

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Geração de espécies reativas por fluconazol em *Candida glabrata*: ativação de enzimas antioxidantes e dano oxidativo no DNA

Camila Donato Mahl

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Geração de espécies reativas por fluconazol em *Candida glabrata*: ativação de enzimas antioxidantes e dano oxidativo no DNA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profª Drª Mara da Silveira Benfato

“... Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para o outro, como a beleza e a coragem. O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que os deuses decidiram que o doador pode retê-lo mesmo que o tenha transmitido...”

Dedico esse trabalho à minha amada família e aos meus amigos do coração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ricardo e Fátima, e a minha irmã, Fernanda, pelo apoio em todos os momentos, desde o início dessa caminhada até o presente, que não é necessariamente o final. Toda e qualquer palavra de incentivo vinda de vocês tornou tudo mais fácil. Da mesma maneira, agradeço aos meus avós, tios e primos, que mesmo distantes, permanecem sempre presentes torcendo por mim.

Aos meus amigos e amigas, de perto e de longe, do dia a dia de trabalho ou só dos passeios de final de semana, que me impulsionam na busca pelos meus ideais, dividindo momentos bons e ruins comigo. A amizade de vocês é essencial na minha vida.

Ao Diego, pela companhia tão agradável, pela paciência nos momentos de inconstância, pelo carinho sempre demonstrado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato, pelas portas abertas para a realização do meu sonho de fazer mestrado e pelos ensinamentos ao longo desses dois anos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo: Alexey, Ártur, Cléber, Diego, Fer, Jordana, Mélaney, Mile, Nanda, Priscila e Tiago, pela amizade, pela ajuda sempre prestada, pelos momentos de descontração que tornaram mais alegre essa etapa da minha vida profissional.

Aos professores integrantes da comissão de acompanhamento, Profa. Dra. Janette Palma Fett e Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria, pelas contribuições ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, que me iniciou na vida científica e a quem eu serei sempre grata. Da mesma forma, aos demais amigos do LAPEMI/UFSM, com os quais construí amizades sólidas e verdadeiras.

À professora Dra. Patrícia Valente, pelas correções e contribuições no artigo científico.

À Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva, pelas correções e contribuições na dissertação.

Aos professores que compõem a banca de defesa, pela disponibilidade para avaliar esse trabalho e pelas contribuições.

Aos colegas do laboratório 204, pelas dicas e equipamentos sempre compartilhados.

A CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos.

E, finalmente, a mim mesma. Pela dedicação desde o início dos estudos para a prova de seleção do mestrado até o desenvolvimento e defesa desta dissertação, pelo empenho na realização dos ensaios experimentais e por finalizar mais uma etapa na minha vida profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Candida</i> spp. e as candidíases	13
1.2. A espécie <i>Candida glabrata</i>	14
1.3. Antifúngicos azólicos	17
1.3.1. O fluconazol e a resistência a esse azólico em <i>Candida glabrata</i>	18
1.4. Estresse oxidativo e <i>Candida</i> sp.	20
1.4.1. Geração de espécies reativas pelos antifúngicos azólicos	24
1.4.2. A relação entre resposta ao estresse oxidativo e resistência a antifúngicos	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
Artigo científico a ser submetido para a revista <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> . .	28
4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR	56
5. RESULTADO SUPLEMENTAR	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	64
8. PERSPECTIVAS	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CURRÍCULO LATTES	79

RESUMO

A participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) no mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos, bem como a relação entre resistência aos antifúngicos e resposta ao estresse oxidativo, têm sido sugeridos. Entretanto, os dados ainda são inconclusivos e diferem entre os micro-organismos. Neste estudo estão apresentados os resultados da geração de ERO pelo fluconazol em isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes a esse antifúngico e a resposta antioxidante da levedura. Nesses isolados, tratados e não tratados com fluconazol em concentração subinibitória, de acordo com sua concentração inibitória mínima (CIM), até fase de crescimento estacionário, foi avaliado se o fluconazol geraria ERO. Subsequentemente, foram analisadas as defesas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathiona-S-transferase (GST), consumo de peróxido de hidrogênio e glutathiona total, bem como possível dano oxidativo causado pelo fluconazol em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e os níveis de nitritos e nitratos. Os resultados mostram que nos isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, na presença do antifúngico, houve um aumento da geração ERO e maior atividade enzimática da GPx e SOD comparada a dos isolados não tratados com fluconazol, não havendo diferença estatística entre isolados sensíveis e resistentes nesses três parâmetros citados. Em relação à enzima GST, os isolados sensíveis mostraram maior atividade enzimática comparada aos resistentes, e quando as células sensíveis foram tratadas com fluconazol, a atividade da GST diminuiu. O fluconazol não induziu dano oxidativo em proteínas e em lipídeos, entretanto foi observado dano oxidativo ao DNA. Diante disso, sugere-se que o fluconazol gera ERO como parte do seu mecanismo antifúngico em *C. glabrata* em fase de crescimento estacionário, induzindo dano oxidativo no DNA. Como resposta, observa-se aumento na atividade enzimática da SOD e da GPx na levedura. O entendimento da resposta antioxidante de leveduras patogênicas tem importante interesse clínico, uma vez que o desenvolvimento racional de novas drogas antifúngicas requer conhecimento do metabolismo fúngico.

Palavras-chave: *C. glabrata*, fluconazol, geração de ERO, resposta antioxidante.

ABSTRACT

The participation of reactive oxygen species (ROS) in azoles antifungal mechanism of action has been suggested, as well as the relation between antifungal resistance and oxidative stress response. However, data are still inconclusive and differ between microorganisms. This study presents the results of ROS generation by fluconazole in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains and their antioxidant response. It was evaluated whether fluconazole generates ROS in those isolates treated and untreated with fluconazole at sub-inhibitory concentration according to their minimal inhibitory concentration (MIC). This treatment was conducted until stationary growth phase was reached. Subsequently, the antioxidant defenses glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), consumption of hydrogen peroxide and total glutathione, the possible oxidative damage in lipids, proteins and nucleic acids and the levels of nitrites and nitrates were analyzed. Results showed increased ROS generation in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated with fluconazole, and also higher GPx and SOD enzymatic activity, compared to untreated cells. No statistical difference of those three parameters was observed between susceptible and resistant strains. In relation to GST, susceptible strains demonstrated higher activity compared to the resistant ones, and when susceptible cells were treated with fluconazole the GST activity decreased compared to untreated. Fluconazole did not induce oxidative damage in proteins and in lipids, however oxidative DNA damage was observed. Therefore, it is suggested that fluconazole generates ROS as part of its antifungal mechanism in *C. glabrata* at stationary growth phase, inducing oxidative DNA damage. In response, there was increase in the enzymatic activity of SOD and GPx in yeast. The understanding of the pathogenic yeast antioxidant response has important clinical interest, since the rational development of new antifungal drugs requires knowledge about the fungal metabolism.

Key-words: *C. glabrata*, fluconazole, ROS generation, antioxidant response.

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

8OxodG – 8-oxo-7-hidro-2'-desoxiguanosina

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATP – Adenosina trifosfato

CG – Citosina-Guanina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DCFH-DA – Diacetato de diclorofluoresceína

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

EPA – Adesina epitelial

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GST – Glutathione-S-transferase

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-ECD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

MDA – Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Prxs – Peroxirredoxinas

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Geração de ERO por fluconazol medida por Microscopia Confocal.	Página 45
Figura 2. Atividade enzimática da GPx, SOD e GST.	Página 46
Figura 3. Níveis de 8-OxodG.	Página 47
Figura 4. Curva de crescimento dos isolados.	Página 58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. MIC do fluconazol e concentração subinibitória de crescimento dos isolados. Página 48

Tabela 2. Ensaios de estresse oxidativo sem diferença estatística. Página 49

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida* spp. e as candidíases

Desde o início de 1980 os fungos têm emergido como importantes causas de doenças humanas, especialmente entre os imunocomprometidos e hospitalizados com doenças graves subjacentes (Pfaller e Diekema, 2007). Apesar da ampla pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimicóticos, o número de infecções fúngicas continua crescendo (Falagas, Roussos e Vardakas, 2010). Dentre os fungos patogênicos responsáveis por essas infecções estão as espécies do gênero *Candida*, cuja incidência tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, principalmente devido a epidemia da AIDS, ao surgimento de uma população cada vez mais envelhecida, ao maior número de pacientes imunodeprimidos, como os transplantados, e ao amplo uso de antibióticos, antineoplásicos e corticoides, além da exposição a procedimentos invasivos e cateteres endovenosos (Passos *et al.*, 2005; Filler, 2012; Silva *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013).

Candida albicans foi, por muito tempo, descrita como a causadora da maioria das infecções fúngicas humanas, sendo a levedura mais frequentemente isolada em amostras biológicas (Calderone, 2002). Entretanto, o cenário epidemiológico mundial vem mostrando que as infecções por *Candida* não-*albicans* são emergentes e entre as espécies patogênicas mais importantes depois de *C. albicans* estão, em ordem alfabética, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (Haynes, 2001). O envolvimento dessas espécies não-*albicans* em candidíases pode estar parcialmente relacionada aos métodos diagnósticos mais aprimorados, como técnicas moleculares, mas também ao fato de que tais espécies não-*albicans* demonstram elevado nível de resistência aos antifúngicos tradicionais comparadas a *C. albicans*, culminando na persistência das espécies não-*albicans* nas infecções (Massonet *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

No homem, as espécies de *Candida* fazem parte da microbiota da pele, do trato gastrointestinal e urinário (Sardi *et al.*, 2013). Quando há uma perturbação dos mecanismos de defesas locais ou sistêmicos, esse micro-organismo pode proliferar e causar infecções como candidíase orofaríngea ou vulvovaginal. Além disso, em pacientes hospitalizados, *Candida* spp. pode entrar na corrente sanguínea através de cateteres, causando candidíase disseminada (Filler, 2012). Assim, o espectro das candidíases se mostra bastante extenso, podendo variar desde manifestações de menor significância clínica, como a colonização de

mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de diversos órgãos. As mucosas oral, vaginal e esofágica são as mais frequentemente envolvidas em quadros de candidíase (Sidrim e Rocha, 2004).

Assim como *C. albicans*, as espécies não-*albicans* podem causar grande variedade de infecções que vão desde micoses superficiais até micoses sistêmicas disseminadas fatais (Haynes, 2001). As candidíases orofaríngeas são as mais frequentes infecções fúngicas oportunistas entre os pacientes com HIV, podendo atingir quase 45% deles (Fetter *et al.*, 1993; De Repentigny, Lewandowski e Jolicoeur, 2004; Maurya *et al.*, 2013). Outro tipo frequente de infecção por *Candida* spp. é a candidíase vulvovaginal, representando um significativo problema que afeta 75% das mulheres ao menos uma vez durante suas vidas (Fidel, 2004). Com relação às candidemias, foram avaliados episódios em centros médicos brasileiros e foi observado que as candidemias ocorrem em 2,45 casos a cada mil internações, podendo esses números serem de duas a 15 vezes maiores do que os registrados no Hemisfério Norte (Colombo *et al.*, 2006).

Os agentes etiológicos das candidemias apresentam uma variação significativa em diferentes partes do mundo (Falagas, Roussos e Vardakas, 2010). Na América do Sul, as espécies de *Candida* não-*albicans* mostram-se as mais comumente isoladas em episódios de infecções sanguíneas por leveduras (Camargo *et al.*, 2010; Falagas, Roussos e Vardakas, 2010; Cortes *et al.*, 2011). Entre essas espécies, o número de infecções causadas por *C. glabrata* tem demonstrado notório aumento, tanto na Europa (Tortorano *et al.*, 2006), como no Brasil (Colombo *et al.*, 2006; Pasqualotto *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2013).

1.2. A espécie *Candida glabrata*

No princípio, *Candida glabrata* foi classificada como pertencente ao gênero *Torulopsis*, descrito em 1894, enquanto o gênero *Candida* não havia sido nomeado até 1913. Essa levedura foi originalmente classificada junto ao gênero *Torulopsis* devido à incapacidade de produção de pseudo-hifas, entretanto, em 1978 foi determinado que a habilidade de produzir pseudo-hifas não seria um fator de distinção confiável para os membros do gênero *Candida* e foi proposto que *Torulopsis glabrata* passasse a ser classificada no gênero *Candida* (Fidel, Vazquez e Sobel, 1999). Mais tarde foi observado que essa levedura forma pseudo-hifas em ágar contendo baixa concentração de amônia (Vandeputte *et al.*, 2007). Atualmente,

o gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (Calderone, 2002).

Em 1984 foi demonstrado que *C. glabrata* apresenta haploidia, contrastando com *Candida albicans*, diploide e dimórfica (Whelan *et al.*, 1984). Com relação ao dimorfismo, ele acontece com alguns fungos e consiste no desenvolvimento de forma filamentosa ou leveduriforme em condições distintas. Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é um fungo dimórfico, por isso é encontrada como blastoconídios de levedura tanto na forma comensal como na forma de micro-organismo patogênico (Fidel, Vazquez e Sobel, 1999).

Em análises filogenéticas realizadas com sequências de rRNA, a maioria das espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, se agrupam em um grupo monofilético, enquanto *C. glabrata* apresenta maior relação com *S. cerevisiae* (Wong *et al.*, 2003). Essa proximidade filogenética entre *S. cerevisiae* e *C. glabrata* foi demonstrada pela primeira vez em 1991 (Barns *et al.*, 1991). A distinção filogenética entre *C. glabrata* e *C. albicans* poderia sugerir uma evolução independente entre elas no que diz respeito à capacidade de infecção (Kaur *et al.*, 2005).

Em relação ao ciclo de reprodução, *C. glabrata* é tradicionalmente classificada como micro-organismo assexuado, se reproduzindo apenas por brotamento. Entretanto, estudos têm demonstrado que essa espécie apresenta genes de ciclo de reprodução sexual, de meiose e de esporulação, incluindo gene que codifica para ferormônio e genes envolvidos na via de reprodução sexuada (Srikantha, Lachke e Soll, 2003; Wong *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2008). Por conseguinte, é proposto que *C. glabrata* poderia apresentar também um ciclo de reprodução sexual em condições ainda desconhecidas, tais como no corpo humano, podendo passar por uma fase diploide transitória (Muller *et al.*, 2008).

Em 2004 foi publicado o trabalho no qual foi realizado o sequenciamento do genoma de quatro leveduras, entre elas o de *C. glabrata*. Nele é demonstrado, entre outras informações, que essa espécie apresenta 13 cromossomos e tamanho genômico de 12,3 Mb. O conteúdo de CG é de 38,8%, semelhante ao de *S. cerevisiae* (38,3%) (Dujon *et al.*, 2004).

Por muito tempo *C. glabrata* foi considerada uma levedura saprófita não patogênica da microbiota normal de indivíduos saudáveis, raramente causando infecções sérias em

humanos. Entretanto, após a utilização generalizada e crescente da terapia imunossupressora em conjunto com a terapia antifúngica de amplo espectro, observou-se um aumento significativo da frequência de infecções causadas por *C. glabrata* (Fidel, Vazquez e Sobel, 1999). Tais infecções causadas por essa espécie apresentam um grande espectro de apresentações clínicas e podem ser classificadas como superficiais, como são as infecções cutâneas e das mucosas, e como profundas, generalizadas e de alta severidade, como são as candidíases invasivas (Sardi *et al.*, 2013).

A patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada por uma gama de fatores de virulência, que são determinados geneticamente, sendo expressos pelas leveduras quando submetidas a certas condições e interagem diretamente com as células hospedeiras causando danos (Silva *et al.*, 2012). O conhecimento sobre a patogenicidade e os fatores de virulência de *C. glabrata* assim como os mecanismos de defesa do hospedeiro contra esse micro-organismo está crescendo lentamente (Li, Redding e Dongari-Bagtzoglou, 2007). Comparada a *C. albicans*, *C. glabrata* demonstra menor virulência e patogenicidade em modelos animais, e é proposta que essa menor virulência poderia ser decorrente da falta de formação de hifas por essa espécie (Fidel, Vazquez e Sobel, 1999).

A capacidade de aderência às células do hospedeiro é um importante fator de virulência, sendo as adesinas as proteínas da superfície celular de *Candida sp* envolvidas na aderência específica. Em *C. glabrata*, o maior grupo de adesinas é expresso pela família dos genes *EPA* (De Las Penas *et al.*, 2003). A habilidade de aderência está relacionada à formação de biofilmes, e essa capacidade de formação de biofilme por *C. glabrata* é um de seus principais fatores de virulência, além de contribuir para a elevada resistência aos antifúngicos por essa espécie (Seneviratne *et al.*, 2010).

Enzimas hidrolíticas, que quebram polímeros e barreiras para o crescimento fúngico, fornecendo acesso aos nutrientes, bem como inativando células de defesa do hospedeiro, também são fatores de virulência em algumas espécies de *Candida sp* (Haynes, 2001). *C. glabrata* não apresenta aspartil proteínases, o que poderia explicar a menor virulência dessa espécie em relação a *C. albicans*, que apresenta tais proteínases (Li, Redding e Dongari-Bagtzoglou, 2007). Em um recente estudo é ressaltado que *C. glabrata*, na maioria dos casos, não apresenta ação das enzimas hidrolíticas, mas que isso poderia variar de isolado para isolado (Silva *et al.*, 2012), assim como a expressão de diversos fatores de virulência varia

entre isolados de *C. glabrata* pertencentes a diferentes genótipos (Berila, Hyrossova e Subik, 2011).

Em relação à epidemiologia das infecções por *C. glabrata*, um estudo no sul do Brasil realizado em um hospital universitário demonstrou que as candidemias por essa espécie foram três vezes mais frequentes nos anos de 2005 a 2007 comparado aos anos de 1995 a 2003 (Pasqualotto *et al.*, 2008). Um estudo similar também realizado no sul do Brasil entre os anos de 2006 e 2007 avaliou casos de candidemias em sete instituições médicas privadas e duas públicas, e os autores relataram que entre 4.363 episódios de infecções sanguíneas, 300 foram causadas por *Candida* spp (6,9%). *C. glabrata* foi a espécie mais frequentemente isolada nas instituições privadas, sendo nelas também o maior índice de isolados dessa espécie resistentes ao fluconazol (Colombo *et al.*, 2013). Na Europa, *C. glabrata*, responsável por 14% das infecções sanguíneas, é a segunda espécie mais reportada, exceto na Itália e na Espanha, onde é a terceira e a quarta, respectivamente (Tortorano *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos a incidência de candidemias por *C. glabrata* em comparação com outras espécies de *Candida* também está aumentando (Eschenauer *et al.*, 2013).

C. glabrata emerge como espécie patogênica não apenas em infecções sanguíneas, mas também causando candidíases em diferentes locais do corpo humano. No Brasil foi observado que 22% dos pacientes infectados ou colonizados por *Candida* spp apresentavam espécies não-*albicans* na cavidade oral, com predominância de *C. glabrata* e *C. krusei* (Milan *et al.*, 1998). Em 2000, um estudo relatou que *C. glabrata* foi a espécie de *Candida* não-*albicans* mais frequentemente isolada em candidíase oral em pacientes HIV positivos na Espanha (Canuto *et al.*, 2000).

Outra forma de manifestação clínica de infecção por *Candida* sp. é a candidíase vulvovaginal, que é muito comum tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunocomprometidos. Nessa forma de infecção, novamente a espécie *C. glabrata* tem sido identificada como a *Candida* não-*albicans* mais predominantemente isolada, representando 34,5% dos casos (Ozcan *et al.*, 2006), assim como nos casos de candidúria reportados em Goiás, Brasil (Passos *et al.*, 2005) e na Bahia, Brasil (Oliveira *et al.*, 2011).

1.3. Antifúngicos azólicos

Os azólicos são uma importante classe de agentes antifúngicos usados na medicina humana e veterinária (Musiol e Kowalczyk, 2012). São compostos totalmente sintéticos e que, geralmente, têm ação fungistática sobre determinados fungos. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da biossíntese do ergosterol do fungo através da ligação à enzima lanosterol 14- α -desmetilase, o que provoca alterações na membrana citoplasmática (Goodman e Gilman, 1996), uma vez que o ergosterol é um biorregulador na fluidez, assimetria e integridade da membrana celular fúngica (Ghannoum e Rice, 1999). A associação à enzima ocorre pela aproximação do azólico ao grupamento heme da lanosterol 14- α -desmetilase, enzima da família citocromo P450, e substituição de uma molécula de água localizada na posição seis do grupamento heme pelo azólico, bloqueando e inativando o centro ativo da enzima (Balding *et al.*, 2008).

Os azólicos apresentam um anel imidazólico em sua estrutura química e, dependendo do número de átomo de nitrogênio presente nesse anel, esses agentes antifúngicos classificam-se em imidazólicos – quando houver apenas um átomo de nitrogênio (cetoconazol, miconazol), e triazólicos – quando houver três átomos de nitrogênio na molécula (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol). Os triazólicos chegaram ao mercado na década de 80 e entre eles, o fluconazol, desenvolvido pela Pfizer, ganhou destaque quando aprovado para uso no início da década de 90, abrangendo muitas das deficiências demonstradas pelos imidazólicos, como variação da eficácia ou inexistência de absorção oral, elevada hepatotoxicidade, distúrbios endócrinos e interações com outras drogas (Maertens, 2004; Musiol e Kowalczyk, 2012).

1.3.1. O fluconazol e a resistência a esse azólico em *Candida glabrata*

O número de drogas antifúngicas para candidíase invasiva aumentou nas últimas duas décadas e vários estudos compararam essas terapias medicamentosas, no entanto, uma estratégia de tratamento ideal ainda não foi identificada (Andes *et al.*, 2012; Eschenauer *et al.*, 2013). Entre as drogas de escolha, o fluconazol tem sido o agente antifúngico preferido para o tratamento de infecções sistêmicas e tópicas por *Candida* spp. Seu uso generalizado pode ser atribuído a sua estabilidade metabólica, alta solubilidade em água, boa tolerabilidade, baixo custo, possibilidade de administração via oral (Grant e Clissold, 1990) e capacidade de penetrar no SNC (Eschenauer *et al.*, 2013), todos esses atributos culminam em eficiência clínica e segurança (Ghannoum e Rice, 1999).

O fluconazol é utilizado na clínica como profilaxia e tratamento de candidíases orofaríngeas e esofágicas em pacientes com AIDS, assim como em paciente neutropênicos, ou que passaram por procedimentos cirúrgicos e desenvolveram candidíase invasiva (Loeffler e Stevens, 2003). Pelo fato de ser excretado na urina na sua forma ativa, o fluconazol é também o tratamento de escolha para infecções fúngicas no trato urinário (Spampinato e Leonardi, 2013).

Entretanto, o amplo uso do fluconazol na clínica tem resultado em uma mudança na microbiota hospedeira para espécies resistentes a esse agente antifúngico (Loeffler e Stevens, 2003). Essa mudança leva à seleção de micro-organismos resistentes e favorece infecções por *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, que é intrinsecamente menos suscetível ao fluconazol (Spampinato e Leonardi, 2013).

A resistência às drogas antifúngicas é um fenômeno cada vez mais reconhecido e pode ser clinicamente definida como a persistência de sinais e sintomas da infecção, apesar da presença de um tolerável nível da droga. Dependendo do fármaco e da espécie de *Candida*, o mecanismo de resistência antifúngica pode ser intrínseco, presente naturalmente, ou extrínseco, em que a resistência é adquirida por um micro-organismo anteriormente sensível e que depois de um período de exposição ao agente tornou-se resistente a ele (Silva *et al.*, 2012). *C. glabrata* pode apresentar ambas as formas de resistência ao antifúngico fluconazol, sendo que a aquisição de resistência resultante da exposição ao fluconazol ocorre mais frequentemente e mais rapidamente do que em *C. albicans* (Lupetti *et al.*, 2002).

Múltiplos mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos têm sido relatados e os transportadores ABC de efluxo multidrogas são importantes mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. glabrata*. A superexpressão dos transportadores de efluxo multidrogas como CgCDR1, CgCDR2 e CgPDH1, e também do fator de transcrição CgPDR1, são os mecanismos de resistência ao fluconazol mais observados em isolados de *C. glabrata* (Parkinson, Falconer e Hitchcock, 1995; Sanglard *et al.*, 1999; Lupetti *et al.*, 2002; Vermitsky e Edlind, 2004; Vermitsky *et al.*, 2006; Berila *et al.*, 2009).

A superexpressão da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, alvo dos azólicos como o fluconazol, também está associada com a aquisição de resistência ao fluconazol em *C. glabrata*. Essa superexpressão pode ocorrer devido a um aumento da taxa de transcrição do

seu gene codificador, o *ERG11*, resultado da duplicação do cromossomo que contém esse gene (Marichal *et al.*, 1997; Tobudic, Kratzer e Presterl, 2012).

Os pacientes com AIDS são os maiores acometidos por infecções orofaríngeas causadas por *C. glabrata* resistentes ao fluconazol e isso ocorre por que esses pacientes apresentam imunodepressão e prolongada exposição ao azólico (Canuto *et al.*, 2000; Loeffler e Stevens, 2003). A presença de isolados resistentes ao fluconazol aparece em setores hospitalares de hematologia e oncologia, onde os pacientes costumam apresentar imunodepressão devido a doenças de base (Ben-Ami *et al.*, 2013). Estudos mostram que o isolamento de *C. glabrata* resistente ao fluconazol em amostras biológicas, como urina, sangue e secreções, é constante, chegando a ser relatada a ausência de isolados dessa espécie sensíveis ao fluconazol, inclusive no Brasil (Kiraz *et al.*, 2010; Furlaneto *et al.*, 2011; Singla *et al.*, 2012; De Almeida *et al.*, 2013).

1.4. Estresse oxidativo e *Candida* sp.

Os habitats naturais da levedura *C. glabrata*, as mucosas do hospedeiro mamífero, estão associados com limitações de nutrientes, estresse oxidativo, competição com outros micro-organismos e estresses causados pelos mecanismos de proteção. As células fagocíticas, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, são as primeiras respostas do sistema imune inato do hospedeiro às invasões de micro-organismos, sendo importantes defesas contra infecções por *Candida* spp (Fang, 2004; Berila, Hyrossova e Subik, 2011; Jandric e Schuller, 2011). No processo de infecção, a levedura é internalizada nas células fagocíticas por meio de fagolisossomos, que possuem um ambiente interno destrutivo e altamente tóxico. Esse ambiente é constituído, entre outros compostos, de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que causam dano no DNA, nas proteínas e nos lipídeos do fungo fagocitado (Jandric e Schuller, 2011). A síntese de ERO no fagolisossomo é impulsionada pelo complexo da enzima NADPH oxidase, que possui um centro redox e medeia a transferência de elétrons do NADPH citoplasmático para o oxigênio molecular (O_2), gerando superóxido (O_2^{\cdot}), e também ânion radical hidroxila ($\cdot OH$), tanto no fagolisossomo como no meio extracelular (Roos, Van Bruggen e Meischl, 2003; Brown, Haynes e Quinn, 2009; Jandric e Schuller, 2011). Já as ERN, mais especificamente o óxido nítrico (NO^{\cdot}) é gerado pela via da enzima NO^{\cdot} sintase induzível (iNOS) (Fang, 2004).

Cada ERO e ERN possui diferente reatividade, estabilidade, compartimentalização e atividade biológica e várias espécies podem estar presentes simultaneamente em condições biológicas relevantes, podendo interagir com numerosos alvos em uma célula, danificando proteínas, bases nucleotídicas e lipídeos (Fang, 2004). Espécie reativa é um termo amplo, que inclui os radicais livres e outros derivados não-radicalares como o ozônio e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Radical livre é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. A presença de um elétron desemparelhado aumenta sua reatividade (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A suscetibilidade dos fungos às ERO e às ERN, e, portanto, ao sistema de defesa do hospedeiro, depende do micro-organismo (Missall, Lodge e Mcewen, 2004). *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. krusei* demonstram um sistema antioxidante mais potente comparados a *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. guilliermondii*, quando as células em fase de crescimento exponencial foram expostas a peróxido de hidrogênio, o que poderia explicar a maior capacidade daquelas espécies em causar infecções sistêmicas (Abegg *et al.*, 2010). Os micro-organismos, para se proteger das ERO e das ERN, desenvolveram ao longo da evolução sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que apresentam diferentes níveis de proteção, evitando a formação de espécies reativas, neutralizando as formadas e ainda reparando os danos causados por elas (Jamnik e Raspor, 2005; Roetzer *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2011).

As enzimas superóxido dismutases (SOD) são altamente eficientes em remover cataliticamente O₂^{•-} reduzindo-o a H₂O₂ ou também o oxidando à O₂. Essas enzimas possuem íons Mn²⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺ no seu centro catalítico (Halliwell e Gutteridge, 2007). A levedura *C. glabrata* possui dois genes codificadores de SOD, *CgSOD1* que codifica para CuZnSOD com possível localização citoplasmática e mitocondrial, e o gene *CgSOD2* que codifica MnSOD com possível localização mitocondrial e peroxissomal, ambos são ortólogos dos genes de *Saccharomyes cerevisiae*, *ScSOD1* e *ScSOD2* (Petrova *et al.*, 2013). Já em *C. albicans*, foram identificados seis genes que codificam para SOD (*CaSOD1-6*) (Missall, Lodge e Mcewen, 2004; Sheng *et al.*, 2011). Essa diferença de número de genes codificadores de SOD explicaria a menor resistência de *C. glabrata* à menadiona, um pró-oxidante produtor de O₂^{•-}, comparada a *C. albicans* (Cuellar-Cruz *et al.*, 2009). Uma análise da homologia da sequência de aminoácidos da SOD de *C. glabrata*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* mostrou que *CgSODs* estão mais estreitamente relacionadas com *ScSODs* do que com *CaSODs* (Cuellar-Cruz *et al.*,

2009), o que poderia ser explicado pela maior proximidade filogenética de *C. glabrata* a *S. cerevisiae* do que à *C. albicans* (Kaur *et al.*, 2005; Bialkova e Subik, 2006).

A enzima catalase, que detoxifica H_2O_2 através da conversão catalítica à água (H_2O) e O_2 , é altamente conservada entre as leveduras (Jandric e Schuller, 2011). *C. glabrata* possui um gene que codifica para essa enzima, o gene *CAT1*, que é extremamente necessário para resistência *in vitro* a H_2O_2 , não apresentando impacto na virulência dessa levedura em modelo murino (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

Peroxirredoxinas (Prxs) constituem uma família de proteínas extremamente eficazes na eliminação de peróxidos (Cox, Winterbourn e Hampton, 2010). Elas são enzimas tiol-específicas, ou seja, seu sítio ativo é um grupo tiol N-terminal de uma cisteína conservada, por isso são também conhecidas como tiol peroxidases. As Prxs exercem seu papel antioxidante protetor através de sua atividade de peroxidase em que o H_2O_2 e uma vasta gama de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) são reduzidos e detoxificados (Missall, Lodge e Mcewen, 2004; Aksam *et al.*, 2008). Outra família enzimática que remove H_2O_2 e ROOH são as glutatona peroxidases (GPx), que oxidam glutatona reduzida (GSH) na detoxificação de peróxidos e apresentam uma selenocisteína no sítio ativo (Halliwell e Gutteridge, 2007). *C. glabrata* possui um gene *GPX2* e dois *GPX3* que codificam enzimas com localização citoplasmática e mitocondrial (Petrova *et al.*, 2013).

Os níveis de GSH intracelulares em células de leveduras apresentam variações impulsionadas por agentes indutores de estresse oxidativo e também pela morfologia e fase do crescimento celular (Gonzalez-Parraga *et al.*, 2005; Perrone, Grant e Dawes, 2005; Michan e Pueyo, 2009; Abegg *et al.*, 2012). Esse tripeptídeo também está envolvido na atividade detoxificadora da família das enzimas glutatona-S-transferases (GSTs). As GSTs conjugam xenobióticos ou seus metabólitos à GSH, seguido da eliminação dos conjugados ou da internalização em compartimentos celulares, como em vacúolos (Garcera, Casas e Herrero, 2010). Recentemente foi demonstrado que *C. glabrata* possui um gene codificador de GST, o gene *GTT3* (Petrova *et al.*, 2013).

Como dito anteriormente, as células de defesa do hospedeiro produzem altas concentrações de NO^{\bullet} pela ação da iNOS e sua inibição diminui fortemente a atividade candidida dessas células. Fungos e bactérias protegem-se da toxicidade do NO^{\bullet} utilizando enzimas como flavohemoglobina e NO^{\bullet} dioxigenase que convertem NO^{\bullet} a moléculas menos

tóxicas (Ullmann *et al.*, 2004). A flavohemoglobina é uma enzima com dois domínios que detoxificam NO[•] ligando seu grupo heme e oxigênio a ele, formando nitrato, composto inócuo, e flavohemoglobina férrica, que posteriormente é reduzida a forma ferrosa via transferência de elétrons entre NADPH. Essa enzima está presente em microrganismos como *C. albicans* (Ullmann *et al.*, 2004; Hromatka, Noble e Johnson, 2005) e *Candida norvegensis* (Kobayashi, G. *et al.*, 2002)

Quanto aos mecanismos de dano a alvos celulares através de ERO, o dano a proteínas pode ocorrer por ataque direto de espécies reativas ou por danos secundários envolvendo ataque por produtos finais de peroxidação lipídica. O dano proteico é importante *in vivo* porque pode prejudicar, por exemplo, a função de receptores, transdução de sinal, proteínas de transporte e enzimas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Durante o estresse oxidativo, o primeiro evento relacionado ao dano em proteínas é a formação de um radical centrado no carbono por extração de H[•] do carbono α em uma ligação peptídica, então ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção frequente de compostos carbonilados, particularmente a partir de prolina, arginina e lisina. Um estudo demonstrou que a formação de grupos carbonil é menor em *C. glabrata* e *C. albicans* do que em *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* quando tratadas com 0,5 mM H₂O₂ (Abegg *et al.*, 2010).

Ácidos graxos e lipoproteínas de membranas também são alvos potenciais de ERO e ERN, e quando essas estruturas sofrem um ataque resultante do estresse oxidativo, desencadeia-se um processo denominado lipoperoxidação. A peroxidação lipídica inicia-se com o sequestro do hidrogênio da membrana celular com formação do radical lipídico. Este radical reage rapidamente com o oxigênio, resultando em radical peroxila, que, por sua vez, sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o radical lipídico. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais produzidos propagam-se até se autodestruírem (Frisard *et al.*, 2007).

Níveis fisiologicamente relevantes de O₂^{•-}, NO[•], H₂O₂ ou ROOH não reagem com bases de DNA ou RNA significativamente. Entretanto, O₂^{•-} e NO[•] podem reagir com radicais formados após o DNA ser atacado por espécies reativas mais agressivas, como o radical [•]OH, que é altamente reativo e pode gerar uma multiplicidade de produtos por reação com o DNA. O ataque de espécies reativas no DNA pode produzir quebra de fita, dano em desoxirriboses e modificações de purinas e pirimidinas, sendo a medida de modificações nas bases a mais

comumente utilizada para medir dano oxidativo no DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007). A base modificada 8-oxo-7-hidro-2'-desoxiguanosina (8-OxodG) é considerada um dos produtos de dano oxidativo no DNA por espécies reativas que pode ser facilmente medida por HPLC e detecção eletroquímica (Lee e Park, 1998). Esse composto exibe um tautomerismo ceto-enol, a forma ceto é 8-OxodG e a forma enol é 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG), sendo que o equilíbrio favorece a forma ceto (Halliwell e Gutteridge, 2007). Existem inconsistências na literatura em relação a essa nomenclatura, alguns autores referem-se à 8-OxodG (Collins *et al.*, 2003; Cadet *et al.*, 2012) e outros à 8OHdG (Lee e Park, 1998; Dirmeier *et al.*, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007). Nós utilizaremos a nomenclatura 8-OxodG.

1.4.1. Geração de espécies reativas pelos antifúngicos azólicos

A sobrevivência das células fúngicas depende da sua capacidade de sentir as alterações no meio ambiente e de como elas respondem adequadamente à nova situação (Michan e Pueyo, 2009). Além da geração de espécies reativas por parte das células de defesa do hospedeiro, alguns estudos vêm propondo que os fungos passam por estresse oxidativo causado pelos compostos com atividade antifúngica que são utilizados na clínica para combater a infecção, sendo a geração de espécies reativas um mecanismo de ação adicional desses compostos (Kobayashi, D. *et al.*, 2002; Thevissen *et al.*, 2007).

A geração de espécies reativas pelo miconazol em *C. albicans* foi demonstrada através de ensaios fluorimétricos com diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Kobayashi, D. *et al.*, 2002). O DCFH-DA é uma substância apolar que difunde para dentro da célula, onde é hidrolisada por esterases a um derivado polar pro-fluorescente, o DCFH, que se acumula na célula. Na presença de espécies reativas, o DCFH é oxidado ao composto fluorescente DCF (Shen, Scaiano e English, 2006). Os autores do mencionado trabalho propuseram que além da saída do ATP intracelular, a inibição da atividade da ATPase pelo miconazol poderia promover a produção de espécies reativas. O miconazol combinado com a terapia fotodinâmica parece contribuir com a morte de *C. albicans* através do aumento da geração de ERO quando comparado com células que tiveram apenas um dos tratamentos (Snell, Foster e Haidaris, 2012)

O efeito do miconazol sobre o citoesqueleto de actina e a consequente produção de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* foi demonstrado com o uso do corante rodamina-

faloidina (Thevissen *et al.*, 2007). Segundo os autores do trabalho, o miconazol causaria uma aglomeração de actina levando à indução da produção de espécies reativas por mitocôndrias disfuncionais, resultando na apoptose da célula de levedura. De fato, a actina, nos fungos, tem um papel fundamental na atividade da mitocôndria e na regulação da formação de espécies reativas endógenas (Gourlay e Ayscough, 2006).

A atividade antifúngica do fluconazol também parece ter relação com geração de espécies reativas em espécies de *Candida*. Em um estudo com células de *C. albicans* foi evidenciada a expressão de genes específicos de resposta a estresse oxidativo e nitrosativo quando as células foram expostas a diferentes concentrações de fluconazol por diferentes tempos de incubação (Arana, Nombela e Pla, 2010). Esse grupo também propôs que a geração de espécies reativas nas células da levedura na presença do fluconazol poderia ser devido à produção de farnesil pirofosfato, um precursor do ergosterol que estaria acumulado na célula. Da mesma maneira como observado em *C. albicans*, o fluconazol foi capaz de gerar espécies reativas em cepas de *Candida tropicalis* sensíveis a esse antifúngico. Os autores demonstraram, através da versão alcalina modificada do ensaio cometa, que o fluconazol causou dano oxidativo no DNA da levedura (Da Silva *et al.*, 2013).

Entretanto, um recente estudo demonstrou que o fluconazol não foi capaz de gerar espécies reativas na levedura patogênica *Cryptococcus gattii* durante 1h e 24h de exposição, em contrapartida o antifúngico itraconazol levou à formação de espécies reativas e peroxidação lipídica nas células dessa levedura em um curto período de exposição a ele (1h) (Ferreira *et al.*, 2013). Os autores representaram esquematicamente o papel oxidativo e nitrosativo do itraconazol no *C. gattii*, onde ele induz estresse oxidativo na levedura no início do tratamento levando à lipoperoxidação, o que ativa o sistema enzimático antioxidante, resultando num efeito fungistático. Da mesma maneira, o fluconazol induziu uma baixa porcentagem de espécies reativas em células de *Candida krusei* e os autores do trabalho propuseram que o mecanismo antifúngico do fluconazol nessa levedura não estaria baseado na geração de espécies reativas (Costa-De-Oliveira *et al.*, 2012).

Outros estudos envolvendo diferentes classes de antifúngicos também tentam esclarecer o papel pro-oxidativo desses compostos, como é o caso da anfotericina B (Sokolanderson *et al.*, 1988; Okamoto, Aoki e Mataga, 2004). Como observado, o mecanismo de ação adicional dos antifúngicos azólicos, principalmente do fluconazol, que consiste na geração de espécies reativas e dano oxidativo, ainda não está totalmente elucidado e

compreendido. Estudos na emergente levedura *C. glabrata*, na tentativa de explicar a geração de espécies reativas pelos azólicos assim como analisar a resposta desse patógeno nessa situação, ainda são inexplorados.

1.4.2. A relação entre resposta ao estresse oxidativo e resistência a antifúngicos

Mecanismos de defesa antioxidantes parecem estar associados com a resistência a agentes antifúngicos. Uma avaliação da diferença de expressão gênica de isolados de *C. albicans* sensível e resistente ao fluconazol demonstrou que, além dos genes conhecidamente relacionados com a resistência antifúngica, genes de resposta a estresse oxidativo apresentaram expressão aumentada no isolado resistente, como *GPXI* que codifica para glutaciona peroxidase (Rogers e Barker, 2002). Em um estudo similar, as alterações de expressão gênica de isolados de *C. albicans* que adquiriram gradualmente resistência ao fluconazol mostraram que alguns genes com expressão aumentada estão envolvidos na resposta a estresse oxidativo, sugerindo que uma reduzida suscetibilidade ao dano oxidativo pode contribuir para resistência aos azólicos como o fluconazol (Rogers e Barker, 2003).

A sugestão da relação entre resposta a estresse oxidativo e resistência a antifúngico também existe para a levedura *C. glabrata*. A análise proteômica de um isolado de *C. glabrata* sensível e um resistente ao fluconazol mostrou que proteínas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo são superexpressas no isolado resistente, como Yap1p, um fator de transcrição de genes de resposta ao estresse oxidativo (Rogers *et al.*, 2006). Um estudo recente mostrou que o fluconazol gerou espécies reativas apenas em isolados de *C. tropicalis* sensíveis a esse antifúngico, e nos resistentes apenas quando o isolado era tratado com fluconazol e amiodarona sinergicamente (Da Silva *et al.*, 2013), sugerindo algum mecanismo de proteção antioxidante envolvido na resistência dessa levedura ao fluconazol.

Diante disso, há algumas evidências de que a resistência antifúngica poderia estar relacionada à resposta ao estresse oxidativo e ao menor dano oxidativo nas leveduras, assim como a geração de espécies reativas fazendo parte do mecanismo de ação dos antifúngicos. Entretanto, como citado acima, são escassas as pesquisas sobre a relação entre a resistência e suscetibilidade de *C. glabrata* ao fluconazol e a resposta antioxidante dessa levedura.

2. OBJETIVOS

Frente à importância do estudo do patógeno *C. glabrata* e a possível relação entre a resposta ao estresse oxidativo, a geração de espécies reativas pelo fluconazol e a resistência ao fluconazol, este estudo tem como objetivo geral analisar a resposta antioxidante de isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, tratados e não tratados com fluconazol em concentração subinibitória, assim como investigar possível dano oxidativo causado por este antifúngico.

2.1. Objetivos específicos

Nos isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol tratados e não tratados com fluconazol em concentração subinibitória até fase de crescimento estacionário, quantificar e comparar:

- ✓ A produção de espécies reativas através de microscopia eletrônica confocal utilizando DCFH-DA como sonda fluorescente;
- ✓ A atividade das enzimas antioxidantes GPx, SOD, GST e do consumo de peróxido de hidrogênio, assim como a defesa antioxidante não enzimática GSH;
- ✓ Os níveis de MDA, carbonilação de proteínas e 8OxodG como indicadores de dano oxidativo em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, respectivamente;
- ✓ Os níveis de NO₂ e NO₃ como medida indireta de NO·.

3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo científico a ser submetido para a revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage

Camila Donato Mahl^{a,b}, Mélyny Natuane de Carvalho e Silva^b, Camile Saul Behling^{a,b},
Fernanda S. Hackenhaar^{a,b}, Jordana Putti^b, Tiago B. Salomon^{a,b}, Alexandre Fuentefria^c, Mara
S. Benfato^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Micologia Aplicada, Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author. Tel: (55-51) 33087603 - Fax: (55-51) 33087003 - E-mail:

mara.benfato@ufrgs.br

Short running title: Fluconazole induces oxidative stress in *Candida glabrata*

Keywords: candidiasis, azole antifungal, reactive oxygen species, stress response

Synopsis

Objectives: The participation of reactive oxygen species (ROS) in azoles antifungal mechanism of action has been suggested, as well as the relation between antifungal resistance and oxidative stress response; however, the data are still inconclusive and differ between microorganisms. In the present study, we present the results of ROS generation by fluconazole in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains and their oxidative response.

Methods: In fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated or not with fluconazole at sub-inhibitory concentration until stationary growth phase was reached, we analyzed whether fluconazole would generate ROS. Subsequently, we analyzed the antioxidant defenses GPx, SOD, GST, consumption of hydrogen peroxide and total glutathione in the strains, as well as the possible oxidative damage in lipids, proteins and nucleic acids caused by fluconazole.

Results: Data showed that in resistant and susceptible *C. glabrata* strains treated with fluconazole there was increased ROS generation, and as a response, a higher GPx and SOD enzymatic activity compared to untreated cells; however there was no difference among resistant and susceptible strains in these parameters. The susceptible strains demonstrated higher GST activity compared to the resistant ones, and when those cells were treated with fluconazole the GST activity decreased. Fluconazole did not cause proteins and lipids oxidative damage, however oxidative DNA damage was observed.

Conclusions: Fluconazole is able to generate ROS, as organic peroxides and $O_2^{\cdot-}$, in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains at stationary growth phase and this results in oxidative DNA damage.

Introduction

Since the early 1980s, fungi have emerged as major causes of human infections, particularly in immunocompromised and hospitalized patients with serious underlying diseases.¹ Of the fungi regarded as human pathogens, *Candida* spp. have been described as medically important fungi that cause severe mucosal and life-threatening invasive infections.² A prospective study in care hospitals in Brazil from 2003 to 2004 shows a high incidence of candidemia with a significant rate of morbidity and mortality, being *C. glabrata* accountable for 5% of the cases.³ In Europe, *C. glabrata*, responsible for 14% of bloodstream infections, is the second most reported species, except in Italy and Spain, where it is the third and fourth, respectively.⁴ In southern Brazil, a study in a university hospital demonstrated that *C. glabrata* candidemia was 3-fold greater during 2005–2007 compared to 1995–2003.⁵ And a similar study in southern Brazil from 2006 to 2007, revealed an increase in the incidence of *C. glabrata* candidemias in private hospitals, possibly related to a high level of fluconazole use.⁶

These epidemiological studies reveal *C. glabrata* as an important emerging pathogen in nosocomial infections and, due the widely use of fluconazole in clinic, infections caused by fluconazole-resistant *C. glabrata* strains have been rising. *C. glabrata* shows intrinsic and extrinsic fluconazole resistance and studies demonstrated that infections are usual in HIV patients.^{7, 8,9} The main mechanisms of fluconazole resistance among *Candida* species, including *C. glabrata*, are the development of bypass pathways, alterations in the *ERG 11* gene encoding the azole target enzyme and the up-regulation of genes encoding efflux pumps.¹⁰ Although those mechanisms of fluconazole resistance are the most acceptable, there are some evidences about a relation of product of genes involved in oxidative stress response and fluconazole resistance.^{11,12}

Fluconazole is a widely employed antifungal drug due to its metabolic stability, relatively high water solubility and good tolerability.¹³ It inhibits the biosynthesis of ergosterol by interfering with the fungal lanosterol demethylase. A key function of this enzyme is to convert lanosterol to ergosterol and this inhibition causes depletion of sterol in the fungal cell membrane.¹⁴ In the last years some studies have proposed the participation of reactive oxygen species (ROS) in azoles antifungal mechanism of action.^{15,16,17,18,19} However, this additional antifungal mechanism is not fully understood and the generation of reactive species by azoles, mainly fluconazole still needs to be investigated.

During the course of a systemic infection, fungal cells are engulfed by host phagocytes, where they are exposed to reactive species. Therefore, commensal and pathogenic microbial fungal organisms like *Candida* spp. carry a number of antioxidant systems, such as catalases, superoxide dismutases, thioredoxins and glutathione dependent peroxidases and reductases to counteract the broad spectrum of reactive oxidants during the infection.²⁰ In a recent study, *C. glabrata* appeared to be resistant to reactive species and to possess a potent antioxidant system which protects the fungal cell against endogenous and exogenous ROS.²¹ However, the antioxidant response of *C. glabrata* against ROS generation by fluconazole remains poorly explored as well as the possible oxidative damage caused by this antifungal in this species.

The elucidation of oxidative stress response in pathogenic fungi has considerable clinical interest. The understanding of the possible association among antifungal mechanism of action, antifungal resistance and oxidative stress response is important for future identification of new targets for new antifungal agents, culminating in a rational development of antifungal drugs. In this report, to better understand the relation between oxidative stress response, ROS generation by fluconazole and fluconazole resistance in *C. glabrata*, we

analyzed whether fluconazole generates ROS in *C. glabrata* and evaluated the antioxidant defenses of fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated or not with fluconazole. We also asked whether fluconazole at sub-inhibitory concentration causes oxidative damage in proteins, lipids and nucleic acid in these strains.

Methods

Yeast strains, culture growth and cell extract preparation

In this study, two groups of *C. glabrata* clinical strains obtained from HIV patients with oropharyngeal candidiasis from University Hospital of Santa Maria were assessed. The strains are part of the fungi collection of Mycological Research Laboratory, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil and were identified by BioMerieux ID 32C yeast identification system. One group consists of eight fluconazole-susceptible clinical strains, and the other group, derived from the first through the technique of fluconazole resistance induction,²² consists of eight fluconazole-resistant strains. To evaluate the relation between fluconazole and oxidative stress, these two groups were grown in presence of fluconazole (Sigma-Aldrich) at sub-inhibitory concentration according to their MIC, and also without this antifungal, totaling four groups of eight samples each.

The strains were subcultured on sabouraud agar and incubated for 24h at 32°C. Following, they were inoculated into sabouraud broth without fluconazole and with fluconazole at sub-inhibitory concentration according to their Minimal Inhibitory Concentration (MIC) (Table 1) and grown in orbital shaker at 32°C and 200 rpm until stationary phase was reached (24 hours growth).

Cells were transferred to Sorvall tubes and subjected to two steps of washing with 0.9% NaCl and centrifugation (10 min at 1,600g at 4°C). After the second centrifugation,

0.9% NaCl was discarded and lysis buffer (50 mmol/L Basic Tris; 150 mmol/L NaCl; 50 mmol/L EDTA; pH 7.2), 0.1 mmol/L PMSF and glass beads (425-600µm diameter, Sigma) were added to the cells and mixed on a vortex mixer using 4 cycles of 3 min with intervals of 1 min of cooling on ice. A last centrifugation step (10 min at 8,000g at 4°C) was performed to remove cellular debris and beads. The supernatant was the cellular extract used for assays. Total protein concentration was measured using the Bradford method.²³

Measurement of ROS generation

To measure ROS generation in sabouraud broth culture in stationary growth phase (described above), cells were harvested, washed with distilled water and incubated with 10µmol/L 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) in 0.9% NaCl for 30 min at 37°C in the dark. After, cells were transferred to glass slides for analysis of intracellular fluorescence by Confocal Laser Scanning Microscopy (Olympus FluoView™ 1000) (CLSM) equipped with 40x objective at Electron Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul (CME-UFRGS). Cells images were processed by Olympus FluoView ver.4.0a Viewer software, the fluorescence intensity of a hundred cells was measured in 2D by ImageJ software and calculated considering the cell area and the background. Values are expressed as Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF).

Activity of antioxidant enzymes

Glutathione peroxidase (GPx) activity was evaluated in the cellular extract by measuring the oxidation of NADPH in the presence of GSH, glutathione reductase and tert-butyl hydroperoxide at 340nm.²⁴ It is expressed as U/mg of protein and 1U is defined as the ability of the enzyme to oxidize 1 µmol of NADPH/min.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured in the cellular extract by commercial kit RANSOD (RANSOD SD 125 ® Randox Laboratories, Crumlin, UK) according to the protocol provided by the manufacturer. The assay principle is based on the reaction of xanthine and xanthine oxidase to form superoxide radicals that react with 2-(4-iodo-phenyl)-3-(4-pheniltetrazólico-5-nitrophenol) chloride (INT) to form formazan, a red compound measured at 505nm on a spectrophotometer. SOD activity is measured by the degree of inhibition of this reaction, where 1U of SOD causes 50% inhibition of the rate of reduction of INT and is expressed as U/mg of protein.

The assay of glutathione-S-transferase (GST) activity was based on the formation of S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione (GS-DNB) by GST enzymatic activity through GSH and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) conjugation,²⁵ and it was measured in the cellular extract. The absorbance of the compound formed was measured on a spectrophotometer at 340 nm. GST activity is expressed as U/mg of protein and 1U is defined as the ability of the enzyme to produce 1µmol of GS-DNB/min.

The consumption of hydrogen peroxide (H₂O₂) was evaluated in the cellular extract by spectrophotometric assay at 240 nm.²⁶ Activity is expressed as U/mg of protein and 1U is defined as the ability to consume 1 µmol of hydrogen peroxide/min.

Quantification of antioxidant molecule

The assay for quantification of total glutathione, a non-enzymatic antioxidant defense, was performed in the cellular extract on a spectrophotometer by measuring the formation of p-nitrophenol from the reduction of 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412nm. This reduction occurs when NADPH, cofactor for glutathione reductase, is oxidized.²⁷ Glutathione levels were compared with reduced glutathione standard solutions and are expressed as µmol/mg of protein.

Quantification of oxidative damage

The quantification of malondialdehyde (MDA) allows us to evaluate the index of oxidative damage in lipids, or lipoperoxidation, and it was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The column employed was a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm × 4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase flow rate of 0.5 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v).²⁸ The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm and the MDA retention time was 5.6 min. The cellular extract was acidified for protein precipitation and removal of MDA that might be linked to the amino group of proteins and other compounds. MDA levels were determined by comparison with MDA standard solutions (Sigma-Aldrich) and the results are expressed as μmol of MDA/mg of protein.

Oxidative damage in proteins was assessed on a spectrophotometer by measuring the protein carbonylation in the cellular extract. Proteins were precipitated with 2 mol/L HCl, reacted with 10 mmol/L dinitrophenylhydrazine (DNPH) and were dissolved with 6 mol/L guanidine hydrochloride.²⁹ The carbonyl content was calculated using a millimolar extinction coefficient of hydrazone (21,000 M⁻¹cm⁻¹). The absorbance was measured at 370nm and the results are expressed as nmol of carbonyl/mg of protein.

The indirect method of measuring nitric oxide on spectrophotometer is performed by determining the levels of nitrites and nitrates (NO₂ and NO₃) in cellular extract. NO₂ and NO₃ react with Griess solution to form a compound whose color is read at 543nm.³⁰ NO₂ and NO₃ levels were standardized by sodium nitrite and are expressed as nmol of NO₂/mg of protein.

To determine oxidative damage in DNA, we quantified 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OxodG) by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-ECD). The column employed was a reversed-phase

column (LC-18 NUCLEOSIL HPLC column; 15 cm × 4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase flow rate of 0.5 mL/min in 50 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 5.5) and 4% methanol. An UV detector at 254nm was used to detect deoxyguanosine and an electrochemical detector (DECADE II, 20ηV) was used to detect 8-OxodG. Briefly, from sabouraud broth culture in stationary growth phase (described above), DNA was extracted using 10mg/mL Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) and the commercial kit Genomic DNA Extraction Kit-Real Biotec Group. After, DNA was quantified by Nanodrop, cleaved with Nuclease P₁ from *Penicillium citrinum* (Sigma-Aldrich) and hydrolyzed with Alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa (Sigma-Aldrich) to liberate de corresponding nucleosides. 8-OxodG and deoxyguanosine retention time was 5.1 and 11.5 min, respectively. Measurement of 8-OxodG is expressed as amount of 8-OxodG /10⁶ deoxyguanosines calculated from 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (Sigma-Aldrich) and 2'-Deoxyguanosine hydrate (Sigma-Aldrich) standard solutions.

The results from the assays were normalized against the total protein concentration. All assays were independently performed in triplicate.

Statistical analysis

Results were analyzed using SPSS 18.0 statistical software and are expressed as mean ± standard error. To compare variables between groups, a two-way ANOVA was performed followed by Bonferroni's *post hoc* test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis was accomplished with the support of the Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

Results

Increased ROS generation in *C. glabrata* treated with fluconazole

To analyze ROS generation in *C. glabrata* strains, cells were incubated with 10 μ mol/L DCFH-DA in 0.9% NaCl for 30 min at 37°C in the dark. DCFH-DA is a nonpolar substance and readily diffuses into cells, where it is hydrolyzed by intracellular esterases to the profluorescent polar derivative, DCFH, which accumulates within the cell. In the presence of ROS, DCFH is oxidized to the highly fluorescent DCF,³¹ so fluorescent cells can be analyzed by CLSM.

The CLSM analysis demonstrated a significant increase ($p\leq 0.05$) of fluorescence in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated with fluconazole at sub-inhibitory concentration compared to the strains without treatment, suggesting that fluconazole induced ROS generation in the tested conditions. There was no statistical difference in intracellular reactive species generation between susceptible and resistant cells (Figure 1a and 1b).

The effect of fluconazole on the antioxidant response of fluconazole–susceptible and resistant C. glabrata strains

To determine whether treatment with fluconazole at sub-inhibitory concentration influences the antioxidant response of susceptible and resistant *C. glabrata* strains in stationary growth phase, the enzymatic activity of GPx, SOD and GST, the consumption of H₂O₂ and the quantification of total glutathione were assessed.

The results showed a higher ($p\leq 0.05$) enzymatic activity of GPx and SOD in fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated with fluconazole when compared to the same strains without treatment. There was no statistical difference in GPx and SOD enzymatic activity between susceptible and resistant cells (Figure 2a and b). GST enzymatic activity was higher ($p\leq 0.05$) in fluconazole-susceptible *C. glabrata* strains without

fluconazole treatment when compared to the same strains treated with the antifungal and to the resistant strains (Figure 2c).

The quantification of total glutathione, a non-enzymatic antioxidant defense, and the consumption of H₂O₂ showed no statistical difference among the four groups (Table 2). We use this general term, consumption of H₂O₂, because *C. glabrata* makes use of more than one mechanism that detoxifies this reactive species, such as a single catalase Cta1p³² and peroxiredoxins enzymatic family, therefore, the test is not specific for any of them.

Treatment with fluconazole did not induce oxidative damage in lipids and proteins and did not alter NO₂ and NO₃ levels in fluconazole-susceptible and resistant C. glabrata strains

As an index of oxidative damage in lipids and proteins, we quantified MDA and carbonyl levels, respectively, in cellular extract of our four groups. Statistical analysis showed no difference among them, suggesting that treatment with fluconazole did not induce oxidative damage in these macromolecules under the tested conditions (Table 2).

The quantification of NO₂ and NO₃ levels is an indirect measurement of nitric oxide in cellular extract. Our results showed no statistical difference between NO₂ and NO₃ levels among the studied groups (Table 2).

Fluconazole induced oxidative DNA damage and this damage differed between fluconazole-susceptible and resistant C. glabrata strains

Oxidative stress accelerates DNA damage, which may be measured as strand breakage and/or chemical modifications to the DNA bases or deoxyriboses.³³ The modified base 8-OxodG is considered to be one of the oxidative DNA products induced by ROS which can be easily measured by HPLC and electrochemical detection.³⁴

In our results, as shown in Figure 3, the endogenous levels of 8-OxodG in the DNA of fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated with fluconazole at sub-inhibitory concentration were significantly higher ($p \leq 0.05$) than these same strains without the treatment, indicating oxidative DNA damage caused by fluconazole. Furthermore, there is a significantly higher ($p \leq 0.05$) level of 8-OxodG in fluconazole-resistant *C. glabrata* strains treated with fluconazole compared to fluconazole-susceptible strains treated with this antifungal (Figure 3).

Discussion

The antioxidant defenses of *C. glabrata* against various generators of oxidative stress have been studied.^{20,35,36} However, antioxidant response and oxidative damage caused by fluconazole in this yeast remains poorly explored. The present study shows that fluconazole induces ROS generation in *C. glabrata* and also demonstrates the oxidative stress response enzymes whose activities are increased when the cells of both fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains are treated with fluconazole at a sub-inhibitory concentration until stationary growth phase is reached. Furthermore, the oxidative DNA damage in this pathogenic yeast under the same conditions mentioned is identified.

The results of CLSM with DCFH-DA showed a notable ROS generation by fluconazole in *C. glabrata* in the tested conditions (Figure 1a and b). In a recent study, it was shown that fluconazole also generated ROS in fluconazole-susceptible *Candida tropicalis* strains¹⁹ as well as in *Candida albicans*,¹⁵ however, studies with *Candida krusei*³⁷ and *Cryptococcus gattii*¹⁸ showed no increase in the intracellular amount of ROS when the cells were treated with fluconazole. This generation appears to be, among other things, species-dependent, which is comprehensible, since microorganisms differ in their sensitivity and response to oxidative stress.³⁸ Moreover, our data showed that fluconazole resistance or

susceptibility in *C. glabrata* did not affect the ROS generation by fluconazole (Figure 1a), unlike *C. tropicalis*, in which fluconazole, when compared to untreated cells, generated reactive species only in susceptible strains.¹⁹

With the evidence of ROS generation by fluconazole in *C. glabrata* it was decided to evaluate the antioxidant response of fluconazole-susceptible and resistant *C. glabrata* strains treated or not with this antifungal. Cells treated with fluconazole showed increase in GPx and SOD enzymatic activity compared to untreated cells, however there was no difference between these increases in susceptible and resistant strains (Figure 2a and b). GPx enzymatic family removes H₂O₂ and organic peroxides by coupling their reduction to H₂O with oxidation of reduced glutathione, GSH, a thiol-containing tripeptide.³³ *C. glabrata* possesses one *GPX2* and two *GPX3* antioxidant genes, with cytoplasmic and mitochondrial localizations.³⁵ The SOD enzymes are highly efficient in catalytic removal of O₂^{•-}, reducing it to H₂O₂ and also oxidizing it to O₂.³³ *C. glabrata* has *SOD1* and *SOD2* genes with cytoplasmic, mitochondrial and, possibly, peroxisomal localizations.³⁵ Considering such information, it could be proposed that fluconazole is able to generate organic peroxides and O₂^{•-} as part of its antifungal mechanism against *C. glabrata*, resulting in the increased GPx and SOD enzymatic activity as an antioxidant response of the yeast. The way by which these generations of organic peroxides and O₂^{•-} occur in *C. glabrata* still needs to be elucidated. On the other hand, fluconazole, under similar conditions, did not increase SOD activity in *C. gattii*;¹⁸ the authors suggest that this occurs because fluconazole did not generate reactive species in *C. gattii* and is only responsible for the decrease in ergosterol biosynthesis.

Recently, it was proposed that *C. glabrata* has one GST enzyme orthologous to *GTT3* *S. cerevisiae* gene.³⁵ GSTs conjugate xenobiotics and products of oxidative stress or their metabolites to GSH, followed by elimination of the conjugates or their internalization in cell

compartments such as vacuoles.³⁹ A study with the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* revealed that GST mutants showed increased susceptibility to fluconazole and the authors proposed a role for GSTs in the resistance of this yeast to fluconazole.⁴⁰ In this study, it was observed that fluconazole-susceptible *C. glabrata* strains at stationary phase presented higher GST enzymatic activity compared to resistant strains and also that this activity decreased when the susceptible cells were treated with fluconazole at sub-inhibitory concentration (Figure 1c). It could be proposed that susceptible cells lose part of their GST activity, do not externalize the antifungal and become susceptible to it. However, more depth studies need to be performed to verify the GST role in *C. glabrata* and its activity against fluconazole.

The H₂O₂ consumption assay showed the enzymatic activity of catalases, peroxidases and peroxiredoxins. Catalases are well-conserved detoxifying enzymes catalyzing the conversion of H₂O₂ to H₂O and molecular oxygen, and in *C. glabrata* they are encoded by a single gene, *CTAI*.^{35,32} The data of H₂O₂ consumption showed no statistical difference between the four groups, as well as the levels of total glutathione, evidencing no role of these antioxidants against the oxidative stress generated by fluconazole under the conditions tested.

Oxidative damage is the biomolecular damage caused by the attack of ROS upon the constituents of living organisms.³³ It was asked whether fluconazole at sub-inhibitory concentration causes oxidative damage in lipids, proteins and nucleic acid in this yeast quantifying MDA, carbonyl and 8-OxodG levels. MDA is an end-product of lipoperoxidation and our data showed no statistical difference between *C. glabrata* strains treated or not with fluconazole, revealing that despite fluconazole generated ROS there was no lipid oxidative damage (Table 2). A recent study showed that fluconazole also did not induce lipoperoxidation in *C. gattii* after 1 hour and 24 hours of treatment,¹⁸ corroborating these finds. Several reactive species oxidize amino acid residues in proteins to form products with

carbonyl group, which can be measured after reaction with DNPH.³³ The results showed that fluconazole did not induce oxidative damage in proteins under the tested conditions (Table 2). The high GPx and SOD activity observed in cells treated with fluconazole (Figure 2a and b) could be protecting the cell against lipid and protein oxidation, once these enzymes neutralize reactive species. NO[•] is a reactive species that can cross membranes and diffuses readily between and within cells.³³ Its content was measured indirectly quantifying NO₂ and NO₃ in the four groups and the results showed no statistical difference between them (Table 2).

The levels of 8-OxodG were also quantified and data showed that, in some way, the ROS generation as part of fluconazole antifungal mechanism of action can cause oxidative DNA damage in *C. glabrata* (Figure 3). Moreover, the oxidative DNA damage was higher in fluconazole-resistant strains compared to fluconazole-susceptible when they were treated with this antifungal at sub-inhibitory concentration (Figure 3). It is proposed that fluconazole generated O₂^{•-} and organic peroxides in *C. glabrata* and although these reactive species do not react at significant rates with DNA bases, they can react with radicals formed after the DNA has been attacked by more aggressive reactive species such as hydroxyl radical (OH[•]). Furthermore, O₂^{•-} can accelerate OH[•] production by the so-called superoxide-assisted Fenton reaction.³³ A recent study showed, through the modified alkaline version of the comet assay, that fluconazole induced oxidative DNA damage in *C. tropicalis* after 24 hours exposure,¹⁹ reinforcing our finds. To our knowledge, the present study is the first to use HPLC-ECD technique to evaluate oxidative DNA damage in *C. glabrata*. Regarding the fact that fluconazole induced higher oxidative DNA damage in fluconazole-resistant strains compared to fluconazole-susceptible (Figure 3), it could be thought that this occurs because a higher concentration of fluconazole was added in resistant strains to the cells grow at sub-inhibitory concentration (Table 1). The amounts of endogenous 8-OxodG levels in untreated strains

indicates that a certain level of oxidative damage in yeast cells can be caused by normal metabolism.³⁴

The relative susceptibility of fungi to reactive oxygen and nitrogen species depends on the microbe.³⁸ This explanation could be taken to the different responses observed in fungi when they are exposed to generators of reactive species, such as fluconazole, once this antifungal generates ROS only in some yeasts.^{15,19} Data demonstrated that fluconazole generates ROS in *C. glabrata* at stationary growth phase and this generation could be part of its antifungal mechanism, including the generation of organic peroxides and $O_2^{\cdot-}$. The role of the GST enzyme in resistance or susceptibility of *C. glabrata* to fluconazole should be investigated because this enzyme could be an important key on fluconazole resistance. More studies involving this pathogenic yeast and the widely use of the antifungal fluconazole need to be done, once yeast cells in exponential or stationary phase respond differently to oxidative stress^{32,41} and fluconazole could also induce oxidative and nitrosative stress in a time- and dose-dependent manner³⁶ in *C. glabrata*. The importance of our data is on a better knowledge of the antioxidant response of the emergent yeast *C. glabrata* against fluconazole and also on the contribution to the understanding about the recent discovery of an additional antifungal mechanism shown by this azole.

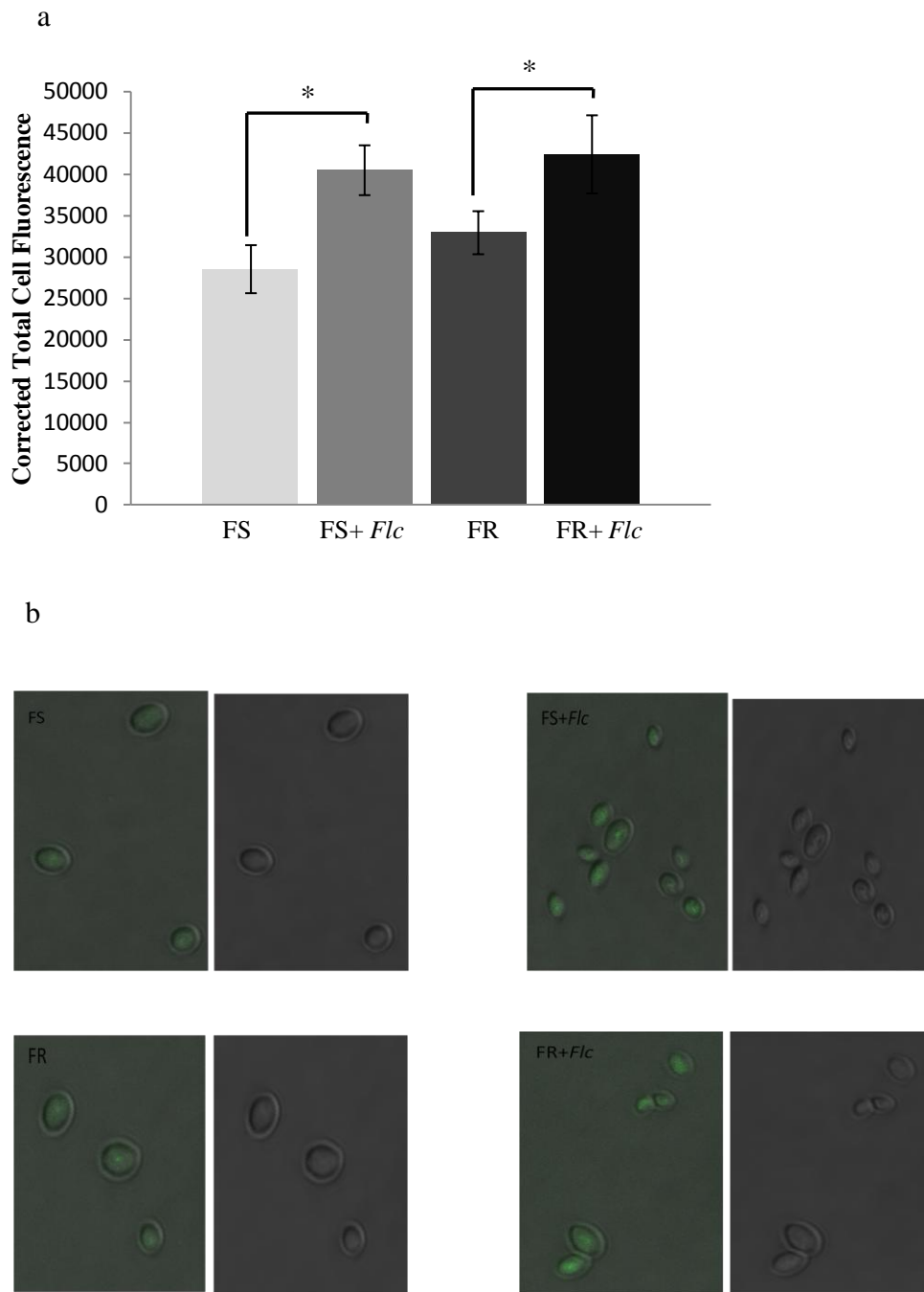


Figure 1. ROS generation induced by treatment with fluconazol (*Flc*) at sub-inhibitory concentration in fluconazole-susceptible (FS) and resistant (FR) *C. glabrata* strains in stationary growth phase. Cells were untreated and treated with the antifungal. Cells were prepared and analyzed according to Materials and methods. (a) Corrected Total Cell Fluorescence. The values reported are mean \pm standard error. * Statistically significant difference ($p \leq 0.05$). (b) Representative images from CLSM of our four study groups, Right: cells labeled with DCFH-DA; Left: differential interference contrast (DIC).

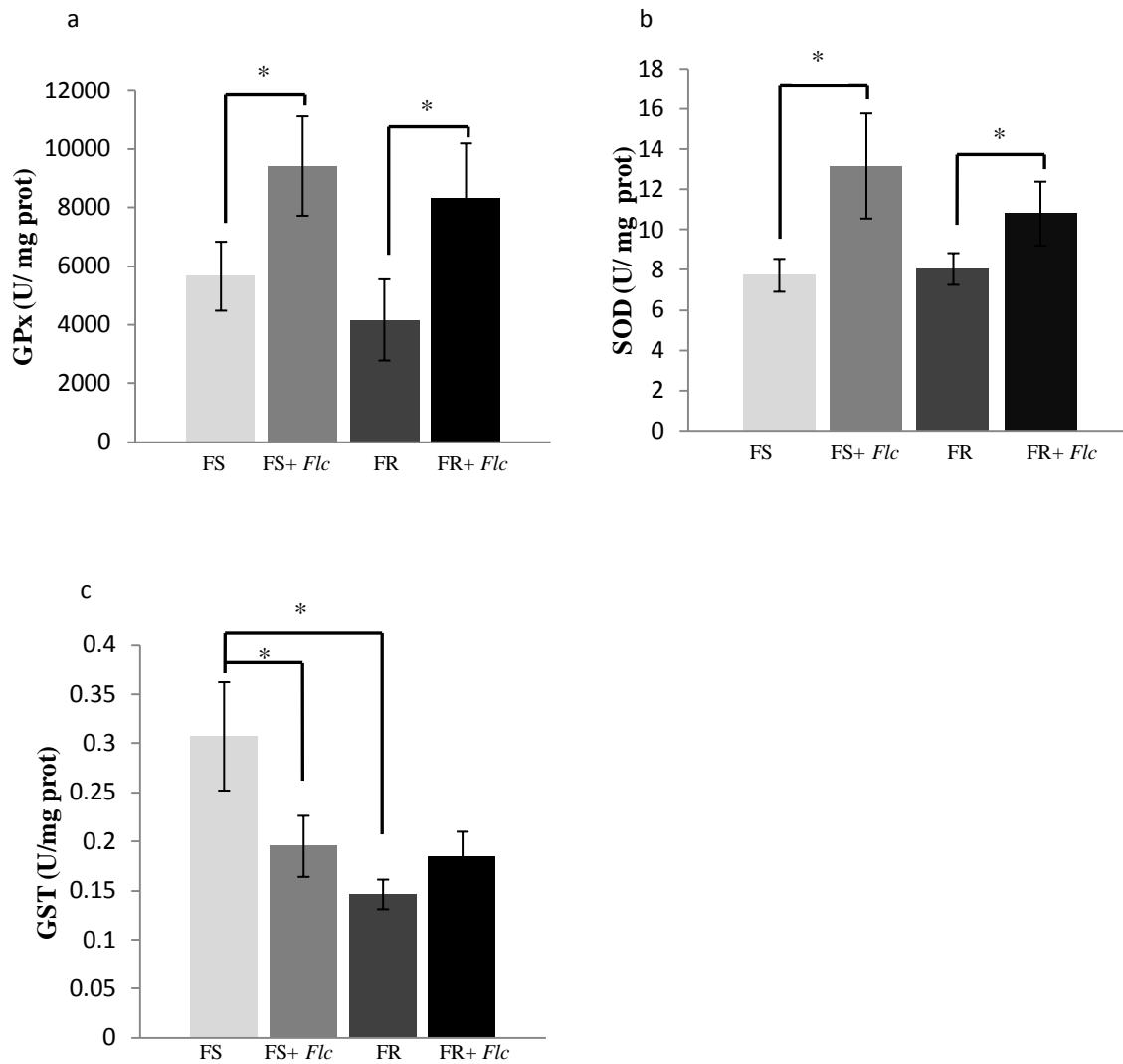


Figure 2. GPx (a), SOD (b) and GST (c) enzymatic activity of fluconazole-susceptible (FS) and resistant (FR) *C. glabrata* strains untreated and treated with fluconazol (*Flc*) at sub-inhibitory concentration. Cells were prepared and analyzed according to Materials and methods. The values reported are mean \pm standard error. * Statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

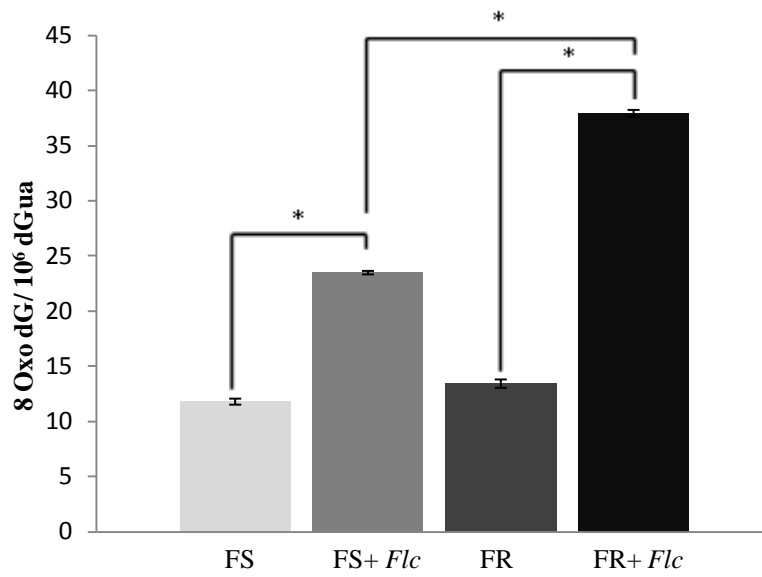


Figure 3. Endogenous levels of 8-Oxo dG in DNA of fluconazole-susceptible (FS) and resistant (FR) *C. glabrata* strains untreated and treated with fluconazole (*Flc*) at sub-inhibitory concentration. Cells were prepared and analyzed according to Materials and methods. The values reported are mean \pm standard error. * Statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Table 1. Fluconazole MIC and sub-inhibitory concentration of each fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* strains grown for oxidative stress assays.

<i>Candida glabrata</i> strains	Fluconazole MIC ^a (n)	Sub-inhibitory concentration of fluconazole for growth
FS	2mg/L (n=5)	1mg/L
	4mg/L (n=3)	2mg/L
FR	128mg/L (n=4)	64mg/L
	256mg/L (n=4)	128mg/L

FS, Fluconazole-susceptible; FR, Fluconazole-resistant; MIC, Minimal Inhibitory Concentration.

^a = MIC is expressed as mg/L, n = number of strains.

Table 2. Oxidative stress assays without statistically significant difference in two-way ANOVA among fluconazole-susceptible (FS) and resistant (FR) *C. glabrata* strains untreated and treated with fluconazole (*Flc*) at sub-inhibitory concentration.

Assays	<i>Candida glabrata</i> strains			
	FS	FS+ <i>Flc</i>	FR	FR+ <i>Flc</i>
MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	0.33 (± 0.13)	0.29 (± 0.05)	0.22 (± 0.07)	0.21 (± 0.06)
Protein Carbonylation ($\text{nmol}/\text{mg prot}$)	0.07 (± 0.008)	0.08 (± 0.02)	0.06 (± 0.01)	0.07 (± 0.01)
NO ₂ /NO ₃ ($\text{nmol}/\text{mg prot}$)	20.11 (± 2.47)	17.92 (± 2.27)	12.76 (± 1.83)	23.48 (± 6.04)
Total glutathione ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	30.47 (± 6.068)	41.61 (± 13.72)	50.14 (± 9.36)	46.22 (± 16.39)
Consumption of H ₂ O ₂ (U/mg prot)	5835 (± 750.24)	7222 (± 1536.54)	5843 (± 788.07)	7269 (± 1575.08)

MDA, malondialdehyde; NO₂/NO₃, nitrates and nitrites; H₂O₂, hydrogen peroxide.

The values are mean \pm standard error.

Acknowledgements

We are grateful to professors Itabajara Vaz and João Antonio Pêgas Henriques for providing equipment.

Funding

This work was supported by CAPES — Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian agency for research support).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; **20**: 133-+.
2. Smeekens S, van de Veerdonk F, Kullberg B et al. Genetic susceptibility to *Candida* infections. *Embo Molecular Medicine* 2013; **5**: 805-13.
3. Colombo A, Nucci M, Park B et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; **44**: 2816-23.
4. Tortorano A, Kibbler C, Peman J et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006; **27**: 359-66.
5. Pasqualotto A, Zimmerman R, Alves S et al. Take control over your fluconazole prescriptions: The growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2008; **29**: 898-9.
6. Colombo A, Garnica M, Camargo L et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 2013; **51**: 38-44.
7. Canuto M, Rodero F, Ducasse V et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2000; **19**: 593-601.
8. Oliveira P, Mascarenhas R, Lacroix C et al. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; **15**: 239-44.

9. Merenstein D, Hu H, Wang C et al. Colonization by *Candida* Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women. *Aids Research and Human Retroviruses* 2013; **29**: 30-4.
10. Tobudic S, Kratzer C, Presterl E. Azole-resistant *Candida* spp. - emerging pathogens? *Mycoses* 2012; **55**: 24-32.
11. Rogers P, Barker K. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: 3412-7.
12. Rogers P, Vermitsky J, Edlind T et al. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **58**: 434-8.
13. Grant S, Clissold S. Fluconazole - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 1990; **39**: 877-916.
14. Silva S, Negri M, Henriques M et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Fems Microbiology Reviews* 2012; **36**: 288-305.
15. Kobayashi D, Kondo K, Uehara N et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: 3113-7.
16. Thevissen K, Ayscough K, Aerts A et al. Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 2007; **282**: 21592-7.

17. Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis H et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**: 694-700.
18. Ferreira G, Baltazar L, Santos J et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**: 1801-11.
19. da Silva C, Neto J, Sidrim J et al. Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**: 1691-700.
20. Roetzer A, Klopff E, Gratz N et al. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *Febs Letters* 2011; **585**: 319-27.
21. Abegg M, Alabarse P, Casanova A et al. Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus *Candida*. *Mycopathologia* 2010; **170**: 11-20.
22. Fekete-Forgacs K, Gyure L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 2000; **43**: 273-9.
23. Bradford M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; **72**: 248-54.
24. Pinto R, Bartley W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal* 1969; **112**: 109-&.
25. Tsuchida S. Glutathione transferase. *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species* Oxford: Oxford University Press, 2000; 83-5.

26. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 1984; **105**: 121-6.
27. Rahman I, Kode A, Biswas S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 2006; **1**: 3159-65.
28. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America* 2004: 104-6.
29. Levine R, Garland D, Oliver C et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990; **186**: 464-78.
30. Grisham M, Johnson G, Lancaster J. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase* 1996; **268**: 237-46.
31. Shen B, Scaiano J, English A. Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblastst. *Photochemistry and Photobiology* 2006; **82**: 5-12.
32. Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-Del-Campo M, Canas-Villamar I et al. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell* 2008; **7**: 814-25.
33. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2007.
34. Lee S, Park J. A yeast mutant lacking thiol-dependent protector protein is hypersensitive to menadione. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1998; **1382**: 167-75.

35. Petrova V, Pisareva E, Angelov A et al. Targeting genes of Cd induced oxidative stress response in yeasts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2013; **27**: 3716-24.
36. Arana D, Nombela C, Pla J. Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**: 54-62.
37. Costa-de-Oliveira S, Sampaio-Marques B, Barbosa M et al. An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress. *Fems Yeast Research* 2012; **12**: 423-9.
38. Missall T, Lodge J, McEwen J. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: Implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic Cell* 2004; **3**: 835-46.
39. Garcera A, Casas C, Herrero E. Expression of *Candida albicans* glutathione transferases is induced inside phagocytes and upon diverse environmental stresses. *Fems Yeast Research* 2010; **10**: 422-31.
40. Veal E, Toone W, Jones N et al. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 35523-31.
41. Jamieson D. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen-peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology* 1992; **174**: 6678-81.

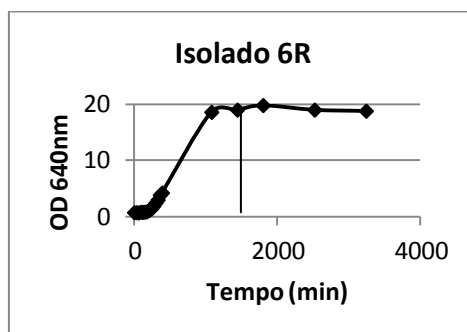
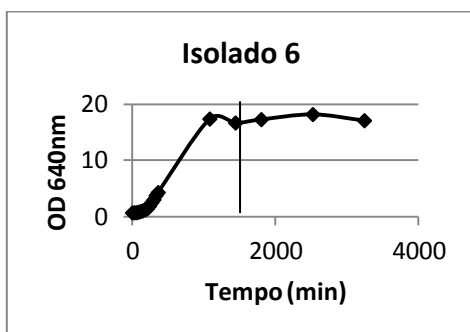
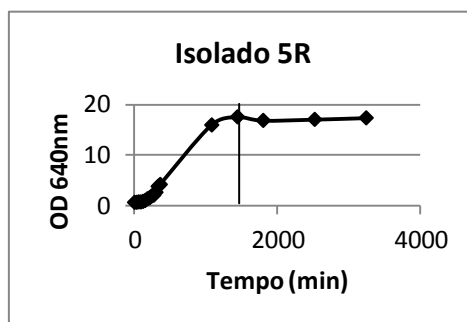
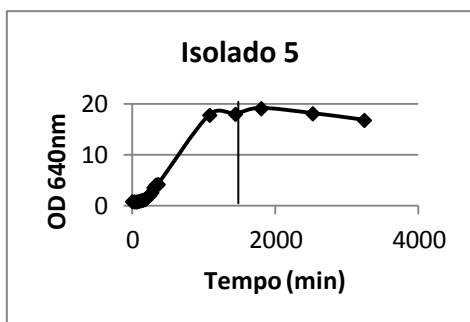
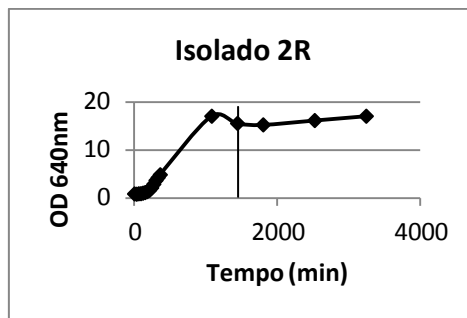
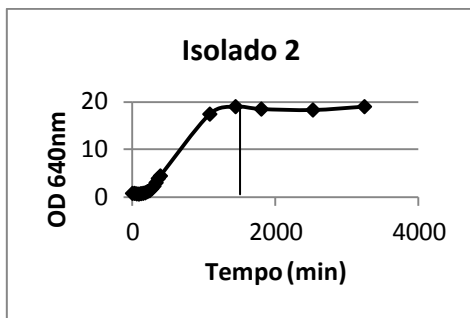
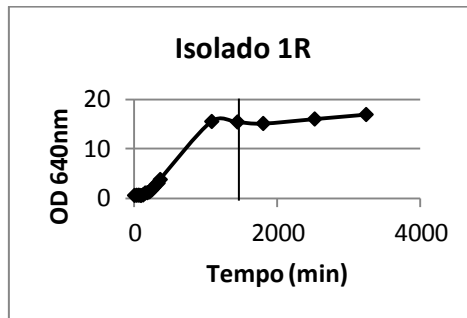
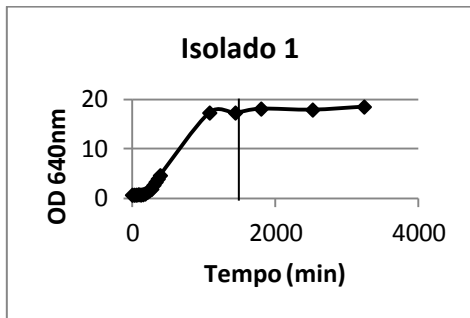
4. MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR

Foi realizada a curva de crescimento de cada isolado de *C. glabrata* utilizado neste estudo para verificar se os perfis de crescimento são semelhantes e, posteriormente, identificar o tempo necessário de crescimento para que todos atinjam a fase estacionária.

Para isso, a partir de uma cultura de 24h de crescimento, um inóculo foi adicionado em erlenmeyer contendo 30mL de caldo sabouraud e a densidade ótica (DO) ajustada para 0,08 em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 640nm. Esse repique foi incubado em *shaker* a 250rpm a 32°C por 48h. Nas seis primeiras horas de incubação a avaliação da DO foi realizada a cada meia hora e nas 42h seguintes, a cada 12h. Diluições necessárias foram feitas para que a DO se ajustasse para leitura em espectrofotômetro durante a realização da curva, assim como a utilização de um branco contendo apenas o meio de cultura.

5. RESULTADO SUPLEMENTAR

A partir da curva de crescimento de cada um dos isolados de *C. glabrata*, foi possível verificar que todos os isolados apresentam perfis de crescimento semelhantes e que o tempo necessário para que todos atinjam fase estacionária é de 24h.



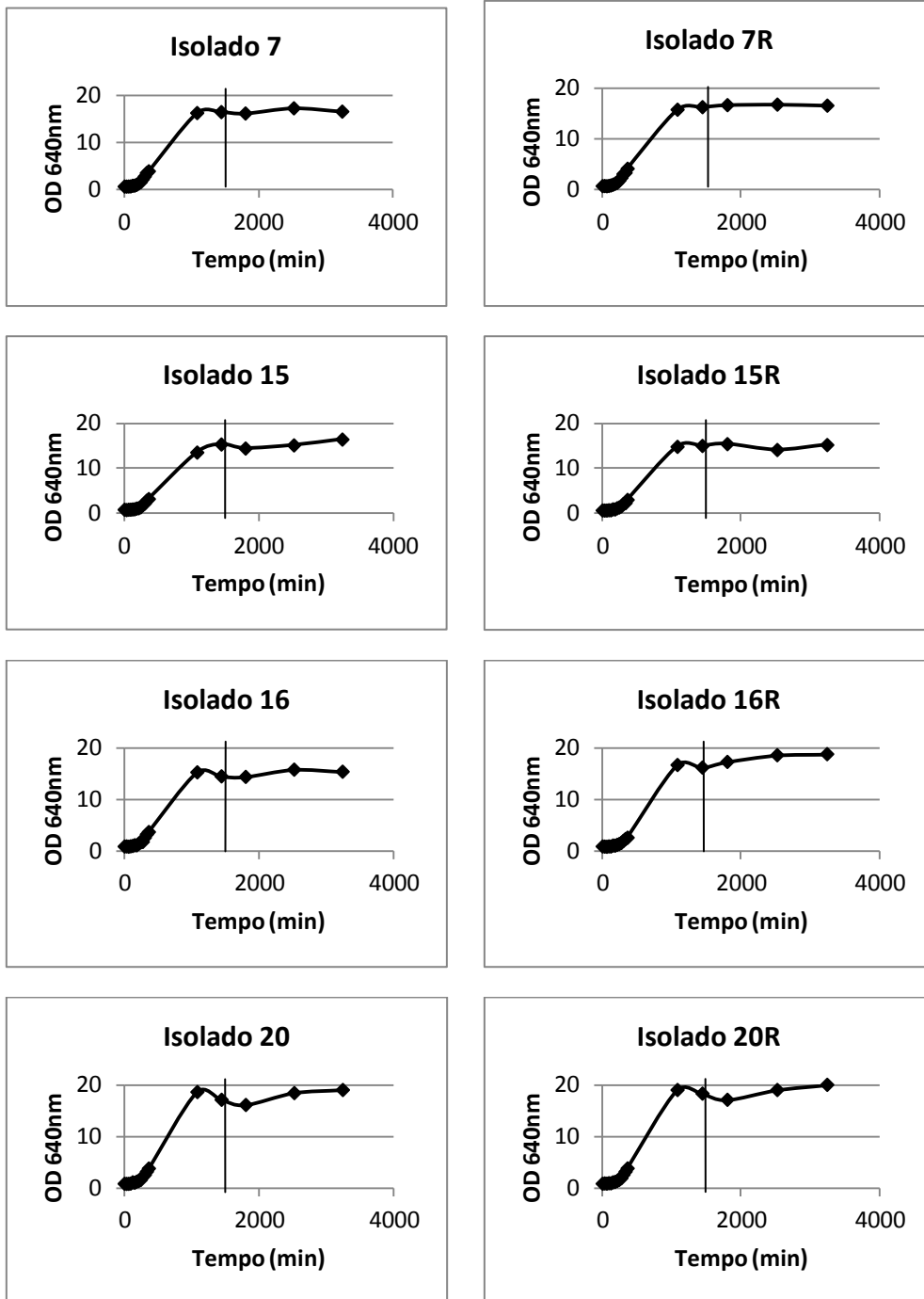


Figura 4: Curva de crescimento dos isolados de *C. glabrata* sensíveis (1, 2, 5, 6, 7, 15, 16 e 20) e resistentes (1R, 2R, 5R, 6R, 7R, 15R, 16R e 20R) ao fluconazol utilizados neste estudo. A linha tracejada representa o crescimento em 24h.

6. DISCUSSÃO

A resposta de *C. glabrata* ao estresse oxidativo tem sido analisada e comparada à resposta de outras espécies fúngicas. Esta levedura apresenta potente sistema antioxidante frente ao estresse oxidativo gerado, por exemplo, pela menadiona (Roetzer *et al.*, 2011) e pelo peróxido de hidrogênio (Abegg *et al.*, 2010) quando comparada às defesas antioxidantes de espécies como *C. albicans* e *S. cerevisiae* nessas condições. Além da geração de ERO por esses compostos, a suposição da geração de ERO como parte do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos tem sido feita frente à demonstração através de ensaios de fluorescência, superexpressão de genes de resposta a estresse oxidativo e ativação de enzimas antioxidantes quando as células fúngicas são expostas a esses agentes antifúngicos (Kobayashi, D. *et al.*, 2002; Arana, Nombela e Pla, 2010).

A geração de ERO pelo fluconazol em *C. glabrata* é demonstrada nos resultados da microscopia eletrônica confocal utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA. Os isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol tratados com fluconazol em concentração subinibitória até fase de crescimento estacionário apresentaram maior fluorescência comparados às mesmas células sem o tratamento (Figura 1a e b). Entretanto, não houve diferença estatística na fluorescência celular entre os isolados sensíveis e resistentes tratados com fluconazol, demonstrando que a geração de ERO independe da suscetibilidade do isolado ao antifúngico. Assim, esses resultados concordam com os que sugerem a participação de ERO no mecanismo de ação antifúngico do fluconazol em *C. albicans* (Kobayashi, D. *et al.*, 2002) e *S. cerevisiae* (Thevissen *et al.*, 2007). Por outro lado, a não geração de ERO pelo fluconazol em isolados de *C. gattii* em condições semelhantes as deste trabalho (Ferreira *et al.*, 2013) e em *C. krusei* (Costa-De-Oliveira *et al.*, 2012) leva a sugerir que esse mecanismo de ação adicional do fluconazol poderia ser espécie-dependente, uma vez que os trabalhos mostram que diferentes espécies respondem de maneira diferente. Além disso, a fase de crescimento do patógeno, assim como a concentração de fluconazol ao qual ele foi submetido poderia interferir nessa geração, pois dados recentes revelaram que a geração de ERO pelos azólicos, principalmente pelo fluconazol, seria dose-dependente (Arana, Nombela e Pla, 2010).

Diante da evidência de geração de ERO pelo fluconazol em *C. glabrata*, foi avaliado o sistema antioxidante de isolados dessa levedura na presença do antifúngico em concentração subinibitória de acordo com a CIM de cada isolado (Tabela 1), analisando se haveria

diferença na resposta ao estresse oxidativo entre os isolados sensíveis e resistentes. As enzimas antioxidantes SOD e GPx apresentaram aumento na sua atividade no extrato celular dos isolados tratados com fluconazol comparados aos não tratados, não havendo diferença na ativação enzimática entre os sensíveis e os resistentes (Figura 2a e b). Essas enzimas detoxificam espécies reativas que foram produzidas nas células tratadas com fluconazol resultando no aumento da atividade enzimática. A enzima SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, reduzindo-o à H_2O_2 ou oxidando-o à O_2 , já a GPx remove H_2O_2 e peróxidos orgânicos reduzindo-o através da oxidação da GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007). Sabendo o substrato dessas enzimas antioxidantes, sugere-se que o fluconazol, nas condições testadas, gerou $O_2^{\cdot-}$ e peróxidos nas células de *C. glabrata* como parte do seu mecanismo antifúngico. A levedura, na tentativa de se proteger de um possível dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas que detoxificam essas espécies.

Considerando que neste estudo as defesas antioxidantes e os danos oxidativos de *C. glabrata* foram quantificados em fase de crescimento estacionário da levedura (24h de tratamento com fluconazol), sugere-se que num processo infeccioso no qual se submete o paciente ao tratamento por fluconazol, na fase mais avançada de tratamento esse patógeno já estaria respondendo à geração de ERO pelo antifúngico; neste caso geração de $O_2^{\cdot-}$ e peróxidos. Essa resposta através da ativação enzimática protegeria a célula de danos como lipoperoxidação, uma vez que os resultados da quantificação de MDA, um produto final de dano oxidativo em lipídeos, não demonstram diferença estatística entre o grupo tratado com fluconazol e o não tratado (Tabela 2). Em células de *C. gattii* tratadas 1h e 24h com fluconazol não foi evidenciada lipoperoxidação em ambos os tempos, uma vez que o antifúngico não gerou ERO nessa espécie, entretanto o azólico itraconazol gerou e os resultados evidenciam peroxidação lipídica apenas com 1h de tratamento; os autores propõem que o estresse oxidativo em *C. gattii* ocorreria mais significativamente no início do tratamento com itraconazol (Ferreira *et al.*, 2013).

A enzima antioxidante GST apresentou maior atividade nos isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol comparada aos isolados resistentes e, além disso, nas células sensíveis tratadas com fluconazol foi observada uma diminuição da atividade da GST comparada com as sensíveis não tratadas (Figura 2c). *C. glabrata* possui o gene *GTT3*, que codifica para uma GST com localização citoplasmática (Petrova *et al.*, 2013), essa enzima é responsável pela detoxificação de xenobióticos através da ligação deles à GSH e a subsequente eliminação do

conjugado ou internalização em vacúolos (Garcera, Casas e Herrero, 2010). A atividade da GST frente ao fluconazol na espécie *C. glabrata* ainda é inexplorada, assim como uma possível associação entre GST e resistência ao fluconazol nessa levedura. Observando os resultados e considerando a atividade da GST, pode-se sugerir que as células sensíveis quando tratadas com fluconazol perdem a atividade da GST e conseqüentemente ocorre diminuição da externalização do fluconazol, tornando a célula sensível ao antifúngico. Entretanto, mais ensaios envolvendo essa enzima são necessários para demonstrar claramente seu papel no estresse oxidativo gerado pelo fluconazol assim como na resposta antioxidante de *C. glabrata*.

O H_2O_2 isolado é praticamente inócuo e pouco reativo, é um fraco agente redutor ou oxidante, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares, como a membrana nuclear, através de aquaporinas e outros mecanismos (Halliwell e Gutteridge, 2007). O consumo de H_2O_2 é realizado por peroxirredoxinas, catalases e glutathione peroxidases, enzimas que, por diferentes reações químicas, detoxificam essa ERO não radicalar. No ensaio de consumo de H_2O_2 não houve diferença estatística entre os quatro grupos estudados (Tabela 2), denotando que não haveria relação entre essas enzimas detoxificadoras de H_2O_2 e a resistência ao fluconazol em *C. glabrata* nas condições testadas. Esse resultado corrobora com o fato de não haver diferença estatística na atividade da GPx entre isolados sensíveis e resistentes. Da mesma maneira, a defesa antioxidante não enzimática glutathione total não apresentou diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

A medida indireta de NO^* através da quantificação de NO_2 e NO_3 não apresentou diferença estatística nos grupos estudados. Esse resultado sugere que o NO^* não apresentaria papel no mecanismo de ação do fluconazol em *C. glabrata* e na sua resistência a esse antifúngico nas condições testadas.

Em adição aos ensaios de defesas antioxidantes, quantificou-se dano oxidativo em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos nos isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol com o intuito de analisar o possível dano oxidativo causado por esse antifúngico em concentração subinibitória. Os resultados da quantificação de MDA e grupamento carbonil, indicadores de dano oxidativo em lipídeos e proteínas respectivamente, demonstram que o fluconazol não induziu dano oxidativo nessas macromoléculas nas condições que foram testadas (Tabela 2), embora o antifúngico tenha gerado ERO (Figura 1a e b). Diante disso, conclui-se que o fluconazol não induziu a formação de peróxidos lipídicos e sim outros peróxidos orgânicos devido ao aumento da atividade da enzima GPx. Leveduras como *C.*

glabrata e também *S. cerevisiae* são mais resistentes ao estresse oxidativo, e consequentemente ao dano oxidativo, na fase de crescimento estacionário do que na fase exponencial (Jamieson, 1992; Brown, Haynes e Quinn, 2009), o que poderia justificar os resultados de MDA e carbonilação proteica encontrados neste trabalho.

Entretanto, foi possível identificar dano oxidativo no DNA dos isolados de *C. glabrata* tratados com fluconazol. Na figura 3 observa-se que a quantificação de 8-OxodG demonstrou-se maior nos isolados tratados com fluconazol e, além disso, os isolados resistentes apresentaram níveis mais elevados de 8-OxodG comparado aos níveis dos sensíveis (ambos tratados com fluconazol). Baseados na ativação enzimática da SOD e da GPx, é sugerido a geração de $O_2^{\cdot-}$ e peróxidos nas células de *C. glabrata* tratadas com fluconazol, entretanto essas ERO não reagem de modo significativo com bases do DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007; Cadet *et al.*, 2012). Espera-se que a reação da maioria dos radicais dos peróxidos orgânicos com o DNA seja mínima, uma vez que apresentam moderada reatividade comparados com $\cdot OH$. Esse radical, por sua vez, apresenta alta reatividade com bases do DNA, seja pela sua adição à dupla ligação da posição C5 e C6 de bases pirimidínicas ou C8 de bases purínicas ou pela subtração de um hidrogênio do grupo metil da timina, do grupo 2-amino da guanina e 2-desoxirribose (Cadet *et al.*, 2012). O $O_2^{\cdot-}$ pode acelerar a produção de $\cdot OH$ pela chamada reação de Fenton assistida por $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell e Gutteridge, 2007), sendo essa um possível via de geração de $\cdot OH$ que resultaria em dano oxidativo no DNA dos isolados de *C. glabrata* tratados com fluconazol. Mas é necessário observar que se o $\cdot OH$ está atacando o DNA, ele deve ser produzido nas suas proximidades, uma vez que $\cdot OH$ é muito reativo para difundir de outro local de formação (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Um estudo recente mostrou, através da versão alcalina do ensaio cometa, que o fluconazol induziu dano oxidativo no DNA de *C. tropicalis* em condições semelhantes (Da Silva *et al.*, 2013), corroborando com os resultados deste trabalho. Até o momento, o presente estudo é o primeiro a utilizar HPLC-ECD para avaliar dano oxidativo no DNA de *C. glabrata*. Com relação ao maior dano oxidativo no DNA dos isolados resistentes ao fluconazol tratados com o antifúngico comparados aos isolados sensíveis tratados (Figura 3), sugere-se que isso ocorre devido à maior concentração de fluconazol no qual os isolados resistentes foram submetidos até atingirem fase estacionária (Tabela 1), já que os ensaios das defesas antioxidantes não apresentam diferença entre os isolados sensíveis e resistentes. Os valores de 8-OxodG nos isolados não tratados com fluconazol indica que certo nível de dano

oxidativo no DNA das leveduras pode ser causado pelo metabolismo normal (Lee e Park, 1998).

A suscetibilidade dos fungos à ERO e ERN depende do micro-organismo (Missall, Lodge e Mcewen, 2004). Essa informação poderia explicar as diferentes respostas observadas nos fungos quando são expostos a agentes geradores de espécies reativas, como supostamente seria o fluconazol, uma vez que esse antifúngico gera ERO apenas em algumas espécies de leveduras (Kobayashi, D. *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2013). Com relação à resistência a antifúngicos estar associada, entre outras coisas, à melhor resposta ao estresse oxidativo e ao menor dano oxidativo (Rogers e Barker, 2002), os resultados mostram que em *C. glabrata* na fase de crescimento estacionário isso não foi totalmente observado, considerando que enzimas antioxidantes como SOD, GPx, o consumo de H₂O₂ realizado por enzimas como catalase, Prxs e peroxidases, não apresentaram maior atividade nos isolados resistentes e nem menor atividade nos sensíveis. Deve-se aqui levar em conta que diferentes condições experimentais interferem nesses resultados, como por exemplo, fase de crescimento da levedura, origem do isolado, espécie estudada, concentração de fluconazol utilizada e tempo de exposição das células ao antifúngico. Mais pesquisas precisam ser realizadas para que tais achados sejam comprovados, assim como aprofundar a análise do papel da enzima GST na resistência aos antifúngicos.

A importância destes resultados está no melhor conhecimento da resposta antioxidante da levedura emergente *C. glabrata* contra o fluconazol e também na contribuição para o entendimento sobre a recente descoberta do mecanismo antifúngico adicional mostrado por esse azólico, a geração ERO. A resposta antioxidante está diretamente relacionada à patogenicidade e então a inibição dessa resposta poderia atenuar a virulência de espécies patogênicas (Saijo *et al.*, 2010) como *C. glabrata*. A compreensão do metabolismo antioxidante das leveduras torna-se essencial no desenvolvimento racional de antifúngicos para uso clínico, uma vez que novos mecanismos antifúngicos são um campo a ser explorado frente à ampla resistência aos antifúngicos vista na epidemiologia.

7. CONCLUSÃO

O antifúngico fluconazol induziu geração de ERO em *C. glabrata* em fase de crescimento estacionário, ativando as enzimas antioxidantes SOD e GPx e induzindo dano oxidativo no DNA da levedura. O fluconazol não induziu dano oxidativo em lipídeos e proteínas nas condições testadas. A relação entre resistência ao fluconazol e a resposta ao estresse oxidativo em *C. glabrata* não foi observada nas condições testadas, embora haja um possível papel da enzima GST na resistência ao antifúngico.

8. PERSPECTIVAS

A conclusão deste trabalho abre a possibilidade de que outros estudos sejam realizados para complementar o entendimento sobre a geração de ERO como parte do mecanismo de ação do fluconazol, assim como a relação entre resistência de *C. glabrata* ao fluconazol e resposta ao estresse oxidativo. Entre eles, podemos citar:

- Realização dos mesmos ensaios em *C. glabrata* em fase de crescimento exponencial;
- Avaliação da geração de ERO em diferentes concentrações de fluconazol em *C. glabrata*;
- Estudo da geração de ERO pelo fluconazol e a resistência a esse antifúngico em outras espécies de *Candida*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. et al. Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus *Candida*. **Mycopathologia**, v. 170, n. 1, p. 11-20, JUL 2010 2010. ISSN 0301-486X.

_____. Glutathione levels in and total antioxidant capacity of *Candida* sp cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 620-626, SEP-OCT 2012 2012. ISSN 0037-8682.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984 1984. ISSN 0076-6879.

AKSAM, E. et al. Absence of the peroxiredoxin Pmp20 causes peroxisomal protein leakage and necrotic cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1115-1124, OCT 15 2008 2008. ISSN 0891-5849.

ANDES, D. et al. Impact of Treatment Strategy on Outcomes in Patients with Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis: A Patient-Level Quantitative Review of Randomized Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p. 1110-1122, APR 15 2012 2012. ISSN 1058-4838.

ARANA, D.; NOMBELA, C.; PLA, J. Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 1, p. 54-62, JAN 2010 2010. ISSN 0305-7453.

BALDING, P. et al. How Do Azoles Inhibit Cytochrome P450 Enzymes? A Density Functional Study. **Journal of Physical Chemistry a**, v. 112, n. 50, p. 12911-12918, DEC 18 2008 2008. ISSN 1089-5639.

BARNS, S. et al. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* especies and relatives. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2250-2255, APR 1991 1991. ISSN 0021-9193.

BEN-AMI, R. et al. Distribution of fluconazole-resistant *Candida* bloodstream isolates among hospitals and inpatient services in Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 752-756, AUG 2013 2013. ISSN 1198-743X.

BERILA, N. et al. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 574-578, JUN 2009 2009. ISSN 0924-8579.

BERILA, N.; HYROSSOVA, P.; SUBIK, J. Oxidative stress response and virulence factors in *Candida glabrata* clinical isolates. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 2, p. 116-121, MAR 2011 2011. ISSN 0015-5632.

BIALKOVA, A.; SUBIK, J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 1, p. 3-20, 2006 2006. ISSN 0015-5632.

BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976. ISSN 0003-2697.

BROWN, A.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 384-391, AUG 2009 2009. ISSN 1369-5274.

CADET, J. et al. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 367-381, APR 2012 2012. ISSN 1071-5762.

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

CAMARGO, T. et al. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 7, p. 546-551, SEP 2010 2010. ISSN 0196-6553.

CANUTO, M. et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 593-601, AUG 2000 2000. ISSN 0934-9723.

COLLINS, A. et al. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 8, p. 1089-1099, APR 15 2003 2003. ISSN 0891-5849.

COLOMBO, A. et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38-44, JAN 2013 2013. ISSN 1369-3786.

_____. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, AUG 2006 2006. ISSN 0095-1137.

CORTES, J. et al. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 28, n. 2, p. 74-78, APR 30 2011 2011. ISSN 1130-1406.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress. **Fems Yeast Research**, v. 12, n. 4, p. 423-429, JUN 2012 2012. ISSN 1567-1356.

COX, A.; WINTERBOURN, C.; HAMPTON, M. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, JAN 15 2010 2010. ISSN 0264-6021.

CUELLAR-CRUZ, M. et al. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 814-825, MAY 2008 2008. ISSN 1535-9778.

_____. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 649-654, JUL 2009 2009. ISSN 0074-0276.

DA SILVA, C. et al. Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, APR 2013 2013. ISSN 0066-4804.

DE ALMEIDA, A. et al. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 335-339, MAY-JUN 2013 2013. ISSN 0037-8682.

DE LAS PENAS, A. et al. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAPI- and SIR-dependent transcriptional silencing. **Genes & Development**, v. 17, n. 18, p. 2245-2258, SEP 15 2003 2003. ISSN 0890-9369.

DE REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 729+, OCT 2004 2004. ISSN 0893-8512.

DIRMEIER, R. et al. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress - Implications for the induction of hypoxic genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 34773-34784, SEP 20 2002 2002. ISSN 0021-9258.

DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35-44, JUL 1 2004 2004. ISSN 0028-0836.

ESCHENAUER, G. et al. Fluconazole versus an echinocandin for *Candida glabrata* fungaemia: a retrospective cohort study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 922-926, APR 2013 2013. ISSN 0305-7453.

FALAGAS, M.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. E954-E966, NOV 2010 2010. ISSN 1201-9712.

FANG, F. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820-832, OCT 2004 2004. ISSN 1740-1526.

FEKETE-FORGACS, K.; GYURE, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7-8, p. 273-279, 2000 2000. ISSN 0933-7407.

FERREIRA, G. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801-1811, AUG 2013 2013. ISSN 0305-7453.

FETTER, A. et al. Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV infection - frequency and predisposing factors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 2, p. 57-59, FEB 1993 1993. ISSN 0904-2512.

FIDEL, P. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 220-227, MAY 2004 2004. ISSN 0966-842X.

FIDEL, P.; VAZQUEZ, J.; SOBEL, J. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-+, JAN 1999 1999. ISSN 0893-8512.

FILLER, S. Insights from human studies into the host defense against candidiasis. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 129-132, APR 2012 2012. ISSN 1043-4666.

FRISARD, M. et al. Aging, resting metabolic rate, and oxidative damage; Results from the Louisiana healthy aging study. **Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 7, p. 752-759, JUL 2007 2007. ISSN 1079-5006.

FURLANETO, M. et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595-599, SEP-OCT 2011 2011. ISSN 0037-8682.

GARCERA, A.; CASAS, C.; HERRERO, E. Expression of *Candida albicans* glutathione transferases is induced inside phagocytes and upon diverse environmental stresses. **Fems Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 422-431, JUN 2010 2010. ISSN 1567-1356.

GHANNOUM, M.; RICE, L. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-+, OCT 1999 1999. ISSN 0893-8512.

GONZALEZ-PARRAGA, P. et al. Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1722, n. 3, p. 324-330, APR 15 2005 2005. ISSN 0304-4165.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1996.

GOURLAY, C.; AYSCOUGH, K. Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 17, p. 6487-6501, SEP 2006 2006. ISSN 0270-7306.

GRANT, S.; CLISSOLD, S. Fluconazole - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. **Drugs**, v. 39, n. 6, p. 877-916, JUN 1990 1990. ISSN 0012-6667.

GRISHAM, M.; JOHNSON, G.; LANCASTER, J. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, p. 237-246, 1996 1996. ISSN 0076-6879.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. 4. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 591-596, DEC 2001 2001. ISSN 0966-842X.

HROMATKA, B.; NOBLE, S.; JOHNSON, A. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 10, p. 4814-4826, OCT 2005 2005. ISSN 1059-1524.

JAMIESON, D. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen-peroxide and menadione. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6678-6681, OCT 1992 1992. ISSN 0021-9193.

JAMNIK, P.; RASPOR, P. Methods for monitoring oxidative stress response in yeasts. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 195-203, 2005 2005. ISSN 1095-6670.

JANDRIC, Z.; SCHULLER, C. Stress response in *Candida glabrata*: pieces of a fragmented picture. **Future Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1475-1484, DEC 2011 2011. ISSN 1746-0913.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, p. 104-106, JUN 2004 2004. ISSN 1527-5949.

KAUR, R. et al. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 378-384, AUG 2005 2005. ISSN 1369-5274.

KIRAZ, N. et al. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 136-140, AUG 2010 2010. ISSN 0167-7012.

KOBAYASHI, D. et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3113-3117, OCT 2002 2002. ISSN 0066-4804.

KOBAYASHI, G. et al. Yeast flavohemoglobin from *Candida norvegensis* - Its structural, spectral, and stability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42540-42548, NOV 8 2002 2002. ISSN 0021-9258.

LEE, S.; PARK, J. A yeast mutant lacking thiol-dependent protector protein is hypersensitive to menadione. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1382, n. 1, p. 167-175, JAN 15 1998 1998. ISSN 0167-4838.

LEVINE, R. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990 1990. ISSN 0076-6879.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 3, p. 204-215, MAR 2007 2007. ISSN 0022-0345.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. Antifungal drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. S31-S41, JAN 15 2003 2003. ISSN 1058-4838.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 76-81, FEB 2002 2002. ISSN 1471-4914.

MAERTENS, J. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1-10, MAR 2004 2004. ISSN 1198-743X.

MARICHAL, P. et al. Molecular-biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2229-2237, OCT 1997 1997. ISSN 0066-4804.

MASSONET, C. et al. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2209-2211, MAY 2004 2004. ISSN 0095-1137.

MAURYA, V. et al. Oropharyngeal candidiasis and *Candida* colonization in HIV positive patients in northern India. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 8, p. 608-613, AUG 2013 2013. ISSN 1972-2680.

MERENSTEIN, D. et al. Colonization by *Candida* Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 1, p. 30-34, JAN 2013 2013. ISSN 0889-2229.

MICHAN, C.; PUEYO, C. Growth phase-dependent variations in transcript profiles for thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems followed by budding and hyphal *Candida albicans* cultures. **Fems Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1078-1090, NOV 2009 2009. ISSN 1567-1356.

MILAN, E. et al. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, n. 3, p. 211-216, NOV 1998 1998. ISSN 0732-8893.

MISSALL, T.; LODGE, J.; MCEWEN, J. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: Implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 835-846, AUG 2004 2004. ISSN 1535-9778.

MULLER, H. et al. The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 848-858, MAY 2008 2008. ISSN 1535-9778.

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics - A Highway to New Drugs or a Dead End? **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1378-1388, MAR 2012 2012. ISSN 0929-8673.

NGUYEN, M. et al. Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, beta-D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 9, p. 1240-1248, MAY 1 2012 2012. ISSN 1058-4838.

OKAMOTO, Y.; AOKI, S.; MATAGA, I. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 9-15, JUL 2004 2004. ISSN 0301-486X.

OLIVEIRA, P. et al. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 239-244, MAY-JUN 2011 2011. ISSN 1413-8670.

OZCAN, S. et al. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. **Apmis**, v. 114, n. 2, p. 139-145, FEB 2006 2006. ISSN 0903-4641.

PARKINSON, T.; FALCONER, D.; HITCHCOCK, C. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 8, p. 1696-1699, AUG 1995 1995. ISSN 0066-4804.

PASQUALOTTO, A. et al. Take control over your fluconazole prescriptions: The growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 9, p. 898-899, SEP 2008 2008. ISSN 0899-823X.

PASSOS, X. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 925-928, DEC 2005 2005. ISSN 0074-0276.

PERRONE, G.; GRANT, C.; DAWES, I. Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 1, p. 218-230, JAN 2005 2005. ISSN 1059-1524.

PETROVA, V. et al. Targeting genes of Cd induced oxidative stress response in yeasts. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 2, p. 3716-3724, APR 2013 2013. ISSN 1310-2818.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133+, JAN 2007 2007. ISSN 0893-8512.

PINTO, R.; BARTLEY, W. Effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. **Biochemical Journal**, v. 112, n. 1, p. 109-&, 1969 1969. ISSN 0264-6021.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006 2006. ISSN 1754-2189.

ROETZER, A. et al. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. **Febs Letters**, v. 585, n. 2, p. 319-327, JAN 21 2011 2011. ISSN 0014-5793.

ROGERS, P.; BARKER, K. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3412-3417, NOV 2002 2002. ISSN 0066-4804.

_____. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1220-1227, APR 2003 2003. ISSN 0066-4804.

ROGERS, P. et al. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 434-438, AUG 2006 2006. ISSN 0305-7453.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1307-1315, NOV 2003 2003. ISSN 1286-4579.

SAIJO, T. et al. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 81-90, FEB 2010 2010. ISSN 0301-486X.

SANGLARD, D. et al. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2753-2765, NOV 1999 1999. ISSN 0066-4804.

SARDI, J. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, JAN 2013 2013. ISSN 0022-2615.

SENEVIRATNE, C. et al. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. **Proteomics**, v. 10, n. 7, p. 1444-1454, APR 2010 2010. ISSN 1615-9853.

SHEN, B.; SCAIANO, J.; ENGLISH, A. Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblastst. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 1, p. 5-12, JAN-FEB 2006 2006. ISSN 0031-8655.

SHENG, Y. et al. Comparison of Two Yeast MnSODs: Mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* versus Cytosolic *Candida albicans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 51, p. 20878-20889, DEC 28 2011 2011. ISSN 0002-7863.

SIDRIM, J. C.; ROCHA, F. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, MAR 2012 2012. ISSN 0168-6445.

SINGLA, N. et al. *Candida* Colonization in Urine Samples of ICU Patients: Determination of Etiology, Antifungal Susceptibility Testing and Evaluation of Associated Risk Factors. **Mycopathologia**, v. 174, n. 2, p. 149-155, AUG 2012 2012. ISSN 0301-486X.

SMEEKENS, S. et al. Genetic susceptibility to *Candida* infections. **Embo Molecular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 805-813, JUN 2013 2013. ISSN 1757-4676.

SNELL, S.; FOSTER, T.; HAIDARIS, C. Miconazole Induces Fungistasis and Increases Killing of *Candida albicans* Subjected to Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 596-603, MAY-JUN 2012 2012. ISSN 0031-8655.

SOKOLANDERSON, M. et al. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing of amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 702-705, MAY 1988 1988. ISSN 0066-4804.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **Biomed Research International**, 2013 2013. ISSN 2314-6133.

SRIKANTHA, T.; LACHKE, S.; SOLL, D. Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 328-340, APR 2003 2003. ISSN 1535-9778.

THEVISSSEN, K. et al. Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21592-21597, JUL 27 2007 2007. ISSN 0021-9258.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. - emerging pathogens? **Mycoses**, v. 55, p. 24-32, APR 2012 2012. ISSN 0933-7407.

TORTORANO, A. et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, MAY 2006 2006. ISSN 0924-8579.

TSUCHIDA, S. Glutathione transferase. In: (Ed.). **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species** Oxford: Oxford University Press, 2000. p.83-85.

ULLMANN, B. et al. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 3, p. 715-723, JUN 2004 2004. ISSN 1535-9778.

VANDENBOSCH, D. et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 694-700, APR 2010 2010. ISSN 0305-7453.

VANDEPUTTE, P. et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal

growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 982-990, MAR 2007 2007. ISSN 0066-4804.

VEAL, E. et al. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35523-35531, SEP 20 2002 2002. ISSN 0021-9258.

VERMITSKY, J. et al. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 704-722, AUG 2006 2006. ISSN 0950-382X.

VERMITSKY, J.; EDLIND, T. Azole resistance in *Candida glabrata*: Coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3773-3781, OCT 2004 2004. ISSN 0066-4804.

WHELAN, W. et al. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. **Fems Microbiology Letters**, v. 24, n. 1, p. 1-4, 1984 1984. ISSN 0378-1097.

WONG, S. et al. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Genome Biology**, v. 4, n. 2, 2003 2003. ISSN 1465-6914.

CURRÍCULO LATTES

Dados pessoais: Nome Camila Donato Mahl

Nascimento: 23/08/1988 - Santa Rosa/RS - Brasil

RG: 7073703667 SSP - RS - 15/10/2004

CPF: 018.609.850-25

Endereço residencial: Rua São Manoel, Santana – Porto Alegre

90620110, RS - Brasil

Telefone: 51 82053875

Endereço profissional: UFRGS, Instituto de Biociências

AC Campus da UFRGS

Agronomia - Porto Alegre

91501970, RS - Brasil

Telefone: 51 33087372

E-mail para contato: camilamahl@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2014 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Geração de espécies reativas por fluconazol em *Candida glabrata*:
ativação de enzimas antioxidantes e dano oxidativo no DNA

Orientador: Mara da Silveira Benfato

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006 - 2011 Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

Orientador: Sydney Hartz Alves

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

1999 – 2004 Curso de Inglês.

Yes English School, Santa Rosa/RS, Brasil

Atuação profissional

1. Farmácia Panvel

2011 - 2012 Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutica Responsável Técnica, Carga horária: 44h semanais, Regime: Integral

2. Farmácia Popular do Brasil – FPB

2011 - 2011 Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 45h totais, Regime: Parcial

3. Farmácia Alternativa - LTDA

2010 - 2010 Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 45 totais, Regime: Parcial

4. Laboratório Adolfo Lutz - Hospital Vida e Saúde - Santa Rosa

2007 - 2007 Vínculo: Estágio voluntário, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 50 totais, Regime: Parcial

5. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

2006 - 2011 Vínculo: Graduação, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20 semanais, Regime: Parcial

01/2008 - 07/2008 Estágio, Farmácia Escola Comercial Setor de Manipulação/UFSM

Áreas de atuação

1. Bioquímica
2. Biologia Molecular
3. Biofísica
4. Microbiologia
5. Micologia

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. AZEVEDO, M. I., BOTTON, S. A., PEREIRA, D. I. B., ROBE, L.J., JESUS, F.P.K., **MAHL, C. D.**, COSTA, M.M., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. *Veterinary Microbiology (Amsterdam. Print)*. , v.159, p.141 - 148, 2012.
2. AZEVEDO, M. I., PEREIRA, D. I. B., BOTTON, S. A., COSTA, M. M., **MAHL, C. D.**, ALVES, S. H., Santurio, J. M., SANTURIO, J. M. *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates.. *Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)*. , v.32, p.619 - 622, 2012.

3. SPADER, T. B., VENTURINI, T. P., CAVALHEIRO, A. S., **MAHL, C. D.**, MARIO, D. A. N., LARA, V. M., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H. In vitro interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampicin against *Fusarium* spp. *Mycoses* (Berlin). , v.54, p.131 - 136, 2011.
4. OLIVEIRA, D. C., LOPES, P. G. M., SPADER, T. B., **MAHL, C. D.**, ALVES, G. R. T., LARA, V. M., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H. Susceptibilities to antifungal agents of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* (Print). , v.49, p.3047 - 3049, 2011.
5. ANDRADE, A. S., SALOMON, T., BEHLING, C. S., **MAHL, C. D.**, HACKENHAAR, F., PUTTI, J., BENFATO, M. S. Alpha-lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Experimental Eye Research*. ,2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MAHL, C. D.**, MARTINS, B., BENFATO, M. S. Desempenho dos alunos de Estresse Oxidativo em Sistemas Biológicos (EaD) e o construtivismo social In: Salão UFRGS 2013: IX SALÃO DE ENSINO, 2013, Porto Alegre.
2. **MAHL, C.**, SILVA, M. N., BEHLING, C. S., HACKENHAAR, F., PUTTI, J., DENARDI, L. B., SALOMON, T., ALVES, S. H., BENFATO, M. S. Oxidative stress and fluconazole resistance in *Candida glabrata* In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires.
3. HACKENHAAR, F., MEDEIROS, T., BEHLING, C. S., PUTTI, J., **MAHL, C.**, VERONA, C., SILVA, A. C. A., OLIVEIRA, V. M., VIEIRA, S. R. R., BENFATO, M. S. Oxidative stress in post-cardiac resuscitation syndrome after mild hypothermia In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires.
4. BOTTON, S.A., COSTA, M., PEREIRA, D.I.B., AZEVEDO, M. I., **MAHL, C. D.**, WEIBLEN, C., JESUS, F. P. K., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. Análise filogenética de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*. In: XVII Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, 2010, Vale Vêneto.

5. ROSSATO, L., VENTURINI, T. P., **MAHL, C. D.**, WEILER, C. B., DENARDI, L. B., ALVES, I. A., BANDEIRA, L. A., MARIO, D. A. N., SOARES, I. H., ALVES, S.H. Atividade "in vitro" das associações de anfotericina B e itraconazol com azitromicina sobre *Fusarium* spp. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu.
6. ROSSATO, L., VENTURINI, T. P., WEILER, C. B., ALVES, I. A., BANDEIRA, L. A., MARIO, D. A. N., DENARDI, L. B., **MAHL, C. D.**, SOARES, I. H., ALVES, S.H. Avaliação da atividade in vitro das combinações de azólicos com ciprofloxacino e metronidazol contra *Fusarium* spp In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu
7. ALVES, I. A., BANDEIRA, L. A., ROSSATO, L., DENARDI, L. B., MARIO, D. A. N., **MAHL, C. D.**, VENTURINI, T. P., WEILER, C. B., ALVES, G. R. T., ALVES, S.H. Detecção de resistência cruzada entre fluconazol e novos triazólicos em *C. glabrata*. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu.
8. MARIO, D. A. N., SCHIED, L. A., DENARDI, L. B., ALVES, I. A., ROSSATO, L., SOARES, I. H., **MAHL, C. D.**, BANDEIRA, L. A., ALVES, S.H. Efeito do fluconazol, microaerofilia e inibidores de proteases do HIV na atividade de proteinases *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010, Foz do Iguaçu.
9. **MAHL, C. D.**, JESUS, F. P. K., AZEVEDO, M. I., CORREA, B.F., BOTTON, S.A., ALVES, S.H. Identificação de fator de virulência em cepas de *Malassezia pachydermatis* In: 25a. Jornada Acadêmica Integrada UFSM, 2010, Santa Maria.
10. AZEVEDO, M. I., **MAHL, C. D.**, WEIBLEN, C., JESUS, F. P. K., COSTA, M., PEREIRA, D.I.B., BOTTON, S.A., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. Isolamento e caracterização molecular de *Pythium insidiosum* oriundos de amostras ambientais. In: XVII Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, 2010, Vale Vêneto.
11. **MAHL, C. D.**, JESUS, F. P. K., AZEVEDO, M. I., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., BOTTON, S.A., PEREIRA, D.I.B. Padronização da extração de DNA de *Fusarium* spp para técnicas de PCR. In: XVII Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, 2010, Vale Vêneto.

12. JESUS, F. P. K., MAHL, D. L., AZEVEDO, M. I., ZANETTE, R.A., LAUTERT, C., MAHL, C. D., MABONI, G., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., BOTTON, S.A. Padronização do teste de suscetibilidade frente a antifúngicos para *Malassezia pachydermatis* In: II Encontro Gaucho de Micologia, 2010, Caxias do Sul, RS.
13. MAHL, C. D., BOTTON, S.A., PEREIRA, D.I.B., MARIO, D. A. N., SANTURIO, J.M. Caracterização Molecular de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*: Análise Filogenética Preliminar In: 24a. Jornada Acadêmica Integrada UFSM, Santa Maria.
14. MAHL, D. L., SANTURIO, J.M., CURTIS, A. O., MAHL, C. D., JESUS, F. P. K., AZEVEDO, M. I. Isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de amostras ambientais. In: 24ª Jornada Acadêmica Integrada, 2009, Santa Maria.
15. MABONI, G., JESUS, F. P. K., MAHL, C. D., SANTURIO, J.M., BOTTON, S.A. Padronização da extração de DNA total para isolados de *Malassezia* spp. In: 24ª Jornada Acadêmica Integrada, 2009, Santa Maria.
16. MARIO, D. A. N., ALVES, S.H., MAHL, C. D., SOARES, I. H., ROSSATO, L., VENTURINI, T. P. Avaliação da Suscetibilidade de *Rhodotorula* spp. a antifúngicos novos, convencionais e associações. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada, 2008, Santa Maria.
17. CAVALHEIRO, P. B., LÖBLER, R., MAHL, C. D., DE LA RUE, M.L., ZANETTE, R.A., CARREGARO, V. M. L. Caracterização imunológica de *Pythium insidiosum* a partir de soros de coelhos infectados experimentalmente In: Jornada Acadêmica Integrada UFSM, 2008, Santa Maria.
18. MAHL, C. D., ALVES, S.H., FORNO, C. F. D., ALVES, G. R. T., ROSSATO, L., BETIOLO, P. C. Relação entre a reduzida suscetibilidade de *Candida* spp a anfotericina B nas candidemias dos pacientes que evoluem ao óbito. In: 23a. Jornada Acadêmica Integrada UFSM, 2008, Santa Maria.
19. ROSSATO, L., ALVES, S.H., MAHL, C. D., OLIVEIRA, D. C., SOARES, I. H., LOPES, P. G. M. Suscetibilidade de *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix mexicana* frente a azólicos e anfotericina B. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada, 2008, Santa Maria.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MAHL, C. D., AZEVEDO, M. I., WEIBLEN, C., OLIVERIA, L. M., THOMAS, L. R., JESUS, F. P. K., PEREIRA, D.I.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., BOTTON, S.A. Análise filogenética preliminar de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* pelo gene da COXII In: I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada e VI Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre.