Candida albicans* from Blood of Two Patients with Leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 196-199.

Odds, F.C. *Candida and Candidosis.* (1988). 2 ed. London, Baillière Tiddall, p. 468.

Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Pelaez, F., Diez, M.T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, R., Harris, G., Tsiouras, A., Wilson, K., Kurtz, M.B. (2000). Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -D-Glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 368-377.

Pan, Y.J. & Loo, G. (2000). Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jukat T-Lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 824-30.

Pappagianis, D., Collins, M.S., Hector, R., Remington, J. (1979). Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 123-126.

Parkinson, T., Falconer, D.J., & Hitchcock, C.A. (1995). Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1696-1699.

Patel, P.V., & Johnston, J.R. (1968). Dominant mutation for nystatin resistance in yeast. *Appl. Microbiol.* 16: 164-165.

Pfaller, M.A., & Diekema, D.J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4419-4431.

Pratt, W.B., Ruddon, R.W. (1979). *The anticancer drugs*. New York: Oxford University Press, p. 323.

Presta, A., & Stillman, M.J. (1997). Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu(I)-metallothionein in intact yeast cells. *J. Inorg. Biochem.* 66: 231-240.

Radisky, D., & Kaplan, J. (1999). Regulation of Transition Metal Transport across the Yeast Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 4481-4484.

Reid, J.M., Kuffel, M.J., Miller, J.K., Rios, R., Ames, M.M. (1999). Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin. Cancer. Res.* 5: 2192-2197.

Rex, J.H., Rinaldi, M.G., & Pfaller, M.A. (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazol. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 1-8.

Rhie, G.E., Hwang, C.S., Brady, M.J., Kim, S.T., Kim, Y.R., Huh, W.K., Baek, Y.U., Lee, B.H., Lee, J.S., Kang, S.O. (1999). Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426: 409-419.

Roehrs, R., Peralba, M.C.R., Henriques, J.A.P., Saffi, J., Ramos, A.L.L.P., Benfato, M.S. (2004). Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1 Δ sod2 Δ double mutants against oxidative damage. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 159-165.

Romandini, P., Tallandini, L., Beltramini, M., Salvato, B., Manzano, M., de Bertoldi, M., Rocco, G.P. (1992). Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 103: 255-262.

Sable, C.A., Strohmaier, K.M., and Chodakewitz, J.A. (2008). Advances in Antifungal Therapy. *Annu. Rev. Med.* 59: 361-79.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., Bille, J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 2378-2386.

Santovito, G., Salvato, B., Manzano, M., Beltramini, M. (2002). Copper adaptation and methylotrophic metabolism in *Candida boidinii*. *Yeast.* 19: 631-640.

Sidrim, J.J.C., and Moreira, J.L.B. (1999). Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Sidrim, J.J.C., & Rocha, M.F.G. (2004). Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Editora Guanabara Koogan, São Paulo.

Shaberg, D.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am. J. Med. 91: 72S-75S.

Spellberg, B.J., Filler, S.G., Edwards, Jr J.E. (2006). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin. Infect. Dis. 42: 244-251.

Sokol-Anderson, M.L., Brajtburg, J., & Medoff, G. (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 154: 76-83.

Stebbing, A.R.D. (1998). A theory for growth hormesis. Mutat. Res. 403: 249-258.

Sullivan, D.J., Moran, G., Donnelly, S., Gee, S., Pinjon, E., McCatan, B., Shanley, D.B., Coleman, D.C. (1999). *Candida dubliniensis*: an update. Rev. Iberoam. Micol. 16: 72-76.

Sullivan, D., and Coleman, D. (1998). *Candida dubliniensis*: characterization and identification. J. Clin. Microbiol. 36: 329-334.

Surarit, R., & Shepered, M.G. (1987). The effects of azole and polyene antifungals on the membrane enzymes of *C. albicans*. J. Med. Vet. Mycol. 25: 403-413.

Stephen, D.W.S., & Jamieson, D.J. (1996). Glutathione is an important molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 141: 207-212.

Thomas, A.H. (1986). Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. J. Antimicrob. Chemother. 17: 269-279.

Thiele, D. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. Mol. Cell Biol. 8: 2745-2752.

Tian, H., & Cronstein, B.N. (2007) Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Bull. NYU Hosp. Jt. Dis. 65: 168-73.

Turton, H.E., Dawes, I.W. & Grant, C.M. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. J. Bacteriol. 179: 1096-1101.

Vanden Bossche, H., Marichal, P., & Odds, C.F. (1994). Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. Trends Microbiol. 2: 393-400.

Vanden Bossche, H., Willemsens, G., & Marichal, P. (1987). Anti-candida drugs – the biochemical basis for their activity. CRC Crit. Rev. Microbiol. 24: 57-72.

Vázquez, N., Walsh, T.J., Friedman, D., Chanock, S.J., Lyman, C.A. (1998). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. Infect. Immun. 66: 145-150.

Viarengo, A., & Nott, J.A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 104: 355-372.

Walsh, T.J., Pauwn, B., Anaissie, E., Martino, P. (1994). Recent advances in the epidemiology, prevention and treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 33-41.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A. (2000). Comparative Antioxidant Defenses in Vertebrates - Emphasis on Fish and Mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7: 37-45.

Wingard, J.R. (1994). Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.* 19: 49-53.

Wingard, J.R. (1995). Importance of *Candida* spp. other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 20: 115-25.