

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO RS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estresse oxidativo em espécies de *Candida* com relevância clínica**

---

Tese de Doutorado

Maxwel Adriano Abegg

Porto Alegre, outubro de 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Estresse oxidativo em espécies de *Candida* com relevância clínica

Maxwel Adriano Abegg

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Mara da Silveira Benfato

Este trabalho foi realizado no laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e nos laboratórios da Universidade Paranaense, Campus Toledo-PR

Aos meus pais Armando e Anila pelo amor e apoio incondicionais.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Mara Silveira Benfato pela oportunidade única, ensinamentos e paciência com que orientou este trabalho.

A meus pais, meu irmão Odécio e irmã Nair e famílias pelo constante incentivo e amor.

Aos membros da minha Comissão de Acompanhamento Profs. Itabajara da Silva Vaz Junior e Marilene Henning Vainstein pela atenção devotada ao trabalho.

À Profa. Patricia Valente da Silva pelo auxílio em diferentes etapas desta jornada e pelo exemplo profissional.

Aos meus colegas inspiradores e apoiadores constantes do laboratório de estresse oxidativo: Paulo V.G. Alabarse, Fernanda S. Hackenhaar, Marcus F.A. Mendes, Tássia M. Medeiros, Ártur K. Schüller, Paula R. Viacava, Tiago B. Salomon e Cleber Verona.

Aos que me acompanharam nos laboratórios da Universidade Paranaense, Campus Toledo, em especial: Márcia C. Lawich, Claudia C. Velazquez e Ângela Prates.

Aos meus orientados do Curso de Farmácia da Universidade Paranaense, Campus Toledo.

A Universidade Paranaense, Campus Toledo, seus Professores e Funcionários, pelo apoio.

À Patrícia B. Leão pelo apoio e incentivo no início desta jornada.

À Ana Paula Faccio por estar comigo, pelo carinho, idéias e grande incentivo.

Aos secretários do PPGBCM Sílvia Centeno e Luciano Saucedo pela constante atenção dedicada e pelo exemplar profissionalismo.

Ao Professor Diego Bonatto pela revisão do presente trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realização deste trabalho.

## Índice

Lista de abreviaturas.....	7
Resumo .....	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. O gênero <i>Candida</i> e candidíase .....	11
1.2. Identificação laboratorial de espécies de <i>Candida</i> .....	17
1.3. Virulência de espécies de <i>Candida</i> .....	19
1.4. Estresse oxidativo.....	25
1.4.1. Estresse oxidativo em sistemas biológicos.....	25
1.4.2. Resposta ao estresse oxidativo em espécies de <i>Candida</i> .....	29
1.4.3. Resposta ao estresse oxidativo e antifúngicos .....	45
2. Objetivos.....	48
2.1. Objetivo geral.....	48
2.2. Objetivos específicos .....	48
3. Materiais e Métodos e Resultados (Artigos Científicos/Manuscritos) .....	49
3.1. Artigo Científico.....	50
3.2. Manuscrito .....	61
3.3. Manuscrito .....	81
3.4. Artigo Científico.....	100
4. Resultados Complementares.....	108
4.1. Materiais e Métodos.....	108
4.1.1. Testes de disco difusão em ágar .....	108
4.1.2. Medição dos níveis de ERO.....	108
4.2. Resultados .....	108
5. Discussão .....	110
5.1. Resistência de <i>Candida</i> spp. ao efeito de oxidantes <i>in vitro</i> .....	114
5.2. Capacidade de adaptação ao estresse oxidativo.....	118
5.3. Dano oxidativo em <i>Candida</i> spp .....	118
5.3.1. Acúmulo de espécies reativas de oxigênio .....	118
5.3.2. Dano em lipídios (MDA) e proteínas (carbonil) .....	120
5.4. Defesas antioxidantes em <i>Candida</i> spp.....	121
5.4.1. Defesas enzimáticas.....	121
5.4.2. Defesas não-enzimáticas – glutathiona .....	124
5.5. Capacidade antioxidante total.....	126
5.6. Resistência ao estresse oxidativo e enzimas hidrolíticas em <i>Candida</i> spp .....	126
6. Referências.....	133
ANEXO I <i>Curriculum Vitae</i> .....	153

## Lista de abreviaturas

REO	resposta ao estresse oxidativo
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
TGU	trato gastrintestinal
TGI	trato geniturinário
HIV	vírus da imunodeficiência humana
UTI	unidade de tratamento intensivo
PCR	reação em cadeia da polimerase
ITS2	espaçador de transcrição interno curto-2
Sap	aspartil-proteases
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de hidrogênio
MDA	malondialdeído
HNE	trans-4-hidroxi-2-nonenal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
iNOS-2	óxido nítrico sintase-2
MPO	mieloperoxidase
MR	manose receptor
DC-SIGN	receptor de lectina tipo C
FPRRs	receptores de reconhecimento de padrão fúngico
PMNs	células polimorfonucleares
GFP	green fluorescent protein
SOD	superóxido dismutase
MNs	células mononucleares
IL-12	interleucina 12
IL-10	interleucina 10
IFN- $\gamma$	interferon gama
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
MAPK	proteína-cinase ativada por mitógeno
ATP	adenosina-trifosfato
t-BOOH	terc-butil-hidroperóxido
AMP	adenosina-monofosfato
Mn-SOD	manganês-superóxido dismutase
GPx	glutathiona-peroxidase
GR	glutathiona-redutase
CDNB	cloro-dinitro-benzeno
SOD	superóxido-dismutase
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol
NEM	n-etilmaleimida
DCFDA	diclorofluoresceína diacetato

DCFH	diclorofluoresceína
DCF	diclorofluorescina
TAC	capacidade antioxidante total
RSE	ressonância do spin eletrônico
UFC	unidades formadoras de colônia
YPD	extrato de levedura-peptona-destrose
OD	densidade óptica
Cu/Zn-SOD	cobre/zinco-superóxido dismutase
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
CAT	catalase
PUFA's	ácidos graxos poliinsaturados de membrana
DMSO	dimetil-sulfóxido



## RESUMO

Espécies de *Candida* com relevância clínica diferem entre si com relação a aspectos como prevalência clínica, virulência e perfil de resistência a antifúngicos. Formulamos a hipótese de que estas diferenças podem ocorrer devidas em parte à capacidade relativa distinta destas espécies de resistirem ao estresse oxidativo que é imposto por fagócitos durante a patogênese da candidíase. Nesse contexto, poucos são os estudos de resposta ao estresse oxidativo (REO) em espécies que não *Candida albicans*. Assim, esse trabalho teve por objetivo investigar a REO *in vitro* em isolados de referência e clínicos de 8 espécies de *Candida* – *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para tal, foi avaliado o grau de resistência a oxidantes, a capacidade de adaptação, a indução de enzimas antioxidantes, os níveis de glutathiona total, a capacidade antioxidante total e a indução de dano oxidativo a proteínas e lipídios através de metodologias atuais. *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo nas condições testadas, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistência média e *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. guilliermondii* foram mais sensíveis. Todas as espécies demonstraram capacidade adaptativa e indução de enzimas antioxidantes. Os níveis de glutathiona total mostraram redução intracelular frente ao estresse oxidativo. A capacidade antioxidante total foi variável entre espécies. Outros testes (efeito de meio condicionado e de moléculas *quorum-sensing* – tirosol e farnesol - no crescimento, capacidade de proteção cruzada e oxidante total) foram empregados sem sucesso. Ainda, verificamos em isolados de *C. albicans* a relação entre capacidade de resistirem a oxidantes e produção de fosfolipase e protease. Os resultados indicaram ausência de correlação entre estes fatores. Espécies com sistema antioxidante mais frágil são também as que ocorrem com menor frequência em infecções sistêmicas ou resistem menos ao efeito dos antifúngicos. É interessante investigar se *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* tiram vantagem efetiva de um sistema antioxidante mais potente para causarem candidíase disseminada ou resistirem a drogas. A caracterização detalhada da REO pode proporcionar a descoberta de novos alvos para a ação de antifúngicos no futuro.

Palavras-chave: *Candida* spp.; estresse oxidativo; defesas antioxidantes; espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

*Candida* species with clinical relevance differ in terms of clinical prevalence, virulence and profile of resistance to antifungal agents. We hypothesized that these differences may be due in part to the relative ability of these species to resist oxidative stress that is imposed by phagocytes in the pathogenesis of candidiasis. In this context, there are few studies of the oxidative stress response (OSR) in different species than *C. albicans*. Thus, this study aimed to investigate the *in vitro* OSR considering isolates of eight *Candida* species – *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. To this purpose, we evaluated the resistance degree to oxidants, the adaptability, the induction of antioxidant enzymes, levels of total glutathione, total antioxidant status and induction of oxidative damage to proteins and lipids by current methodologies. *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* showed greater resistance to oxidative stress in the conditions tested; *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* showed an intermediate resistance and *C. dubliniensis*, *C. famata* and *C. guilliermondii* were more sensitive to oxidative stress. All species showed adaptive capacity and induction of antioxidant enzymes. The levels of total glutathione showed intracellular reduction against oxidative stress. The total antioxidant capacity was variable between species. Other tests (effect of conditioned medium and quorum-sensing molecules - farnesol and tirosol – on growth, ability of cross-protection and total oxidant status) were tested without success. Still, we found in isolates of *C. albicans* the relationship between ability to resist oxidation and production of phospholipase and protease. The results indicated no correlation between these factors. Species with weaker antioxidant system are also those that occur less frequently in systemic infections or are less resistant to the effect of antifungal agents. It is interesting to investigate if *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* take effective advantage of a more powerful antioxidant system to cause disseminated candidiasis or resist drugs. The detailed characterization of the OSR can provide the discovery of new targets for the action of antifungals in the future.

Keywords: *Candida* spp., oxidative stress, antioxidant defenses, reactive oxygen species.

## 1. Introdução

### 1.1. O Gênero *Candida* e candidíase

O reino Fungi é diverso, apresentando um número estimado de 1,5 milhões de espécies. No entanto, somente em torno de 400 espécies foram associadas com doença em humanos. A maioria das micoses invasivas é ocasionada por um pequeno grupo de fungos: *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (BROWN *et al.*, 2009).

Apesar de micoses serem tipicamente autolimitadas, o número de infecções fúngicas com risco de vida cresceu firmemente nas últimas três décadas, embora este aumento possa ter atingido um platô (NETEA *et al.*, 2008). Várias causas vêm sendo propostas para explicar este crescimento, entre as quais é citada a epidemia de AIDS, o uso de antibióticos de amplo espectro e por longos períodos, o uso de agentes antineoplásicos, cateterismo endovenoso e o crescente número de pacientes com neutropenia e imunossupressão iatrogênica. No ambiente hospitalar, a contaminação cruzada é igualmente uma possível causa. Espécies de *Rhodotorula* e *Candida parapsilosis* foram isoladas com frequência de até 70% das mãos de profissionais da área hospitalar (FERREIRA & ÁVILA, 2001; KONEMAN *et al.*, 2001).

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (anamórfica) (CALDERONE, 2002). Este gênero contém em torno de 200 espécies, das quais somente cerca de 20 foram associadas a processos infecciosos em humanos (estima-se que 65% das espécies de *Candida* não crescem a temperatura de 37°C, com isso não causando infecção humana). Estas 20 espécies podem potencialmente provocar infecção primária ou secundária, chamada candidíase ou candidose (CALDERONE, 2002; BILLACK *et al.*, 2009).

Normalmente, diferentes espécies de *Candida* são comensais inofensivas dos tratos geniturinário (TGU) e gastrointestinal (TGI), por isso, a candidíase é considerada infecção oportunista. A habilidade dos fungos de tornarem-se patogênicos é determinada primariamente pelo estado imune do hospedeiro. Quando o equilíbrio dos ambientes colonizados é perturbado, como na supressão da função imune ou em alterações na microbiota, espécies de *Candida* são capazes de invadir e danificar os tecidos (CHENG *et al.*, 2007; HUBE, 2009).

*Candida* spp. são comensais em até 71% da população saudável (dependendo dos métodos de coleta de amostras e sítios do organismo) (CALDERONE, 2002). Em média, 25% a 30% dos indivíduos são portadores de *Candida albicans*, a principal espécie patogênica do gênero, na cavidade oral, com maior incidência em crianças pequenas,

lactentes e indivíduos com AIDS. Estima-se que humanos saudáveis tenham índices de colonização  $\geq 50\%$  no TGI e entre 10 a 20% na cavidade oral, trato anorretal e vagina (ODDS, 1988). Especificamente, entre 25 a 30% das mulheres adolescentes e adultas têm colonização vaginal em algum momento, sendo particularmente prevalente durante a gravidez. Mulheres adolescentes e adultas têm a mesma distribuição de espécies de *Candida* na vagina (KONEMAN *et al.*, 2001; NANTEL *et al.*, 2002; FIDEL Jr., 2004).

Fatores de risco para infecções por *Candida* incluem: colonização prévia por espécies deste gênero, infecção com HIV, quimioterapia de câncer, neutropenia, transplante de órgãos, utilização de cateteres ou dispositivos invasivos, infecções prévias por outros organismos (p. ex. citomegalovírus), doenças autoimunes, queimaduras, terapia antimicrobiana, idade (avançada ou infantes prematuros), cirurgias abdominais ou perfurações, politrauma, doença cardíaca, tratamento intensivo, radioterapia, distúrbios reumáticos e qualquer terapia envolvendo exposição prolongada a esteróides. Nem todos estes fatores predisõem igual para candidíase (MAVOR *et al.*, 2005). Estima-se que candidíase ocorra em 8 a 10% dos pacientes com condições predisponentes (ARATANI *et al.*, 2002).

A candidíase não tem limitação geográfica, porque a doença ocorre, conforme exposto, principalmente em pacientes com predisposição. É a quarta infecção adquirida em hospitais mais frequente nos Estados Unidos, sendo os custos de tratamento estimados em mais de um bilhão de dólares/ano (BERMAN & SUDBERY, 2002; CHAUHAN *et al.*, 2006). A presença de *Candida* na corrente circulatória (candidemia) tem uma incidência de 1,1 a 24 casos por 100.000 indivíduos e uma mortalidade associada superior a 30% (NETEA *et al.*, 2008).

Dois tipos principais de candidíase podem ser observados: superficial e invasiva. Infecções superficiais de mucosas são comuns em pacientes imunocomprometidos e incluem estomatite crônica atrópica, candidíase crônica mucocutânea e vulvovaginite. Em casos mais graves, as espécies podem invadir, causando candidemia, com penetração subsequente em qualquer órgão do corpo, infectando órgãos individuais ou múltiplos (CALDERONE, 2002). Somente alguns microrganismos têm potencial de causar infecções em uma gama tão ampla de sítios corporais quanto certas espécies de *Candida* (FROHNER *et al.*, 2009).

*C. albicans* é um patógeno oportunista extraordinariamente versátil que não parece possuir habitat fora de animais de sangue quente (CHENG *et al.*, 2007). Esta espécie causa a maioria das infecções fúngicas humanas e é a levedura isolada com maior frequência a partir de amostras biológicas (CALDERONE, 2002). De modo geral, os estudos indicam que

ao redor de 60% dos casos de infecção envolvem esta espécie, embora isso seja variável conforme o sítio de infecção. Mas, em adição a *C. albicans*, espécies muito menos virulentas de *Candida* não-*albicans*, como *Candida krusei*, foram reportadas como causadoras de candidíase sistêmica (FERREIRA & ÁVILA, 2001; KONEMAN *et al.*, 2001; NANTEL *et al.*, 2002).

Embora *C. albicans* continue sendo a espécie infectante mais frequente, a epidemiologia das infecções por *Candida* mudou consideravelmente nos últimos anos. Espécies de *Candida* raramente associadas à infecção humana no passado emergiram como sérios patógenos e alguns destes microrganismos mostraram-se mais difíceis de eliminar que *C. albicans* com as terapias correntes. Candidíase causada por estas espécies é um problema clínico (KREMERY & BARNES, 2002; REDDING, 2003). Esta mudança pode ser observada, por exemplo, em estudos com zaragatoas orais de pacientes com câncer, onde as espécies não-*albicans* atingiram percentuais de aproximadamente 25% dos casos (DAVIES *et al.*, 2006).

Um dos fatores propostos para o aumento na incidência de espécies não-*albicans*, particularmente de *Candida glabrata*, em hemoculturas, por exemplo, é o uso maciço do antifúngico fluconazol (KONEMAN *et al.*, 2001; SOBEL, 2010). Segundo SRIKANTHA *et al.* (2005), *C. glabrata* é a segunda espécie mais prevalente infectando humanos. *C. glabrata* é também tida como sendo simbiote em humanos e pode ser rotineiramente isolada da cavidade oral e dos tratos geniturinário, alimentar e respiratório da maioria dos indivíduos.

*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são responsáveis por 95% das infecções sanguíneas causadas por leveduras do gênero *Candida*. *C. glabrata*, por exemplo, causa de 11,7 a 37,3% das candidemias. *C. albicans* ainda é o mais frequente patógeno em candidíase orofaríngea, mas *C. glabrata* coloniza e infecta até 29% dos pacientes acima dos 80 anos com esta doença. Porém, é comum obter culturas de infecções orais com populações mistas. Treze espécies restantes de *Candida* respondem por somente 5% das candidemias, as mais comuns em ordem são: *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (KREMERY & BARNES, 2002; LUPETTI *et al.*, 2002; REDDING, 2003).

WINGARD *et al.* (1995) em uma revisão de 1.591 casos de candidíase divulgados em 37 trabalhos entre 1952 e 1992, verificaram que as espécies de *Candida* não-*albicans* haviam sido os agentes causais de 46% das infecções sistêmicas; *C. tropicalis* foi responsável por 25% das infecções, *C. glabrata* por 8%, *C. parapsilosis* por 7% e *C. krusei* por 4%. A partir desses trabalhos, verifica-se que os pacientes com leucemia têm maior probabilidade de adquirirem infecção por *C. albicans* ou *C. tropicalis* e os receptores de transplante de medula óssea por *C. krusei* ou *C. lusitaniae*.

Segundo FERREIRA & ÁVILA (2001), entre as espécies de *Candida* encontradas na cavidade oral, *C. albicans* é a mais frequente (70%), seguida de *C. tropicalis* (6,7%), *C. glabrata* (6,6%), *C. parapsilosis* (1,9%), *C. krusei* (1,7%), *Candida kefyr* (1%) e *C. guilliermondii* (0,4%). *C. albicans* é também a levedura mais frequente no epitélio vaginal em grupos de mulheres sem sintomatologia aparente, assim como nas que apresentam vaginite (84%), seguido de *C. glabrata*.

CALDERONE (2002) revisou estudos de prevalência relativa de espécies de *Candida* e apontou predominância de *C. albicans* em pacientes com: HIV e septicemia, septicemia e câncer, candidemia em UTI e unidade neonatal, câncer no pescoço e cabeça, de *Candida dubliniensis* em candidíase oral e HIV-soropositivos, de *C. guilliermondii* em candidemia com câncer; de *C. parapsilosis* em peritonite em diálise. Em fungemias nosocomiais em doenças hematológicas e do TGI, *C. albicans* apresentou 50% de prevalência e *C. parapsilosis*, 17%. No caso de candidemias em condições variadas, *C. albicans* apresentou 53% e não-*albicans* 47% de prevalência.

De acordo com PFALLER *et al.* (2003), em um total de 1.586 episódios de infecção, 57,7% foram causadas por *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* (14,8%), *C. parapsilosis* (12,5%), *C. tropicalis* (9,4%), *C. krusei* (2,7%) e *C. lusitanae* (1,5%).

Segundo FIDEL Jr. (2004), a candidíase vulvovaginal é um problema significativo que afeta 75% das mulheres ao menos uma vez durante a vida. *C. albicans* é o agente causador em 85 a 90% dos casos. Em função de ser comensal no trato gastrintestinal e geniturinário, a maioria senão todos os indivíduos desenvolveram resposta imune adaptativa específica contra *Candida* que é demonstrável por anticorpos de soro e mucosa, por respostas de células T *in vitro* e teste de reatividade tardia na pele. Mais de 10% das mulheres apresentam candidíase recorrente, definida como três ou mais episódios por ano.

Recentemente, HORN *et al.* (2009) identificaram 2.019 casos de candidemia entre julho de 2004 e março de 2008 e observaram que a incidência de candidemia causada por espécies de *Candida* não-*albicans* foi maior (54,4%) do que a causada por *C. albicans* (45,6%). A taxa de mortalidade média de 12 semanas foi de 35,2%. Pacientes com *C. parapsilosis* apresentaram a menor taxa de mortalidade (23,7%) e os com *C. krusei* a maior taxa (52,9%).

Com relação a eventuais associações de espécies de *Candida* com síndromes clínicas definidas, segundo RIPPON (1988) *C. parapsilosis* associa-se com paroníquia, endocardite, otite externa, endoftalmite, artrite séptica e peritonite; *C. tropicalis* com vaginite, infecções intestinais, broncopulmonares e sistêmicas; *C. guilliermondii* com endocardite,

candidíase cutânea e onicomicose; *C. krusei* raras vezes com endocardite e vaginite e *Candida zeylanoides* com onicomicose.

Segundo FERREIRA & ÁVILA (2001), *C. parapsilosis* é uma das principais espécies envolvidas em endocardite, *C. tropicalis*, variante sacarose-negativa, tem sido associada à infecção disseminada em pacientes debilitados.

VAN ASBECK *et al.* (2009) apontam que *C. parapsilosis* emergiu como patógeno nosocomial importante, provocando patologias multifacetadas em hospedeiros imunodebilitados e também em indivíduos aparentemente normais. Isto ocorreu mais notavelmente em neonatos de baixo peso. Sua emergência pode estar relacionada com sua habilidade de colonizar a pele, proliferar em soluções contendo glicose e aderir ao plástico.

A espécie *C. dubliniensis*, organismo muito similar a *C. albicans*, foi primeiramente descrita em 1995 por SULLIVAN *et al.* como causador de candidíase oral em pacientes aidéticos. Esta espécie tem atraído a atenção da comunidade científica atualmente em função de sua semelhança morfológica e bioquímica com *C. albicans*, o que provoca confusão frequente na identificação e pela sua incidência crescente na clínica (LORETO *et al.*, 2010).

Casos incomuns de infecções com espécies de *Candida* encontrados na literatura incluem fungemia por *Candida utilis*, devida a implantação de cateter, em paciente de 5 anos de idade com AIDS; peritonite por *Candida norvegensis* com infecção invasiva em paciente submetido à diálise peritoneal, infecções de pele e unhas por *Candida ciferrii* e endoftalmite secundária por *Candida famata*. *Candida viswanathii* foi isolada de líquido de pacientes com meningite (FERREIRA & ÁVILA, 2001; KONEMAN *et al.*, 2001).

Espécies de *Candida* crescendo como comensais são controladas pela microbiota normal e pela resposta imune na superfície. Células que ocasionalmente buscam penetrar em tecidos mais profundos são rapidamente eliminadas pelo sistema imune inato em indivíduos saudáveis. Vários fatores predisponentes, como os anteriormente citados, podem levar ao crescimento exacerbado e infecções superficiais. Invasões profundas são relativamente raras; somente em casos severos de debilidade do paciente ou comprometimento imune é que células de *Candida* causam infecções invasivas ou disseminadas (MAVOR *et al.*, 2005).

Embora existam indícios de que *C. albicans* possa também se disseminar dentro do sistema linfático, a rota principal para disseminação é o sangue. O fungo precisa entrar na corrente circulatória, sobreviver no sangue e escapar da corrente circulatória de modo a estabelecer infecções profundas (ANDRUTIS *et al.*, 2000).

Segundo MAVOR *et al.* (2005), as três rotas principais de entrada de células de *Candida* na corrente circulatória são: a via “natural” através da penetração em células epiteliais de superfícies mucosas para tecidos mais profundos e capilares ou vasos sanguíneos; as segundas e terceira vias são “artificiais” (iatrogênicas), que são disponibilizadas devido ao uso de dispositivos médicos ou causadas por danos às barreiras, por exemplo, devido a cirurgia, politrauma ou tratamento com drogas.

Se a rota “natural” de infecções disseminadas é via pele ou via TGI é também objeto de discussão. Em sua maioria os estudos indicam que a origem gastrointestinal é mais frequente. Além disso, a candidíase disseminada é frequentemente associada com lesões intestinais, o que suporta a teoria de que o TGI é a fonte de origem (KOH *et al.*, 2008). Ao contrário, dados que suportem a pele como possível origem de infecções sanguíneas são reduzidos e incompletos. Como exceção, é possível que a origem para a disseminação de *C. parapsilosis* seja principalmente a cutânea, pois esta espécie ocorre mais frequentemente em pacientes com cateteres venosos centrais (MAVOR *et al.*, 2005).

O mecanismo exato pelo qual espécies de *Candida* atravessam a barreira epitelial no trato gastrointestinal não está claro. Sugere-se que proteinases extracelulares secretadas pelo fungo exerçam ao menos um papel parcial em danificar a camada epitelial para ganhar a corrente circulatória. Outros fatores de virulência como a transição de levedura para hifa, tigmotropismo, secreção de lipases e fosfolipases, possivelmente exerçam papel na penetração do epitélio intestinal (MAVOR *et al.*, 2005; GROPP *et al.*, 2009; DALLE *et al.*, 2010).

A primeira etapa no processo de infecção através de dispositivos médicos é usualmente a formação de comunidades fixadas na superfície destes materiais, os chamados biofilmes. Estes são formados inicialmente pela colonização com células leveduriformes, seguido de crescimento de células filamentosas (hifas e pseudohifas) e um acúmulo de matriz de tipo glicoprotéica extracelular (MAVOR *et al.*, 2005; ALBY & BENNETT, 2009).

Uma vez na corrente circulatória, as células fúngicas podem disseminar pelo corpo e infectar múltiplos órgãos. Em infecções experimentais sanguíneas, as células inoculadas não podem ser reisoladas do sangue circulante após curtos períodos. Frequentemente o termo *clearance* é usado para esse fenômeno. No entanto, não está claro se estas células são mortas pelo sistema imune, se ligam a células endoteliais ou escapam da corrente circulatória e invadem tecidos profundos. Após 5 a 15 minutos de infecção experimental em animais, ao menos 90% das células inoculadas são retidas no fígado ou nos pulmões, uma



proporção grande das células continua viável e algumas continuam na corrente circulatória, ligadas a células endoteliais (revisado em MAVOR *et al.*, 2005).

As defesas do hospedeiro contra fungos vão desde mecanismos proteolíticos não-específicos até respostas imunes adaptativas. A resposta mais precoce está no reconhecimento fúngico por células imunes inatas como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos e envolve receptores de reconhecimento de padrão, seguida de fagocitose e eliminação dos patógenos microbianos. Um sistema imune e uma flora microbiana normais parecem ser suficientes para proteger um indivíduo de infecções por *Candida* (FROHNER *et al.*, 2009).

## **1.2. Identificação laboratorial de espécies de *Candida***

As manifestações clínicas de infecções superficiais, mucosas ou invasivas por *Candida* não são específicas de espécies desse gênero, ou seja, podem ser causadas por outros organismos. Desta forma, a identificação laboratorial de espécies de *Candida* é essencial para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo de candidíase (CALDERONE, 2002).

A identificação rápida e acurada de isolados de *Candida* pode auxiliar no estudo de sua epidemiologia, disseminação e rotas de transmissão (LIGUORI *et al.*, 2010). No laboratório clínico, a identificação demonstra importância prognóstica e terapêutica, permitindo início rápido e correto de terapia antifúngica (MILAN & ZAROR, 2004). No caso de espécies de *Candida*, outro estímulo para a busca por diagnósticos precisos e rápidos é o fato de que a incidência de espécies menos comuns tem aumentado (PFALLER & DIEKEMA, 2007), conforme exposto anteriormente.

A identificação de leveduras patogênicas em laboratórios médicos e de pesquisa é frequentemente baseada em técnicas laboratoriais padronizadas, como formação de tubo germinativo e testes bioquímicos, embasadas, portanto, em critérios fenotípicos (BUSCHELMAN *et al.*, 1999). O padrão de assimilação de carbono, por exemplo, é considerado um teste confiável e é geralmente usado para a identificação correta de leveduras de interesse clínico (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os principais testes morfológicos e bioquímicos para a identificação de *Candida* spp. incluem: aparência e cor de colônias em meios de isolamento primário ((Sabourauds, CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson), albicans ID (BioMérieux) e Fluoroplate *Candida* agar (Merck)); avaliação de morfologia celular em microcultivos (produção de hifas e pseudohifas); testes de produção de tubo germinativo e clamidósporos; testes de temperatura de crescimento (prova de termotolerância); testes de assimilação de

carboidratos, particularmente em sistemas comerciais como o API 20C, API 20C AUX e API 32C (BioMérieux) (estes dois últimos incluem carboidratos específicos para *C. dubliniensis*), o CandiFast (International Microbio), *etc.* e ainda, testes de identificação em microplaca (GP2 microplate – Biolog) (BUSCHELMAN *et al.*, 1999; CALDERONE, 2002; SPOLIDORIO *et al.*, 2009).

As únicas espécies patogênicas importantes capazes de formar o chamado tubo germinativo e clamidósporos são *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Ocasionalmente, porém, células de *C. tropicalis* formam clamidósporos. À exceção de *C. glabrata*, que parece não ter capacidade significativa de formar pseudohifas, as demais espécies clinicamente relevantes de *Candida* têm em diferente grau, esta capacidade. Estes critérios auxiliam na identificação fenotípica (CALDERONE, 2002).

Embora simples e relativamente baratos, os métodos morfológico-bioquímicos demandam tempo considerável para sua execução e são frequentemente inábeis em diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis*, por exemplo (PINJON *et al.*, 1998; LEES & BARTON, 2003; MOSCA *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2005; 2006). Em função dos problemas associados com o diagnóstico morfológico-bioquímico de *Candida* spp., foram desenvolvidos métodos de laboratório baseados no não-cultivo. Esses têm por fundamento a detecção de antígenos de *Candida*, de componentes não-antigênicos, como metabólitos D-arabinitol e manose, o componente da parede celular (1-3)- $\beta$ -D-glucana, ou ainda a detecção de ácidos nucléicos destas espécies (CALDERONE, 2002). Atualmente, os testes mais confiáveis para a rápida identificação de *Candida* spp. e, especialmente, para a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, são baseados em técnicas moleculares (LORETO *et al.*, 2010; MARINHO *et al.*, 2010).

A diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* continua um desafio em laboratórios de microbiologia clínica. É provável que cepas de *C. dubliniensis* foram e continuarão a serem identificadas como *C. albicans*, pois ambas as espécies compartilham características fenotípicas como a formação de tubos germinativos, produção de clamidoconídios e padrões bioquímicos (LORETO *et al.*, 2010). É relatado que existe uma diferença na intensidade da cor das colônias destas espécies no meio CHROMAgar Candida (JABRA-RIZK *et al.*, 2001; MILAN & ZAROR, 2004), de modo que colônias de *C. albicans* são verde-azulada pálidas e de *C. dubliniensis* são verde-escuras, mas esta habilidade é perdida após o congelamento das amostras. Em muitos casos esta diferença não é reprodutível. As diferenças mais pronunciadas entre estas espécies são genéticas, sendo que *C. dubliniensis* é aproximadamente 2,5% divergente de *C. albicans* na sequência

do DNA, de acordo com DNA *fingerprinting*, análise de cariótipo e de sequência de DNA de genes de rRNA (MARINHO *et al.*, 2010).

A identificação, taxonomia e análise epidemiológica de patógenos fúngicos é crescentemente dependente de técnicas moleculares modernas, baseadas na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões conservadas do genoma e subsequente sequenciamento dos produtos resultantes da PCR. De fato, na última década, muitos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a identificação de *Candida* spp. Estes métodos parecem confiáveis e relativamente fáceis de usar (FUJITA & HASHIMOTO, 2000; LUO & MITCHELL, 2002; BAUTISTA-MUÑOZ *et al.*, 2003; BORMAN *et al.*, 2008; LIGUORI *et al.*, 2010).

Apesar disto, XU *et al.* (2002) compararam a tecnologia API20C com amplificação por PCR e seqüenciamento direto da região 2 do espaçador de transcrição interno curto (ITS2) para a identificação de 58 isolados de espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*) obtidos de infecções sanguíneas. De modo geral só houve um desacordo entre a identificação fenotípica e a genotípica, onde o API identificou o isolado como *C. albicans*, mas o molecular como *C. dubliniensis*.

### **1.3. Virulência de espécies de *Candida***

Segundo DE REPENTIGNY (2004), a habilidade de *C. albicans* para colonizar, penetrar e danificar os tecidos do hospedeiro depende de um desequilíbrio entre os atributos de virulência da espécie e os defeitos específicos nas defesas imunes do hospedeiro. Diferentemente de patógenos altamente especializados que expressam um fator de virulência majoritário (p.ex., *Clostridium tetani*), *C. albicans* expressa um repertório de atividades que contribuem com a virulência (KUMAMOTO & VINCES, 2005). Diversas propriedades de *C. albicans* que contribuem para a virulência foram caracterizadas, incluindo aderência aos tecidos, secreção de enzimas hidrolíticas, sequestro de ferro, *switching* fenotípico, habilidade de reversivelmente transitar entre a forma de célula individual –blastosporo- e formas filamentosas extendidas (morfogênese), *etc.* A deleção de genes envolvidos nesses processos diminui a virulência de *C. albicans*. Porém, não parece haver um fator de virulência dominante. Em lugar disso, a patogênese depende da expressão coordenada de múltiplos genes de uma forma que facilite a proliferação, invasão e o dano tecidual (CHENG *et al.*, 2007).

*C. albicans* pode crescer em pelo menos três morfologias: levedura, pseudohifa e hifa. As formas de pseudohifa e hifa são mais difíceis de distinguir, sendo ambas consideradas formas filamentosas do fungo (SUDBERY *et al.*, 2004). A forma de levedura

está mais associada à disseminação aos tecidos do organismo durante infecções sistêmicas (KUMAMOTO & VINCES, 2005). No caso de hifas, ao menos duas funções importantes foram sugeridas: penetração na superfície dos tecidos pela aplicação de força mecânica e escape das células hospedeiras após internalização. Mutantes de *C. albicans* incapazes de formarem filamentos são avirulentos (LO *et al.*, 1997). Mas também, mutantes que são constitutivamente filamentosos exibem virulência atenuada, de forma que a virulência ótima requer a capacidade de transitar de uma forma para outra (KUMAMOTO & VINCES, 2005).

Outra característica observável, particularmente em *C. albicans* e *C. glabrata* é o *switching* fenotípico ou de colônia. Esse envolve transição reversível e transmissível entre fenótipos celulares alternativos, frequentemente distinguíveis por diferenças na morfologia microscópica e macroscópica. A transição branco-opaca em *C. albicans* é um exemplo de *switching* fenotípico em eucariotos. Nesta transição, células brancas são arredondadas e formam colônias lisas, enquanto que as opacas possuem forma de feijão e formam colônias achatadas e translúcidas. Esta mudança de estado acontece com pouca frequência, em média um evento a cada 10.000 divisões celulares. Mais de 450 genes são diferencialmente regulados entre os estados e estas diferenças afetam a patogenicidade, eficiência de cruzamento e formação de biofilmes. De modo interessante, células brancas parecem ser mais virulentas em modelo sistêmico de injeção em ratos, enquanto que as opacas são mais eficientes na colonização da pele em modelo de infecção cutânea. As células opacas também parecem ser as competentes para cruzamento, uma vez que apresentam esta habilidade ao menos um milhão de vezes mais eficientemente que as células brancas (NETT *et al.*, 2008; ALBY & BENNETT, 2009).

ALBY & BENNETT (2009) demonstraram que o estresse oxidativo, entre outros estímulos, induz altos índices de *switching* fenotípico em *C. albicans*. O *switching* parece estar também aliado a inibição do crescimento celular e ser influenciado por múltiplos fatores. A concentração de 0,8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu *switching* em 42% das colônias, enquanto que 1 mM induziu em mais de 70% das colônias. Este *switching* promove um meio rápido de adaptação. Células brancas parecem ser fagocitadas mais facilmente por macrófagos que opacas. Células brancas, mas não opacas, liberam um quimioatrativo para leucócitos. Em resposta ao estresse oxidativo as células tendem a realizar a transição para o opaco, o que potencializa a capacidade de escape do sistema imune. LAN *et al.* (2002) descrevem a diversidade e gama de genes regulados na transição branco/opaco. Os perfis transcricionais revelam-se distintos. A expressão de fatores de virulência correlaciona-se com o tipo fenotípico. A importância desse fenômeno parece significativa na patogênese por *C. albicans*.

Segundo SRIKANTHA *et al.* (2005), considerando que *C. glabrata* se encontra nos mesmos nichos ecológicos que *C. albicans* e provoca infecções similares, se assumia que sua biologia básica seria similar a de *C. albicans*. Mas, estudos de sequenciamento revelaram que *C. glabrata* apresenta maior proximidade genética a *Saccharomyces cerevisiae* do que a *C. albicans*, sugerindo que ela possa empregar mecanismos diferentes dos utilizados por *C. albicans* para gerar plasticidade fenotípica durante a patogênese. Esses autores demonstraram que alterações fenotípicas em *C. glabrata* são acompanhadas por mudanças na expressão de genes com funções envolvidas em resposta ao estresse oxidativo, sendo estas mudanças diferentes das ocorridas em *S. cerevisiae*.

Espécies de *Candida* tem a habilidade de produzir uma variedade de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases, fosfolipases, esterases e fosfatases. As três mais importantes enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *C. albicans* são as aspartil-proteases (Sap), fosfolipase B e lipases. Essas enzimas possuem outras funções em adição ao papel de digerir moléculas para a aquisição de nutrientes, como no caso de microrganismos saprofiticos. Hidrolases secretadas tem propriedades de virulência diretas e contribuem para a invasão dos tecidos do hospedeiro digerindo ou distorcendo membranas celulares, degradando moléculas de superfície para facilitar a adesão e moléculas do sistema imune para evitar ou resistir ao ataque antimicrobiano. A produção de enzimas hidrolíticas também foi reportada para outras espécies de *Candida* (CALDERONE, 2002; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; DOSTÁL *et al.*, 2003; GROPP *et al.*, 2009; RÖRIG *et al.*, 2009).

LUO *et al.* (2001) examinaram 80 isolados de *Candida* de 14 espécies para sua atividade hemolítica. Oito das espécies testadas demonstraram atividade hemolítica alfa e beta (*C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*). Somente hemólise alfa foi detectável em quatro espécies (*C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* e *C. utilis*), enquanto que *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa* não demonstraram qualquer atividade hemolítica mesmo após mais de 48 h de incubação. A atividade beta-hemolítica de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. tropicalis* foi significativamente mais alta que a de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Das espécies patogênicas de *Candida* mais frequentes, *C. albicans* e *C. dubliniensis* parecem ser as mais prolíficas produtoras de hemolisinas.

Mais de 70 genes foram, até o momento, implicados como contribuintes para a virulência de *C. albicans* em experimentos baseados na disrupção seletiva de genes e teste de virulência em modelos de desafio intravenoso em camundongos e ratos (CHAVES *et al.*, 2007). A expressão gênica de *C. albicans* parece ser tanto regulada por uma interação

permanente entre patógeno-hospedeiro quanto por programas genéticos distintos (HUBE, 2009; MOCHON *et al.*, 2010). Questiona-se se a transição de comensal ao estado parasitário é um processo ativo ou passivo. Segundo HUBE (2009), não totalmente passivo, mas também não restritamente ativo.

Segundo HAYNES (2001), mudanças no hospedeiro são geralmente requeridas antes que a doença possa se estabelecer e progredir, sugerindo que não há evento que ocorra no fungo para mediar uma maior capacidade de virulência. No entanto, espécies de *Candida* podem responder rapidamente a mudanças ambientais, incluindo provavelmente aquelas observadas *in vivo*, e esta flexibilidade pode permitir que esses organismos tirem vantagem da imunodebilidade do hospedeiro, facilitando o estabelecimento de doença. Nem todos os fatores de virulência devem ser necessários em todos os sítios de doença.

HUBE (2004) lembra que *C. albicans* é um patógeno de extremo sucesso em humanos. Porém, o que há de especial sobre *C. albicans* em comparação com outros patógenos fúngicos não é claro. Um aspecto é que, diferentemente de outros fungos de importância médica, como *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* é raramente encontrado em nichos ambientais como o solo. No caso de *H. capsulatum*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*, partículas fúngicas são inaladas e a doença é estabelecida via pulmões. Esse não é o caso para *C. albicans* e para algumas outras espécies de *Candida*. Infecções são estabelecidas por células que normalmente colonizam superfícies mucosas ou a pele como comensais, conforme exposto anteriormente. Desta forma, espécies de *Candida* são altamente adaptadas e especializadas para sobreviver no hospedeiro. Para HUBE, é surpreendente que *C. albicans* seja somente associada com animais, pois esta não tem requerimentos nutricionais específicos que podem impedi-la de sobreviver no ambiente externo.

Há considerável informação sobre fatores de virulência de *C. albicans*. Porém, os mecanismos de adaptação a condições de estresse no hospedeiro (como ao estresse oxidativo relacionado à fagocitose) são menos compreendidos. A importância de neutrófilos e macrófagos na proteção contra espécies de *Candida* reflete-se, segundo CHAUHAN *et al.* (2003), no aumento da susceptibilidade de pacientes à candidíase devida a defeitos na função ou redução no número total de neutrófilos (neutropenia).

Até 2001, segundo HAYNES (2001), pouca atenção havia sido devotada para o estudo dos fatores de virulência de espécies de *Candida* não-*albicans*. Para o mesmo, a identificação destes fatores únicos a uma espécie particular de *Candida* pode prover informações importantes do processo patogênico e é provável que diferentes espécies de *Candida* compartilhem fatores de virulência comuns, mas também tenham um repertório

distinto, sendo importante identificar tanto os comuns quanto os únicos. HAYNES levanta questões que até 2001 eram consideradas não respondidas, entre elas: porque *C. albicans* é um patógeno mais prevalente que outras espécies de *Candida*? É porque esta é mais disseminada e a prevalência é somente um reflexo disso, ou *C. albicans* possui um repertório de fatores de virulência diferente comparado com outras espécies de *Candida* que permite que ela seja um patógeno “melhor”? Estas perguntas, até o momento, não parecem estar completamente respondidas.

Quase todas as espécies patogênicas de *Candida*, com exceção de *C. glabrata* e *C. krusei*, pertencem a um único clado, caracterizado pela tradução única de códons CUG como serina em lugar de leucina. Dentro desse, espécies haplóides e diplóides ocupam dois subclados separados (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* – diplóides; *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. famata* – haplóides). *C. glabrata* é haplóide (BUTLER *et al.*, 2009). *C. krusei* apresenta genoma diplóide (JACOBSEN *et al.*, 2007).

BUTLER *et al.* (2009) buscaram determinar as características genéticas por trás da diversidade de biologia e patogênese de espécies de *Candida*, sequenciando seis genomas do clado de *Candida* e comparando as sequências obtidas com a de *C. albicans* (cepa SC5314). Os autores observaram enorme variação no tamanho e composição dos genomas analisados. O tamanho variou de 10,6 a 15,5 megabases (Mb), uma diferença próxima a 50%, tendo as espécies haplóides um genoma menor.

Mesmo com a variação de tamanho de genoma e fenotípica entre as espécies, o número predito de genes codificantes de proteínas foi muito similar entre as mesmas, variando de 5.733 a 6.318. Mesmo as pequenas diferenças no número de genes não se correlacionaram com o tamanho do genoma: o menor genoma, *C. guilliermondii*, apresentou mais genes que o maior genoma, *Lodderomyces elongisporus*. As diferenças no tamanho do genoma são explicadas por variações de aproximadamente três vezes no espaçamento intergênico. Buscando identificar famílias gênicas possivelmente associadas com patogenicidade e virulência em *Candida*, entre 9.209 famílias gênicas, foram identificadas 21 que estavam significativamente enriquecidas nas espécies mais comumente patogênicas (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Genes envolvidos em resposta ao estresse também apresentaram variação entre as espécies estudadas (BUTLER *et al.*, 2009).

Algumas espécies de *Candida* não-*albicans* aparentam ter virulência menor que *C. albicans* em modelos animais, mas demonstram virulência igual ou superior no homem. A mortalidade devida a *Candida* não-*albicans* é similar a *C. albicans*, variando de 15 a 35% (KREMERY & BARNES, 2002). ARENDRUP *et al.* (2002) investigaram a patogenicidade relativa de oito espécies de *Candida* com importância médica em um modelo murino

imunocompetente e os dois a três isolados de cada espécie testados comportaram-se de maneira similar em relação à virulência. Os autores, em função disso, consideraram possível dividir as espécies em três grupos com virulência decrescente: *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*; *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Mortalidade só foi observada em camundongos inoculados com *C. albicans* e *C. tropicalis*. A virulência relativa das espécies foi considerada significativamente diferente neste modelo.

SCHALLER *et al.* (2002) associaram um padrão diferente de produção de citocinas induzidas por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com a virulência dessas espécies. MORAN & JABRA-RIZK (2006) demonstraram que *C. dubliniensis* falha em filantar no fagolisossomo, diferentemente de *C. albicans*. Isso estaria associado a diferenças na regulação do repressor de filantação, Nrg1p. A deleção do gene *NRG1* em *C. dubliniensis* promoveu filantação e sobrevivência em macrófagos cultivados, sugerindo que a regulação diferencial desse gene pode ser em parte responsável pela disparidade de virulência entre as duas espécies.

Como exposto, frequentemente as infecções por *Candida* iniciam-se com a aderência e colonização em superfícies artificiais ou bióticas de hospedeiros, levando a formação de biofilmes. É documentado que ao menos 65% de todas as infecções microbianas estão relacionadas a biofilmes. Essas são comunidades estruturadas que apresentam características que oferecem vantagens de sobrevivência em relação as suas contrapartes planctônicas (SENEVIRATNE *et al.*, 2008). Espécies de *Candida* podem desenvolver biofilmes em praticamente todos os dispositivos médicos correntemente em uso, incluindo *stents*, *shunts*, próteses (vocais, cardíacas, válvulas, dentais, *etc.*), implantes (lentes, mamas, *etc.*) e vários tipos de cateteres. SENEVIRATNE *et al.* (2008) avaliaram as proteínas diferencialmente expressas em biofilmes de *C. albicans* em comparação com as contrapartes planctônicas e observaram que o modo de biofilme exibe características que podem atribuir resistência ao estresse oxidativo (antioxidantes) e dessa forma exercer resistência aos antifúngicos comumente usados, segundo esses autores.

Células bacterianas de diferentes espécies monitoram sua densidade populacional liberando moléculas pequenas de sinalização chamadas *quorum sensing*. Após atingirem certo limiar, essas moléculas induzem a população a cooperar em diversos comportamentos, como em bioluminescência, produção de antibióticos, virulência, formação de biofilmes, esporulação, *etc.* (CHEN *et al.*, 2004). Em *C. albicans*, farnesol e ácido farnesóico foram identificados como moléculas *quorum-sensing* que bloqueiam a transição de levedura para formas filamentosas em densidades celulares altas e a produção de



farnesol nessa espécie são o primeiro sistema *quorum sensing* descoberto em um eucarioto (HORNBY *et al.*, 2001).

WEBER *et al.* (2008) examinaram a capacidade de secretar E,E-farnesol em oito espécies patogênicas de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii*) e observaram que em meio livre de soro, *C. albicans* apresentou as maiores concentrações, sendo a quantidade 35 vezes maior que nas espécies não-*albicans*, à exceção de *C. dubliniensis*. A média para *C. albicans* foi de 35,6  $\mu\text{M}$ , quase quatro vezes maior que para *C. dubliniensis*, 8,3  $\mu\text{M}$ . Isolados individuais de *C. albicans* variaram bastante na sua produção (de 13,7 a 58,5  $\mu\text{M}$ ). Todas as outras espécies produziram baixas concentrações de farnesol ( $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ). Em condições de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino, houve reduções significativas na produção.

ABE *et al.* (2009) testaram concentrações de farnesol que podem ser produzidas por *C. albicans* frente a macrófagos murinos e observaram que esse composto reduziu a atividade dos macrófagos em inibir o crescimento micelial e os mesmos perderam sua viabilidade. Essa supressão da função macrofágica pelo farnesol foi neutralizada pela coexistência dos antioxidantes probucol e trolox. Macrófagos incubados por 2 horas na presença de farnesol demonstraram sinais de apoptose e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos macrófagos tratados com farnesol aumentou. Os resultados indicaram que o farnesol diminuiu a viabilidade dos macrófagos murinos e suprimiu seus efeitos anti-*Candida*, talvez através da indução da produção de ERO.

CHEN *et al.* (2004) demonstraram que a fase lag de crescimento que ocorre após diluição do meio é abolida por meio condicionado, sendo o composto ativo tirosol. O mesmo é liberado continuamente durante o crescimento e acelera a formação de tubos germinativos em culturas diluídas, sugerindo que a morfogênese de *Candida* está sob regulação complexa positiva e negativa de condições ambientais.

## **1.4. Estresse oxidativo**

### **1.4.1. Estresse oxidativo em sistemas biológicos**

Quando organismos fotossintéticos adquiriram a habilidade de produzir oxigênio ( $\text{O}_2$ ), estes alteraram substancialmente a atmosfera terrestre e as formas de vida que podiam ser sustentadas. O acúmulo de  $\text{O}_2$  atmosférico permitiu a evolução de vias bioenergéticas, como a respiração aeróbica, que acoplou a redução de  $\text{O}_2$  com a formação de um gradiente de prótons. O advento da respiração aeróbica foi seguido pela evolução de organismos complexos, incluindo animais e plantas (ZIEGELHOFFER & DONOHUE, 2009). Atualmente,

com exceção de alguns anaeróbios e espécies aerotolerantes, todos os organismos requerem  $O_2$  para a produção eficiente de energia pelo uso de cadeias de transporte de elétrons. Isto obscurece o fato de que o  $O_2$  é um gás tóxico e mutagênico. Seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas nos ambientes intra e extracelular. Surge assim o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

As primeiras sugestões da causa dos efeitos tóxicos do  $O_2$  eram de que esse inibia diretamente enzimas essenciais. De fato existem alguns exemplos disso, mas a maioria das enzimas em aeróbios não são afetadas pelo  $O_2$ . Em um trabalho de 1954, Rebecca Gershan, Daniel L. Gilbert e cols. (GERSHMAN *et al.*, 1954) traçaram um paralelo entre os efeitos do oxigênio e os da radiação ionizante e propuseram que a maioria dos efeitos danosos deste gás ocorre devido à formação dos derivados chamados espécies reativas de oxigênio (ERO). Hoje se sabe que essas ERO são geradas a partir do  $O_2$  durante o transporte de elétrons, primariamente como um escape da cadeia respiratória mitocondrial (estima-se que 2% do total de  $O_2$  absorvido seja convertido no radical livre ânion superóxido -  $O_2^{\cdot-}$ ), por reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas. Outros exemplos são o oxigênio singlet ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Algumas das ERO são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares (como o  $H_2O_2$ ). Radicais livres são designados como qualquer espécie capaz de existência independente (por isso o termo livre), que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, além de incluir outras espécies radicalares que não somente as ERO, como por exemplo, aquelas centradas em carbono e nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio – ERN) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron, ou ainda quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron do par de ligações permanece em cada átomo, processo conhecido como fissão homolítica. Quanto a como esses radicais reagem, se dois radicais livres se encontram, esses podem unir seus elétrons não-pareados para formar uma ligação covalente. No entanto, a maioria das moléculas biológicas são não-radicais. Quando um radical livre reage com um não-radical, um novo radical resulta e reações em cadeia podem ocorrer. Essas reações podem ocorrer com virtualmente qualquer molécula com importância biológica (CARBALLAL *et al.*, 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Em ERO, o próprio termo “reativo” acaba sendo bastante relativo, uma vez que há muita diferença entre as constantes de reatividade do  $H_2O_2$  ( $k=2,26 M^{-1}s^{-1}$ ) e do radical  $HO^{\cdot}$

( $k \Rightarrow 1.010 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) com a albumina, por exemplo. Algumas dessas moléculas reagem rapidamente apenas com certas substâncias, como é o caso do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto outras, como o radical  $\text{HO}^\bullet$ , reagem rapidamente com inúmeras moléculas. Essas características geram diferentes níveis de efeitos biológicos, dependendo da taxa e local de formação, ambiente e compartimento celular das ERO (CARBALLAL *et al.*, 2003).

Em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos, o balanço redox é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem frequentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns desses pares redox são interligados (*redox cycling*), enquanto outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox, na célula, relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, acoplados, presentes. Mudanças no balanço redox de sistemas biológicos e predomínio de espécies pró-oxidantes causam o chamado “estresse oxidativo”. A intensidade desses desequilíbrios vai depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas e da compartimentalização celular dos processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Segundo 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. ERO e ERN podem interagir com numerosos alvos em uma célula incluindo tiols, centros metálicos, proteínas, bases nucleotídicas e lipídeos. De fato, a maioria dos componentes celulares (lipídeos, proteínas, DNA e carboidratos) pode ser alvo de ERO, o que leva a perda de função desses componentes e por vezes ocasiona a morte celular.

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, como o malondialdeído (MDA) ou o trans-4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Esse dano é importante *in vivo* porque pode prejudicar, por exemplo, a função de receptores, transdução de sinal, transporte de proteínas e de enzimas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Ácidos graxos e lipoproteínas de membranas também são alvos potenciais. Geralmente entre ERO e essas biomoléculas ocorre uma reação chamada peroxidação lipídica. O início desta reação pode ser causado por adição de uma espécie reativa, mas mais usualmente pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) por uma espécie reativa. Em ambos os casos, um radical de carbono resulta. Em

membranas essa reação pode propagar-se em cadeia através da formação de novos radicais peroxila com os lipídeos adjacentes desestabilizando a membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O DNA é altamente estável, mas passa por decomposição química espontânea. No genoma humano, por exemplo, estima-se que ocorra a perda de purinas  $10^4$  vezes/dia. O estresse oxidativo acelera o dano ao DNA, que pode ser danificado por alguns radicais, mas não por todos. Níveis fisiologicamente relevantes de  $O_2^{\cdot-}$ , óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ),  $H_2O_2$  ou peróxidos orgânicos não reagem com bases de DNA ou RNA significativamente. Mas,  $O_2^{\cdot-}$  e  $NO^{\cdot}$  podem reagir com radicais formados após o DNA ser atacado por espécies reativas mais agressivas. O radical  $HO^{\cdot}$  é altamente reativo e pode gerar uma multiplicidade de produtos por reação com o DNA. Esse pode, por exemplo, aderir-se a guanina nas posições 4, 5 e 8 do anel purínico. Esses danos usualmente param a replicação do DNA e a divisão celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Aeróbios saudáveis, para lidar com o “paradoxo do  $O_2$ ”, possuem uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério das ERO, comumente chamadas de defesas antioxidantes. Essas estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO; neutralizar espécies reativas formadas e ainda, reparar os danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser utilizado para qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (JAMNIK & RASPOR, 2005). A decomposição do  $H_2O_2$ , por exemplo, é de primária importância para evitar danos oxidativos severos à célula, já que este pode gerar o radical  $HO^{\cdot}$ , através da reação de Fenton (EMRI *et al.*, 1997).

Fagócitos profissionais, como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, são unicamente qualificados para engolfar partículas grandes ( $\geq 0,5\mu M$ ), incluindo microrganismos. A internalização e subsequente destruição de patógenos através do processo de fagocitose são chave para a resposta imune inata e promovem a apresentação de antígenos e o desenvolvimento de imunidade adaptativa (FLANNAGAN *et al.*, 2009).

A observação de que neutrófilos apresentam um consumo maior de oxigênio durante o processo de fagocitose data de 1933 (BALDRIDGE & GERARD, 1933). Este consumo súbito de  $O_2$  (*burst* respiratório) e suas ações antimicrobianas associadas são atualmente entendidas como dependentes da enzima NADPH fagócito-oxidase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

ERN são produzidos em fagócitos mononucleares ativado pela enzima óxido-nítrico sintase-2 (INOS-2). A INOS-2 é induzida também em resposta a citocinas e outros estímulos

imunológicos. INOS-2 gera uma gama de ERN incluindo o radical  $\text{NO}^\bullet$  e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).  $\text{NO}^\bullet$  reage com  $\text{O}_2^-$  formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e a combinação de  $\text{NO}_2^-$  e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) gera nitril-cloreto ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode gerar  $\text{HOCl}$  pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO), no interior de células com capacidade fagocítica. Dessa forma, fagócitos são capazes de gerar um coquetel tóxico de ERO, ERN e espécies reativas de cloro que podem oxidar, nitrosilar e clorinar aminoácidos, nucleotídeos e/ou lipídeos das células de microrganismos alvo durante o processo de fagocitose (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007).

#### **1.4.2. Resposta ao estresse oxidativo em espécies de *Candida***

Atualmente entende-se que a morte por oxidação de células fúngicas representa uma importante linha de eliminação de microrganismos patogênicos. Não surpreendentemente, correlações têm sido feitas entre o funcionamento da resposta ao estresse oxidativo em certos fungos patogênicos e a sua habilidade de proliferar no hospedeiro. Além disso, o estudo do estresse oxidativo em leveduras, especialmente o papel das mitocôndrias, claramente auxilia na compreensão de mecanismos envolvidos em envelhecimento, apoptose e doença em organismos superiores (MOYE-ROWLEY, 2003).

A maioria dos estudos envolvendo resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo em fungos patogênicos se limitaram a espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. *C. albicans* e *C. neoformans* podem ativar um *burst* oxidativo em macrófagos e *A. fumigatus* estimula, além disso, a produção de óxido nítrico em macrófagos. Porém, observações deste tipo podem depender do contexto experimental. *C. neoformans*, por exemplo, estimula a síntese de ERN em camundongos com meningoencefalite e por contato com macrófagos alveolares de ratos, mas não em macrófagos cultivados de rato. Por isso, BROWN *et al.* (2009) destacam a importância de considerar o contexto experimental quando são interpretados dados referentes a estresse oxidativo/nitrosativo.

Conforme exposto anteriormente, *C. albicans* possui uma relação comensal com organismos homeotérmicos e dessa forma é esperado que viva num ambiente relativamente estável em termos de temperatura e condições osmóticas. Em contraste, o estresse oxidativo pode ser um desafio frequente para células de *C. albicans* quando essas se transformam em alvo da ação de fagócitos, por exemplo, devendo o mesmo ocorrer no caso de outras espécies de *Candida* potencialmente patogênicas e saprófitas em condições normais (ENJALBERT *et al.*, 2003).

A fagocitose de *C. albicans* é mediada por vários receptores opsônicos e não-opsônicos. Fixação de complemento e ativação é mediada pela via alternativa e a ativação do complemento é principalmente importante para a quimiotaxia e opsonização de *C. albicans*, mas não para a lise. Ainda, embora *C. albicans* seja reconhecida pelo receptor de lectina ligante de manose, a via da lectina de ativação do complemento provavelmente exerce somente um efeito menor no englobamento desta espécie. Muitos receptores ligados a membrana contribuem para a fagocitose de *C. albicans*. Entre eles, dectina-1, receptor de manose (MR), receptor de lectina tipo C (DC-SIGN) demonstraram mediar diretamente o englobamento de partículas fúngicas (FROHNER *et al.*, 2009).

Segundo NAOUM (1996), após a ingestão, a morte de *C. albicans* ocorre através de mecanismos tanto oxidativos quanto não-oxidativos. O *burst* respiratório é um mecanismo efetor antifúngico essencial que resulta na produção de oxidantes tóxicos e na ativação de proteases de grânulo que podem matar *C. albicans*. A morte desse fungo também ocorre no meio extracelular, através de ações não definidas de receptores de reconhecimento de padrão fúngico (FRRs) e galectina-3.

As respostas globais de espécies fúngicas a ERO e ERN foram historicamente definidas principalmente através de estudos *in vitro*. Porém, essas respostas *in vitro* parecem ser refletidas nas respostas amplas de genoma de patógenos fúngicos aos seus hospedeiros, por exemplo, genes oxidativos e nitrosativos são induzidos em *C. albicans* seguida de exposição a macrófagos, neutrófilos, sangue total humano, mucosa tecidual, células epiteliais ou durante infecções orais. Esses genes codificam proteínas envolvidas na detoxificação de ERO/ERN, como catalase, superóxido dismutase e componentes do sistema tioredoxina e glutaredoxina. Mas, essa resposta no transcriptoma é menos aparente durante infecções peritonais (CHAUHAN *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2009). Assim, CHAUHAN *et al.* (2006) levantaram importantes questões com relação à patogenicidade de *C. albicans* e sua resposta ao estresse oxidativo:

- Correlações podem ser feitas entre o papel e a regulação de proteínas antioxidantes (largamente definidas em estudos *in vitro*, como exposto) e a sobrevivência de *C. albicans* nas células fagocíticas?

- O paradigma para proteção imune inata contra candidíase invasiva, que deriva tanto de ciência básica quanto de observações clínicas, é de que neutrófilos e não monócitos são mais importantes em matar *C. albicans*. Existem dados novos que suportam essa conclusão?

- Entender os mecanismos antioxidantes de *C. albicans* proverá informações para melhorar o cuidado aos pacientes? Nosso conhecimento dos mecanismos de adaptação a oxidantes podem ser aplicados em potenciação imune?

Com relação à primeira questão proposta, THOMPSON & WILTON (1992) demonstraram que a capacidade de eliminação de *C. albicans* por células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos foi maior em condições aeróbicas do que em anaeróbicas e também que a morte por macrófagos foi reduzida por inibidores de  $O_2^{\cdot-}$  e de  $H_2O_2$  e a morte por PMNs foi diminuída por inibidores de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , HOCl e  $HO^{\cdot}$ , sugerindo que essas células usam ERO para eliminar *C. albicans* e que o arsenal químico utilizado difere entre esses tipos celulares.

KUSCH *et al.* (2007) estabeleceram o perfil proteômico da resposta ao estresse oxidativo de *C. albicans* induzida por concentrações não-letais de  $H_2O_2$  e de diamida. A expressão de 57 e 45 proteínas foi modificada pela exposição a esses estressores, respectivamente. As assinaturas de indução foram praticamente idênticas, enquanto as de repressão demonstraram sobreposição pequena. Entre as proteínas induzidas estavam enzimas com funções antioxidantes conhecidas como catalase e tioredoxina-redutase e um conjunto de oxidorreductases.

ENJALBERT *et al.* (2007) examinaram através de genes repórteres fusionados a *green fluorescent protein* (GFP), a extensão em que células individuais de *C. albicans* ativam uma resposta ao estresse oxidativo em microambientes específicos do processo da candidíase sistêmica. Os resultados indicaram que essa espécie é exposta a estresse oxidativo significativo após fagocitose por neutrófilos, porém poucas células fúngicas são expostas a um estresse oxidativo depois de exposição a macrófagos ou quando uma infecção renal é estabelecida. Para estes autores, pareceu claro que o estresse oxidativo não é uma ameaça constante durante infecção sistêmica e que as células fúngicas mais provavelmente são expostas ao estresse oxidativo precocemente no estabelecimento de uma infecção sistêmica, quando entram em contato com neutrófilos circulantes. Nesse estágio, a habilidade para adaptar-se apropriadamente ao estresse oxidativo pode promover a sobrevivência do patógeno e o subsequente desenvolvimento de infecção profunda. Esses concluem que a resposta ao estresse oxidativo por *C. albicans* é nicho-específica durante o estabelecimento e progresso de infecção sistêmica.

Segundo BROWN *et al.* (2009), atualmente se sabe que a interação com fagócitos ocupa uma larga porção do ciclo de doença na candidíase, de forma que sobreviver nos sítios de infecção requer, entre outras coisas, induzir vias de sinalização que detectam oxidantes (entrada) e produção *downstream* de antioxidantes (saída) que detoxificam estes

oxidantes. Ainda com relação ao quão relevante são os estudos *in vitro*, existem muitos genes para os quais o papel na adaptação *in vitro* (geralmente determinados por estudos de *spot-plate*) é conhecido, mas o papel na sobrevivência a fagócitos só foi determinado para alguns genes. Correlações entre funções *in vitro* e *ex vivo* (*pool* de fagócitos humanos) foram feitas construindo mutantes e testando cada um para susceptibilidade a oxidantes *in vitro* e sobrevivência *ex vivo* frente a fagócitos. Cada mutante testado foi avirulento em modelos murinos de candidíase invasiva. Também, células de *C. albicans* e *C. glabrata* em fase estacionária são mais resistentes a ERO que células em fase exponencial. Isso sugere que pode ser vital equilibrar o crescimento com a resistência ao estresse para proliferar no hospedeiro. CHAUHAN *et al.* (2006) interpretam que existe relação entre os dados em mutantes e os estudos *in vitro*.

De modo interessante, a inativação da enzima iNOS-2 não faz com que camundongos se tornem mais susceptíveis a infecção por *C. albicans*, sugerindo que a produção de ERN pode não ser a principal defesa contra candidíase e que aparentemente ERO seriam mais importantes. No entanto, ERN são protetoras em candidíase oral (BROWN *et al.*, 2009).

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada principalmente em neutrófilos e, em menor extensão, em monócitos. Esta enzima produz o oxidante poderoso HOCl, a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do íon cloreto (Cl<sup>-</sup>). Deficiência de MPO é o defeito congênito de neutrófilos mais comum. Fagócitos deficientes em MPO expressam defeito leve a moderado em matar bactérias, mas deficiência marcante na eliminação de fungos *in vitro*. No entanto, pessoas com deficiência de MPO são usualmente saudáveis, mas algumas têm maior susceptibilidade em adquirir infecções, particularmente por *C. albicans*. ARATANI *et al.* (1999) demonstraram que camundongos sem MPO apresentaram susceptibilidade aumentada à pneumonia e à morte após infecção intratraqueal por *C. albicans* e houve igualmente maior disseminação para vários órgãos quando células do fungo foram injetadas intraperitonealmente, aparentemente provando que a MPO é importante na defesa contra a infecção fúngica por *C. albicans* e que a incapacidade de gerar HOCl não pode ser compensada por outros sistemas dependentes de oxigênio em camundongos.

Esses mesmos autores (ARATANI *et al.*, 2000) testaram a virulência de fungos e bactérias via intranasal em camundongos sem MPO. Esses camundongos apresentaram redução acentuada na citotoxicidade particularmente contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. A citotoxicidade para *C. glabrata* apresentou-se comparável a do tipo selvagem, sugerindo que o sistema de oxidação dependente de MPO é importante como defesa do hospedeiro contra fungos, mas o efeito varia de acordo com o patógeno.



WELLINGTON *et al.* (2009) investigaram a produção de ERO em fagócitos expostos a *C. albicans* e *C. glabrata* e observaram um efeito supressivo na produção de ERO particularmente por *C. albicans*. Células vivas foram mais efetivas, sugerindo não se tratar somente de neutralização de ERO por superóxido-dismutase (SOD), catalase, ou outros compostos antioxidantes e sim de um mecanismo ativo de supressão. Esse efeito sobrepôs o efeito de sinais estimulatórios da parede celular, previamente descritos, e não foi dependente de fagocitose, sugerindo que esse possa ser um importante mecanismo de evasão imune. Esta supressão da produção de ERO não ocorreu com *S. cerevisiae*. Esse grupo também relatou que das diferentes espécies testadas, *C. albicans* foi a que suprimiu mais a produção de ERO por fagócitos, sendo *C. krusei* também bastante efetiva. Nem *C. glabrata*, nem *C. tropicalis* foram supressores efetivos da formação de ERO (MACCALLUM, 2008).

Sobre a questão envolvendo uma maior efetividade de neutrófilos em comparação com monócitos/macrófagos em sua habilidade de matar *C. albicans*, em um estudo (FRADIN *et al.*, 2005) foram comparados os perfis de transcrição gênica de *C. albicans* incubada com diferentes tipos de células sanguíneas humanas e sangue total. Entre as diversas conclusões, a fração de PMNs mimetizou proximamente os eventos que ocorreram com o sangue total com relação ao crescimento do organismo e a transcrição gênica. Células leveduriformes predominaram no sangue total enquanto que em eritrócitos, plasma ou monócitos, a forma de hifas foi predominante. Aproximadamente 97% das células permaneceram como leveduras em PMNs. Ainda nestas células, 16 de 18 genes antioxidantes foram induzidos, enquanto só 2 dos 18 foram induzidos em células mononucleares (MNs). Desta forma, os eventos transcricionais que ocorrem em neutrófilos humanos e populações de monócitos são substancialmente diferentes e estas diferenças parecem correlacionar-se com maior atividade inibitória do crescimento de *C. albicans* por PMNs comparados com MNs.

De acordo com isso, KOH *et al.* (2008) observaram que a depleção seletiva de neutrófilos combinada com a disrupção da mucosa gastrointestinal resultou em infecção por *C. albicans* e 100% de mortalidade em um modelo de colonização gastrintestinal em ratos. A depleção seletiva de neutrófilos, de macrófagos, linfopenia ou disrupção gastrointestinal isoladamente não resultou em mortalidade.

Diferentemente, XIONG *et al.* (2000) apontam que candidíase sistêmica também ocorre em hospedeiros com função de neutrófilos normal, sugerindo que outras células que não essas também exercem papel importante no sistema de defesa do hospedeiro. Quando os hospedeiros são neutropênicos, células mononucleares, especialmente

monócitos/macrófagos, contribuem para a defesa contra infecções. Esses autores hipotetizaram que espécies de *Candida* que diferiam em patogenicidade poderiam induzir diferencialmente a produção de citocinas imunoregulatórias por monócitos humanos e demonstraram que *C. krusei*, mas não *C. albicans*, claramente induz IL-12 pelos monócitos, indicando que espécies como *C. albicans* tem a habilidade de criar um ambiente rico em IL-10 e pobre em IL-12 e IFN- $\gamma$ , que poderia gerar um estado mais susceptível do hospedeiro a candidíase.

Sobre a questão se o conhecimento sobre os mecanismos de adaptação ao estresse oxidativo podem ser aplicados em potenciação imune, CHAUHAN *et al.* (2006) lembram que o pré-tratamento de *C. albicans* com um anticorpo monoclonal dirigido ao oligomanano ácido-lábil da parede celular aumenta a morte do organismo por neutrófilos (CAESAR-TONTHAT & CUTLER, 1997). Dessa forma, a transferência passiva de anticorpos pode ser protetora em pacientes de alto risco. A identificação de novos alvos para a descoberta de drogas também é importante e uma possibilidade é a proteína Ssk1p, que possui um papel importante de controle da virulência e proteção contra ERO em neutrófilos (CALERA *et al.*, 2000). Estes aspectos serão detalhados adiante.

Patógenos fúngicos tem diferentes rotas de infecção e isso influencia na sua resposta ao arsenal químico dos fagócitos. Isso pode também ter contribuído para a divergência evolucionária da resposta ao estresse em diferentes espécies. De fato, os dados sugerem que organismos diferentes evocam respostas celulares diferentes no hospedeiro ou que organismos distintos respondem diferentemente ao mesmo ambiente oxidativo em neutrófilos, por exemplo, e se utilizam de diferentes mecanismos para detoxificar ERO e garantir a sua sobrevivência (MOYE-ROWLEY, 2003; RUBIN-BEJERANO *et al.*, 2003). Também BROWN *et al.* (2009) apontam que as respostas a ERO e ERN fazem contribuições diferenciais à patogenicidade dependendo do tipo do patógeno, da porta de entrada no hospedeiro e do tipo e estágio da infecção.

Em contrapartida, fungos patógenos divergentes também possuem aspectos comuns na sua resposta ampla de genoma a estresse oxidativo. De acordo com isso, NIKOLAOU *et al.* (2009) avaliaram a diversidade filogenética de vias de sinalização celular em fungos. Esses autores observaram que os componentes centrais das vias de sinalização de estresse osmótico, oxidativo e de parede celular são relativamente bem conservados, enquanto que os sensores posicionados corrente acima e os fatores de transcrição posicionados corrente abaixo desses módulos divergiram significativamente. Não houve correlação óbvia entre o grau de conservação das vias de sinalização ao estresse e a resistência de um fungo em particular ao estresse correspondente.

JAMIESON *et al.* (1996) estudaram a resposta de *C. albicans* a oxidantes como um primeiro passo para determinar o papel de respostas ao estresse oxidativo no processo de virulência e observaram que essa levedura possui uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menadiona e que esta resposta difere da observada na levedura normalmente não-patogênica *S. cerevisiae*. *C. albicans* foi constitutivamente mais resistente a oxidantes que *S. cerevisiae*. Esses autores também demonstraram a capacidade de um oxidante levar a adaptação e resistência a doses normalmente letais de um segundo oxidante (proteção cruzada). Os oxidantes induziram a atividade de diferentes enzimas antioxidantes testadas em *C. albicans*: aldeído-redutase; catalase, gliceraldeído-6-fosfato-desidrogenase, glutationa-peroxidase, quinona-redutase, manganês-superóxido dismutase e cobre/zinco superóxido dismutase.

INGRAM *et al.* (2001) compararam a resistência a oxidantes de *C. albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Alternaria* spp. Entre essas espécies, *C. albicans* apresentou a maior resistência geral aos oxidantes e o maior conteúdo intracelular de glutationa (GSH). Em todos esses microrganismos o tratamento com oxidantes diminuiu o conteúdo intracelular de GSH. O aumento de GSH total no meio externo foi também observado e pode dever-se, segundo os autores, à exportação da forma oxidada da GSH, GSSG.

Relativamente poucos estudos foram realizados sobre resposta ao estresse oxidativo em *Candida* não-*albicans* patogênicas, se comparados aos numerosos trabalhos envolvendo *C. albicans* e particularmente *S. cerevisiae* (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001).

TOSELLO *et al.* (2007) observaram que cepas de *C. dubliniensis* foram menos resistentes a oxidantes que *C. albicans* e que as duas espécies geram uma resposta adaptativa a oxidantes. Esses autores propõem que a resposta adaptativa, entre outros fatores, pode contribuir para que *C. dubliniensis* cause infecções em indivíduos imunocomprometidos. Células em fase exponencial de *C. glabrata* foram mais resistentes ao estresse oxidativo que células de *C. albicans* na mesma condição e essa resistência foi mediada pela catalase Cta1p, embora uma cepa de *C. glabrata* deficiente para o gene *CTA1* exibiu virulência similar à da cepa selvagem (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008). Ainda, se demonstrou que *C. krusei* é mais resistente a oxidantes que *C. albicans* (COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

SRIKANTHA *et al.* (2005) lembram que os patógenos fúngicos são expostos a combinações de diferentes estresses no hospedeiro, em lugar de somente ERO ou ERN sozinhos, de forma que claramente é necessário estudar o impacto combinatório de

estresses nos patógenos fúngicos. Da mesma forma, segundo TEMPLE *et al.* (2005), nenhum oxidante é representativo do estresse oxidativo, mesmo com o amplo uso de um único composto como o  $H_2O_2$  em estudos *in vitro*. O padrão de resposta transcricional a determinada ERO depende de sua concentração e um sistema antioxidante clássico induzido por altas concentrações de certa ERO pode ser reprimido quando células se adaptam a baixas concentrações dessa mesma ERO.

THORPE *et al.* (2004) investigaram a resposta de vários mutantes de *S. cerevisiae* a cinco diferentes oxidantes. As respostas dos isolados foram altamente dependentes da natureza da substância. O espectro de mutantes sensíveis foi muito diferente para cada oxidante testado. Seus achados em *S. cerevisiae* demonstram a especificidade das respostas celulares a diferentes oxidantes e reforçam que não há um único oxidante representativo de um estresse oxidativo geral. Esses autores observaram que o metabolismo protéico foi uma função estratégica para a sobrevivência a todos os oxidantes, de forma que o dano protéico deve ser um componente essencial do dano oxidativo. Poucos mutantes afetados no reparo a DNA foram sensíveis, excluindo os afetados no reparo do DNA mitocondrial, de forma que o dano a proteínas, mas não ao DNA, deve ser o maior fator na perda da viabilidade celular como resultado do estresse oxidativo.

BRANCO *et al.* (2004) investigaram a possibilidade de que, em *S. cerevisiae*, a adaptação ao  $H_2O_2$  poderia envolver alterações na permeabilidade da membrana plasmática ao oxidante e demonstraram, entre outras coisas, que não existe correlação entre a capacidade de remover o  $H_2O_2$  do ambiente intracelular e a resistência ao mesmo; a permeabilidade da membrana para o oxidante diminui por um fator de dois após a aquisição de resistência pela pré-exposição a esse agente em *S. cerevisiae*.

O  $H_2O_2$  em concentrações subletais afeta diretamente vários sistemas redox para regular a diferenciação celular, proliferação, morte, transdução de sinais e transporte iônico (NASUTION *et al.*, 2008). Dessa forma, a manutenção do  $H_2O_2$  a níveis baixos deve ser finamente regulada. *C. albicans* encontra fagócitos no processo de infecção, mas sobrevive adotando rapidamente a morfologia de hifa. A concentração de  $H_2O_2$  nos macrófagos é intrinsecamente alta. Esses autores observaram que o  $H_2O_2$  externamente adicionado induz a formação de hifas de forma dose-dependente. Com 10mM  $H_2O_2$  a taxa de sobrevivência foi baixa (35%), diferentemente do que ocorreu com 0,4 mM e 1mM (90%) e mesmo com 10mM não ocorreu 100% de diferenciação. Os resultados sugeriram que somente a elevação do  $H_2O_2$  não é suficiente para a diferenciação completa em hifa. Já células crescidas em YPD suplementado com soro diferenciaram-se 100% em hifa, indicando a necessidade de fatores presentes no soro para a completa diferenciação. Os autores

sugerem que a diferenciação em hifas por *C. albicans* ocorre em duas etapas separadas, mas não mutuamente exclusivas: início pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular acima de certa concentração e promoção de fatores adicionais no soro até o momento desconhecidos.

À parte do potencial danoso de espécies reativas, crescem as evidências de que estas moléculas exercem papéis regulatórios essenciais *in vivo*, em processos como: controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório. Assim, se aceita que as defesas antioxidantes devem minimizar os níveis de espécies reativas, mas permitindo que permaneçam níveis suficientes para o exercício destas funções regulatórias (DRÖGE, 2002; PEREIRA *et al.*, 2003; FIALKOW *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007).

Um papel imunomodulatório para ERO é suportado por estudos em camundongos deficientes na produção de ERO e ERN inoculados com *C. albicans* via TGI (BALISH *et al.*, 2005). Embora nesses estudos todos os camundongos tenham morrido após a inoculação, parece que a causa de morte foi mais uma resposta imune exagerada do que a multiplicação excessiva do fungo. Fagócitos de camundongos normais e deficientes na produção de ERO/ERN apresentaram igual habilidade em eliminar *C. albicans in vitro*, o que sugere que a produção de ERO pode não ser importante para matar *C. albicans* diretamente. WELLINGTON *et al.* (2009) sugerem que a produção de ERO pode ser mais importante como reguladora da resposta inflamatória do que para efeitos anti-*Candida* diretos.

MOYE-ROWLEY (2002) enfatiza que entender a base molecular da resposta ao estresse oxidativo em fungos é um aspecto central para nossa compreensão da patogênese fúngica. Aparentemente as vias de proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) exercem um papel central na resposta ao estresse oxidativo de diversos patógenos fúngicos. Em *C. albicans*, o fator de transcrição AP1-like Cap1 é o principal regulador do transcriptoma e proteoma induzido por estresse oxidativo tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, após exposição a neutrófilos. Neste sentido, KUSCH *et al.* (2007) analisaram mutantes no gene *CAP1* de *C. albicans*, o que revelou que a síntese de 12 proteínas antioxidantes é controlada pelo regulador de estresse oxidativo Cap1p.

Em *S. cerevisiae* existe uma via de resposta ambiental comum na qual um grupo comum de genes é induzido por diferentes tipos de estresse, incluindo choque térmico, estresse osmótico e oxidativo. Nessa levedura, a regulação da resposta geral a diferentes condições de estresse está ligada aos fatores de transcrição gerais de resposta ao estresse Msn2 e Msn4, mas não há uma única via regulatória que adapta as células a vários tipos de

estresse. Hog1 parece responder primariamente a mudanças de osmolaridade, Hsf1 e Skn7 à regulação de choque térmico e Skn7 e Yap1 regulam estresse oxidativo. A via de resposta ambiental comum é também operativa em *C. albicans*, mas somente quando as células são submetidas a condições dose-dependente que ativam MAPK Hog1. Desta forma, mudanças transcricionais observadas com 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,3 M de NaCl, ou durante choque térmico, mostram sobreposição mínima, indicando não ocorrência de resposta ambiental comum. Mas os dados indicam que em condições mais drásticas, como em concentrações de 2-5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hog1 regula uma resposta ambiental comum em *C. albicans* (CHAUHAN *et al.*, 2006).

GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.* (2008) também revisaram a questão sobre a existência de uma resposta geral ao estresse em leveduras. Segundo esses, muitos resultados apontam para uma resposta geral no caso de *S. pombe* e *S. cerevisiae*. Esse mecanismo geral assegura proteção cruzada contra diferentes tipos de injúria ambiental. *C. albicans* parece igualmente ter condições de elaborar resposta cruzada (SMITH *et al.*, 2004), particularmente através da via *HOG1* (ENJALBERT *et al.*, 2003; 2006). Hog1 MAP quinase em *C. albicans* é essencial para resistência ao estresse oxidativo agudo (VAZQUEZ-TORRES & BALISH, 1997).

De fato, uma característica da resposta ambiental comum em *S. cerevisiae* é que exposição prévia a um estresse leve pode proteger células contra um desafio subsequente mais forte do mesmo estresse ou de um diferente. Para *C. albicans*, proteção cruzada é somente parcialmente observada. Por exemplo, uma elevação moderada (duas vezes) na resistência ao estresse oxidativo é induzida por um estresse térmico, mas não há acréscimo na sobrevivência se um estresse oxidativo moderado é seguido de um estresse térmico intenso. Mas, se um primeiro estresse ativa Hog1 através de fosforilação, então subseqüentes exposições a níveis mais altos de um segundo estresse não relacionado conferem proteção. Dessa forma, parece que a fosforilação de Hog1 regula as respostas de proteção cruzada. Conforme exposto, Hog1 de *S. cerevisiae* responde primariamente a condições de estresse osmótico, mas a ativação deste fator de transcrição em *C. albicans* ocorre sob uma gama de condições, incluindo estresse osmótico, menadiona, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metais pesados (Cd<sup>2+</sup> e As<sup>3+</sup>), cafeína, farnesol e soro. Essas diferenças intuitivamente relacionam-se com as necessidades destes organismos: *C. albicans* precisa sobrepor desafios de estresse oxidativo nas superfícies mucosas e quando engolfada por fagócitos, enquanto *S. cerevisiae* necessita se adaptar a estresse osmótico no seu ambiente (CHAUHAN *et al.*, 2006).

No entanto, recentemente este mesmo grupo demonstrou evidências que suportam a existência de mecanismos independentes tanto de Cap-1 quanto de Hog-1 contra estresse oxidativo em *C. albicans*. Seus dados apontam que nem a resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado por menadiona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nem a proteção cruzada são mediados por Hog1 e Cap1 (GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2010).

CAO *et al.* (2009) investigaram o papel de um gene de *C. albicans* com homologia estrutural à metacaspase *YCA1* de *S. cerevisiae* (denominada pelos autores *CaMCA1*) e demonstraram que sua deleção claramente atenuou a morte induzida por estresse oxidativo ou a ativação de caspase. Medições de acúmulo de trealose, concentração intracelular de ATP, potencial da membrana mitocondrial e geração de ERO endógenos demonstraram uma clara mudança no metabolismo energético protegendo as células de eventuais danos por estresse oxidativo. Seus resultados sugerem que este gene pode mediar a sensibilidade ao estresse oxidativo por afetar o metabolismo energético.

Os fatores de transcrição *Msn2* e *Msn4*, de forma similar a *S. cerevisiae*, em *C. glabrata* medeiam uma resposta geral ao estresse. No entanto, a função de proteínas *Msn2/4-like* divergiu significativamente em *C. albicans* onde essas não apresentam papel detectável na mediação de respostas ao ERO ou a uma resposta geral ao estresse (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008). SAIJO *et al.* (2010) construíram uma cepa deletada para *skn7* de *C. glabrata* e observaram que a mesma apresentou maior susceptibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e terc-butil-hidroperóxido (t-BOOH). A deleção de *SKN7* resultou em atenuação de virulência em modelo murino de candidíase sistêmica. Em contraste aos reguladores positivos, a via de sinalização de AMP cíclico regula negativamente a resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo em *C. albicans* (MOYE-ROWLEY, 2002). Menos é conhecido a respeito de reguladores de transcrição da resposta ao estresse nitrosativo. Em *C. albicans* parece que a expressão gênica induzida por ERN é primariamente regulada pelo fator de transcrição *Cta4* (CHAUHAN *et al.*, 2006).

Pelo exposto anteriormente, é possível notar que fungos necessitam de sistemas de detoxificação de ERO. Estes sistemas incluem antioxidantes enzimáticos (superóxido-dismutases, catalases, peroxidases, glutathiona-peroxidases, *etc.*) e não-enzimáticos (glutathiona, peroxiredoxina, *etc.*) que garantem um rápido *turnover* de ERO para manter a homeostase redox (AGUIRRE *et al.*, 2005; SCOTT & EATON, 2008). Mutantes defectivos em vias requeridas para detectar o estresse oxidativo frequentemente possuem reduzida virulência, por exemplo, no caso de mutantes de MAP quinase ativada por estresse de *C. albicans* (ALONSO-MONGE *et al.*, 2003).

De acordo com NAOUM (1996), as principais enzimas constituintes em todos os organismos aeróbicos na prevenção ou atenuação dos efeitos deletérios promovidos por ERO são as catalases, as superóxido-dismutases (SODs), a glutathione-peroxidase e a glutathione-redutase. É através delas que as células tentam manter níveis aceitáveis de  $O_2^{\cdot-}$  e de  $H_2O_2$ , para evitar a formação de radical hidroxila, que é extremamente danoso. O  $O_2^{\cdot-}$  sofre ação enzimática da SOD, que o dismuta em  $H_2O_2$ , que possui, conforme exposto, reatividade limitada. O  $O_2^{\cdot-}$  não tem habilidade de ultrapassar a membrana mitocondrial interna. No entanto, a Mn-SOD mitocondrial dismuta 92% deste superóxido em  $H_2O_2$  que pode ultrapassar a membrana. O  $H_2O_2$  é então catabolizado por catalases e por peroxidases e, em humanos, a glutathione-peroxidase é considerada a principal enzima detoxificante de  $H_2O_2$ .

Sobre a SOD (E.C. 1.15.1.1), essa é uma metaloenzima amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos (FRIDOVICH, 1995). É capaz de catalisar a conversão de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  através de dois passos reacionais. O primeiro passo consiste na reação do  $O_2^{\cdot-}$  com o grupo prostético da SOD na sua forma oxidada. Essa ligação conduz à aquisição de um próton e conseqüente liberação de  $O_2$ . A forma reduzida da enzima liga, então, um segundo  $O_2^{\cdot-}$  e próton, para liberar  $H_2O_2$  e retornar a sua forma oxidada (JOHNSON & GIULIVI, 2005).

*C. albicans* tem seis SODs, quatro delas são dependentes de Cu-Zn, nomeadamente a Sod1 citoplasmática e as Sod4, Sod5 e Sod6 de superfície celular e duas são dependentes de manganês, a Sod2, mitocondrial e a Sod3, citoplasmática. As mais estudadas em relação ao seu papel na patogênese são Sod5 e Sod1. Indução do gene *SOD5* foi observada na transição levedura-hifa na presença de estresse oxidativo e osmótico. Um mutante de deleção foi sensível ao  $H_2O_2$  em condições de limitação de nutrientes e também requerido em um modelo de infecção em camundongos. No entanto, o mutante conseguiu sobreviver em macrófagos na mesma extensão que o tipo selvagem. Perfil transcricional de *C. albicans* com PMNs indicou que *SOD5* foi induzido durante fagocitose. A sobrevivência foi significativamente diminuída em PMNs. Um mutante de *SOD1* também foi examinado e demonstrou sensibilidade à menadiona, mas não ao  $H_2O_2$ , este foi mais sensível à morte por macrófagos e apresentou também reduzida virulência em modelo murino (FROHNER *et al.*, 2009). HWANG *et al.* (2002) demonstraram que uma Cu/Zn superóxido dismutase é comprovadamente requerida para a proteção de *C. albicans* contra estresse oxidativo e para a expressão de sua virulência completa. Em outro estudo, mutantes nulos, não possuindo uma Mn-SOD mitocondrial em *C. albicans*, mostraram-se



significativamente mais sensíveis que o tipo selvagem para vários tipos de estresse (HWANG *et al.*, 2003).

Em *C. albicans*, uma única catalase (E.C. 1.11.1.6) foi reportada (designada *CTA1*, *CCT1* ou *CAT1*). O sítio ativo da catalase contém o grupo heme e essa enzima está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. O grupo heme da enzima é o responsável pela atividade catalítica, convertendo o  $H_2O_2$  em duas moléculas de água e oxigênio (MICHIELS *et al.*, 1994). A reação se dá quando  $H_2O_2$  entra no centro ativo da enzima e interage com dois aminoácidos da cadeia polipeptídica: uma histidina e uma asparagina. Um dos átomos de hidrogênio do  $H_2O_2$  é transferido de um oxigênio para o segundo. Como consequência, a ligação entre os dois átomos de oxigênio sofre uma distensão e quebra-se heteroliticamente, sendo que os elétrons responsáveis pela ligação química O-O deslocam-se para a molécula de água formada. O átomo de oxigênio restante liga-se, então, ao átomo de ferro (+3), formando a espécie  $Fe(IV)=O$  e liberando uma molécula de água. A espécie  $Fe(IV)=O$  tem alto poder oxidante, reagindo facilmente com uma segunda molécula de  $H_2O_2$ . Nesse passo reacional é removido um átomo de oxigênio do  $H_2O_2$ , formando-se, assim, o  $O_2$  que é liberado do íon ferro concomitantemente com a formação de uma segunda molécula de água. Os íons ferro retornam ao seu estado de oxidação +3, estando prontos para mais uma catálise (CHELIKANI *et al.*, 2004). *Cta1p* protege células do estresse por peróxido e é requerida para virulência em modelo murino de candidíase invasiva. Hifas de um mutante de *CTA1* foram danificadas por neutrófilos humanos, indicando um papel protetor deste gene contra PMNs (WYSONG *et al.*, 1998).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir  $H_2O_2$  a água. Talvez a mais importante das peroxidases seja a glutiona-peroxidase (E.C. 1.11.1.19 – GPx). Uma enzima selênio-dependente, tetramérica, com subunidades idênticas de aproximadamente 22 kD. Essa enzima utiliza o tripeptídeo tiólico glutiona na sua forma reduzida (GSH) como substrato para a decomposição de peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da GSH, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH que se oxidam (GSSG). A enzima glutiona redutase (GR) dependente de NADPH reconverte continuamente a GSSG para o GSH (KELLING & SMITH, 1982). A manutenção dos níveis elevados da GPx é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organosulfurados (grupo thiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembrana e do citoesqueleto (FUJII *et al.*, 1984; DAILLY *et al.*, 1998).

São mais escassos os estudos da atividade da enzima GPx em espécies de *Candida*. MANAVATHU *et al.* (1996) e GUNASEKARAN *et al.*, (1995) estudaram a relação de GPx e GSH na conversão da fase leveduriforme para filamentosa em *C. albicans*.

A GSH (L-gama-glutamil-L-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina. É o tiol não-protéico mais abundante em células eucarióticas, onde seu potencial redox muito baixo ( $E'_0 = -240$  mV) lhe dá propriedades de tampão redox. É substrato essencial da família de enzimas glutationa-peroxidase, conforme citado. Em células de leveduras de brotamento, GSH e GSSG estão envolvidas em funções fisiológicas essenciais, como a síntese de DNA e proteínas, transporte, detoxificação de xenobióticos e metabólitos tóxicos endógenos, bem como na defesa celular contra ERO. GSH é considerada o principal composto antioxidante intracelular não-enzimático (DAILLY *et al.*, 1998).

Isolados fúngicos sem GSH ou alterados em seu estado redox de GSH são sensíveis ao estresse induzido por peróxidos,  $O_2^{\cdot-}$  e produtos de peroxidação lipídica. Em *C. albicans*, GSH é um metabólito essencial, desde que um mutante deficiente na biossíntese de GSH sofre apoptose (CARMEL-HAREL & STORZ, 2000; GRANT, 2001; PENNINGCKX, 2002; BELOZERSKAYA & GESSLER, 2007).

GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.* (2005) evidenciaram em *C. albicans*, que o conteúdo de GSH total e a razão GSH/GSSG passou por moderada elevação em paralelo à indução de um grau significativo de formação de tubos germinativos por ação de soro humano. O fornecimento de GSH exógeno não afetou o grau de transição dimórfica, mas a depleção de GSH intracelular pela adição do oxidante cloro-dinitro-benzeno (CDNB) causou uma redução clara na percentagem de formação de hifa. Isto provavelmente ocorreu pela elevada mortalidade provocada pelo oxidante, o que não permitiu uma conclusão sobre o papel da GSH no processo de dimorfismo.

ALVAREZ-PERAL *et al.* (2002) e mais recentemente CAO *et al.* (2009) demonstraram que o dissacarídeo não-redutor trealose parece ser um protetor contra o estresse oxidativo em *C. albicans*. Células expostas a altas concentrações de  $H_2O_2$  demonstraram alta sobrevivência celular acompanhada por elevação marcada do conteúdo de trealose. Em um mutante duplo *tps1/tps1* houve severa redução da viabilidade celular e o fenótipo foi suprimido pela superexpressão do gene *TPS1*. A trealose não parece ter efeito tão significativo em *S. cerevisiae*, que raramente encontram altos níveis de oxidantes em seu habitat (GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2008).

JAMNIK & RASPOR (2005) fazem uma extensa revisão sobre os métodos atualmente disponíveis para monitorar respostas a estresse oxidativo em leveduras. Entre as técnicas

utilizadas estão: monitoramento da pressão parcial de oxigênio durante o cultivo, determinações de viabilidade celular, medições de atividade enzimática de sistemas de defesa antioxidantes, medições de níveis de sistemas antioxidantes não-enzimáticos, além do exame de modificações no transcriptoma e no proteoma da levedura analisada.

Com relação à determinação da atividade da enzima SOD, a maioria das análises é realizada verificando-se a atividade indiretamente, geralmente por adição do sistema xantina-xantina oxidase como fonte de  $O_2^{\cdot-}$  e um composto que seja reduzido pelo  $O_2^{\cdot-}$ , como, por ex., o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT). Neste, o  $O_2^{\cdot-}$  transfere um elétron ao INT e produz formazana, detectada em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade da enzima é medida a partir do grau de inibição da reação a que o sistema foi submetido. Nessa técnica, uma inibição de 50% é definida como uma unidade de SOD (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para a determinação da atividade da catalase, os dois caminhos mais usados são a medida do decaimento na concentração de  $H_2O_2$  e o da geração de  $O_2$ . A leitura do decaimento de  $H_2O_2$  é feita por espectrofotometria a 240 nm. Uma unidade de catalase corresponde a atividade da enzima necessária para o consumo de 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  em 1 min (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para avaliar a atividade da enzima GPx, o principal método usado consiste em adicionar ao lisado celular uma mistura contendo NADPH, GSH, GR, EDTA e tampão fosfato. Uma alíquota da mistura é adicionada ao lisado, mantido em banho-maria a 37°C durante 1 min, adicionando-se em seguida  $H_2O_2$  ou hidroperóxido orgânico, para iniciar a reação, que é acompanhada em espectrofotômetro. Uma unidade de GPx corresponde a atividade de enzima necessária para converter 1  $\mu$ mol de NADPH a  $NADP^+$  em 1 min. A concentração de glutathiona total (GSH + GSSG) pode ser medida usando-se 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e GR. A velocidade de redução de DTNB é verificada espectrofotometricamente a 412 nm, comprimento de onda relativo à absorção do produto reduzido, o ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (DTNB), ou sais correspondentes. O mesmo procedimento pode ser usado para a determinação de GSSG, com acompanhamento da mudança de absorbância em NADPH a 340 nm. Entretanto, para evitar a interferência de GSH, essa deve ser derivatizada com vinilpiridina ou com N-etilmaleimida (NEM) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Muitos métodos estão disponíveis para identificar espécies reativas em células, mas informação química precisa sobre o que realmente medem tende a ser limitada e é importante considerar que a cultura celular em si causa estresse oxidativo. A sonda mais popular para detectar espécies reativas é a diclorofluoresceína diacetato (DCFDA),

frequentemente usada para medir possíveis peróxidos celulares. No entanto, segundo HALLIWELL & GUTERIDGE (2007), parece que esta não detecta peróxidos tão bem. DCFDA entra nas células e acumula no citosol, onde é desacetilada por esterases a diclorofluoresceína (DCFH) e convertida por espécies reativas em diclorofluorescina (DCF), que pode ser visualizada por fluorescência ao redor de 525 nm quando excitada ao redor de 488 nm. Peróxidos ou  $O_2^{\cdot-}$  não oxidam DCFH rapidamente, mas os radicais peroxi ( $RO_2^{\cdot}$ ), oxi ( $RO^{\cdot}$ ),  $NO_2^{\cdot}$ , radical ânion carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ),  $HO^{\cdot}$  e  $ONOO^-$  podem. Dessa forma, DCFDA somente detecta eficientemente peróxidos celulares se estes são convertidos a radicais.

O ensaio de carbonil é um “ensaio geral” de dano oxidativo a proteínas. Muitas espécies reativas oxidam resíduos de aminoácidos em proteínas para formar produtos com grupos carbonil, que podem ser medidos após reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Quanto à biomarcadores da peroxidação lipídica, uma das formas de detecção é medir produtos finais do processo. Muitos aldeídos e outros compostos são gerados durante a peroxidação lipídica, incluindo o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonal (HNE). A concentração de aldeídos livres *in vivo* é provavelmente baixa, porque eles conjugam com proteínas. Isto pode tornar seus níveis verdadeiros difíceis de acessar, desde que a habilidade de vários métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa para detectar todos os adutos formados é incerta. Muitos métodos usam incubações prolongadas para liberar aldeídos ligados para análise, havendo o risco da elevação artefactual da peroxidação. MDA, HNE e outros aldeídos são ainda metabolizados pelas células, de forma que seus níveis como mensuração de peroxidação lipídica devem ser interpretados com cautela (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Tem sido feitas tentativas de acessar a capacidade antioxidante total (TAC) de fluídos biológicos. Os ensaios utilizados são chamados ensaios de capturação (*trap assays*). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ressonância do spin eletrônico (RSE) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa. Dentre os diversos testes conhecidos citam-se os conhecidos pelas siglas TRAP, ORAC, FRAP e TEAC. O primeiro ensaio TAC usado foi o teste TRAP (*total peroxyl radical trapping antioxidant parameter*). Neste, um fluído biológico é incubado com 2,2'-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH), que forma radicais peroxil que reagem com antioxidantes no fluído. Um dos problemas com estes ensaios é o fato de que certos fluídos contêm misturas complexas de componentes que reagem com

radicais em taxas diferentes, de forma que o tempo pelo qual o ensaio é conduzido pode influenciar nos resultados (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### 1.4.3. Resposta ao estresse oxidativo e antifúngicos

As infecções fúngicas invasivas estão historicamente associadas à alta morbidade e mortalidade, devido, em parte, às limitações da terapia antifúngica disponível e às dificuldades em se fazer um diagnóstico rápido e acurado. Se compararmos com antibióticos antibacterianos, somente um reduzido número de antifúngicos está disponível, o que se deve principalmente ao fato de que as células fúngicas, eucarióticas, apresentam a primeira vista menor número de alvos que possam permitir a geração de fármacos com toxicidade seletiva (SABLE *et al.*, 2008).

Segundo GAUWERKY *et al.* (2009) as drogas correntemente usadas para o tratamento de doenças fúngicas sistêmicas ou localizadas compreendem principalmente os grupos dos poliênicos, azóis e alilaminas, flucitosina e griseofulvina. A maior parte destas drogas inibe de alguma forma a biossíntese do ergosterol, como os azóis, por exemplo. Outro importante sítio de ação dos azóis compreende alterações na atividade das enzimas citocromo c oxidase, peroxidase e catalase (THOMAS, 1986). A flucitosina inibe a síntese protéica fúngica no nível de DNA/RNA, havendo problemas de resistência bem caracterizados e possui espectro de ação bastante limitado. A griseofulvina interfere com a produção de microtúbulos intracelulares, o que inibe a mitose fúngica. Essa somente exerce efeito contra dermatófitos (GAUWERKY *et al.*, 2009).

Certos novos antifúngicos atuam na produção/integridade da parede celular fúngica, como as candinas (echinocandin, pneumocandin e papulacandin) e as micinas (nikkomycin, pramidicin e benanomycin). Segundo GAUWERKY *et al.* (2009) pode-se concluir que durante os últimos 50 anos um arsenal inteiro de drogas antifúngicas potentes foi estabelecido. Porém, a popularidade do mais empregado grupo de antifúngicos, os azóis, foi comprometida pelo desenvolvimento de resistência particularmente entre espécies de *Candida não-albicans*, limitando em muitos casos as opções de tratamento e, desde que as opções de tratamento são limitadas, o desenvolvimento da próxima geração de antifúngicos irá requerer um maior entendimento da biologia dos patógenos fúngicos (COWEN *et al.*, 2002; ARATANI *et al.*, 2002).

Com isso, as doenças fúngicas continuam sendo um desafio e é interessante continuar com o desenvolvimento de antifúngicos que interfiram com a produção de elementos principais da membrana celular ou da parede celular. Mas, em função desses crescentes problemas com resistência a antifúngicos, cabe igualmente considerar opções

totalmente novas. Nesse contexto, os fatores de virulência oferecem interesse como alternativas aos alvos tradicionais. Entre esses se inclui catalases, aspártico-proteinases (de *C. albicans*, particularmente), melanina e fosfolipases (GAUWERKY *et al.*, 2009).

Existem dados que sugerem que o dano causado pelos antifúngicos nas células, aumentando a sensibilidade ao dano oxidativo, seja parte do mecanismo de ação dos azólicos (ROGERS & BAKER, 2002). A produção de ERO é, por exemplo, comprovadamente importante na atividade antifúngica do miconazol (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Segundo ROILIDES *et al.* (1990), os azóis não suprimem a função de PMNs e podem até selecionar funções dessas células *in vitro*. Sugere-se inclusive que a eficácia dos azólicos se deva em parte à sensibilização de *C. albicans* aos oxidantes produzidos pelos macrófagos. Também, a diferente sensibilidade de tipos celulares brancos e opacos de uma cepa de *C. albicans* (WO-1) a oxidantes e neutrófilos foi reportada (JAMIESON *et al.*, 1996). Fortes evidências demonstram que para a ação fungicida da histatina-5, a formação de ERO é a etapa final e essencial para o efeito (HELMERHORST *et al.*, 2001).

SOKOL-ANDERSON *et al.* (1988) sugeriram que a resistência a poliênicos (anfotericina B, particularmente) pudesse ter como mecanismo adicional o aumento da atividade da catalase fúngica, que aumentaria a resistência das leveduras à ação oxidativa da anfotericina B. LINARES *et al.* (2006), demonstraram que o antineoplásico metotrexato aumentou a atividade de catalase e os antifúngicos fluconazol e anfotericina B aumentaram a atividade de SOD e catalase em cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes a estes antifúngicos, indicando um efeito oxidante destas drogas.

Segundo SAIJO *et al.* (2010), assume-se que a resposta ao estresse oxidativo em patógenos está diretamente relacionada com patogenicidade, sendo assim, a inibição desta resposta pode levar a uma atenuação de sua virulência. Ainda, esclarecer os mecanismos da resposta ao estresse oxidativo em fungos patogênicos poderia auxiliar no encontro de alvos de novos antifúngicos.

Mecanismos de defesa antioxidantes também parecem estar relacionados com resistência a antifúngicos. A resistência a antifúngicos poliênicos (anfotericina B, nistatina) pode envolver, entre outros mecanismos, o aumento da atividade de catalase intracelular do fungo, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação de poros (KERRIDGE & NICHOLAS, 1986). A enzima antioxidante Cu/Zn SOD é requerida para a ocorrência de resistência a oxitetraciclina em *S. cerevisiae* (AVERY *et al.*, 2000).

A análise do perfil amplo de expressão gênica em *C. albicans* revelou a regulação coordenada de genes associados com a aquisição gradual de resistência a azólicos, particularmente ao fluconazol, em isolados clínicos deste fungo e vários destes genes estão

envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, como o *GPX1* que codifica para a enzima GPx, sugerindo que a suscetibilidade reduzida ao dano oxidativo possa contribuir para a aquisição de resistência (ROGERS & BARKER, 2003). O gene *CAP1* de *C. albicans* está envolvido em resistência a múltiplas drogas e também na resposta ao estresse oxidativo nessa levedura. Ainda, as informações indicam que pode ser importante o entendimento do sistema de defesa antioxidante e da capacidade de resposta adaptativa em espécies de *Candida* não-*albicans* de importância médica, uma vez que esses mecanismos podem ser espécie-específicos e provavelmente contribuam para mecanismos de resistência a antifúngicos (ALARCO & RAYMOND, 1999).

Em outra situação, ZHANG *et al.* (2009) apontam que, considerando a proximidade entre ERO e várias doenças, existe um interesse contínuo em encontrar antioxidantes como drogas preventivas ou terapêuticas. De acordo com o MDL *Drug Data Report* (MDDR), até o momento sete drogas antioxidantes foram introduzidas, a maioria dessas (ácido lipóico, policosanol, acetilcisteína, idebenone e probucol) direta ou indiretamente derivada de antioxidantes naturais. Explorar como organismos usam antioxidantes para combater ERO é, portanto, de grande importância para a descoberta de drogas antioxidantes.

De fato, existem vários indícios no sentido de haver uma contribuição de certos produtos de genes envolvidos em resposta ao estresse oxidativo com o desenvolvimento de resistência a antifúngicos azólicos e mesmo da produção de ERO com o mecanismo de ação de antifúngicos. O entendimento dessa possível associação é importante para elucidar completamente os mecanismos que geram resistência a essas drogas e nas futuras abordagens de desenvolvimento racional de drogas antifúngicas (KOVACIC & BECVAR, 2000; CHAUHAN *et al.*, 2006).

As informações anteriormente expostas motivaram a investigação do perfil redox *in vitro* de espécies de *Candida* clinicamente relevantes, a fim de contribuir com o entendimento do processo patogênico particularmente de espécies que não *C. albicans*.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a capacidade de espécies patogênicas de *Candida* clinicamente relevantes em resistirem ao estresse oxidativo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Detectar o grau de resistência a oxidantes através de diferentes metodologias em isolados de referência e clínicos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;
- Verificar a capacidade de adaptação ao estresse oxidativo e de proteção cruzada nestas espécies;
- Comparar o perfil antioxidante enzimático (catalase, glutationa-peroxidase e superóxido dismutase), não-enzimático (glutaciona) e a capacidade antioxidante total em extratos celulares das espécies citadas;
- Comparar o perfil de dano oxidativo (em lipídios e proteínas) e de geração de ERO frente a estresse oxidativo nessas espécies;
- Verificar a relação da resistência ao estresse oxidativo com a produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e protease);
- Relacionar os resultados com as diferenças de virulência descritas na literatura entre estas espécies de *Candida*.



### **3. Materiais e Métodos e Resultados (Artigos Científicos/Manuscritos)**

### 3.1. Artigo Científico

#### **Artigo Científico publicado:**

ABEGG, M.A.; ALABARSE, P.V.G.; CASANOVA, A.; HOSCHEID, J.; SALOMON, T.B.; HACKENHAAR, F.S.; MEDEIROS, T.M. & BENFATO, M.S. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, 170(1): 11-20, 2010.

# Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus *Candida*

Maxwel Adriano Abegg · Paulo Vinicius Gil Alabarse · Anderson Casanova ·  
Jaqueline Hoscheid · Tiago Boeira Salomon · Fernanda Schäfer Hackenhaar ·  
Tássia Machado Medeiros · Mara Silveira Benfato

Received: 25 November 2009 / Accepted: 2 March 2010 / Published online: 13 March 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** In the course of an infection, the formation of reactive oxygen species by phagocytes and the antioxidant defense mechanisms of microorganisms play a crucial role in pathogenesis. In this study, isolates representing 8 pathogenic *Candida* species—*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*—were compared with regard to their resistance to oxidative stress in vitro. We evaluated degree of resistance, induction of oxidative damage, capacity to adapt, and induction of antioxidant enzymes. The species showed variable sensitivity to oxidative attack. *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* were more resistant to oxidative stress under the conditions tested; *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* presented medium resistance; and *C. dubliniensis*, *C. famata*,

and *C. guilliermondii* were more sensitive. The overall greater resistance to oxidative stress of *C. albicans* and *C. glabrata* may provide an advantage to these species, which are the major causative agents of candidiasis.

**Keywords** *Candida* spp. · Oxidative stress · Antioxidant defenses · Reactive oxygen species

## Introduction

Certain species of the genus *Candida* are commensals of the human gastrointestinal and genitourinary tract. However, in individuals whose immune system is compromised, *Candida* can cause diseases that vary from superficial mycoses to disseminated infections which are frequently fatal [1, 2].

The most important pathogenic species in addition to *Candida albicans* are, in alphabetical order, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis* [2, 3]. Non-*albicans* *Candida* species are emerging as important colonizers and pathogens [2, 4].

Different *Candida* species show diverse virulence, epidemiological traits [4, 5], and antifungal susceptibility profiles [5, 6]. Clearly, this heterogeneity complicates decision making for the clinician [7].

In order to colonize a host and to start an infection, yeasts need to adhere to the host and need to avoid phagocytosis by neutrophils and macrophages.

---

M. A. Abegg · P. V. G. Alabarse · F. S. Hackenhaar ·  
M. S. Benfato

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular (PPGBCM), Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

M. A. Abegg · A. Casanova · J. Hoscheid  
Universidade Paranaense (UNIPAR), Toledo, PR, Brazil

P. V. G. Alabarse · T. B. Salomon · F. S. Hackenhaar ·  
T. M. Medeiros · M. S. Benfato (✉)  
Departamento de Biofísica (IBIO), Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves  
9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil  
e-mail: 00006614@ufrgs.br

Neutrophils and macrophages use reactive oxygen species (ROS) as part of their arsenal to neutralize microorganisms [8, 9]. ROS can cause damage to biological macromolecules such as proteins and lipids [10, 11]. Unsaturated fatty acid chains of membrane lipids and, to a lesser extent, saturated lipids can react with ROS and undergo peroxidation, which yields lipid peroxides, lipid alcohols, and aldehydic by-products such as 4-hydroxynonenal and malondialdehyde (MDA) [10]. Reactions of ROS with proteins result in the oxidation of amino acid side chains, often leading to a loss of function. The most widely used markers of protein oxidation are protein carbonyl groups, which are formed by oxidation of the side chains of lysine, proline, arginine, and threonine residues [11].

Data suggest that different organisms respond differently to ROS and that they use different mechanisms to detoxify those substances [9, 12–14]. For example, cellular viability in *Saccharomyces cerevisiae* is seriously compromised after low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposures (in the range of 1–5 mM). In contrast, *C. albicans* exhibits increased resistance, and higher non-physiological concentrations are required to cause a significant degree of cell-killing (in the range of 25–100 mM) [15].

The response to oxidative stress has been studied to some extent in *C. albicans* [16, 17]. Despite the fact that the oxidative stress response seems to be a niche-specific phenomenon during the establishment of a systemic infection by this species [18], it is accepted that this response is at least partially necessary to establish a disseminated infection [16, 19]. *C. albicans* expresses enzymes that detoxify ROS (e.g., superoxide dismutase and catalase), and it also generates scavengers such as glutaredoxin and thioredoxin. Data from *C. albicans* mutants revealed that there is a correlation between resistance to oxidants in vitro, survival in phagocytes, and virulence [16].

Information addressing oxidative stress resistance in non-*albicans* species is fragmentary [17]. *C. dubliniensis* was demonstrated to be less resistant to oxidants than *C. albicans*, but was able to initiate an adaptive response [20]; exponential phase cells of *C. glabrata* were found to be more resistant to oxidative stress than *C. albicans* and this resistance was mediated by the catalase Cta1p, although a *C. glabrata* strain deficient for the *CTA1* gene exhibited virulence similar to the wild-type strain [21]. *C. krusei* was shown to be more resistant to oxidants than *C. albicans* [22].

It is important to understand the response of fungi to ROS because of the implications of this response for the establishment of infection and survival within the host [18]. In this work, we present a systematic comparison of the susceptibility of pathogenic *Candida* species to oxidative stress.

## Materials and Methods

### Yeast Strains, Media, and Culture Conditions

The following yeast strains were used: *Candida albicans* type strain ATCC 18804, *Candida dubliniensis* type strain CBS 7987, *Candida famata* ATCC 62894, *Candida glabrata* type strain ATCC 2001, *Candida guilliermondii* type strain ATCC 46036, *Candida krusei* type strain ATCC 6258, *Candida parapsilosis* type strain ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803, and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26787.

*Candida* strains were identified by the following tests: germ tube production, hyphae/pseudohyphae and chlamyospore formation, growth on CHROMagar *Candida* medium (Becton, Dickinson, USA), and carbohydrate assimilation tests using commercial kits, Candifast (International Microbio, France) and API 20C (Bio Merieux, France). Yeast strains were maintained at 4°C and were periodically subcultured on solid YPD.

The strains were routinely cultivated on solid YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) to obtain viable cells and were then grown in liquid YPD medium on an orbital shaker at 30°C and 100 rpm until exponential growth (OD<sub>600 nm</sub> = 1.5–1.6) was reached. Cells were washed twice with sterile water and diluted to an OD<sub>600 nm</sub> = 0.15 in fresh liquid YPD for use. Cells were grown at 30°C rather than at 37°C because all strains grow well at this temperature, and *C. dubliniensis* and *C. famata* grow better at this temperature than at 37°C.

To obtain cell-free extracts, cells were lysed by adding approximately 0.5 g of glass beads (diameter 425–600 µm, Sigma) to tubes containing 1.5 ml of cells and mixing on a vortex mixer using 3 cycles of 3 min with intervals of 1 min of cooling on ice. The samples were then centrifuged 10 min at 8,000g to remove cellular debris and beads.

### Oxidant Sensitivity Assays

For spot tests, initial cell suspensions were diluted up to  $10^{-4}$  in sterile water and spotted (5  $\mu$ l) onto YPD agar plates containing various concentrations of  $H_2O_2$  (2, 7.5, 10, 12 and 15 mM). The growth of each strain was examined after 72 h at 30°C.

Tolerance curves were obtained using 2-ml aliquots of the initial cell suspension. Aliquots were incubated for 1 h in an orbital agitator at 30°C in medium containing  $H_2O_2$  (12.5, 25, and 50 mM). One aliquot was left untreated as a control. After incubation, cells were washed twice in distilled water, diluted and plated on YPD plates and incubated at 30°C for up to 72 h and colony forming units (CFU) were counted.

### MDA Determination

MDA was measured by HPLC using the method described by Karatepe [23] with slight modifications. Twenty-five milliliters of 0.1 M perchloric acid and 55 ml of distilled water were added to a 2-ml aliquot of cell suspension ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.15$ ). The acidified suspension was treated with 0.5 mM  $H_2O_2$  for 1 h at 30°C in YPD, washed and lysed. Addition of acid was necessary to precipitate proteins and to release MDA that was bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. The samples were then centrifuged at 11,800g for 5 min and a 20  $\mu$ l sample was analyzed by HPLC using a reverse-phase column (SUPELCO-SIL™ LC-18-DB HPLC Column; 15 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m). The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)/methanol, the flow rate was 1.2 ml  $\text{min}^{-1}$ , and the chromatograms were monitored at 250 nm. The retention time of MDA was 1.55–1.60 min.

### Protein Carbonyl Groups

Cells were treated with 0.5 mM  $H_2O_2$  for 1 h at 30°C in liquid YPD with agitation at 100 rpm. Aliquots (1 ml) of the cultures were washed 3 times with 1 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, lysed and subsequently sedimented by centrifugation at 11,800g for 5 min. Duplicate aliquots of the lysate (0.8 ml) were mixed with 0.2 ml 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 11,800g for 5 min and 0.1 ml of either 2 M HCl or 10 mM 2,4-

dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 M HCl were added to the precipitates followed by incubation at 25°C for 60 min. The protein was then dissolved by addition of 6 M of guanidine hydrochloride. Excess dinitrophenylhydrazine was removed with ethanol/ethyl acetate 1:1 (v/v). Quantification was performed using a spectrophotometer at an absorbance of 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient for hydrazone ( $21,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Values of carbonyl content for crude extracts are reported as nmol/mg protein.

### Acquired Oxidative Stress Tolerance and Viable Counts

Aliquots (25 ml) of cell cultures were treated with different  $H_2O_2$  concentrations, or maintained without treatment as a control, and incubated at 30°C for 2 h with agitation at 100 rpm. One aliquot was incubated with 0.5 mM  $H_2O_2$  at 30°C for 1 h and immediately challenged with 100 mM  $H_2O_2$ . Aliquots (25  $\mu$ l) were removed from cultures at 0, 30, 60, 90, and 120 min, diluted in sterile water and plating on solid YPD for viability determinations. Between 30 and 300 colonies were counted per plate. Survival was normalized to control samples (100% viability).

### Enzymatic Assays

Cell suspensions were treated with 0.5 mM  $H_2O_2$  (final concentration) or left untreated and incubated for 1 h at 30°C on a rotary platform at 100 rpm. Cells were then washed twice in sterile water and then lysed in 500  $\mu$ l lysis buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.2) in the presence of 50 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF). Clarified supernatants of the resulting cell-free extracts were used in the enzymatic assays.

Catalase (CAT) activity was determined by monitoring the removal of  $H_2O_2$  as described by Aebi [24]. The reaction was started by the addition of 20  $\mu$ l of the supernatant to reaction buffer consisting of 2.8 ml phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 100  $\mu$ l  $H_2O_2$  (300 mM) and was measured at 240 nm with a spectrophotometer.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was assayed using 10  $\mu$ l samples of the supernatants with the commercial kit RANSEL (Randox® Laboratories,

Crumlin, UK). The kinetics of the GPx reaction was verified using 1 U glutathione reductase enzyme in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.15 mM NADPH, and 1 mM glutathione. The reaction was started with the addition of 10  $\mu$ l 70% t-BOOH, and GPx activity was measured by NADPH decrease at 340 nm on a spectrophotometer.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured in 10  $\mu$ l samples of cell supernatant using the commercial kit RANSOD (RANSOD SD 125, Randox<sup>®</sup> Laboratories, Crumlin, UK) according to the manufacturer's protocol. The assay principle is based on the reaction of xanthine and xanthine oxidase to form superoxide radicals which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye. Superoxide dismutase activity is then measured by the degree of inhibition of this reaction. One unit of SOD is that which causes a 50% inhibition of the rate of reduction of I.N.T. under the conditions of the assay. Inhibition was measured at 505 nm on a spectrophotometer.

#### Total Protein Content

The protein content of the cell extracts was measured by the Bradford method [25], using bovine serum albumin as standard.

#### Data Analysis

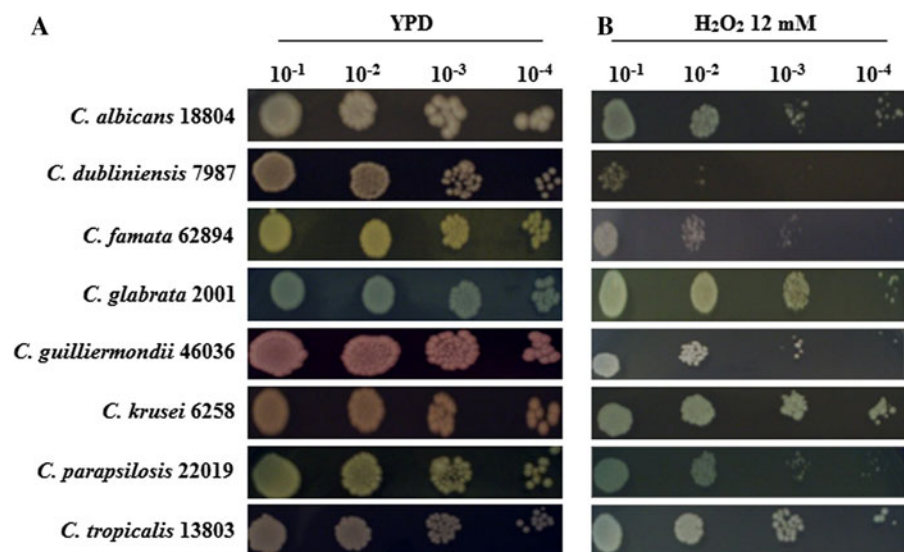
Results are expressed as means  $\pm$  SD, and analysis was performed using SPSS version 16 (SPSS, Chicago, IL). To compare variables between groups, a one-way ANOVA was performed followed by *Tukey's post hoc test*. Untreated samples were compared with treated samples using Student's *t*-test. Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

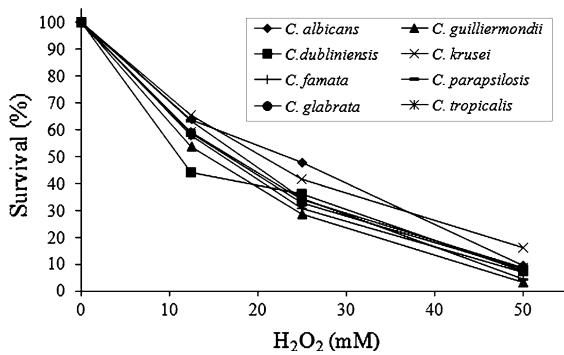
#### Results

##### Effects of Oxidants and Oxidative Damage on *Candida* Species

In order to compare the oxidative stress response between different pathogenic *Candida* species, we investigated the resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of *Candida* cells during exponential growth. Results of spot tests obtained using 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in YPD plates are shown in Fig. 1b. Results of control spots without oxidative treatment are shown in Fig. 1a. *C. albicans* exhibited an intermediate resistance to oxidative stress in the spot test (Fig. 1b). *C. dubliniensis* was the most affected and *C. glabrata* and *C. krusei* were the most resistant species.

**Fig. 1** Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of *Candida* sp. cells during logarithmic growth. Mid-log phase cultures of *Candida* sp. were diluted to OD<sub>600 nm</sub> = 0.15. **a** Dilutions up to 10<sup>-4</sup> in sterile water were spotted (5  $\mu$ l) onto YPD agar plates without oxidant or **b** onto YPD agar plates containing 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plates were incubated at 30°C for up to 72 h





**Fig. 2** Cell viability of *Candida* sp. isolates. Log phase cells were standardized to an OD<sub>600 nm</sub> = 0.15 and incubated for 1 h in an orbital agitator at 30°C with increasing levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12.5, 25, and 50 mM. After incubation, cells were washed, diluted and plated on YPD agar. Plates were incubated at 30°C for up to 72 h, and the CFU were counted. The experiments were repeated 3 times with the standard deviation being less than 12%

In the cell viability experiments, with 12.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *C. dubliniensis* (44% survival) and *C. guilliermondii* (53.8% survival) were significantly (ANOVA; Tukey test,  $P \leq 0.05$ ) more sensitive than *C. albicans* (64.2% survival) and *C. krusei* (65.3% survival). When 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used, *C. guilliermondii* (28.7% survival) was significantly more sensitive than *C. albicans* (47.8% survival). With 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *C. guilliermondii* (3.2% survival) was significantly more sensitive than *C. krusei* (16.1% survival) (Fig. 2). Similar experiments using disk diffusion assays gave equivalent results (results not shown).

#### Lipid Peroxidation and Protein Carbonylation

The lipid peroxidation index was determined on the basis of MDA levels (Fig. 3a). *C. glabrata* showed the lowest level of MDA followed by *C. krusei* and *C. dubliniensis*. The highest levels were observed for *C. parapsilosis*, followed by *C. albicans*. The level of protein carbonyl groups, which provide a measurement of the oxidative damage, was lower for *C. albicans* and *C. glabrata*, and higher for *C. dubliniensis*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis*. *C. famata* and *C. tropicalis* showed the highest levels of carbonyl groups (Fig. 3b).

#### Adaptation to Oxidative Stress

Yeast strains were exposed to 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and subsequently to 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lethal dose to the

species tested). An adaptive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed in all *Candida* species tested. This response resulted in an increased level of resistance to a lethal dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In comparison, the *S. cerevisiae* strain tested showed less resistance and adaptation capacity (Fig. 4).

#### Antioxidant Enzyme Activities

The activities of CAT, GPx, and SOD, enzymes with known antioxidant activity, were determined. The results (Table 1) demonstrate that treatment with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced increased levels of CAT activity in the strains tested. *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, and *C. krusei* showed high CAT activity in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *C. guilliermondii* had the highest GPx activity followed by *C. krusei*. *C. glabrata* had the highest SOD activity in response to oxidative stress followed by *C. albicans*, whereas *C. tropicalis* exhibited the lowest SOD activity.

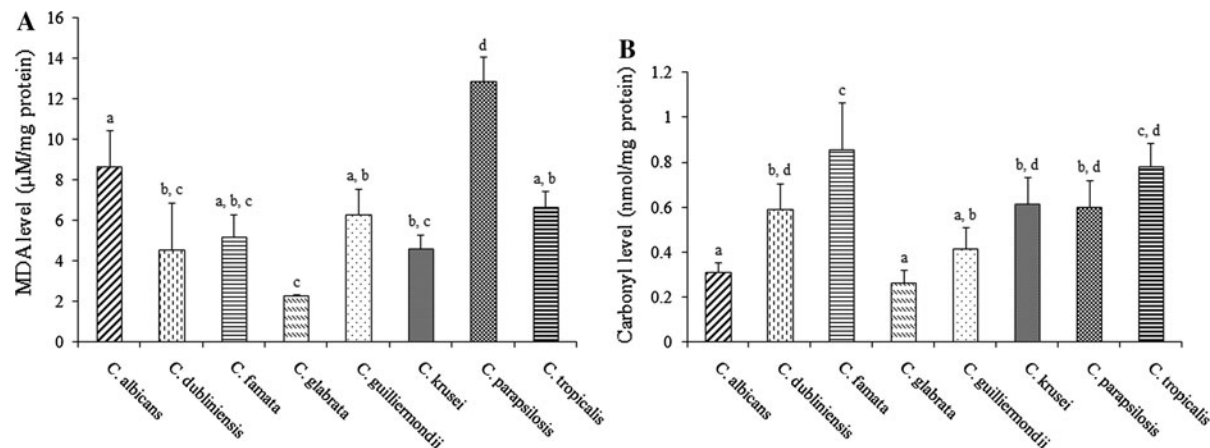
#### Discussion

The oxidative stress response was previously analyzed in *C. albicans* [18, 26–29], *C. dubliniensis* [20], and *C. glabrata* [21]. We were interested in determining the response in other important non-*albicans* *Candida*.

The physiological condition of distinct species in each experiment may not to be identical, but we observed similar cell sizes and growth curves in YPD medium (results not shown). The mild oxidative stress used in this study to induce protection (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is similar to the concentration (0.4 mM) of this oxidant that Enjalbert et al. [18] showed to be equivalent to the cellular response seen in kidney infections.

Based on the results of the oxidant sensitivity tests (Figs. 1, 2), *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* were determined to be more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* showed intermediary resistance, and *C. dubliniensis*, *C. famata*, and *C. guilliermondii* were the most sensitive species.

Tosello et al. [20] found that *C. dubliniensis* was less resistant to oxidants than *C. albicans*. Similarly, in our study, *C. dubliniensis* showed lower resistance to oxidative stress. This may be related to the reduced infectivity of *C. dubliniensis* [30], which shows



**Fig. 3** Lipid peroxidation and protein carbonylation in *Candida* sp. Cells in exponential phase were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h at 30°C in YPD medium. MDA levels (a) were measured by HPLC as described in “Materials and Methods”. Protein damage (b) was measured by carbonyl assay as

described in “Materials and Methods”. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. Columns with equal letters are not significantly different by ANOVA followed by *Tukey's post hoc test* ( $P > 0.05$ )

disparities in virulence genes in comparison with *C. albicans* [31]. Our results (Figs. 1, 2, 3, 4), also suggest that the *C. famata* and *C. guilliermondii* isolates have a weak antioxidant system, which could contribute to their relative poor virulence [32, 33].

Cuéllar-Cruz et al. [21] demonstrated that stationary phase cells of *C. glabrata* are more resistant to higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in comparison with *C. albicans* and *S. cerevisiae*. These authors also recently demonstrated that stationary phase cells of *C. glabrata* are less resistant to menadione than *C. albicans* [34]. In the present work, exponentially growing *C. glabrata* cells showed similar resistance as *C. albicans*. This *C. glabrata* resistance may be explained by the high activity of SOD and CAT, despite the low production of GPx found in this study (Table 1).

The clinical importance of *C. krusei* rests on its innate resistance to azole antifungal drugs [35]. This species is relatively resistant to ROS compared to *C. albicans* strains [22]. In our work, *C. krusei* was more resistant than *C. albicans*, and this may be explained by our findings of high activity of GPx and intermediate activity of SOD and CAT (Table 1). Despite high resistance to oxidative stress, *C. krusei* has reduced pathogenicity when compared to *C. albicans*, which may be due partially to the differential induction of immunoregulatory cytokines produced by human monocytes [36] and the lack of phospholipase and proteinase by *C. krusei* isolates [37].

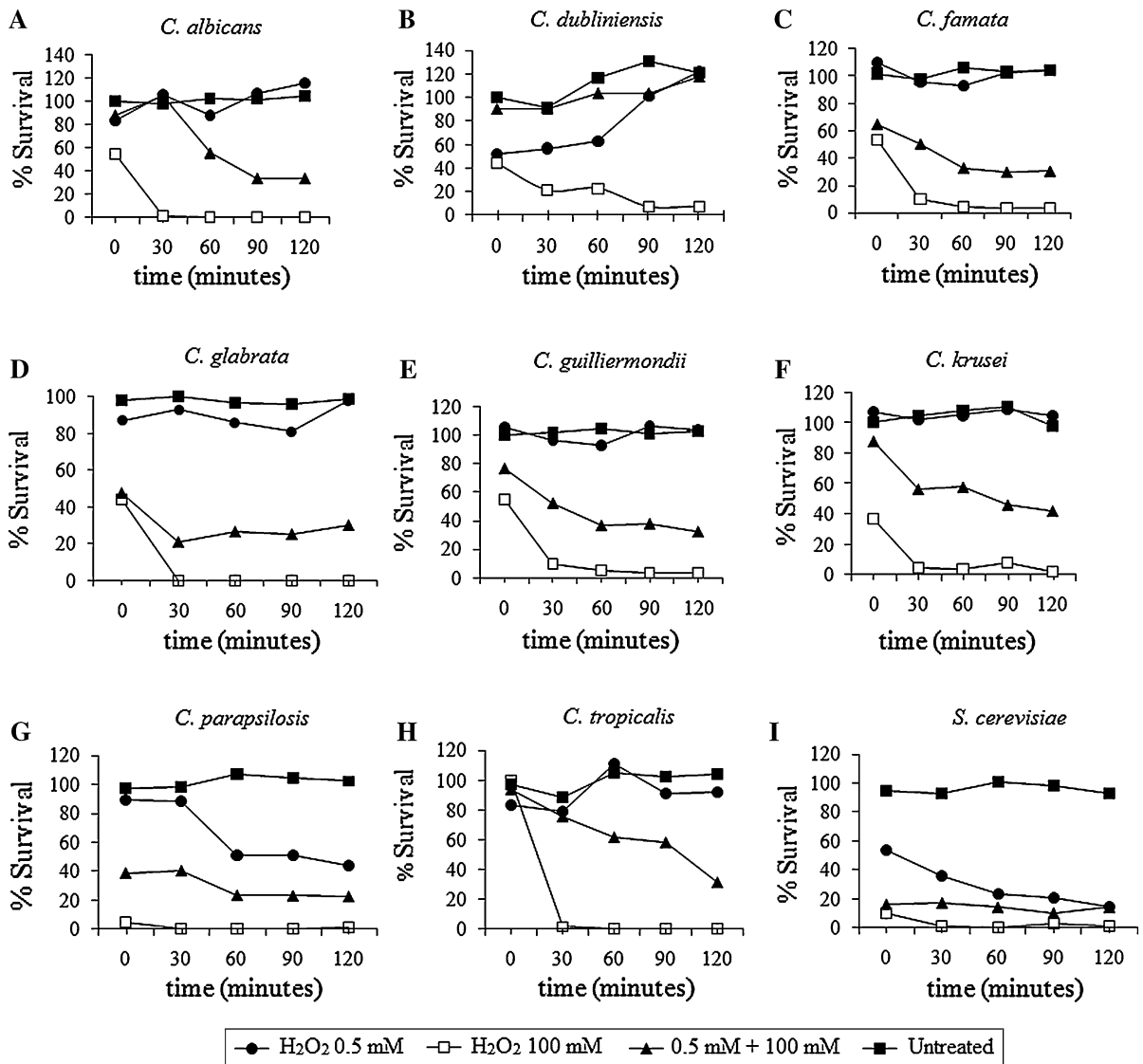
It has been previously demonstrated that the budding yeast, *S. cerevisiae*, and dimorphic yeast such as *C. albicans* [26, 38], *C. dubliniensis* [20] and *C. glabrata* [21] can adapt to oxidative stress, whereby initial exposure to a non-lethal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose confers resistance to a higher, and normally lethal, dose of the same oxidant. All the *Candida* species tested in this study exhibited adaptation to higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose. This capacity was higher among *Candida* species than in *S. cerevisiae* (Fig. 4).

The MDA results (Fig. 3a) showed that *C. glabrata* and *C. krusei* had a reduced lipid peroxidation index. This study is the first lipid peroxidation determination of different *Candida* species, and the levels found are in agreement with those observed by Manfredini et al. [39] for *S. cerevisiae*.

Figure 3b shows that *C. albicans* and *C. glabrata* had reduced production of carbonyl groups in response to oxidative stress. The levels of carbonyl found in these species were lower than those found in *S. cerevisiae* in two previous studies [39, 40]. This is also the first comparison of protein damage in different *Candida* species.

In general, it can be concluded that the mild oxidative stress treatment (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced adaptation and protection in all species studied, by the induction of at least one of the three antioxidant enzymes tested (Table 1). This observation was previously made for CAT, GPx, and SOD in *C. albicans*





**Fig. 4** Adaptation to hydrogen peroxide stress in *C. albicans* (a), *C. dubliniensis* (b), *C. famata* (c), *C. glabrata* (d), *C. guilliermondii* (e), *C. krusei* (f), *C. parapsilosis* (g), *C. tropicalis* (h), and *S. cerevisiae* (i). Aliquots of cell cultures

either were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or were incubated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and challenged with 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or were left untreated, and viability was determined as described in “Materials and Methods”

[26, 27] and, particularly SOD and CAT, in *C. dubliniensis* [20].

Fekete et al. [41] had described a mutant strain of *C. albicans* chronically adapted to oxidative stress. This strain had reduced pathogenicity and reduced formation of hyphae. However, a recent observation demonstrated in a *C. albicans* mutant that when oxidative phosphorylation was uncoupled, there was an increase in paraquat resistance. This mutant strain persisted and proliferated more than a wild-type

strain in a mouse model of infection, suggesting that resistance to oxidants and the uncoupling of oxidative phosphorylation provided a means for adapting to, and colonizing, the host [42].

It is possible that the adaptive response of *C. albicans* to oxidative stress permits this species to survive the initial attack from the host immune system and enables it to establish a tissue infection [18]. According to this view, and in agreement with our results, it is possible that species such as *C. dubliniensis*,

**Table 1** Antioxidant enzyme activities in *Candida* extracts

Strain	Treatment	GPx U/mg prot. $\pm$ SD	SOD U/mg prot. $\pm$ SD	CAT U/g prot. $\pm$ SD
<i>C. albicans</i> 18804	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	841.2 $\pm$ 39.6	15.9 $\pm$ 0.8	668.3 $\pm$ 35.2
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	601.2 $\pm$ 21.1 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 0.6* <sup>ad</sup>	2096.2 $\pm$ 181.5* <sup>a</sup>
<i>C. dubliniensis</i> 7987	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	662.12 $\pm$ 14.9	9.5 $\pm$ 0.5	2471.1 $\pm$ 63.3
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	642.3 $\pm$ 70.3 <sup>a</sup>	11.5 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	3326.45 $\pm$ 227.4* <sup>b</sup>
<i>C. famata</i> 62894	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	311.1 $\pm$ 96.2	5.8 $\pm$ 0.2	442.5 $\pm$ 129.5
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	898.3 $\pm$ 21.8* <sup>ab</sup>	8.7 $\pm$ 0.4* <sup>c</sup>	3044.8 $\pm$ 527.4* <sup>b</sup>
<i>C. glabrata</i> 2001	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	136.9 $\pm$ 20.8	2.8 $\pm$ 0.1	1418.4 $\pm$ 70.9
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	171.1 $\pm$ 13.2* <sup>c</sup>	15.9 $\pm$ 0.3* <sup>d</sup>	3221.0 $\pm$ 293.6* <sup>b</sup>
<i>C. guilliermondii</i> 46036	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1121.6 $\pm$ 148.7	16.7 $\pm$ 0.5	469.7 $\pm$ 67.5
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1545.3 $\pm$ 174.3 <sup>c</sup>	13.9 $\pm$ 0.5* <sup>a</sup>	1242.36 $\pm$ 86.9* <sup>c</sup>
<i>C. krusei</i> 6258	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1088.9 $\pm$ 119.5	15.4 $\pm$ 1.0	1121.6 $\pm$ 37.1
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1130.6 $\pm$ 265.5 <sup>b</sup>	11.7 $\pm$ 0.6* <sup>b</sup>	1633.56 $\pm$ 144.2* <sup>ac</sup>
<i>C. parapsilosis</i> 22019	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	906.2 $\pm$ 61.6	12.4 $\pm$ 0.8	1186.0 $\pm$ 38.2
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	724.2 $\pm$ 62.0 <sup>a</sup>	11.5 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	5294.7 $\pm$ 797.4* <sup>d</sup>
<i>C. tropicalis</i> 13803	Without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	153.2 $\pm$ 16.0	3.2 $\pm$ 0.1	340.81 $\pm$ 30.9
	0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	752.6 $\pm$ 48.5* <sup>a</sup>	6.9 $\pm$ 0.5* <sup>e</sup>	618.9 $\pm$ 104.9* <sup>e</sup>

Cultures of *Candida* species were grown aerobically at 30°C in YPD medium at 100 rpm until early exponential phase. Cultures were then either exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or left untreated, and then frozen at –80°C. Cells were harvested and extracts were prepared and assayed as described in Materials and Methods. Values reported are the means of three determinations. \* Statistical significance ( $P \leq 0.05$ ) between untreated and treated samples (Student's *t*-test). Means of treated samples within the same column followed by identical letters are not significantly different ( $P > 0.05$ ) and followed by different letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) by ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. SD = standard deviation

*C. famata*, *C. guilliermondii*, and also *S. cerevisiae* are less capable of causing deep infections because of their relative incapacity to overcome the initial challenge of oxidative stress that is imposed by phagocytes. On the other hand, *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* have a more potent antioxidant system, which might provide an advantage enabling these species to cause deep systemic infections.

The limitations of our study should be noted. Mainly, because of the use of one single representative isolate of each species in the analyses, the results cannot be generalized. Despite this, *Candida* species display differences in their ability to withstand an oxidant attack and we suggest that this difference may impact the capacity of these species to cause disease.

**Acknowledgments** The authors thank Patrícia Valente for reading of the manuscript, M. H. Vainstein, T. I. E. Svidzinsky, S. H. Alves, and the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS for kindly providing strains.

## References

- Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002;3:918–30.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133–63.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1, 586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from The ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1440–6.
- Kremery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002;50:243–60.
- Cantón EC, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2477–82.
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8:378–84.

7. Weig M, Brown AJP. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends Microbiol.* 2007;15:310–7.
8. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K + influx. *Nature.* 2002;416:291–7.
9. Fang F. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:820–32.
10. Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med.* 1996;21: 917–43.
11. Stadman ER, Berkett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 1997;10:485–94.
12. Moye-Rowley WS. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell.* 2003;2:381–9.
13. Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink G. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:11007–12.
14. Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 2005;13:111–8.
15. González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Argüelles JC. Stress responses in yeasts: what rules apply? *Arch Microbiol.* 2008;189:293–6.
16. Chauhan N, Latge JP, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:435–44.
17. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. *Microbiology.* 2007;153:3211–7.
18. Enjalbert B, MacCallum M, Odds FC, Brown AJP. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2007;75:2143–51.
19. Westwater C, Balish E, Schofield DA. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell.* 2005;4:1654–61.
20. Tosello ME, Biasoli MS, Luque AG, Magaró HM, Krapp AR. Oxidative stress response involving induction of protective enzymes in *Candida dubliniensis*. *Med Mycol.* 2007;45:535–40.
21. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-Del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, et al. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by the single catalase, Cta1p, and controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p. *Eukaryot Cell.* 2008;7: 814–25.
22. Costa-De-Oliveira S, Pina-Vaz C, Gonçalves-Rodrigues A, Ludovico P. *Candida krusei* showed promoted resistance to oxidative stress. 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005;Abstract Number:1135-204.
23. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LC GC North America.* 2004;22:362–5.
24. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105: 121–6.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
26. Jamieson DJ, Stephen DWS, Terrière EC. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;138:83–8.
27. González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defenses against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast.* 2003;20:1161–9.
28. Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell.* 2003;14:1460–7.
29. Pedreño Y, González-Párraga P, Conesa S, Martínez-Esparza M, Aguinaga A, Hernández JA, et al. The cellular resistance against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is independent of neutral trehalase (Ntc1p) activity in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:57–62.
30. Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol.* 2000;26:59–68.
31. Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology.* 2004;150:3363–82.
32. Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, Gonzalez MA. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *J Clin Microbiol.* 2005;43:635–40.
33. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3551–6.
34. Cuéllar-Cruz M, Castaño I, Arroyo-Helguera O, De Las Peñas A. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:649–54.
35. Moran GP, Jabra-Rizk MA. 8<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and Candidiasis: molecular tools provide insights into host-pathogen interactions. *Mycopathologia.* 2006; 162:17–24.
36. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68:2464–9.
37. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses.* 2002;45:160–5.

38. Davies JMS, Lowry CV, Davies KJA. Transient adaptations to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys.* 1995;317:1–6.
39. Manfredini V, Martins VD, Peralba MCR, Benfato MS. Adaptative response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 2005;276:175–81.
40. Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2000;275:27393–8.
41. Fekete A, Emri T, Gyetvai A. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7:834–47.
42. Cheng S, Clancy CJ, Zhang Z, Hao B, Wang W, Iczkowski KA, et al. Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue. *Cell Microbiol.* 2007;9:492–501.

### 3.2. Manuscrito

#### **Manuscrito submetido:**

ABEGG, M.A.; MENDES, M.F.A.; HACKENHAAR, F.S.; MEDEIROS, T.M.; SCHÜLLER, A.K.; ALABARSE, P.V.G.; SALOMON, T.B.; VIACAVA, P.R. & BENFATO, M.S. *In vitro* response of *Candida* sp. clinical isolates to oxidative stress. *Mycoses*

1  
2  
3 Original article  
4  
5

6 ***In vitro* response of *Candida* sp. clinical isolates to oxidative stress**  
7  
8

9  
10  
11  
12 **Short Title:** Response of *Candida* sp. to oxidative stress  
13  
14

15  
16 **Key words:** *Candida* spp., oxidative stress, antioxidant defenses.  
17  
18

19  
20  
21  
22 Maxwel A. Abegg,<sup>1</sup> Marcus F.A. Mendes,<sup>2</sup> Fernanda S. Hackenhaar,<sup>1</sup> Tássia M. Medeiros,<sup>2</sup>  
23  
24 Ártur K. Schüller,<sup>2</sup> Paulo V.G. Alabarse,<sup>1</sup> Tiago B. Salomon,<sup>2</sup> Paula R. Viacava,<sup>2</sup> Mara S.  
25  
26 Benfato<sup>1,2</sup>  
27  
28

29  
30  
31  
32  
33  
34 <sup>1</sup>*Post-Graduate Programme in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio*  
35  
36 *Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and* <sup>2</sup>*Federal University of Rio Grande do Sul, Porto*  
37  
38 *Alegre, Brazil*  
39  
40

41  
42  
43  
44  
45 *Correspondence:* Mara S. Benfato, DSc., Department of Biophysics, Federal University of Rio  
46  
47 Grande do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves, 9500, building 43431, Porto Alegre, RS - 91501-  
48  
49 970, Brazil.  
50

51  
52  
53 Tel.: +55 51 3308/7603. Fax: +55 51 3308/7003.  
54

55  
56 E-mail: 00006614@ufrgs.br  
57  
58  
59  
60

## Summary

Pathogenic species of *Candida* differ in many aspects, including their clinical prevalence, virulence, and profile of antifungal resistance. One of the causes of these differences is possibly related to the differential capacity of these species to deal with oxidative stress. In this study, we compared clinical isolates of eight *Candida* sp. with respect to their oxidative stress resistance *in vitro*, oxidative damage induction, and antioxidant enzymes. Intraspecific and interspecific variation was observed. In accord with data previously obtained from laboratory isolates, the results here indicate that *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* have a more effective antioxidant system, and that *C. dubliniensis*, *C. famata* and *C. guilliermondii* are highly sensitive to oxidative stress. *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* have intermediate resistance profiles. The stronger antioxidant system of some species may enable them to cause systemic infections or to resist to antifungals.

**Key words:** *Candida* spp., oxidative stress, antioxidant defenses.

## Introduction

The clinical spectrum of *Candida* spp. infections ranges from benign colonization of the skin and mucosal surfaces to mucocutaneous forms of candidiasis and systemic infections.<sup>1</sup> Sobel [2] pointed out that, for more than a decade, multiple epidemiological studies have indicated that *Candida* species represent the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infection worldwide; emphasis was given to the continued extremely high mortality associated with candidemia, which approaches 35% in the United States.<sup>2,3</sup>

Some factors involved in development of candidiasis are: mucosal and cutaneous barrier disruption, neutrophil dysfunction (quantitative and qualitative), metabolic disorders, and extremes of age (< 1 and > 70 yr).<sup>4</sup> AIDS patients, organ transplant recipients, cancer patients receiving chemotherapy, recipients of artificial joints and prosthetic devices, and other immunocompromised individuals are particularly susceptible to candidiasis.<sup>3</sup>

Although *Candida albicans* remains the most important human fungal pathogen because of its frequency of isolation, and the amount of morbidity and mortality it causes, the relative prevalence of *Candida* sp. has changed.<sup>2</sup> Horn *et al.* [5] described a higher incidence of non-*albicans* species (54.4%) than *C. albicans* (45.6%) in 2019 candidemia cases. The decline in occurrence of *C. albicans* has largely been the result of an increased proportion of *C. glabrata*.<sup>2</sup>

The initial host response to *Candida* is through recognition by innate immune cells (especially dendritic cells, macrophages, and neutrophils) and subsequent phagocytosis and elimination.<sup>6</sup> Professional phagocytes destroy pathogens in part through reactive oxygen species (ROS), including the superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ), generated directly or indirectly by NADPH oxidase.<sup>7</sup> The importance of ROS in



1  
2  
3 pathogen elimination is highlighted by individuals with mutations that cause partial or total  
4  
5 inactivation of NADPH oxidase, who suffer from chronic granulomatous disease. This disease  
6  
7 is characterized by severe, recurrent, life-threatening infections. In addition, incontrovertible  
8  
9 evidence of the antimicrobial roles of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  has been established from results of  
10  
11 targeted deletion of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase  
12  
13 (SOD).<sup>8,9</sup>  
14  
15  
16  
17

18  
19 Butler *et al.* [10] showed recently that there are significant expansions of gene families  
20  
21 related to virulence in pathogenic *Candida* sp. The occurrence of genes involved in stress  
22  
23 responses is also variable between species. Previous studies have also demonstrated differences  
24  
25 among *Candida* sp. in their capacity to overcome ROS toxicity.<sup>11-13</sup> Our results using laboratory  
26  
27 *Candida* sp. isolates also revealed differences in responses to oxidative stress.<sup>14</sup> Here, we  
28  
29 analyzed *in vitro* oxidative stress responses of clinical isolates of eight important pathogenic  
30  
31 *Candida* species.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

## 39 **Materials and methods**

40  
41  
42 Yeast isolates studied were: *C. albicans* 1 (isolate from a nosocomial patient), *C.*  
43  
44 *albicans* 51 (oro-tracheal tube of an AIDS patient), *C. dubliniensis* 23 and *C. dubliniensis* 25 (  
45  
46 both from oropharynx of AIDS patients), *C. famata* 1 and *C. famata* 24 (both clinical isolates  
47  
48 from nosocomial patients), *C. glabrata* 1, *C. glabrata* 75, and *C. glabrata* 118 (all obtained  
49  
50 from catheter tips), *C. guilliermondii* 73 (clinical isolate from a nosocomial patient) and *C.*  
51  
52 *guilliermondii* 6260 (ATCC isolate from a patient with bronchomycosis), *C. krusei* 1 and *C.*  
53  
54 *krusei* 2 (both isolated from skin lesions of diabetic patients), *C. parapsilosis* 81 and *C.*  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 *parapsilosis* 115 (both isolated from patients with onychomycosis) and *C. tropicalis* 1 (isolated  
4  
5 from an oral granuloma, *C. tropicalis* 55 and *C. tropicalis* 56 (both clinical isolates from  
6  
7 nosocomial patients).  
8  
9

10  
11 We have used a methodology that was described previously in detail.<sup>14</sup> Yeasts were  
12  
13 maintained on solid YPD medium (yeast extract-peptone-dextrose) (4-8°C). Species  
14  
15 identification of the isolates was based on morphological and biochemical tests. Viable cells  
16  
17 obtained from yeast cultivated on solid YPD medium were grown in liquid YPD medium on an  
18  
19 orbital shaker (30 °C, 100 rpm) until exponential growth was reached ( $OD_{600nm} = 1.5-1.6$ ). Cells  
20  
21 were then washed and diluted to  $OD_{600nm} = 0.15$  in fresh liquid YPD for use. To obtain cell-free  
22  
23 extracts, cells were lysed by disruption with glass beads and then centrifuged (10 min, 8,000 g)  
24  
25  
26 to remove debris.  
27  
28  
29

30  
31 For disk diffusion tests, sterile 6-mm diameter filter paper disks were used. Each disk  
32  
33 was impregnated with 5  $\mu$ l of 30%  $H_2O_2$ , 0.5 M paraquat (1,1V-dimethyl-4,4V-bipyridinium  
34  
35 dichloride hydrate, 95% purity) or 0.3 M menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin  
36  
37 K3, 95% purity). Diluted yeast ( $OD_{600nm} = 0.15$ ) were plated onto YPD solid agar by using  
38  
39 sterile cotton swabs and incubated at 30 °C for up to 72 h with the disks. Halos of growth  
40  
41 inhibition were measured with a micrometer.<sup>15</sup> For spot tests, initial cell suspensions were  
42  
43 diluted up to  $10^{-4}$  in sterile water and spotted (5  $\mu$ l) onto YPD agar plates containing 12 mM  
44  
45  $H_2O_2$ . After 72 h at 30 °C the growth of each isolate was examined and the plates were  
46  
47  
48 photographed.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Malondialdehyde (MDA) was measured by HPLC using a method described by  
4 Karatepe [16]. The chromatograms were monitored at 250 nm. The protein carbonyl groups  
5 were quantified by a method employing 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH).<sup>17</sup>  
6  
7

8  
9  
10  
11 For enzymatic assays, cell suspensions were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final  
12 concentration) or left untreated, and incubated for 1 h, 30 °C, 100 rpm on a rotary platform.  
13  
14 Cells were then washed, lysed and centrifuged. Clarified supernatants were used in enzymatic  
15 assays. Catalase (EC 1.11.1.6) activity was determined by monitoring the removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as  
16 proposed by Aebi [18]. Glutathione peroxidase (GPx - EC 1.11.1.9) activity was assayed using  
17 10 µl samples of the supernatants with the commercial kit, RANSEL (Randox® Laboratories,  
18 Crumlin, UK). Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activity was measured in 10 µl samples of  
19 cell supernatant using the commercial kit, RANSOD (RANSOD SD 125, Randox®  
20 Laboratories, Crumlin, UK) according to the manufacturer's protocol.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 To normalize the results, the total protein content of the cell extracts was quantified  
34 using the Bradford method [19]. Results are expressed as means ± S.D. Statistical analysis was  
35 performed using PASW 18.0 software (SPSS, Chicago, IL). To compare variables between  
36 groups, a one-way ANOVA was performed followed by the *post-hoc* test of Tukey. Untreated  
37 samples were compared with treated ones by Student's *t*-test. Correlations were determined by  
38 Spearman rank correlation coefficient ( $\rho$ ). Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically  
39 significant. In the figures, statistics has been omitted to facilitate interpretation.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Results and discussion

In this work, our previous analysis of the *in vitro* oxidative stress response of laboratory *Candida* sp. isolates,<sup>14</sup> was extended to clinical isolates of the same species. Disk diffusion and spot tests were used to compare the relative sensitivity of the isolates to oxidants (Fig. 1 and Fig. 2).

The disk diffusion test is widely employed to evaluate the sensitivity of microorganisms to oxidative agents.<sup>15,20</sup> We found that the sensitivity of each isolate varied according to the oxidant employed. *C. albicans* and *C. krusei* 2 isolates were significantly more resistant to menadione than *C. dubliniensis* and *C. guilliermondii* isolates. *C. glabrata* isolates were significantly more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *C. dubliniensis* 23 and *C. guilliermondii* 6260. *C. albicans* isolates were significantly more resistant to paraquat than *C. famata* 1 and *C. guilliermondii* 6260 (Fig. 1).

Sampaio *et al.* [20] also found significant differences in the susceptibility patterns of *C. albicans* to various stress agents. These authors found inhibition halos ranging from 30-35 mm using 10 µl 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as compared to 20-23 mm halos with 5 µl of 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observed in this study. They also found halos ranging from 20-30 mm using 10 µl of 0.5 M menadione as compared to 20 mm halos with 5 µl of 0.3 M menadione, observed in this study (Fig. 1).

Spots obtained without oxidative treatment and with 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> YPD plates are shown in Figure 2a and 2b, respectively. *C. dubliniensis*, *C. famata* and *C. guilliermondii* isolates were more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The other species were more resistant and grew better under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (Fig. 2b). Our results for growth of *C. albicans* under 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress were equivalent to those under 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress obtained by Walia and Calderone [21].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Taking together, the results of sensitivity assays generally corroborated our previous observation that *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* were particularly resistant to oxidative stress, that *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* possessed an intermediate degree of resistance, and that *C. dubliniensis*, *C. famata* and *C. guilliermondii* exhibited more sensitivity to *in vitro* oxidative stress.<sup>14</sup>

MDA levels were determined as a means to evaluate the lipid peroxidation index, and the degree of protein damage was assessed by measurement of protein carbonylation. Both assays were conducted under mild oxidative stress (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fig. 3). *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates presented the highest MDA levels. MDA levels in *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates were significantly higher than in *C. krusei* isolates. The clinical *C. guilliermondii* isolates presented carbonyl levels that were significantly higher than in *C. albicans* isolates.

MDA levels did not correlate with carbonyl levels. However, carbonyl levels correlated with the sensitivity of the isolates in disk diffusion tests ( $\rho = 0.424, 0.300, \text{ and } 0.411$  for menadione, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and paraquat, respectively). The lack of correlation between MDA and carbonyl levels may be related to the fact that the production of MDA depends on the availability of substrates, which are usually membrane polyunsaturated fatty acids (PUFA).<sup>22</sup> *C. albicans* possess membrane PUFA,<sup>23</sup> but little is known about PUFA content in other pathogenic *Candida* spp. However, the carbonyl levels demonstrate that higher resistance to oxidants is reflected in better protection against damage to lipids and to proteins.

CAT, GPx, and SOD activities were determined with and without oxidative treatment (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fig. 4). Oxidative treatment increased CAT activity in all species tested. *C.*

1  
2  
3 *albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* demonstrated higher CAT activity. This increase was higher  
4  
5 than our previous observation,<sup>14</sup> and may contribute to higher resistance to oxidative stress  
6  
7 observed in these species.<sup>12</sup> Similar increases in CAT activity with oxidative stress have been  
8  
9 previously observed.<sup>13,24,25</sup>  
10  
11

12  
13  
14 We found a reduction in GPx activity in most of the isolates under the conditions  
15  
16 employed. Kusch *et al.* [26] observed an up-regulation in CAT and GPx proteins after treatment  
17  
18 with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, Yang *et al.* [27], investigating the influence of cultural conditions  
19  
20 on GPx production in *C. albicans*, observed a slight GPx activity reduction using 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
21  
22 and a slightly elevation using 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, it appears that the conditions of the test  
23  
24 produced the variable results of GPx activity found in the different studies.<sup>24,25</sup>  
25  
26  
27

28  
29 SOD activity was either increased or was not significantly altered in most of the isolates  
30  
31 (Student *t*-test; *P* > 0.05). *C. parapsilosis* isolates had the highest SOD activity followed by *C.*  
32  
33 *glabrata* isolates. The possible inhibition of SOD activity under mild oxidative stress is in  
34  
35 agreement with results of Gunasekaran *et al.* [28]. These authors found a slight inhibition in  
36  
37 SOD activity using 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (from 15.05 to 12.46 U/mg protein). Using 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> there  
38  
39 was an 83.6% inhibition<sup>28</sup>. Pedreño *et al.* [29] observed a reduction in SOD activity in yeast  
40  
41 treated with 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, Tosello *et al.* [13] described a twofold increase in SOD  
42  
43 activity in *C. albicans* and *C. dubliniensis* isolates treated with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fekete *et al.* [30]  
44  
45 observed SOD activities ranging from 3.7 to 11 U/mg protein in untreated and treated (1 to 6  
46  
47 mM of tert-butyl hydroperoxide - t-BOOH) *C. albicans* cells. Gyetvai *et al.* [31] observed  
48  
49 similar SOD activities in untreated *C. albicans* cells. In general, the SOD activities reported  
50  
51 here agree with other studies.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Brown *et al.* [32] noted that *in vitro* experimental data on nitrosative and oxidative stress responses have to be interpreted with caution. Stress-resistance mechanisms other than scavenging of ROS by redox-reactive molecules may be used by *Candida* spp. This was proposed by Wellington *et al.* [33], who observed that *C. albicans* and *C. krusei* were highly effective in suppressing ROS production by phagocytes through a mechanism that was thought to be independent of ROS scavenging. Suppression of ROS production was less effective in *C. glabrata* and *C. tropicalis* than in other *Candida* spp.<sup>33,34</sup> This suggests that certain *Candida* sp. use additional mechanisms to subvert the toxic effects of phagocytes.

Haynes [35] posed some questions yet to be answered on the subject: “Why is *C. albicans* a more prevalent pathogen than other *Candida* species? Is it more widespread and the prevalence is just a reflection of this, or does *C. albicans* have a different repertoire of virulence determinants compared to other *Candida* species that allow it to be a *better* pathogen?” Our view is that species such as *C. albicans* and *C. glabrata* have a better repertoire of virulence determinants; and species with a stronger antioxidant capacity are better prepared to cause disseminated infections. If confirmed by *in vivo* studies, the questions posed by Haynes might be fully answered.

### Acknowledgement

The authors thank M.H. Vainstein, T.I.E. Svidzinsky, S.H. Alves, and the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS for kindly providing isolates.

## References

- 1 Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 67-78.
- 2 Sobel JD. Changing trends in the epidemiology of *Candida* blood stream infections: a matter for concern? *Crit Care Med* 2010; **38**: 990-2.
- 3 Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, López-Ribot JL, Kadosh D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 599-604.
- 4 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133-63.
- 5 Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1695-703.
- 6 Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal [beta]-glucans. *Cell Microbiol* 2005; **7**: 471-79.
- 7 Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**: 355-66.



- 1  
2  
3 8 Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond R. Cloning and sequencing of a  
4  
5 *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* 1998; **66**:  
6  
7 1953-61.  
8  
9  
10  
11 9 Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida*  
12  
13 *albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-increased  
14  
15 *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 456-67.  
16  
17  
18  
19 10 Butler G, Rasmussen MD, Lin MF *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction  
20  
21 in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009; **459**: 657-62.  
22  
23  
24  
25 11 Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Gonçalves-Rodrigues A, Ludovico P. *Candida krusei*  
26  
27 showed promoted resistance to oxidative stress. *15th European Congress on Clinical*  
28  
29 *Microbiology and Infectious Diseases* 2005; Abstract Number: 1135-204.  
30  
31  
32  
33 12 Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I *et al.* High resistance to  
34  
35 oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by the single catalase,  
36  
37 Cta1p, and controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p. *Eukaryot*  
38  
39 *Cell* 2008; **7**: 814–25.  
40  
41  
42  
43 13 Tosello ME, Biasoli MS, Luque AG, Magaró HM, Krapp AR. Oxidative stress response  
44  
45 involving induction of protective enzymes in *Candida dubliniensis*. *Med Mycol* 2007; **45**: 535-  
46  
47 40.  
48  
49  
50  
51 14 Abegg MA, Alabarse PVG, Casanova A *et al.* Response to oxidative stress in eight  
52  
53 pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia* 2010; published online 13  
54  
55 march. DOI 10.1007/s11046-010-9294-5  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 15 Lamarre C, Le May JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y. *Candida albicans* expresses an  
4 unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (*SOD3* gene product) upon  
5 the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43784-91.  
6  
7  
8  
9  
10  
11 16 Karatepe, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in  
12 human serum by HPLC-UV. *LC GC North America* 2004; **22**: 362-65.  
13  
14  
15 17 Levine RL, Garland D, Stadtman ER *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively  
16 modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 464-78.  
17  
18  
19 18 Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 121-26.  
20  
21  
22  
23 19 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
24 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.  
25  
26  
27 20 Sampaio P, Nogueira E, Loureiro AS, Delgado-Silva Y, Correia A, Pais C. Increased  
28 number of glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the  
29 resistance to stress agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; **96**: 395-404.  
30  
31  
32  
33 21 Walia A, Calderone R. The *SSK2* MAPKKK of *Candida albicans* is required for oxidant  
34 adaptation *in vitro*. *FEMS Yeast Res* 2008; **8**: 287-99.  
35  
36  
37  
38 22 Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in  
39 mitochondrial inner membranes I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med* 1996; **21**:  
40 917-43.  
41  
42  
43 23 Murayama SY, Negishi Y, Umeyama T *et al.* Construction and functional analysis of fatty  
44 acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* 2006; **152**: 1551-58.  
45  
46  
47  
48 24 Jamieson DJ, Stephen DWS, Terrière EC. Analysis of the adaptive oxidative stress response  
49 of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **138**: 83-8.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 25 González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defenses  
4 against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*.  
5  
6 *Yeast* 2003; **20**: 1161-69.  
7  
8  
9  
10  
11 26 Kusch H, Engelmann S, Albrecht D, Morschhäuser J, Hecker M. Proteomic analysis of the  
12 oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics* 2007; **7**: 686-97.  
13  
14  
15  
16  
17 27 Yang R, Mohan N, Muthukumar C, Thajuddin N, Gunasekaran M. Influence of cultural  
18 conditions on glutathione peroxidase synthesis in *Candida albicans*. *Asian J Biochem* 2009; **4**:  
19  
20 99-105.  
21  
22  
23  
24  
25 28 Gunasekaran U, Yang R, Gunasekaran M. Regulation of superoxide dismutase synthesis in  
26 *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1998; **141**: 59-63.  
27  
28  
29  
30  
31 29 Pedreño Y, González-Párraga P, Conesa S *et al.* The cellular resistance against oxidative  
32 stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is independent of neutral trehalase (Ntc1p) activity in *Candida albicans*. *FEMS*  
33  
34 *Yeast Res* 2006; **6**: 57-62.  
35  
36  
37  
38  
39 30 Fekete A, Emri T, Gyetvai A *et al.* Development of oxidative stress tolerance resulted in  
40 reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-  
41  
42 butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2007; **7**: 834-47.  
43  
44  
45  
46  
47 31 Gyetvai Á, Emri T, Fekete A *et al.* High-dose methylprednisolone influences the physiology  
48 and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the  
49  
50 polyene antibiotic amphotericin B an the superoxide-generating agent menadione. *FEMS Yeast*  
51  
52 *Res* 2007; **7**: 265-75.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 32 Brown AJP, Haynes K, Quinn J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal  
4 pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* 2009; **12**: 384–91.  
5  
6  
7

8  
9 33 Wellington M, Dolan K, Krysan DJ. Live *Candida albicans* suppresses production of  
10 reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* 2009; **77**: 405-13.  
11  
12

13  
14 34 MacCallum D. 9<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and candidiasis. *FEMS Yeast Res*  
15 Conference Report, 2008; <http://www.fems-microbiology.org>  
16  
17

18  
19  
20 35 Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 591-96.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

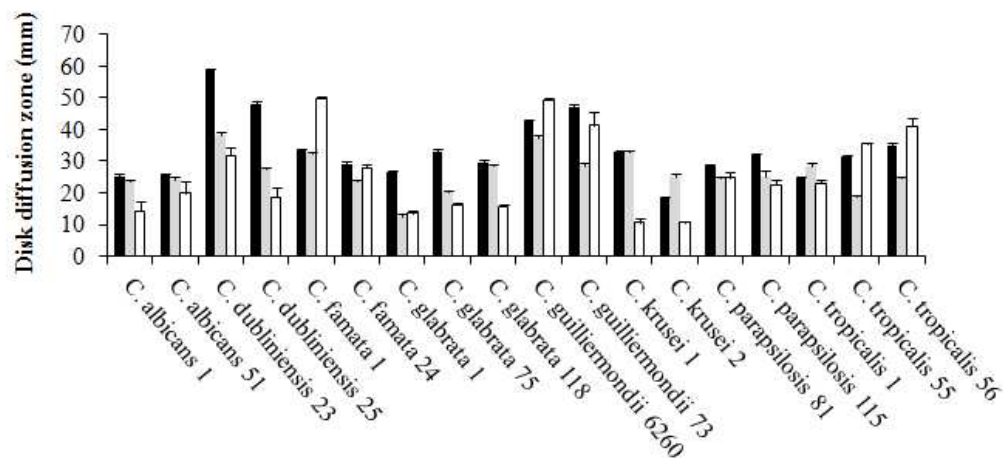


Figure 1. Results of disk diffusion assay. The diameters of the zones of inhibition of growth around filter disks on YPD agar were determined. The following quantities of oxidant solutions were used per disk: 5  $\mu$ l of 0.3 M menadione (black bars), of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (gray bars) and of 0.5 M paraquat (white bars). Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.  
137x62mm (120 x 120 DPI)

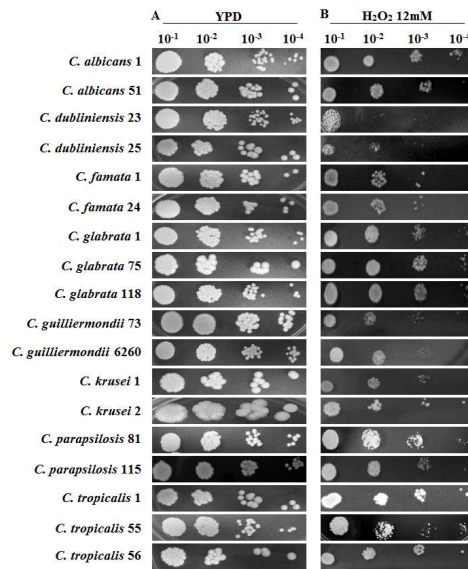


Figure 2. Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of *Candida* sp. clinical isolates during logarithmic growth. Mid-log phase cultures of *Candida* sp. were diluted to OD<sub>600</sub> nm = 0.15. A Dilutions up to 10<sup>-4</sup> in sterile water were spotted (5μL) onto YPD agar plates without oxidant or B onto YPD agar plates containing 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plates were incubated at 30°C for up to 72 h and photographed.  
311x206mm (120 x 120 DPI)

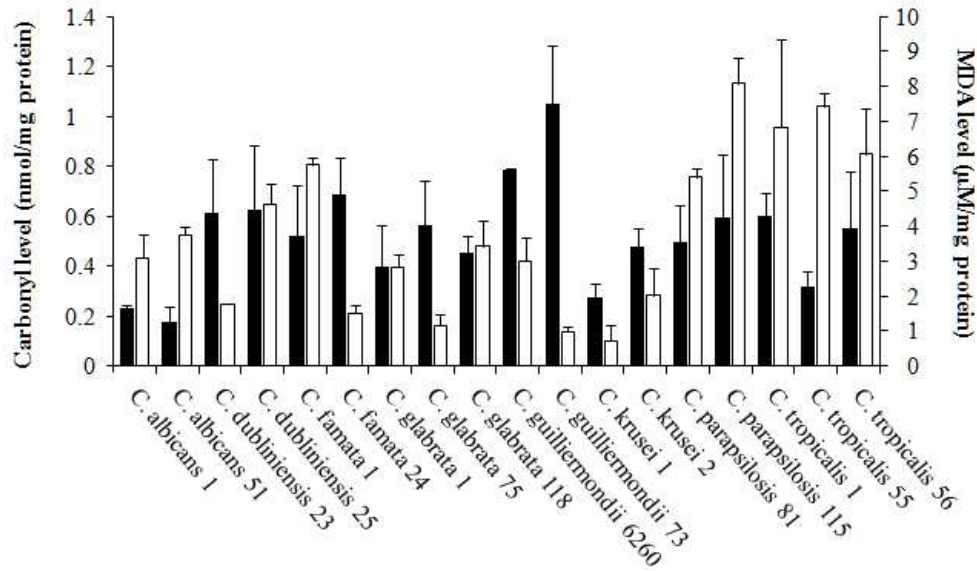


Figure 3. Lipid peroxidation and protein carbonylation in *Candida* sp. Cells in exponential phase were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h at 30 °C in YPD medium. MDA levels (white bars) were measured by HPLC and protein damage (black bars) was measured by carbonyl assay as described in Materials and methods. Data represent the mean ± S.D. of three independent experiments.

138x81mm (120 x 120 DPI)

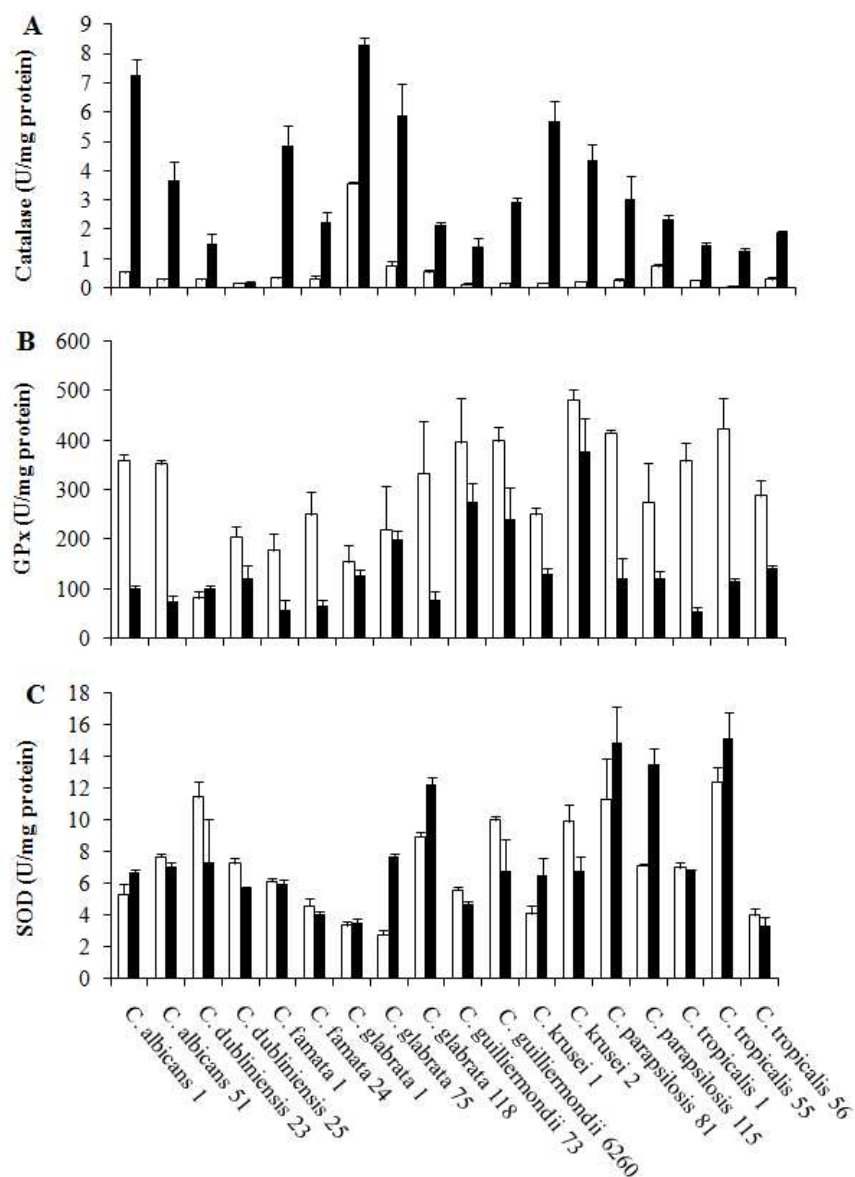


Figure 4. Activities of antioxidant enzymes in *Candida* extracts. Cultures of *Candida* spp. were grown aerobically at 30 °C in YPD medium at 100 rpm until exponential phase was reached. Cultures were then either exposed to 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (black bars) or left untreated (white bars), and then frozen at -80 °C. Cells were harvested and extracts were prepared and assayed as described in Materials and Methods. Values reported are the means ± S.D. of three independent determinations.

127x176mm (120 x 120 DPI)



### 3.3. Manuscrito

#### **Manuscrito submetido:**

ABEGG, M.A.; ALABARSE, P.V.G.; SCHÜLLER, A.K. & BENFATO, M.S. Glutathione levels and total antioxidant capacity in *Candida* sp. cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Mycoses*

1  
2  
3 Original article  
4  
5

6 **Glutathione levels and total antioxidant capacity in *Candida* sp. cells exposed to oxidative stress**  
7  
8 **caused by hydrogen peroxide**  
9  
10

11  
12  
13  
14  
15 **Short Title:** GSH and antioxidant capacity in *Candida* spp.  
16

17  
18 **Key words:** *Candida* spp., glutathione, total antioxidant capacity  
19  
20

21  
22  
23  
24  
25 Maxwel A. Abegg,<sup>1</sup> Paulo V.G. Alabarse,<sup>1</sup> Ártur K. Schüller,<sup>2</sup> Mara S. Benfato<sup>1,2</sup>  
26  
27

28  
29  
30  
31 <sup>1</sup>*Post-Graduate Programme in Cellular and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande*  
32 *do Sul, Porto Alegre, Brazil*, <sup>2</sup>*Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 *Correspondence:* Mara S. Benfato, DSc., Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande  
44 *do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves, 9500, building 43431, Porto Alegre, RS - 91501-970, Brazil.*  
45  
46  
47

48  
49 Tel.: +55 51 3308/7603. Fax: +55 51 3308/7003.  
50

51  
52 E-mail: mara.benfato@ufrgs.br  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Summary

The capacity to overcome oxidative stress imposed by phagocytes is thought to be critical to the ability of *Candida* species to cause invasive candidiasis. To better characterize the oxidative stress response (OSR) of eight clinically relevant *Candida* sp., we measured glutathione levels, which is a vital component of the intracellular redox balance, and measured the total antioxidant capacity (TAC) after mild oxidative challenge with hydrogen peroxide. Oxidative stress depleted total intracellular glutathione levels. This depletion was most pronounced in *C. albicans*, and the levels of glutathione in untreated cells were also higher in this species. TAC demonstrated intra-specific variation. Although glutathione is generally regarded as the most important non-enzymatic intracellular antioxidant molecule, glutathione levels did not correlate with the total antioxidant capacity measured. These results demonstrated that the measurement of TAC alone does not predict the ability of a given *Candida* sp. to respond to oxidative stress.

**Key words:** *Candida* spp., glutathione, total antioxidant capacity

## Introduction

*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* account for approximately 95% of identified *Candida* infections. Other species, including *C. krusei*, *C. lusitanae*, and *C. guilliermondii* account for less than 5% of invasive candidiasis. The most common causative agent is *C. albicans*, but the incidence of *C. albicans* infection is declining, and the frequency of infection by other species is increasing. Invasive candidiasis has a mortality rate approaching 40%.<sup>1,2</sup> Although most people are colonized with *Candida* spp., the majority never develop invasive candidiasis. Alterations in host immunity, physiology, or normal microflora rather than acquisition of novel or additional virulence factors associated with *Candida* are suggested to cause degeneration of the commensal-host interaction leading to opportunistic infection.<sup>3</sup>

During the course of a systemic infection, *Candida* cells are engulfed by host phagocytes, where they are exposed to reactive oxygen species (ROS).<sup>4</sup> ROS contribute to killing of *C. albicans* in both cultured cells and intact organisms.<sup>5-8</sup> Upon incubation with macrophages, *C. albicans* DNA repair genes are transcriptionally induced, suggesting that DNA damage occurs in the phagosome and that hypersensitivity to genotoxic stress would be disadvantageous to the pathogen.<sup>9</sup> Recently, it was demonstrated that a large proportion of *C. albicans* cell surface antigens known to be related to acute candidemia are involved in the oxidative stress response.<sup>3</sup> Taking into account these data, it would seem that overcoming the oxidative challenge posed by phagocytosis was critical for establishment of candidemia.

*Candida* species possess an antioxidant defensive response that encompasses, among other components, glutathione (GSH, L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) and GSH-related proteins (i.e. glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glucose-6P-dehydrogenase).<sup>10</sup> GSH is the most

1  
2  
3 abundant non-protein thiol in eukaryotic cells, and its very low redox potential ( $E'_{\circ} = -240$  mV) gives  
4  
5 the cell redox buffer properties. In budding yeasts, GSH and its oxidized disulfide form (GSSG) are  
6  
7 involved in essential physiological functions such as DNA and protein synthesis, transport, and cellular  
8  
9 detoxification.<sup>11</sup> Yeast isolates lacking glutathione or altered in their glutathione redox state are sensitive  
10  
11 to peroxide-induced oxidative stress, to superoxide anions, and to lipid peroxidation products.<sup>11-14</sup>  
12  
13  
14  
15

16 Although numerous assays for measuring antioxidant status have been described, there is no  
17  
18 ideal method.<sup>15</sup> Different antioxidants can be measured separately, but the measurements are time-  
19  
20 consuming, labor-intensive, costly, and often require complicated techniques.<sup>16,17</sup> Hence, the concept of  
21  
22 a single test that might reflect total antioxidant capacity (TAC) of biological fluids is of interest. The  
23  
24 most widely used colorimetric methods to measure TAC are based on the 2,2'-azinobis-(3-  
25  
26 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS<sup>\*+</sup>) assay. Reduced ABTS is a colorless  
27  
28 molecule, but when oxidized to the radical cation, ABTS<sup>\*+</sup>, it assumes a characteristic blue-green color.  
29  
30 When the ABTS<sup>\*+</sup> radical is mixed with an oxidizable substance, it is reduced to its colorless form.<sup>16</sup>  
31  
32  
33  
34  
35

36 Different *Candida* sp. exhibit unequal oxidative stress resistance *in vitro*,<sup>18-20</sup> and we have  
37  
38 proposed that this contributes to the capacity of each species to cause candidemia.<sup>20</sup> To better  
39  
40 characterize the oxidative stress response of eight clinically relevant *Candida* sp., we measured  
41  
42 glutathione levels and total antioxidant capacity after oxidative challenge with hydrogen peroxide.  
43  
44  
45  
46  
47  
48

## 49 **Materials and methods**

### 50 Yeast isolates and cultivation

1  
2  
3 The following collection of yeast isolates were used: *C. albicans* type strain ATCC 18804, *C.*  
4 *dubliniensis* type strain CBS 7987, *C. famata* ATCC 62894, *C. glabrata* type strain ATCC 2001, *C.*  
5 *guilliermondii* type strain ATCC 46036, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. krusei* type strain ATCC  
6 6258, *C. parapsilosis* type strain ATCC 22019 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The clinical isolates used  
7 were: *C. albicans* 1 (from a nosocomial patient), *C. albicans* 51 (from orotracheal tube of an AIDS  
8 patient), *C. dubliniensis* 23 and *C. dubliniensis* 25 (both from oropharynx of AIDS patients), *C. famata* 1  
9 and *C. famata* 24 (both from nosocomial patients), *C. glabrata* 1, *C. glabrata* 75, and *C. glabrata* 118  
10 (all obtained from catheter tips), *C. guilliermondii* 73 (from a nosocomial patient), *C. krusei* 1 and *C.*  
11 *krusei* 2 (both isolated from skin lesions of diabetic patients), *C. parapsilosis* 81 and *C. parapsilosis* 115  
12 (both isolated from patients with onychomycosis), *C. tropicalis* 1 (isolated from an oral granuloma), and  
13 *C. tropicalis* 55 and *C. tropicalis* 56 (both from nosocomial patients).  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 The isolates were identified and maintained as previously described.<sup>20</sup> Cultivation was on solid  
31 YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) to obtain viable cells, and isolates  
32 were then grown in liquid YPD medium on an orbital shaker (100 rpm, 30°C) until late exponential  
33 growth ( $OD_{600nm} = 1.5-1.6$ ) was reached. Cells were washed twice with sterile distilled water and diluted  
34 to  $OD_{600nm} = 0.15$  in fresh liquid YPD for use. Cells were grown at 30°C rather than at 37°C because *C.*  
35 *dubliniensis* and *C. famata* grow better at 30°C.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 Cell-free extracts

46  
47  
48 Cell suspensions (1.5 mL) were centrifuged 5 min at 8,000 g and lysed by adding 0.5 mL of lysis  
49 buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.2), 50 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride  
50 (PMSF, Sigma), and approximately 0.5 g glass beads (diameter 425-600  $\mu$ m, Sigma) and mixing on a  
51 *vortex* mixer for 3 cycles of 3 minutes with 1 min intervals of cooling on ice. Lysis was checked  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 microscopically. The samples were then centrifuged 10 min at 8,000 g to remove cellular debris and  
4  
5 beads.  
6

#### 7 8 9 Total glutathione assay

10  
11 Total intracellular glutathione was determined by the DTNB-GSSG reductase recycling  
12 method.<sup>21, 22</sup> Cell suspensions were either untreated or treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated for 1 h  
13 with agitation (100 rpm, 30°C), washed with sterile distilled water, resuspended to the original volume,  
14 lysed, and centrifuged. A 25 µL sample of the supernatant was *vortex* mixed thoroughly with an equal  
15 volume of 2 M HClO<sub>4</sub>, 4 mM EDTA. After 15 min incubation at 0°C, suspensions were centrifuged  
16 (8,000 g, 5 min, 0°C) and 45 µL of the supernatant was brought to neutral pH by the addition of 38 µL 2  
17 M KOH. This was centrifuged 1 min at 8,000 g and 35 µL of the supernatant was added to a mixture  
18 containing 174 µL 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 17 µL 4 mM NADPH and 7 µL glutathione  
19 reductase solution (6 U/mL). This was mixed and incubated 5 min at 37°C. Then, 18 µL of DTNB  
20 reagent (0.040 g 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (Sigma) dissolved in 10 ml 50 mM potassium  
21 phosphate buffer, pH 7.0) was added and the absorbance was read at 412 nm after 2 min incubation at  
22 37°C.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 Total antioxidant capacity

42  
43  
44 A modified method based on ABTS\*<sup>+</sup> decolorization described by Erel [16] was employed. Cell  
45 suspensions were treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, washed, lysed, and centrifuged as previously described,  
46 and 5 µL of each supernatant was mixed with 200 µL 0.4 M acetate buffer, pH 5.8. Then 20 µL of  
47 ABTS\*<sup>+</sup> in 30 mM acetate buffer, pH 3.6 was added and mixed. Absorbance was read after 5 min, and  
48 compared with a reagent blank without ABTS\*<sup>+</sup>. Vitamin E water-soluble analogue (6-hydroxy-2,5,7,8-  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)) was used as a standard and data were expressed in  
4  
5 mmol Trolox equivalent/mg of protein.  
6  
7

8  
9 Total protein content

10  
11  
12 Total protein content in lysed cells was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA).  
13  
14

15 Statistics

16  
17  
18 Statistical analysis was performed using PASW software v. 18.0 (SPSS, Chicago, IL). One-way  
19 ANOVA was performed followed by Tukey *post-hoc* test to compare differences among groups.  
20  
21

22 Student's *t*-test was used to compare treated against untreated samples. Correlations were determined by  
23 Spearman rank correlation coefficient ( $\rho$ ). Some statistical values were omitted from the figures to  
24 facilitate visualization.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 34 **Results and discussion**

35  
36  
37 *C. albicans* virulence appears to be multifactorial,<sup>23</sup> but the ability of this fungus to mount a  
38 stress response is one important aspect because this response promotes survival in the host during  
39 systemic infection.<sup>24</sup> According to Ng *et al.* [25] the network of enzymes that detoxify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in  
40 biological systems has at least three nodes. The most well know of these is catalase, which requires no  
41 cofactors. In addition, there are six members of the peroxiredoxin family of enzymes. Finally, there are  
42 the glutathione peroxidases, which rely on GSH as the electron donor and specific cofactor. We  
43 previously characterized the response to oxidative stress in eight clinically relevant *Candida* species.<sup>20</sup>  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52 In the current study, we continued this effort by measuring the levels of total intracellular GSH  
53  
54  
55  
56 following mild oxidative stress in *Candida* sp.  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 GSH levels in untreated samples ranged from 80-290 nmol/mg of protein, and in samples treated  
4 with hydrogen peroxide GSH levels ranged from 21-83 nmol/mg of protein (Figure 1). Fekete *et al.* [26]  
5  
6 observed similar GSH levels (90-152) in untreated *C. albicans* isolates. With the exception of *C.*  
7  
8 *tropicalis*, all species tested exhibited a significant reduction in total GSH levels after exposure to mild  
9  
10 oxidative stress (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *C. albicans* presented the most dramatic reduction. In untreated  
11  
12 samples, *C. albicans* exhibited the highest GSH levels, and those levels were significantly higher than  
13  
14 levels in untreated *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis* ( $p <$   
15  
16 0.05) (Figure 1).  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 Similarly, Lemar *et al.* [27] showed that exposure of *C. albicans* for 30 min to 0.5 mM diallyl  
24  
25 disulfide (a garlic oxidative constituent) decreased intracellular GSH and elevated intracellular ROS  
26  
27 levels. It was also demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure caused a reduction in intracellular GSH levels,  
28  
29 particularly in *S. cerevisiae* and caused a shift in the GSH redox balance towards the oxidized form,  
30  
31 GSSG (reviewed in Penninckx [11]). Thomas *et al.* [28] have reported a dramatic decline in the level of  
32  
33 intracellular GSH concomitant with yeast-mycelial conversion in *C. albicans*. Accordingly, Michán and  
34  
35 Pueyo [29] reported that GSH levels in *C. albicans* hyphae were approximately 50% of the levels in  
36  
37 yeasts. Considering that the yeast to hyphae transition imposes oxidative stress,<sup>29,30</sup> and this transition  
38  
39 diminishes GSH levels, our treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was expected to reduce the GSH content. Pacheco *et al.*  
40  
41 [22] demonstrated that cadmium treatment increased ROS production, depleted intracellular GSH, and  
42  
43 raised the external GSH concentration. Also, González-Párraga *et al.* [10] used the oxidant, 1-chloro-  
44  
45 2,4-dinitrobenzene, to reduce intracellular GSH levels in *Candida*. Madeo *et al.* [31] also demonstrated  
46  
47 that treatment with 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced intracellular GSH depletion and apoptosis in *S. cerevisiae*.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 In contrast, Fekete *et al.* [32] found GSH levels of around 160 nmol/mg protein in untreated *C.*  
56  
57 *albicans* isolates and around 260 nmol/mg protein after 1 mM tert-butyl-hydroperoxide treatment. Lee *et*  
58  
59  
60

1  
2  
3 *al.* [33] found that a 6 h treatment with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoked a 3.14-fold increase in GSH levels in  
4  
5 *Schizosaccharomyces pombe*. Manfredini *et al.* [34] reported an increase in GSH levels in wild type *S.*  
6  
7 *cerevisiae* cells treated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and a significant reduction in those levels in cells treated with  
8  
9 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. With respect to our results, these differences may be related to the duration of the  
10  
11 treatment, to the use of different oxidants, to lower doses of hydrogen peroxide, or to differences in  
12  
13 metabolism of the species studied. In the case of *S. cerevisiae*, the high sensitivity of this species to 0.5  
14  
15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in comparison to *Candida* sp may be responsible for the different findings. Treatment with  
16  
17 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces 40% lethality for *S. cerevisiae*, but is normally sublethal (95-100% viability) for  
18  
19 *Candida* sp.<sup>20,35</sup>

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
GSH occurs in multiple forms in yeasts, for example, as the reduced GSH form, as the oxidized form GS-SG, and as different mixed disulfides such as GS-S-CoA and GS-S-Cys.<sup>11</sup> The treatment used to induce oxidative stress (0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h) was probably detoxified in part through the action of the enzyme glutathione-peroxidase (GPx) and the concomitant conversion of GSH into GSSG.<sup>25</sup> The increase in GSSG levels would potentially inhibit protein synthesis in animal and plant cells,<sup>36,37</sup> and because of this, *Candida* cells would probably export GSSG during oxidative stress, which would reduce total intracellular glutathione levels.

In yeasts, peroxide resistance has been associated with intracellular levels of GSH.<sup>38-40</sup> Also, it was previously proposed that the rate of removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a direct function of GPx activity on GSH.<sup>25</sup> The highest levels of GSH and the intense diminution of its intracellular levels in *C. albicans* (Figure 1), together with the GPx activities found for this species in previous observations<sup>20</sup> (and Abegg *et al.* unpublished results), may indicate a more efficient detoxification system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through GPx/GSH in *C. albicans* in comparison with other *Candida* sp. However, limitations of the GSH results should be

1  
2  
3 noted because only one isolate of each species was used. More comparisons in additional isolates  
4  
5  
6 regarding GSH metabolism should be made.  
7

8  
9 The TAC results varied among the tested isolates from the different species (Figure 2). This  
10  
11 intra-specific variation is in agreement with variations in the sensitivity to oxidants found in *C. albicans*  
12  
13 isolates.<sup>41</sup> However, the TAC results did not correlate ( $\rho = 0.051$ ) with the sensitivity to oxidative  
14  
15 stress previously reported for *Candida* sp. isolates<sup>20</sup> (and Abegg *et al.* unpublished results). One *C.*  
16  
17 *albicans* isolate (51), two *C. guilliermondii* isolates (6260 and 73), and one *C. krusei* isolate (6258)  
18  
19 presented the highest TAC levels. With the exception that isolate *C. guilliermondii* 73 was not  
20  
21 significantly different from *C. tropicalis* 55, TAC levels in the isolates *C. albicans* 51, *C. guilliermondii*  
22  
23 6260 and 73 and *C. krusei* 6258 were significantly different in comparison to all other isolates tested ( $p$   
24  
25  $< 0.05$ ).  
26  
27  
28  
29  
30

31 This was the first reported attempt to use a single test of TAC in *Candida*. The use of a single  
32  
33 marker of antioxidant capacity has drawbacks, and these data must be interpreted with caution.  
34  
35 According to Young [15], these single markers measure predominantly low molecular weight and chain  
36  
37 breaking antioxidants, and exclude antioxidant enzymatic contributions and metal binding proteins. The  
38  
39 fact that the TAC results did not correlate with the sensitivity of *Candida* sp. isolates to oxidative stress  
40  
41 reported previously<sup>20</sup> (and Abegg *et al.* unpublished results) and did not correlate with total intracellular  
42  
43 GSH levels in either untreated samples ( $\rho = 0.042$ ) or in treated samples ( $\rho = 0.058$ ) suggests that a  
44  
45 single marker is not sufficient to assess the antioxidant capacity of a *Candida* sp.  
46  
47  
48  
49  
50

51 Fekete *et al.* [26] searched for *C. albicans* isolates that were naturally resistant to oxidative  
52  
53 stress, but did not found this phenotype. These authors argued that *in vivo* selection of oxidative stress-  
54  
55 tolerant mutants would be beneficial to the pathogen-phagocyte interaction, but would be unlikely to  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 occur because of the concomitant disadvantageous changes in virulence attributes, such as  
4  
5 morphological transitions and phospholipase secretion. They also pointed out that an over-efficient  
6  
7 antioxidant defense system might also be disadvantageous for *C. albicans* by hindering the ROS-  
8  
9 triggered activation of genomic aging and cell death programs that promote adaptation to stress in the  
10  
11 human body. In addition to the (unlikely) selection of *C. albicans* natural oxidant resistant mutants, it is  
12  
13 probable that species such as *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, and *C. famata* will be evolutionarily  
14  
15 unprepared to cope with the first line of immune defense and oxidative stress even in moderately  
16  
17 immunocompromised individuals. This is reflected in the relatively rare incidence of these species as  
18  
19 causal agents of invasive candidiasis.  
20  
21  
22  
23

24  
25       Macrophages and neutrophils use ROS, reactive nitrogen species (RNS), and chlorine species as  
26  
27 host protection,<sup>5-8,42</sup> but the idea that ROS exert direct killing of *Candida* sp and other fungi *in vivo* is  
28  
29 controversial. Balish *et al.* [43] studied susceptibility of ROS- and RNS-deficient mice to  
30  
31 gastrointestinal *Candida* inoculation. Although the mice died, it was an exaggerated immune response  
32  
33 rather than an overwhelming fungal infection that appeared to cause death. Also, in an *in vitro* study,  
34  
35 phagocytes from normal and ROS/RNS-deficient mice were equally able to kill *C. albicans*. Wellington  
36  
37 *et al.* [44] considered these data to be in agreement with their results that showed suppression by *C.*  
38  
39 *albicans* of ROS production in phagocytes. However, it is clear that *Candida* species have distinct  
40  
41 capacities to deal with oxidative stress, and inhibition of specific antioxidant molecules may be useful  
42  
43 therapeutically in the future.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 **Acknowledgment** The authors thank M. H. Vainstein, T. I. E. Svidzinsky, S. H. Alves, and the  
54  
55 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS for kindly providing isolates.  
56  
57  
58  
59  
60

## References

- 1 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133-63.
- 2 Sobel JD. Changing trends in the epidemiology of *Candida* blood stream infections: A matter for concern? *Critical Care Medicine* 2010; **38**: 990-2.
- 3 Mochon AB, Ye J, Kayala MA, et al. Serological Profiling of a *Candida albicans* Protein Microarray Reveals Permanent Host-Pathogen Interplay and Stage-Specific Responses during Candidemia. *Plos Pathog* 2010; **6**: 1-14.
- 4 Vazquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 170-92.
- 5 Thompson HL, Wilton JMA. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leukocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol* 1992; **87**: 316-21.
- 6 Steinhagen A, Vanfurth R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 170-5.
- 7 Donini M, Zenaro E, Tamassia N, Dusi S. NADPH oxidase of human dendritic cells: Role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 1194-203.
- 8 Aratani Y, Kura F, Watanabe H, et al. Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1833-7.
- 9 Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 1076-87.

- 1  
2  
3 10 Gonzalez-Parraga P, Marin FR, Arguelles JC, Hernandez JA. Correlation between the  
4 intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in  
5  
6  
7  
8 *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1722**: 324-30.  
9
- 10 11 Penninckx MJ. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts.  
12  
13 *FEMS Yeast Res* 2002; **2**: 295-305.  
14
- 15 12 Carmel-Harel O, Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems  
16  
17 in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol*  
18  
19 2000; **54**: 439-61.  
20
- 21 22 Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and  
23  
24 response to stress conditions. *Mol Microbiol* 2001; **39**: 533-41.  
25
- 26 27 Belozerskaya TA, Gessler NN. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense  
28  
29 in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2007; **43**: 506-15.  
30
- 31 32 Young IS. Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol* 2001; **54**: 339-  
33
- 34 35 Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new  
36  
37 generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 2004; **37**: 277-85.  
38
- 39 40 Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*  
41  
42 2005; **38**: 1103-11.  
43
- 44 45 Tosello ME, Biasoli MS, Luque AG, Magaro HM, Krapp AR. Oxidative stress response  
46  
47 involving induction of protective enzymes in *Candida dubliniensis*. *Med Mycol* 2007; **45**: 535-40.  
48
- 49 50 Cellar-Cruz M, Briones-Martin-Del-Campo M, Canas-Villamar I, et al. High resistance to  
51  
52 oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is  
53  
54 controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 2008; **7**: 814-  
55  
56 25.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 20 Abegg MA, Alabarse PVG, Casanova A, et al. Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic  
4 Yeast Species of the Genus *Candida*. *Mycopathologia* 2010; **170**: 11-20.  
5  
6  
7  
8 21 Akerboom T, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed  
9 disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; **77**: 373-82.  
10  
11  
12 22 Pacheco CC, Passos JF, Castro AR, Moradas-Ferreira P, De Marco P. Role of respiration and  
13 glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* 2008; **189**:  
14 271-8.  
15  
16  
17  
18  
19 23 Chauhan N, Inglis D, Roman E, et al. *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates  
20 a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative  
21 stress. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 1018-24.  
22  
23  
24  
25 24 d'Enfert C, Hube B, eds. *Candida: comparative and functional genomics.*: Caister Academic  
26 Press, 2007.  
27  
28  
29  
30  
31 25 Ng CF, Schafer FQ, Buettner GR, Rodgers VGJ. The rate of cellular hydrogen peroxide removal  
32 shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GPx concentrations. *Free*  
33 *Radic Res* 2007; **41**: 1201-11.  
34  
35  
36  
37  
38 26 Fekete A, Poci I, Emri T, et al. Physiological and morphological characterization of tert-  
39 butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J Basic Microbiol* 2008; **48**: 480-7.  
40  
41  
42  
43 27 Lemar KM, Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B, Muller CT, Lloyd D. Diallyl disulphide depletes  
44 glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon  
45 microscopy. *Yeast* 2007; **24**: 695-706.  
46  
47  
48  
49 28 Thomas D, Klein K, Manavathu E, Dimmock JR, Mutus B. Glutathione levels during thermal  
50 induction of the yeast-to-mycelial transition in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; **77**: 331-4.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 29 Michan C, Pueyo C. Growth phase-dependent variations in transcript profiles for thioredoxin-  
4 and glutathione-dependent redox systems followed by budding and hyphal *Candida albicans* cultures.  
5  
6  
7  
8 *FEMS Yeast Res* 2009; **9**: 1078-90.
- 9  
10 30 Schroter C, Hipler UC, Wilmer A, Kunkel W, Wollina U. Generation of reactive oxygen species  
11 by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Arch Dermatol Res* 2000; **292**: 260-4.
- 12  
13  
14 31 Madeo F, Frohlich E, Ligr M, et al. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol*  
15  
16  
17 1999; **145**: 757-67.
- 18  
19  
20 32 Fekete A, Emri T, Gyetvai A, et al. Development of oxidative stress tolerance resulted in  
21 reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-  
22  
23  
24 butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2007; **7**: 834-47.
- 25  
26  
27 33 Lee YY, Kim SJ, Park EH, Lim CJ. Glutathione content and the activities of glutathione-  
28 synthesizing enzymes in fission yeast are modulated by oxidative stress. *J Microbiol* 2003; **41**: 248-51.
- 29  
30  
31 34 Manfredini V, Roehrs R, Peralba MCR, et al. Glutathione peroxidase induction protects  
32  
33  
34 *Saccharomyces cerevisiae* sod1 Delta sod2 Delta double mutants against oxidative damage. *Braz J Med*  
35  
36  
37 *Biol Res* 2004; **37**: 159-65.
- 38  
39 35 Gonzalez-Parraga P, Sanchez-Fresneda R, Martinez-Esparza M, Arguelles JC. Stress responses  
40 in yeasts: what rules apply? *Arch Microbiol* 2008; **189**: 293-6.
- 41  
42  
43 36 Dhindsa RS. Glutathione status and protein-synthesis during drought and subsequent rehydration  
44 in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol* 1987; **83**: 816-9.
- 45  
46  
47 37 Schuppekoistinen I, Gerdes R, Moldeus P, Cotgreave IA. Studies on the reversibility of protein  
48 S-thiolation in human endothelial-cells. *Arch Biochem Biophys* 1994; **315**: 226-34.
- 49  
50  
51 38 Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress-response in yeast - effect of glutathione on  
52  
53  
54 adaptation to hydrogen-peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1995; **368**: 73-6.
- 55  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 39 Kobayashi S, Miyabe S, Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Correlation of the OSR/ZRCI gene  
4 product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem*  
5  
6 1996; **23**: 3-6.  
7  
8  
9  
10 40 Grant CM, Perrone G, Dawes IW. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for  
11 protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res*  
12  
13 *Commun* 1998; **253**: 893-8.  
14  
15  
16  
17 41 Sampaio P, Nogueira E, Loureiro AS, Delgado-Silva Y, Correia A, Pais C. Increased number of  
18 glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the resistance to stress agents.  
19  
20 *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; **96**: 395-404.  
21  
22  
23  
24 42 Missall TA, Lodge JK, McEwen JE. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative  
25 stress: Implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 835-46.  
26  
27  
28  
29 43 Balish E, Warner TF, Nicholas PJ, Paulling EE, Westwater C, Schofield DA. Susceptibility of  
30 germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice defective in the production of  
31 reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous  
32 origin. *Infect Immun* 2005; **73**: 1313-20.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 44 Wellington M, Dolan K, Krysan DJ. Live *Candida albicans* Suppresses Production of Reactive  
40 Oxygen Species in Phagocytes. *Infect Immun* 2009; **77**: 405-13.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

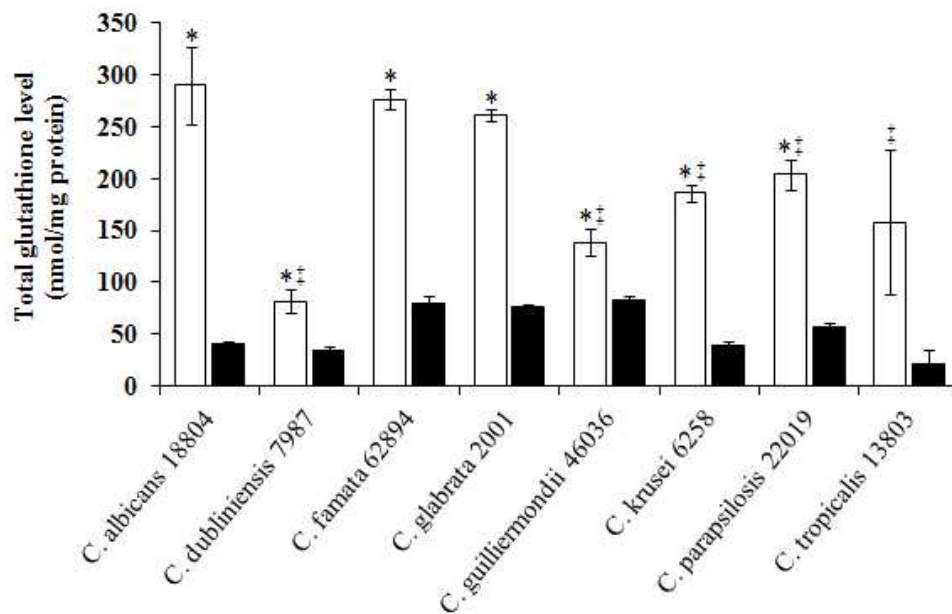


Figure 1. Effect of 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on total intracellular glutathione concentration (nmol GSH + 2GSSG mg<sup>-1</sup> protein) in *Candida* sp. Cells were treated (black bars) or were untreated (white bars) as described in Materials and methods. \*significant difference ( $p < 0.01$ ) between untreated and treated sample. #significantly different ( $p < 0.01$ ) from untreated *C. albicans*. Data show mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.  
125x80mm (120 x 120 DPI)

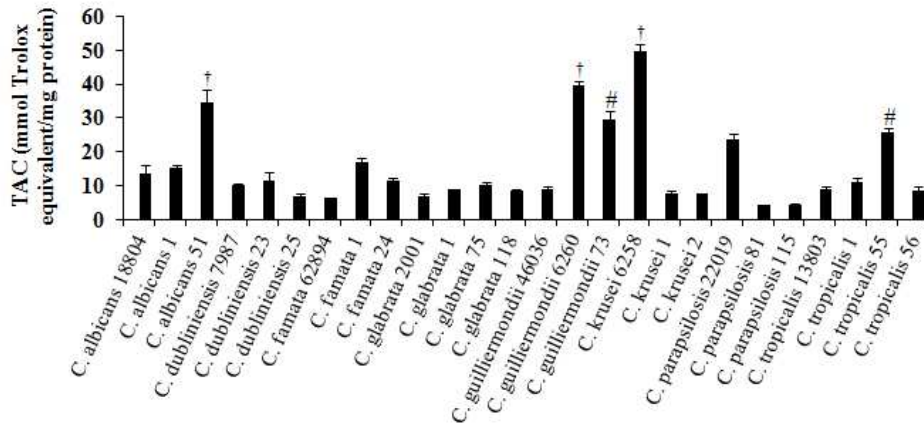


Figure 2. Total antioxidant capacity in *Candida* sp. cells after 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Cells were treated as described in Materials and Methods. †significant difference among each isolate and all other isolates tested ( $p < 0.05$ ). #no significant difference between *C. guilliermondii* 73 and *C. tropicalis* 55, but significant differences ( $p < 0.05$ ) between *C. guilliermondii* 73 and all other isolates tested. Data show mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.  
149x73mm (120 x 120 DPI)

### 3.4. Artigo Científico

#### **Artigo Científico publicado:**

ABEGG, M.A.; LUCIETTO, R.; ALABARSE, P.V.G.; MENDES, M.F.A. & BENFATO, M.S.  
Differential resistance to oxidants and production of hydrolytic enzymes in *Candida albicans*.  
Mycopathologia, DOI 10.1007/s11046-010-9346-x

# Differential Resistance to Oxidants and Production of Hydrolytic Enzymes in *Candida albicans*

Maxwel A. Abegg · Rodrigo Lucietto ·  
Paulo V. G. Alabarse · Marcus F. A. Mendes ·  
Mara Silveira Benfato

Received: 25 August 2009 / Accepted: 6 July 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Resistance to the toxic effects of reactive oxygen species produced by phagocytes and production of hydrolytic enzymes are important aspects of *Candida albicans* virulence. In this report, we compared twelve *C. albicans* isolates for their in vitro capacity to resist oxidants—hydrogen peroxide, menadione and paraquat; and to produce hydrolytic enzymes—phospholipase and protease. Different *C. albicans* isolates showed different degrees of resistance to oxidants as well as differences in production of hydrolytic enzymes. Resistance to oxidative stress did not correlate with production of hydrolytic enzymes. This reinforces the view that *C. albicans* differentially regulates the expression of virulence factors in response to local environmental conditions.

**Keywords** *Candida* · Oxidative stress · Protease · Phospholipase

## Introduction

*Candida albicans* is normally a harmless commensal fungus of mucosal surfaces but can cause several types of infections in predisposed patients, ranging from superficial to life-threatening disease [1]. In the United States, candidiasis is the fourth most common fatal infection and the fourth leading cause of nosocomial bloodstream infection [2]. The mortality rate can be as high as 30–40% [3].

The ability of the fungus to become pathogenic is determined primarily by the immune status of the host [4]. In addition, *C. albicans* has three major mechanisms of its own that mediate pathogenicity and invasiveness: (i) escape from host immune responses, (ii) morphogenic change from the yeast form to the hyphal form, which increases adherence and ability to invade host cells, and (iii) host cell invasion, which is supported by factors associated with hyphae including adhesion molecules, invasion-like molecules, and secreted hydrolytic enzymes [5]. Proteolytic enzyme production is also found in vitro in most isolates of other pathogenic *Candida* sp., including *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* [6].

The three most significant extracellular hydrolytic enzymes produced by *C. albicans* are the secreted

---

M. A. Abegg · R. Lucietto  
Universidade Paranaense, UNIPAR, Toledo, PR, Brazil

M. A. Abegg · P. V. G. Alabarse · M. S. Benfato  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Molecular, PPGBCM, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

M. F. A. Mendes · M. S. Benfato  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,  
Porto Alegre, RS, Brazil

M. S. Benfato (✉)  
Departamento de Biofísica, IBIO, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves  
9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil  
e-mail: 00006614@ufrgs.br

aspartyl proteases (Sap), phospholipase B enzymes, and lipases [7]. The hydrolytic enzymes produced by *C. albicans* fulfill a number of possible functions in addition to the simple role of digesting molecules for nutrient acquisition, as in the case of saprophytic microorganisms. Secreted hydrolases have direct virulence properties and contribute to host tissue invasion by digesting or distorting host cell membranes, degrading host surface molecules to enhance adhesion and digesting cells and molecules of the host immune system to avoid or resist antimicrobial attack [8–10].

During systemic infection, *C. albicans* cells are engulfed by phagocytes and sequestered in phagosomes where they are exposed to fungicidal molecules that can be classified as oxidative (e.g., hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), and oxygen- and nitrogen-derived oxidants) and non-oxidative (e.g., anti-fungal peptides and enzymes) [11]. The presence of reactive oxygen species (ROS) generated through the action of phagocyte NADPH oxidase has been shown to reduce fungal dissemination and to protect mice against *C. albicans* [12].

In response to the entire set of tools that phagocytes use to promote intracellular killing, fungi have evolved a number of escape mechanisms, e.g., synthesis and activation of protective enzymes and/or molecules [11]. The analysis of stress regulatory mutants has reinforced the view that robust ROS and reactive nitrogen species (RNS) responses contribute to fungal pathogenicity. Furthermore, inactivation of ROS detoxification enzymes such as superoxide dismutases and catalase has been shown to attenuate virulence in *C. albicans* [13].

To understand pathogenesis, it is important to know how the pathogen regulates the production of different virulence factors [14]. In this work, we compared the resistance of *C. albicans* isolates to oxidants and assessed the relationship between the degree of resistance to oxidants and production of phospholipase and protease.

## Materials and Methods

### Fungal Isolates

Ten clinical isolates (1, 21, 25, 33, 51, 67, 81, 101, 441, and 771) and two *C. albicans* reference isolates (ATCC 18804 and ATCC 10231) were used. ATCC 18804 was

isolated from a human skin lesion in Uruguay; it is avirulent in CFW1 mice and Sprague–Dawley rats. ATCC 10231 was isolated from a man with bronchomycosis, and it is also an avirulent strain in these infection models [15]. Based on previously published studies, these two ATCC isolates were used as controls [16–19]. The clinical isolates were isolated from candidemia cases, with the exception of isolate 1, which was isolated from an orotracheal tube of a HIV-positive patient. Stock cultures were maintained on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) agar medium (0.5% yeast extract, 1% peptone, and 2% glucose) at 4°C.

### Protease Production

Protease production was tested on agar plates containing bovine serum albumin (BSA). Sixty milliliters of a solution containing 0.04 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 0.2 g of dry yeast extract, 4 g of glucose, and 0.5 BSA (Fraction V) at pH 3.5 was prepared [8]. The solution was sterilized by filtration and mixed with 140 mL of molten agar. Each isolate was inoculated in triplicate, and the plates were incubated at 35°C for 7 days. Indices of protease and phospholipase activities were calculated according to Cassone et al. [20] as the diameter of the colony divided by the diameter of colony plus the precipitation zone (Pz).

### Phospholipase Production

Phospholipase production was verified using the egg yolk agar plate method [8]. The test medium consisted of Sabouraud agar containing 1 M sodium chloride, 0.005 M calcium chloride, and 2% egg yolk. Each isolate was inoculated in triplicate. Petri dishes were incubated at 35°C, and the diameters of the colonies and colonies plus precipitation zone were measured after 7 days of incubation.

### Susceptibility Assays

#### *Disc Diffusion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat, and Menadione*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was selected for use in this study because it is normally generated by activated phagocytes engaged in phagocytosis [21]. Menadione is a cytotoxic quinone, which generates superoxide through autooxidation and

subsequently generates  $H_2O_2$  as a metabolic product. It also displays some unique properties not shared with  $H_2O_2$  (cell death induction through modification of protein-SH and glutathione by oxidation or arylation, or through alteration of cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis) [22]. Paraquat was used to generate superoxide through its capacity to be reduced by NADPH and to generate superoxide radicals. Microorganisms have been reported to display differential sensitivities to paraquat versus  $H_2O_2$  [23].

Filter paper discs (5 mm diameter) were impregnated with 5  $\mu$ l of 30%  $H_2O_2$  (Merck), 0.5 M paraquat (Merck), or 0.3 M menadione (Sigma) [24]. Cells in stationary growth were diluted to a standard  $OD_{600} = 0.5$ . In sequence, these cells were used to impregnate sterile swabs, the excess material was removed, and the swab material inoculated on the surface of Petri dishes (10 cm) containing YPD agar. Impregnated discs were placed on the inoculated plates, which were incubated at 35°C for up to 72 h. Following incubation, halos of inhibition of growth were measured with a micrometer. The test was performed four times.

### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Spot Test*

Suspensions of cells were standardized to an  $OD_{600} = 0.5$  [25]. This suspension was serially diluted to  $10^{-4}$  in sterile distilled water. Samples of each dilution (5  $\mu$ l) were then inoculated onto a YPD agar plate containing 8.5 mM  $H_2O_2$ . Inoculated plates were incubated at 35°C for 72 h. The plates were photographed. Each test was performed in triplicate.

### *Statistics*

Statistical analysis was performed using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Variables between groups were compared by one-way ANOVA and *post hoc* test of Tukey. Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was used to determine correlations. Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results and Discussion**

Production of hydrolytic enzymes by *C. albicans* isolates was evaluated by validated plate methods

[26–28]. All isolates produced phospholipase (Table 1), which is consistent with previous studies [8, 27–29]. Kantarcioglu & Yucel reported that 93.3% of *C. albicans* isolates produced phospholipase [8], and Gokce et al. [29] reported 60.3%. We found that 83.3% of isolates produced protease (Table 1), which is in agreement with 89.7% reported by Gokce et al. [29] and 95% reported by Kantarcioglu & Yucel [8]. Faria et al. [17] found a protease  $Pz = 0.36$  for ATCC 18804 compared to  $Pz = 0.34$  found in this study, and a lower phospholipase activity,  $Pz = 0.60$  compared to  $Pz = 0.47$ , found in this study. Kumar et al. [16] found a phospholipase  $Pz \leq 0.69$  for ATCC 10231 compared to a  $Pz = 0.45$  found in this study, and a protease  $Pz$  in the range 0.70–0.79 compared to a lower value ( $Pz = 0.33$ ) found in this study. Isolates 21 and 25 failed in produce protease (Table 1). This has been observed previously in other *C. albicans* isolates [29].

There was a positive correlation between phospholipase and protease production ( $\rho = 0.496$ ). Naglik et al. [30], analyzing the *in vivo* expression of *C. albicans* secreted aspartyl protease (*SAP1–SAP8*) and phospholipase B (*PLB1* and *PLB2*) genes, found similar correlations in oral infection isolates. As well, it was previously demonstrated that low phospholipase production correlates with reduced pathogenicity in an animal model [31].

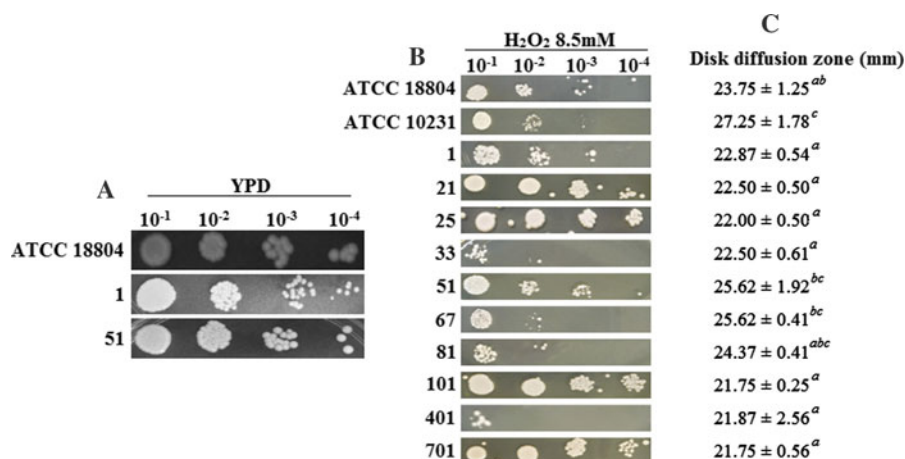
*C. albicans* pathogenicity has been associated, in part, with the degree of resistance to oxidants generated by phagocytes [32]. This resistance is promoted by antioxidant enzymes and molecules [33, 34]. Disc diffusion tests are employed to estimate the degree of sensitivity to oxidants [35]. The spot test is a qualitative test that also allows visual evaluation of differential sensitivity to oxidants [36]. Figure 1 shows the differences in the degree of resistance of the various isolates to  $H_2O_2$ . Isolates 21, 25, 101, and 771 were particularly resistant to  $H_2O_2$  (Fig. 1). Resistance to menadione and paraquat is shown in Table 1. Isolates 25 and 771 were significantly more resistant to menadione, but not to paraquat, in comparison with control ATCC strains. Paraquat generated less variation in the strains disc diffusion zones (Table 1).

Disc diffusion results with  $H_2O_2$  correlated with menadione results ( $\rho = 0.716$ ) and correlated negatively with paraquat results ( $\rho = -0.791$ ). This was not expected, because menadione and paraquat are

**Table 1** Susceptibility of *C. albicans* to paraquat and menadione; and production of phospholipase and protease

<i>C. albicans</i> isolates	Paraquat mm $\pm$ SD	Menadione mm $\pm$ SD	Phospholipase Pz $\pm$ SD	Protease Pz $\pm$ SD
ATCC 18804	18.50 $\pm$ 0.41	20.25 $\pm$ 1.47	0.466 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.335 $\pm$ 0.015 <sup>b,e,f</sup>
ATCC 10231	21.22 $\pm$ 0.83	20.75 $\pm$ 1.67	0.450 $\pm$ 0.011 <sup>a,b</sup>	0.330 $\pm$ 0.010 <sup>b,e,f</sup>
1	20.62 $\pm$ 0.54	25.37 $\pm$ 1.58	0.460 $\pm$ 0.020 <sup>a,b</sup>	0.370 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
21	22.62 $\pm$ 1.03	17.62 $\pm$ 0.56	0.456 $\pm$ 0.020 <sup>a,b</sup>	1.000 $\pm$ 0.000 <sup>c</sup>
25	26.75 $\pm$ 0.35	13.62 $\pm$ 1.02	0.480 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	1.000 $\pm$ 0.000 <sup>c</sup>
33	24.00 $\pm$ 0.87	13.37 $\pm$ 1.14	0.480 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.400 $\pm$ 0.026 <sup>d</sup>
51	17.12 $\pm$ 0.43	19.37 $\pm$ 2.88	0.455 $\pm$ 0.007 <sup>a,b</sup>	0.320 $\pm$ 0.011 <sup>a,e,h</sup>
67	20.50 $\pm$ 0.50	19.87 $\pm$ 0.61	0.480 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.413 $\pm$ 0.015 <sup>d</sup>
81	22.87 $\pm$ 0.83	16.25 $\pm$ 1.43	0.425 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.310 $\pm$ 0.017 <sup>e,f</sup>
101	23.00 $\pm$ 0.25	16.50 $\pm$ 0.25	0.473 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.450 $\pm$ 0.011 <sup>d</sup>
401	25.75 $\pm$ 1.92	15.00 $\pm$ 1.30	0.453 $\pm$ 0.011 <sup>a,b</sup>	0.356 $\pm$ 0.005 <sup>a,f,h</sup>
771	26.01 $\pm$ 1.20	11.75 $\pm$ 1.09	0.470 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.480 $\pm$ 0.002 <sup>g</sup>

In disc diffusion assays with oxidants, the diameters of the zones of inhibition around paper discs in YPD agar were measured. Five microliters of paraquat (0.5 M) and menadione (0.3 M) solutions were used per disc. Phospholipase and protease activities were determined with plate methods as described in Materials and Methods. Values of disc diffusion zones and Pz (mean of treated samples  $\pm$  S.D.) within the same column followed by identical letters are not significantly different ( $P > 0.05$ ); values followed by different letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) (ANOVA, *post hoc* Tukey's test). In paraquat and menadione columns, statistics has been omitted to facilitate interpretation. SD = standard deviation. mm = millimeters; Pz = activity index (Materials and methods)



**Fig. 1** Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *C. albicans* isolates. Representative growth from spotting 5  $\mu$ l of serially diluted yeast suspension (10<sup>-1</sup>–10<sup>-4</sup>) onto plates (a) without treatment or (b) containing 8.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. c Disc diffusion zones surrounding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impregnated discs determined as described in

Materials and Methods. Values of disc diffusion zones (mean of treated samples  $\pm$  S.D.) followed by identical letters are not significantly different ( $P > 0.05$ ); values followed by different letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) (ANOVA, *post hoc* Tukey's test)

both redox cycling agents capable of generating intracellular superoxide anions, but may be explained by putative differences in the mechanism of action of paraquat (compared to menadione) under some conditions in wild type isolates, as previously demonstrated for *Saccharomyces cerevisiae* [37].

Results for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disc diffusion tests and spot tests were partially congruent. Exceptions were isolates 33 and 401, which presented high sensitivity in the spot test but relatively small disc diffusion zones, and isolates 51 and 67, which had similar disc diffusion zones, but divergent ability to grow on YPD plates



containing 8.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1). We are not able to explain this, considering that they grow well on control YPD plates (not shown).

Significant differences in the susceptibility patterns of 123 *C. albicans* isolates to various stress agents were reported previously [35]. These authors observed inhibition halos ranging from 30 to 35 mm using 10 µl 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to our finding of 21- to 27-mm halos using 5 µl of 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. They found halos ranging from 20 to 30 mm using 10 µl of 0.5 M menadione, compared to 11- to 25-mm halos with 5 µl of 0.3 M menadione, in this study (Fig. 1). In view of the fact that the prior study used more than twice as much menadione as was used in our study, these results may be equivalent. The results could not be related to the clinical origin, since the majority of the isolates came from blood (candidemia).

In general, resistance to oxidants did not correlate with production of hydrolytic enzymes. Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not correlate with phospholipase activities and correlated negatively with protease ( $\rho = -0.720$ ). Menadione resistance did not correlate with phospholipase production and correlated negatively with protease production ( $\rho = -0.672$ ). Paraquat resistance did not correlate with phospholipase production but correlated with protease production ( $\rho = 0.802$ ). Samaranayake et al. [14] found no relation between the production of phospholipase B and four other virulence factors (germ-tube formation, cell surface hydrophobicity, adherence to buccal epithelial cells, and production of hemolysin). In contrast, in other studies, higher levels of extracellular phospholipase activity correlated well with adhesion, invasion of host tissues, and greater germ-tube formation. Non-pathogenic yeasts, including *C. albicans* isolates, which did not adhere and did not kill mice, had lower phospholipase activities [38]. These differences could be related to the methodology employed or to the isolates used.

The control ATCC isolates are from patient samples but were considered avirulent in CFW1 mice and Sprague–Dawley rats [15]. Results obtained using these isolates were not discrepant in comparison with results from clinical isolates (Fig. 1 and Table 1). Considering that we did not test the global virulence of the isolates in animal models, it is not possible to infer a relationship between virulence globally and specific virulence factors tested in this study.

It is known that *C. albicans* uses several factors to cause disease; however, it seems that regulation of these factors occurs according to the site or stage of infection, and there is not a coordinate relationship with respect to regulation of all factors [31, 39]. It is also known that different environmental conditions, including pH, starvation, and other factors, may influence protease and phospholipase activities [10]. These relationships were not addressed in our study but should be addressed in future studies.

This study is a first attempt to determine whether there is a correlation between production of proteolytic enzymes and resistance to oxidative stress under a given condition. The lack of correlation between resistance to oxidants and hydrolytic enzyme production may be related to the fact that synthesis of these factors is a priority at different time points (i.e., synthesis of hydrolytic enzymes occurs early in the process of invasion in the host, while synthesis of antioxidants occurs at later times in the infection process, when the yeast are in contact with immune cells), indicating fine regulation in expression of different virulence factors by *C. albicans*.

**Acknowledgments** We thank Marilene H. Vainstein, Carmem Donaduzzi, and Gilmar Bellato for kindly providing the isolates.

## References

- Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans*. Cell Microbiol. 2007;9:2938–54.
- Michán 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 Res. 2009;9:1078–90.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20:133–63.
- Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Harcus D, Marciel A, Bouin AP, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. Mol Biol Cell. 2002;13:3452–65.
- Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. Mol Immunol. 2009;47:465–75.
- Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36:223–8.

7. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71:348–76.
8. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of isolates. *Mycoses.* 2002;45:160–5.
9. Dostál J, Hamal P, Pavlíková L, Soucek M, Ruml T, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol.* 2003;41:712–6.
10. Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington, DC: ASM Press; 2001. p. 451.
11. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11:313–7.
12. Lopes da Rosa J, Boyartchuk VL, Zhu LJ, Kaufman PD. Histone acetyltransferase Rtt109 is required for *Candida albicans* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107: 1594–9.
13. Brown AJP, Haynes K, Quinn J. Nitrosative and oxidative stress in fungal pathogenicity. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12:384–91.
14. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA, Cheung BP, Yau JY, Yeung KW, Samaranayake LP. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol.* 2005;54:583–93.
15. Schmidt A, Geschke U. Comparative virulence of *Candida albicans* isolates in CFW1 mice and Sprague-Dawley rats. *Mycoses.* 1996;39:157–60.
16. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and protease activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006;161: 213–8.
17. Faria RL, Jorge AOC, Junqueira JC, Santiago NF, Martins J da S, Colombo CED. Comparison of pathogenicity factors between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: an in vitro and in vivo study. XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2009. [http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_01240689608.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_01240689608.pdf):69–75.
18. Kadir T, Gümrü B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol.* 2007;52:691–6.
19. Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu C. Phospholipase, protease and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007;56:1393–8.
20. Cassone A, de Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernández-Rodríguez M, Quindós G, Pontón J. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis.* 1995;171:967–75.
21. Kulcharyk PA, Heinecke JW. Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry.* 2001;40:3648–56.
22. Ma X, Du J, Nakashima I, Nagase F. Menadione bio-physically controls JNK-linked cell death in leukemia jurkat T cells. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:371–8.
23. Kogoma T, Farr SB, Joyce KM, Natvig DO. Isolation of gene fusions (soi:lacZ) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85: 4799–803.
24. Lamarre C, Le May JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem.* 2001;276:43784–91.
25. Chauhan N, Inglis D, Roman E, Pla J, Dongmei L, Calera JA, Calderone R. *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell.* 2003;2:1018–24.
26. da Costa KRC, Ferreira JC, Komesu MC, Candida RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, coenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia.* 2009;167:73–9.
27. Prince MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982;20:7–14.
28. Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Comparison of phospholipase and protease activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses.* 2005;48:62–7.
29. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid protease, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.* 2007;164:265–9.
30. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe S. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl protease and phospholipase B genes in human's correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis.* 2003;188:469–79.
31. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, JE Jr Edwards, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1995;63:1993–8.
32. Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell.* 2003;14:1460–7.
33. Tosello ME, Biasoli MS, Lugue AG, Magaró HM, Krapp AR. Oxidative stress response involving induction of protective enzymes in *Candida dubliniensis*. *Med Mycol.* 2007; 45:535–40.
34. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W. The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol.* 1995;19:651–8.
35. Sampaio P, Nogueira E, Sá-Loureiro A, Delgado-Silva Y, Correia A, Pais C. Increased number of glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the resistance to stress agents. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2009; 96:395–404.
36. Petrovic V. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:816–22.
37. Wallace MA, Bailey S, Fukuto JM, Valentine JS, Gralla EB. Induction of phenotypes resembling CuZn-Superoxide dismutase deletion in wild-type yeast cells: an in vivo

- assay for the role of superoxide in the toxicity of redox-cycling compounds. *Chem Res Toxicol.* 2005;18:1279–86.
38. Barrett-Bee K, Hayes Y, Watson RG, Ryley J. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity in yeast. *J Gen Microbiol.* 1985;131:1217–21.
39. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hofand H, Morschhäuser J. Host versus in vitro signals and intrastrain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. *Mol Microbiol.* 2002;44:1351–66.

## 4. Resultados Complementares

### 4.1. Materiais e Métodos

#### 4.1.1. Teste de disco difusão em ágar:

Foi utilizada a mesma metodologia descrita em Materiais e Métodos do Artigo 2.

#### 4.1.2. Medição dos níveis de ERO

Alíquotas de suspensões celulares (obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos – Artigo 2) foram tratadas ou não com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 a 10 mM). As células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e ressuspensas com 1,5 mL de tampão de lise com PMSF. DCFDA (Sigma) em solução 5 mM de dimetil-sulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada tubo para uma concentração final de 10 µM e esses foram incubados em ausência de luz por 1 h com agitação suave. As células foram lisadas utilizando pérolas de vidro (Materiais e Métodos – Artigo 1) e centrifugadas a 8.000 g por 10 min. A fluorescência do sobrenadante foi lida após 30 min ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm - *bandpass* - 2 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm - *bandpass* - 2.5 nm) em um espectrofluorímetro SPF-500 C (SLM Instruments, Urbana, IL, USA). Os resultados foram normalizados com o conteúdo total de proteínas nos extratos celulares (JAKUBOWSKY & BARTOSZ, 1997; JAMNIK & RASPOR, 2003).

### 4.2. Resultados

A Tabela 1 demonstra os resultados de teste de disco difusão em ágar com isolados de referência de *Candida* spp. (Artigo 1 – Materiais e Métodos). Na Figura 1 são mostrados os resultados da medição dos níveis de ERO em *Candida* spp.

Tabela 1. Suscetibilidade de isolados de *Candida* a agentes oxidantes em teste de disco difusão em ágar.

Isolado	Diâmetro de zona de inibição (mm) (média ± DP)*		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Paraquat	Menadiona
<i>C. albicans</i> 18804	24.33 ± 0.58	12.66 ± 0.58	25.33 ± 1.15
<i>C. dubliniensis</i> 7987	33.66 ± 1.53	30.00 ± 1.00	51.33 ± 2.52
<i>C. famata</i> 62894	29.66 ± 0.58	37.00 ± 1.00	35.66 ± 0.58
<i>C. glabrata</i> 2001	22.00 ± 1.00	20.00 ± 1.00	28.33 ± 0.58
<i>C. guilliermondii</i> 46036	26.66 ± 0.58	42.66 ± 0.58	40.00 ± 1.00
<i>C. krusei</i> 6258	22.33 ± 1.15	13.00 ± 1.00	36.66 ± 0.58
<i>C. parapsilosis</i> 22019	26.66 ± 1.53	26.00 ± 1.00	30.33 ± 0.58
<i>C. tropicalis</i> 13803	26.00 ± 1.00	24.66 ± 0.58	28.66 ± 0.58

\*Foram determinados os diâmetros da zona de inibição de crescimento em torno de discos de papel filtro em ágar YPD em ensaios de disco difusão em ágar. As seguintes quantidades de compostos foram usadas (por disco): 5 µL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; 5 µL de uma solução de paraquat 0,5M; 5 µL de uma solução de menadiona 0,3M.

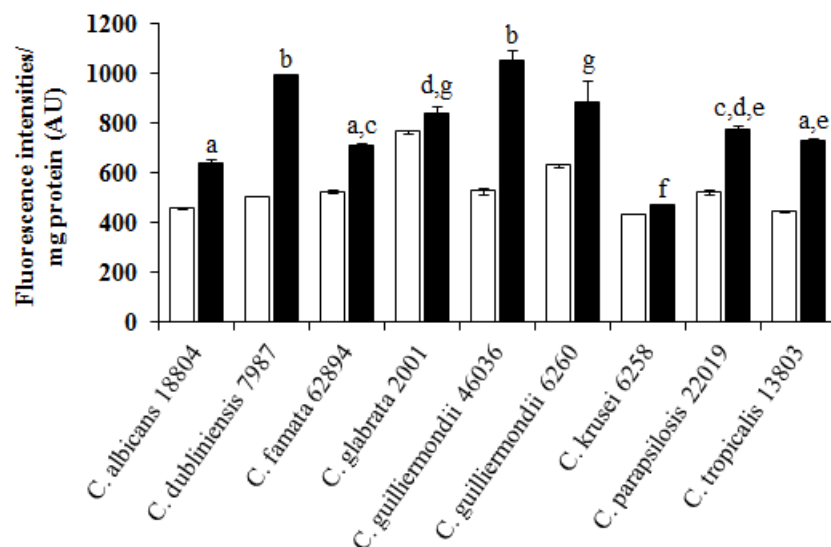


Figura 1. Efeito de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no acúmulo de ERO em *Candida* spp. As células foram tratadas (barras negras) ou não (barras brancas) conforme descrito em Materiais e Métodos. Colunas com letras iguais em amostras tratadas não são significativamente diferentes (ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey;  $p > 0.05$ ). Dados demonstram média ± D.P. de três experimentos independentes.

## 5. DISCUSSÃO

HALLIWELL & GUTERIDGE (2007) questionam se a única função do *burst* respiratório que ocorre em fagócitos em processo de fagocitose é de criar condições ótimas para que proteases possam operar. Os mesmos respondem que provavelmente não. Segundo estes autores, existem evidências indicando que fagócitos realmente utilizam  $H_2O_2$ , HOCl,  $ONOO^-$  (e possivelmente  $OH^\bullet$  e ozônio -  $O_3$ ) para promover morte direta de microrganismos e que um número grande de trabalhos demonstram que microrganismos com defesas antioxidantes desabilitadas são mais sensíveis à morte fagocítica, apontando um papel para espécies reativas. Na patogênese da candidíase esses eventos também são importantes. Assim, a caracterização da resposta ao estresse oxidativo é relevante para a obtenção de novas perspectivas sobre os mecanismos de virulência de espécies de *Candida* (POTOKA *et al.*, 1998; CHAUHAN *et al.*, 2006; D'ENFERT & HUBE, 2007; BROWN *et al.*, 2009).

Nesse estudo, buscamos obter dados sobre a resposta ao estresse oxidativo em oito espécies de *Candida*. Ao menos sete dessas espécies (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) estão entre as mais relevantes na clínica. *C. famata* pode ser considerada exceção, uma vez que é mais frequente a inclusão de *C. lusitaniae* entre as mais relevantes (SCHULZE & SONNENBORN, 2009; PANG *et al.*, 2010).

Em relação à metodologia empregada, os isolados foram identificados através de testes morfológicos e bioquímicos (Artigo 1 – Materiais e Métodos). Considerando os dados já referidos de XU *et al.* (2002), sobre diferenças entre as identificações fenotípica e genotípica, a metodologia utilizada permite comprovar com certa segurança a identidade dos isolados. Uma possível exceção seria a diferenciação *C. albicans* x *C. dubliniensis*. No entanto, os isolados de *C. dubliniensis* utilizados foram identificados previamente por métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares e gentilmente cedidos pelo Prof. Sydney H. Alves (Universidade Federal de Santa Maria – RS).

Sabe-se que isolados laboratoriais nem sempre se comportam como isolados clínicos quanto aos resultados obtidos (CALDERONE, 2002). Em função disso, utilizamos no decorrer deste estudo, 10 isolados de referência e 25 isolados clínicos.

As suspensões de células frescas utilizadas nos experimentos foram padronizadas através de leitura da densidade óptica (600 nm). O tamanho celular pode apresentar variação (2 a 8 x 2,5 a 20  $\mu$ M) inter- e intra-específico em *Candida* (CALDERONE, 2002).

Considerando isso, foi realizada inicialmente contagem de células em câmara de Neubauer e de unidades formadoras de colônia (UFC) em placa (YPD) para validar essa padronização.

Certas espécies utilizadas apresentam consideráveis diferenças genéticas, como *C. albicans* e *C. glabrata* (BUTLER *et al.*, 2009). Com isso, mesmo padronizando as suspensões iniciais de células, é possível que o estado fisiológico das espécies não seja idêntico. Ainda, concordando com PANG *et al.* (2010), foi possível em observações preliminares neste estudo, notar que a taxa de crescimento das espécies utilizadas (em meio YPD) apresenta diferenças. PANG *et al.* (2010) inclusive propuseram recentemente que a taxa de crescimento relativamente distinta de espécies de *Candida* possa contribuir para a variada patogenicidade das mesmas. Por isso, as células de cada espécie foram cultivadas com a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) sendo monitorada até atingirem fase exponencial (OD<sub>600</sub>=1,5 a 1,6  $\approx$  4,5x10<sup>7</sup> UFC) (HERRERO *et al.*, 2002; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008; HUA *et al.*, 2009) e o inóculo inicial padronizado (OD<sub>600</sub>=0,15) (Artigo 1 – Materiais e Métodos). Ainda, diferentes tipos de testes de sensibilidade foram executados e nos demais ensaios, os tratamentos foram mantidos por 1h, para paralelamente permitir a ocorrência de estresse oxidativo e minimizar a influência da diferente taxa de multiplicação.

Realizar os testes aqui propostos tanto com células em crescimento exponencial quanto estacionário é recomendável (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2009). Porém, considerando não haver tempo suficiente para isso, o cultivo exponencial foi adotado por permitir obtenção rápida das células e igualmente por ser esta a fase de multiplicação mais comumente avaliada neste tipo de estudo (JAMIESON *et al.*, 1996; FEKETE *et al.*, 2007).

Outras questões a considerar eram: quais oxidantes empregar? Em quais concentrações? Como observado anteriormente, oxidantes diferentes podem ter efeitos distintos em certa espécie e o mesmo oxidante pode ter efeitos variados em diferentes espécies. Não há, portanto, um oxidante universal (JAMIESON *et al.*, 1996; THORPE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009). Os três oxidantes utilizados (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona e paraquat) foram selecionados em função do seu efeito diferencial e da popularidade de seu uso (D'ENFERT & HUBE, 2007). Porém, não foi possível estender o uso dos três oxidantes para todos os isolados/testes.

Sobre as concentrações utilizadas, a de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (na maior parte dos testes) é semelhante à concentração (0,4 mM) que ENJALBERT *et al.* (2007) afirmam ser encontrada por células de *C. albicans* na fagocitose por neutrófilos em infecções renais.

Segundo esses autores, frente a 0,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no ambiente fagocítico de neutrófilos, poucas células desta espécie foram capazes de sobreviver. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) é semelhante à utilizada em diferentes estudos (JAMIESON *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2003; PEDREÑO *et al.*, 2007; TOSELLO *et al.*, 2007), assim como a de menadiona (0,3 M) (SMITH *et al.*, 2004) e paraquat (0,5 M) (ITO-KUWA *et al.*, 1999; LAMARRE *et al.*, 2001; TOSELLO *et al.*, 2007).

Respostas ao estresse são definidas como mecanismos moleculares induzidos nas células sob exposição a condições de estresse (MAGER & HOHMANN, 1997) e condições de estresse, no caso de microrganismos unicelulares, relacionam-se com fatores ambientais que provocam redução na taxa de crescimento (RUIS & SCHÜLLER, 1995; PIPER *et al.*, 1997). Embora a concentração de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja, *in vitro*, na maioria das vezes subletal para *C. albicans* (PEDREÑO *et al.*, 2006; 2007; Artigo 1 - Resultados), esta concentração é, conforme exposto antes, seguramente efetiva no ambiente fagocítico (ENJALBERT *et al.*, 2007).

Estudos em *S. pombe* indicam que as respostas ao estresse oxidativo são dose-dependentes (QUINN *et al.*, 2002). Nesta espécie, por exemplo, tioredoxina-peroxidase (tpx1) é mais fortemente ativada quando células são expostas a relativamente baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que a glutationa-peroxidase (gpx1) é mais fortemente ativada em altas concentrações deste oxidante. *C. albicans* também parece mostrar respostas transcricionais diferentes a relativamente baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e altas (0,4 e 5 mM) (ENJALBERT *et al.*, 2003; 2006). No presente trabalho não foi possível testar o efeito de diferentes concentrações dos oxidantes na maioria dos testes.

O próprio meio de cultura pode ser um inibidor da ação de oxidantes sobre as células e em diferentes meios de cultura o efeito de oxidantes pode ser variado (LARSEN & WHITE, 1995). O meio YPD (pH 5,0) foi utilizado nos cultivos em função de seu amplo emprego nos tipos de testes realizados aqui (JAMIESON *et al.*, 1996; ENJALBERT *et al.*, 2007).

A temperatura de crescimento utilizada foi 30°C em lugar de 37°C por algumas razões: na maior parte dos estudos dessa natureza, 30°C é a temperatura de cultivo empregada (JAMIESON *et al.*, 1996; FEKETE *et al.*, 2007; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2009); foi observado que essa temperatura permite um melhor crescimento de *C. dubliniensis* e *C. famata* e, em associação com o uso do meio YPD, a temperatura de 30°C faz com que a maior parte das células de *C. albicans* e *C. dubliniensis* se mantenha na forma de levedura, o que permite uma melhor padronização do tipo celular nos estudos (MICHÁN & PUEYO,



2009). Uma perspectiva, no caso principalmente de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, é realizar os testes com meios que selecionem a morfologia de hifa (NASUTION *et al.*, 2008; CARLISLE *et al.*, 2009).

O perfil amplo de expressão genômica de células de *C. albicans* seguido de exposição a óxido nítrico (estresse nitrosativo) revela a ativação de 65 genes, muitos dos quais também implicados em resposta a ERO (HROMATKA *et al.*, 2005). Assim, parece haver forte sobreposição com a resposta transcricional global ao estresse oxidativo. Aqui, testar os efeitos de substâncias que geram ERN e estresse nitrosativo não foi um dos objetivos, embora isso fosse recomendável (BROWN *et al.*, 2009).

*C. albicans* é uma espécie diplóide heterozigótica que possui predominantemente um modo clonal de reprodução, apesar da ocorrência de um ciclo parassexual. Tipagem molecular através de *fingerprinting* de DNA genômico com a sonda Ca3 demonstrou que a população desta espécie é dividida em cinco clados principais (BOUGNOUX *et al. apud* D'ENFERT & HUBE, 2007). Mais recentemente, dados de tipagem de sequência multiloco indicam a ocorrência de clados adicionais (SAMPAIO *et al.*, 2010). Fenótipos clado-específicos, exemplificados no contexto de susceptibilidade a antifúngicos e estrutura de moléculas de adesão tem sido identificados (BOUGNOUX *et al. apud* D'ENFERT & HUBE, 2007). Ainda, certas observações sugerem que a população celular infectante resulta de uma proliferação seletiva de um ou mais clones que estavam presentes em populações mistas comensais, antes do estabelecimento do processo de infecção (JACOBSEN *et al.*, 2008). Considerando isso, seria recomendável utilizar ao menos um representante de cada clado neste estudo, a exemplo do que fizeram recentemente RODAKI *et al.* (2009). Situação semelhante se aplica a *C. krusei* (VOS *et al.*, 2006). Não foi possível considerar essa questão no presente estudo.

ABIKA *et al.* (2000) demonstraram que a atividade das enzimas Cu/Zn-SOD, GPx e GR é estável a -80°C em eritrócitos lavados por quase 2 anos. Assim, acredita-se que no presente trabalho, o procedimento de obtenção e armazenamento dos extratos celulares (com inclusão do inibidor de proteases – PMSF - e congelamento a -80°C), tenha preservado as atividades enzimáticas. Não é possível descartar que o uso de protocolos de lise alternativos ao empregado (ITO-KUWA *et al.*, 1999), pudessem repercutir nos resultados obtidos.

Ainda, o procedimento de lise envolvendo a utilização de pérolas de vidro não permite romper a totalidade das células nas amostras. Estimamos que o protocolo utilizado

possibilita obter em torno de 80% de células lisadas. Por isso, parece recomendável a utilização de protocolos alternativos envolvendo o uso de sonificador, por exemplo.

### 5.1. Resistência de *Candida* spp. ao efeito de oxidantes *in vitro*

O objetivo inicial neste trabalho foi comparar a capacidade de espécies de *Candida* patogênicas para humanos em resistirem ao estresse oxidativo. Este tipo de avaliação havia sido previamente realizada envolvendo *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *C. albicans* (revisado em D'ENFÉRT & HUBE, 2007), *C. albicans* e *S. cerevisiae* (JAMIESON *et al.*, 1996), *C. albicans* e *C. dubliniensis* (TOSELLO *et al.*, 2007), *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. glabrata* (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008; 2009) e *C. albicans* e *C. krusei* (COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005). LEHRER (1969) testou o efeito de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *C. albicans*. Frente a outras espécies de *Candida* (*C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. pseudotropicalis*), este autor descreveu somente o efeito de combinações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com iodeto de potássio e com mieloperoxidase purificada de humanos. LARSEN & WHITE (1995) compararam o efeito antifúngico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Candida* spp., mas estes autores apontaram o uso de 26 isolados de *C. albicans* ou *C. stellatoidea* e de 12 isolados descritos somente como sendo de *Candida* não-*albicans*, impossibilitando uma avaliação espécie-específica.

As metodologias utilizadas nos testes de sensibilidade foram escolhidas pela sua relativa facilidade/possibilidade de execução e por serem metodologias validadas para fungos (LAMARRE *et al.*, 2001; FEKETE *et al.*, 2007; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2009).

Observamos que as espécies de *Candida* testadas apresentam diferenças na sua capacidade de resistir a um ataque oxidante (Artigos 1 e 2 - Resultados). Com base nos resultados obtidos nos testes de sensibilidade a oxidantes, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* aparentam maior resistência ao efeito destas substâncias. *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram resistência intermediária e *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. guilliermondii* foram mais sensíveis. Estes resultados também parecem ser em parte corroborados por comparações entre um menor número de espécies de *Candida*, conforme será discutido adiante. Aparentemente os resultados de sensibilidade obtidos não apresentam relação com a origem clínica dos isolados (Artigo 2 - Resultados).

Os dados obtidos demonstraram variabilidade intra-específica na susceptibilidade das espécies testadas ao estresse oxidativo. Isto concorda, por exemplo, com SAMPAIO *et al.* (2009), que igualmente encontraram diferenças significativas nos padrões de susceptibilidade de *C. albicans* a diferentes estressores. Estes observaram halos de inibição

variando de 30 a 35 mm com 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%. Neste estudo, observamos halos de 21 a 27 milímetros com 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Os mesmos encontraram halos variando de 20 a 30 mm com 10 µL de menadiona 0,5 M, em comparação com halos de 11 a 25 milímetros com 5 µL de 0,3 M menadiona, neste estudo (Artigo 2 – Resultados). Considerando as diferentes concentrações utilizadas, os resultados aparentam equivalência.

Inicialmente SULLIVAN *et al.* (2004) e mais recentemente TOSELLO *et al.* (2007) constataram que *C. dubliniensis* é menos resistente a oxidantes do que *C. albicans*. Nesse estudo o mesmo foi observado (Artigos 1 e 2 - Resultados). LINARES (2009) observaram maior atividade de SOD e CAT em isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes frente à anfotericina B e fluconazol do que nos respectivos grupos e fármacos com relação à *C. dubliniensis*, indicando, como colocado anteriormente, que as drogas podem atuar ao menos em parte através de estresse oxidativo e que *C. albicans* é mais apta a resistir a esse estresse que *C. dubliniensis*, o que concorda com a observação do presente estudo.

KOGA-ITO *et al.* (no prelo) recentemente observaram que *C. dubliniensis* é menos virulenta que *C. albicans* em camundongos e isto também é observado nas infecções em humanos (CALDERONE, 2002; PANG *et al.*, 2010). É possível que um sistema antioxidante menos efetivo somado à reduzida produção de protease e fosfolipase e baixa termotolerância observados em *C. dubliniensis* (RÖRIG *et al.*, 2009), dificulte a invasão da corrente circulatória. Testes mais específicos são necessários para comprovar esta hipótese.

CUÉLLAR-CRUZ *et al.* (2008; 2009) demonstraram que células de *C. glabrata* em fase estacionária de crescimento são mais resistentes que *C. albicans* e *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados de STRUS *et al.* (2005) também indicam maior resistência de *C. glabrata* que de *C. albicans* frente a esse oxidante. No presente trabalho, conforme mencionado, o cultivo inicial foi realizado até fase exponencial. Nesta condição, os isolados de *C. glabrata* apresentaram resistência variável ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A resistência global foi aparentemente equivalente a de *C. albicans* (Artigos 1 e 2 - Resultados). A tolerância relativamente alta de *C. glabrata* ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é, segundo CUÉLLAR-CRUZ *et al.* (2008), mediada por uma catalase única (Cta1). A resistência de *C. glabrata* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é possivelmente decorrente de sua atividade relativamente alta de CAT e SOD, também observadas aqui (Artigos 1 e 2 - Resultados). Mais recentemente, CUÉLLAR-CRUZ *et al.* (2009) reportaram que células de *C. glabrata* em fase estacionária de cultivo foram menos resistentes à menadiona do que células de *C. albicans*, reforçando o mencionado efeito

diferencial de oxidantes distintos. Em nosso estudo, essa diferença não pode ser observada (Artigo 2).

COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.* (2005) relataram maior resistência de *C. krusei* que *C. albicans* frente a estresse oxidativo (0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM de menadiona e 3 µM de plumbagina – tratamentos de 15, 30 e 60 min). Nossos resultados em geral concordam com essa observação. Observamos ainda que a espécie *C. krusei* apresenta morfologia colonial bastante distinta das demais espécies de *Candida* utilizadas. Os isolados dessa espécie apresentaram atividade relativamente elevada de GPx e atividade intermediária de SOD e CAT (Artigos 1 e 2 - Resultados), conforme será discutido adiante. Porém, mais pesquisas são necessárias para identificar a origem desta elevada resistência de *C. krusei* ao estresse oxidativo.

Cabe lembrar que *C. krusei* é intrinsecamente resistente a diferentes antifúngicos (MORAN & JABRA-RIZK, 2006). A resistência a estas drogas em muitos casos é associada com resistência ao estresse oxidativo (LINARES, 2009). Assim, parece possível que parte da resistência de *C. krusei* às drogas esteja relacionada com sua capacidade de resistir ao estresse oxidativo, o que estimula a continuidade da caracterização da resposta dessa espécie a oxidantes e possivelmente com relação à resistência frente a anfotericina B, por exemplo.

*C. albicans* e *C. krusei* parecem prejudicar a função fagocítica *in vivo* por inibirem a produção de ERO (WELLINGTON *et al.*, 2009). Isto pode possivelmente fazer com que estas espécies “percebam” menos ERO que as demais, durante o processo de fagocitose. A invasão da corrente circulatória por *C. krusei* parece difícil em comparação a *C. albicans*, provavelmente em função da pouca produção de fatores necessários para tal (XIONG *et al.*, 2000; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2003; RÖRIG *et al.*, 2009), o que deve explicar, ao menos em parte, seu isolamento relativamente pouco frequente (2,5%) em infecções sistêmicas (PANG *et al.*, 2010). Essa invasão parece ocorrer mais em pacientes severamente imunocomprometidos, tais como os acometidos por leucemia aguda (ABBAS *et al.*, 2000). Porém, é interessante observar que a taxa de mortalidade em candidemias por *C. krusei* é a mais elevada (48,7 e 52,9% em dois levantamentos independentes) (HORN *et al.*, 2009; PANG *et al.*, 2010). É claro que boa parte da alta mortalidade está relacionada com a neutropenia observada nos pacientes com candidemia por *C. krusei* (ABBAS *et al.*, 2000), mas a elevada resistência ao estresse oxidativo e possivelmente à fagocitose pode ser um contribuinte.

Conforme exposto, os resultados apontam que *C. famata* e *C. guilliermondii* apresentam um sistema antioxidante pouco efetivo (Artigos 1 a 3 - Resultados). *C. guilliermondii* é isolada em somente 0,7% dos casos de candidemia e *C. famata* não figura entre as espécies mais frequentes nesses casos (SCHULZE & SONNENBORN, 2009; PANG *et al.*, 2010). É possível que a baixa tolerância ao estresse oxidativo dificulte a invasão da corrente circulatória.

A sensibilidade de cada isolado variou de acordo com o oxidante empregado (Artigos 2 e 4 - Resultados). Considerando dados da literatura (THORPE *et al.*, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2009), isso é esperado. Para *C. albicans*, os resultados de disco difusão em ágar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram correlação positiva com os de menadiona (rho=0,716) e negativa com os de paraquat (rho=-0,791) (Artigo 4 - Resultados e Discussão). De forma interessante, quando considerados os dados de disco difusão em ágar para os isolados de referência (Resultados Complementares) e os isolados clínicos (Artigo 2), conjuntamente, os resultados dos oxidantes apresentaram correlação positiva entre si (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x menadiona – rho=0,522; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x paraquat – rho=0,415 e menadiona x paraquat – rho=0,548). Menadiona e paraquat são ambos capazes de gerar superóxido intracelular, mas apresentam diferenças no mecanismo de ação proposto (WALLACE *et al.*, 2005), assim, espera-se alguma variação nos resultados.

Com relação à concordância entre os diferentes testes de sensibilidade empregados, os resultados são até certo ponto, concordantes (Artigos 1 a 3 - Resultados). Exceções são, por exemplo, os resultados obtidos com os isolados de *C. albicans* 33 e 401, que apresentaram alta sensibilidade no teste da mancha, mas diâmetros de halos de inibição relativamente pequenos. No mesmo sentido, os isolados de *C. albicans* 51 e 67, que apresentaram diâmetros de halos de inibição em ágar semelhantes, mas a capacidade de crescer em placas de YPD contendo 8,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bastante diferentes (Artigo 4 - Resultados).

Sabe-se que *C. albicans* é significativamente mais resistente ao estresse oxidativo que *S. pombe* e *S. cerevisiae*. Para as duas primeiras espécies, 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é relativamente tóxico, enquanto *C. albicans* resiste bem a esta concentração. Esta maior resistência de *C. albicans* provavelmente esteja relacionada com sua adaptação ao ambiente em animais homeotérmicos (QUINN & BROWN *apud* D'ENFERT & HUBE, 2007). Os resultados dos testes de adaptação indicaram que as espécies de *Candida* testadas são mais resistentes ao estresse que *S. cerevisiae* (Artigo 1 - Resultados). Sugerimos que a

diferença na capacidade de resistir ao estresse oxidativo possa refletir na condição de diferentes espécies de *Candida* causarem infecções sistêmicas.

## **5.2. Capacidade de adaptação ao estresse oxidativo**

Foi demonstrado que *S. cerevisiae* (DAVIES *et al.*, 1995), *C. albicans* (JAMIESON *et al.*, 1996), *C. dubliniensis* (TOSELLO *et al.*, 2007) e *C. glabrata* (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008) podem adaptar-se ao estresse oxidativo (a primeira exposição a uma dose não-letal do oxidante confere resistência a uma segunda dose maior, e normalmente letal, da mesma substância). Todas as espécies de *Candida* testadas neste estudo apresentaram capacidade adaptativa ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados mostraram, em acordo com o observado por JAMIESON *et al.* (1996), uma maior capacidade adaptativa por *C. albicans* do que por *S. cerevisiae* e paralelamente, conforme colocado anteriormente, maior resistência de *C. albicans* ao estresse oxidativo (Artigo 1 - Resultados).

FEKETE *et al.* (2007) descreveram uma cepa mutante de *C. albicans* cronicamente adaptada ao estresse oxidativo. Esta apresentou redução na sua capacidade de formar hifas e na virulência. Entretanto, CHENG *et al.* (2007) demonstraram que uma cepa mutante de *C. albicans*, obtida por passagens seriais em baço murino por inoculação venosa, na qual a fosforilação oxidativa foi desacoplada, foi mais resistente ao paraquat e à fagocitose. Esta cepa persistiu e proliferou mais do que a selvagem em um modelo de infecção em rato, porém apresentou menor virulência/mortalidade, sugerindo que a menor geração de espécies reativas permitiu maior facilidade em adaptar-se e colonizar o hospedeiro.

Segundo ENJALBERT *et al.* (2007), a capacidade adaptativa é um requisito necessário para que *C. albicans* sobreviva ao ataque inicial do sistema imune do hospedeiro e estabeleça uma infecção tecidual. Provavelmente, isso é também válido para as demais espécies patogênicas de *Candida*.

## **5.3. Dano oxidativo em *Candida* spp.**

### **5.3.1. Acúmulo de espécies reativas de oxigênio**

A sonda DCFDA foi usada para estimar o acúmulo intracelular de ERO após a exposição ao estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Essa sonda pode penetrar no interior das células e detectar peróxidos celulares se eles são convertidos em radicais (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007). Nesse trabalho, concentrações inferiores a 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não permitiram observar acúmulo de ERO. Com o emprego de 10mM deste oxidante, todas as

amostras tratadas apresentaram aumento nos níveis de ERO (Resultados Complementares).

As intensidades de fluorescência observadas variaram de 460 a 600 (unidades arbitrárias) em amostras não tratadas e, como exposto acima, os resultados foram semelhantes em testes preliminares com concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,5, 5,0 e 7,5 mM (1 h de tratamento). CAO *et al.* (2009) obtiveram intensidades de fluorescência de 150 a 750 (unidades arbitrárias) com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 a 3 h de tratamento) em *C. albicans*. Estes autores não reportaram a fluorescência em amostras não tratadas. NASUTION *et al.* (2008) reportaram um acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após tratamento com esse oxidante por 6h em concentrações de 0,2 a 2 mM. RODAKI *et al.* (2009), mostraram a influência da glicose nos níveis de ERO e encontraram intensidades de fluorescência de 900 a 1400 (unidades arbitrárias). Valores estes similares aos nossos dados (400 a 1100 unidades arbitrárias) (Resultados Complementares).

*C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* acumularam maiores quantidades de ERO. Ao contrário, *C. glabrata* e *C. krusei* acumularam quantidades inferiores. De forma interessante, os níveis de ERO encontrados nas amostras tratadas apresentaram correlação positiva ( $\rho = 0,420$ ), com os halos de inibição de crescimento em testes de disco difusão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Artigo 2 – Resultados e Resultados Complementares), embora deva-se frisar que as concentrações de oxidante empregadas para obter esses resultados foram diferentes (10 mM e 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente).

HIPLER & HIPLER (2005) relataram que a geração de ERO basal foi menos intensa em *C. albicans* em comparação com *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Em *C. albicans*, geração de ERO não pode ser detectada com o método de quimioluminescência em concentrações de 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> blastósporos/mL. Neste estudo, igualmente observamos relativamente baixo acúmulo de ERO por *C. albicans* (Resultados Complementares), o que pode estar relacionado com sua efetiva capacidade de neutralizar estas moléculas.

MICHAN & PUEYO (2009) demonstraram que há um declínio na presença de ERO quando aumenta a densidade de células de *C. albicans* até a fase estacionária, aparentando um mecanismo de proteção. Um acúmulo real menor seria provavelmente uma vantagem para suportar o estresse oxidativo fagocítico.

CABISCOL *et al.* (2000) observaram uma produção marcada de ERO com um tratamento contendo 20mM de menadiona em *S. cerevisiae*. Os mesmos igualmente

demonstraram a influência do meio de cultura. HALLIWELL & WHITEMAN (2004) enfatizam a importância de examinar o meio sozinho quando substâncias são adicionadas ao mesmo, o que não foi realizado neste trabalho.

Embora a sonda DCFDA seja utilizada para o fim proposto, os dados obtidos devem ser interpretados com cautela, pois parece que ainda não há dados conclusivos sobre o que a mesma está realmente medindo e frequentemente, embora desaconselhado (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007), essa sonda é utilizada para a medição direta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NASUTION *et al.*, 2008). Assim, é possível que nestes experimentos, tenha sido captado somente o sinal da adição de quantidade considerável de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) e não das ERO geradas em consequência do estresse oxidativo, mesmo a sonda sendo considerada pouco sensível para esse oxidante (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007). Além disso, o tempo requerido para que pudesse ser realizada a medição foi de aproximadamente 1,5 h, o que impede a observação de um efeito mais imediato do estresse oxidativo na formação de ERO potencialmente danosas para as células.

Neste trabalho também foi realizado um teste de medição da capacidade oxidante total de extratos celulares, de acordo com o proposto por EREL (2005), mas não foram obtidos resultados. A fim de verificar se a eliminação de espécies oxidantes por ação mecânica estava impedindo a detecção, foram utilizados protocolos de lise alternativos (sonicação e lise química) (DASSANAYAKE *et al.*, 2006; OKUNGBOWA *et al.*, 2007), o que não produziu resultados. E, mesmo com a adição de um inibidor de catalase (azida sódica) e de um inibidor de glutathione (N-etilmaleimida) aos extratos celulares, para prevenir a eliminação dos oxidantes, não foi possível obter leituras.

### **5.3.2. Dano em lipídios (MDA) e proteínas (carbonil)**

Os níveis de MDA foram determinados como um meio de avaliar o índice de peroxidação lipídica e o grau de dano em proteínas foi verificado pela medida da carbonilação de proteínas. Ao que sabemos, esta é a primeira aplicação destes testes em isolados de *Candida*.

Com o estresse oxidativo empregado em ambos os testes (0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *C. glabrata* e *C. krusei* tiveram um menor índice de peroxidação lipídica (MDA), enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* os maiores. Estes níveis foram significativamente maiores que os observados nos isolados de *C. krusei* (Artigos 1 e 2 - Resultados). Os níveis de MDA



encontrados nesse estudo estão em concordância com os observados por MANFREDINI *et al.* (2005) para *S. cerevisiae*.

Foi interessante a observação de que *C. albicans* e *C. glabrata* apresentaram níveis de carbonil inferiores em resposta ao estresse oxidativo. Os níveis encontrados nessas espécies foram inclusive inferiores aos encontrados em *S. cerevisiae* em dois estudos anteriores (CABISCOL *et al.*, 2000; MANFREDINI *et al.*, 2005). Os isolados de *C. guilliermondii* apresentaram níveis de carbonil significativamente maiores que os de *C. albicans* (Artigos 1 e 2 - Resultados).

Os níveis de MDA não se correlacionaram com os níveis de carbonil. No entanto, os níveis de carbonil apresentaram correlação positiva com os testes de disco difusão em ágar ( $\rho = 0,424, 0,300$  e  $0,411$  para menadiona,  $H_2O_2$  e paraquat, respectivamente) (Artigos 1 e 2 - Resultados). A falta de correlação entre os níveis de MDA e de carbonil pode estar relacionada com o fato de que a produção de MDA depende da disponibilidade de substratos, que são geralmente ácidos graxos poliinsaturados de membrana (em inglês PUFA's) (ANTUNES *et al.*, 1996). *C. albicans* possui PUFA's (MURAYAMA *et al.*, 2006), mas pouco se sabe sobre o conteúdo destas moléculas na parede celular de outras espécies de *Candida*. Assim, é possível que a susceptibilidade ao dano lipídico seja diferente entre estas espécies.

Os baixos níveis de carbonil acumulados em espécies como *C. albicans* e *C. glabrata* podem refletir uma melhor condição de detoxificar oxidantes, corroborando parte dos achados nos testes de sensibilidade.

#### **5.4. Defesas antioxidantes em *Candida* spp.**

##### **5.4.1. Defesas enzimáticas**

Como sugerem JAMIESON *et al.* (1996), de forma a examinar em maior detalhe a base bioquímica da resposta protetora e possíveis razões para o diferente grau de resistência das espécies de *Candida* aqui estudadas, determinamos as atividades de três enzimas (CAT, GPx e SOD) com conhecido efeito protetor antioxidante.

As atividades enzimáticas foram determinadas em amostras não-tratadas ou tratadas (Artigo 1 - Materiais e Métodos). O tratamento envolveu estresse oxidativo (0,5 mM de  $H_2O_2/1$  h) leve e não-letal *in vitro* (GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2003), embora certamente representativo no ambiente fagocítico (ENJALBERT *et al.*, 2007), conforme comentado. Os resultados demonstraram que todas as oito espécies estudadas foram capazes de

responder ao estresse oxidativo através da indução da atividade de ao menos uma das três enzimas antioxidantes testadas.

A atividade de CAT elevou-se na maior parte das espécies testadas. A indução foi expressiva em isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Artigo 2 - Resultados). Considerando que CAT é uma linha inicial de detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NG *et al.*, 2007), é possível que esta capacidade de induzir a atividade dessa enzima, tenha repercutido nos resultados dos testes de sensibilidade a oxidantes, particularmente com relação às três espécies citadas. Os isolados de *C. krusei* apresentaram atividade relativamente elevada de GPx e atividade intermediária de SOD e CAT (Artigos 1 e 2 - Resultados).

A indução da atividade de CAT frente a estresse oxidativo é demonstrada em diferentes estudos envolvendo metodologias variadas em *C. albicans* (JAMIESON *et al.*, 1996; PEDREÑO *et al.*, 2006; FEKETE *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2010), *C. dubliniensis* (TOSELLO *et al.*, 2007) e *C. glabrata* (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2009). De modo geral, o grau de indução observado para essas espécies foi similar ao observado neste estudo.

Com relação aos isolados de referência utilizados, os resultados quanto à indução ou inibição da atividade de SOD foram bastante variados (Artigo 1 - Resultados). Indução da atividade de SOD foi mais notada para *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Inibição da atividade foi vista principalmente em *C. krusei*. No caso dos isolados clínicos testados, de modo geral não houve alteração significativa na atividade observada para esta enzima. Os isolados de *C. parapsilosis* apresentaram maior atividade de SOD seguidos pelos isolados de *C. glabrata* (Artigo 2 - Resultados). É possível que a atividade de SOD seja em parte responsável pela resistência elevada de *C. glabrata* ao estresse oxidativo, de certa forma observada aqui e em outros estudos, conforme mencionado (STRUS *et al.*, 2005; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008).

GUNASEKARAN *et al.* (1998) encontraram uma pequena inibição na atividade dessa enzima com 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15,05 para 12,46 U/mg de proteína) e uma marcada inibição (83,6%) na atividade com o uso de 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PEDREÑO *et al.* (2006) observaram uma redução na atividade de SOD com 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, com 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a maior parte dos estudos reporta indução, em geral moderada, da atividade de SOD, ao menos para *C. albicans*. É possível que a inobservância dessa indução no presente trabalho esteja relacionada com diferenças de metodologia. Relativamente poucos estudos foram

conduzidos em espécies de *Candida* não-*albicans* quanto à atividade de enzimas antioxidantes (TOSELLO *et al.*, 2007; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2008).

JAMIESON *et al.* (1996) trataram um isolado de *C. albicans* (3153) com 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,5 mM de menadiona, por 1h, em meio YPD. Esses autores reportaram uma indução de CAT, GPx, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD nessas condições. Porém é necessário considerar que as células foram cultivadas a 30°C até fase exponencial inicial (OD<sub>600</sub>=0,15), diferentemente do presente estudo, onde o cultivo se deu até fase exponencial tardia (OD<sub>600</sub>=1,5 a 1,6), o que pode ter influenciado nas diferenças observadas.

TOSELLO *et al.* (2007) descreveram indução na atividade de CAT e SOD em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* tratados com 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 0,5 mM de paraquat. O protocolo de tratamento foi semelhante ao de JAMIESON *et al.* (1996). Os autores descrevem somente que cultivos exponenciais foram utilizados, sem especificar até qual densidade óptica as células foram cultivadas. Interessante notar que esses autores descrevem atividades de SOD total variando de 0,16 a 0,67 (U/mg de proteína), as quais são consideravelmente menores que as encontradas no presente trabalho (Resultados – Artigos 1 e 2) e que o geralmente descrito na literatura (JAMIESON *et al.*, 1996; PEDREÑO *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2010).

GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.* (2010) observaram elevação na atividade de SOD total em isolados mutantes de Hog1 e Cap1 de *C. albicans* frente a 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e igualmente inibição frente a 5 e 50 mM do mesmo oxidante. FEKETE *et al.* (2007) observaram atividades de SOD de 3,7 a 11 (U/mg de proteína) em amostras não-tratadas e tratadas (1-6 mM de t-BOOH) de *C. albicans*. GYETVAI *et al.* (2007) observaram atividades de SOD similares as obtidas em nosso estudo em células não tratadas de *C. albicans*.

FROHNER *et al.* (2009) sugerem através de seus dados obtidos com um mutante para *SOD5* de *C. albicans*, que esta espécie consegue eliminar ERO produzidas no espaço extracelular de macrófagos e células dendríticas, incluindo ERO produzidas durante a formação do fagossomo em células imunes, atraindo a atenção para SODs de *Candida*.

Na maior parte dos isolados estudados, foi observada redução na atividade de GPx frente ao estresse oxidativo empregado. YANG *et al.* (2009), investigando a influência das condições de crescimento na atividade de GPx em *C. albicans*, observou uma ligeira redução da atividade desta enzima empregando 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma leve elevação com o uso de 1mM deste oxidante. No entanto, em estudos de proteômica, KUSCH *et al.* (2007; 2008) observaram uma indução em CAT e GPx após tratamento com 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os

protocolos empregados por JAMIESON *et al.* (1996) e FEKETE *et al.* (2007) (neste último caso empregando 1 e 6 mM t-BOOH) igualmente mostraram ativação de GPx. É possível que o tempo de contato com o oxidante, a fase de crescimento empregada ou o tipo de oxidante tenham ocasionado essas diferenças.

De modo geral, a amplitude das atividades enzimáticas observadas nesse estudo está de acordo com dados prévios, particularmente para *C. albicans*. Avaliando os resultados de SOD e GPx obtidos aqui frente a outros trabalhos, aparentemente a indução destas enzimas não é o principal fator de resistência ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com CUÉLLAR-CRUZ *et al.* (2008), o gene único de catalase (*CTA1*) de *C. glabrata* foi absolutamente requerido para a resistência *in vitro* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fase exponencial de crescimento, embora esse pareça dispensável em fase estacionária (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2009). LARSEN & WHITE (1995), embora tenham reportado atividade de CAT em todos os isolados de *C. albicans* e não-*albicans* testados, não observaram aparente relação entre a atividade de CAT de isolados individuais e a concentração antifúngica mínima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mesmo assim, a marcada ativação de CAT observada aqui para todas as espécies de *Candida* testadas estimula a melhor caracterização dessa enzima em cada espécie, a exemplo de trabalhos iniciais nesse sentido, como o de MIYASAKA *et al.* (2004).

Considerando observações anteriores (JAMIESON *et al.*, 1996; THORPE *et al.* 2004), sobre o efeito diferencial de oxidantes diversos sobre células fúngicas, seria interessante testar a atividade de enzimas antioxidantes frente a uma gama de oxidantes. Considerando que a adição de SOD e CAT inibe significativamente a morte de *C. albicans* por macrófagos (KIM *et al.*, 1999), seria igualmente interessante testar o efeito prático da adição de antioxidantes no sistema.

#### **5.4.2. Defesas não-enzimáticas - glutathiona**

Determinamos os níveis de glutathiona total (GSH) em lisados celulares após estresse oxidativo (0,5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1h). Segundo NG *et al.* (2007), esta molécula é essencial na detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como substrato específico de enzimas da família das peroxiredoxinas, tioredoxinas e da GPx, além de ser um tampão redox por si só.

Amostras não tratadas apresentaram níveis de GSH variando de 80 a 290 (nM/mg de proteína) e amostras tratadas de 21 a 83 (nM/mg de proteína) (Artigo 3 - Resultados). FEKETE *et al.* (2008) observaram níveis semelhantes de GSH (90 a 152 nM/mg de proteína) em amostras não-tratadas de *C. albicans*. Com exceção de *C. tropicalis*, todas as

espécies testadas apresentaram uma redução significativa nos níveis de GSH total após o estresse oxidativo imposto. *C. albicans* apresentou a redução mais dramática. Nas amostras não tratadas, *C. albicans* apresentou os níveis mais altos de GSH (Artigo 3 - Resultados).

Considerando a sugestão prévia de que a resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esteja associada com níveis intracelulares de GSH (IZAWA *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1996; GRANT *et al.*, 1998) e os níveis de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sejam função direta da atividade de GPx x GSH (NG *et al.*, 2007), os resultados obtidos nesse estudo para *C. albicans* estimulam uma verificação mais detalhada sobre o emprego mais efetivo de GSH como antioxidante nessa espécie em relação às demais.

A observação da diminuição/utilização da GSH frente ao estresse oxidativo está de acordo com diversas observações de outros autores em variadas situações experimentais, tanto em *C. albicans* quanto em *S. cerevisiae* (THOMAS *et al.*, 1991; MADEO *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2005; LEMAR *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2008; MICHÁN & PUEYO, 2009). Cabe ressaltar que esta é a primeira tentativa de observar o efeito da GSH como antioxidante em diferentes espécies de *Candida não-albicans*.

A diminuição da GSH total relaciona-se com a sua utilização como agente antioxidante e conversão na forma dissulfídica oxidada (GSSG). GSH é regenerada pela glutathione-redutase, mas isto leva certo tempo. Com o tratamento oxidativo empregado, é mais provável que o acúmulo de GSSG faça com que esta molécula seja exportada, pois a mesma é tóxica para a célula (DHINDSA, 1987; SHUPPE-KOISTINEN *et al.*, 1994), e sua exportação promove a redução da GSH total no ambiente intracelular.

FEKETE *et al.* (2007) observaram uma elevação nos níveis de GSH em mutantes de *C. albicans* obtidos através de tratamentos com 1mM de terc-butil-hidroperóxido (t-BOOH). LEE *et al.* (2003) observaram uma elevação de 3,14 vezes nos níveis de GSH após tratamento com 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/6h em *S. pombe*, o que possivelmente é explicado pelo longo tratamento, que permitiria à célula reciclar a forma reduzida (GSH), elevando seus níveis. MANFREDINI *et al.* (2004) relataram um aumento nos níveis de GSH com um tratamento de 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e uma redução significativa nos níveis com 5mM deste oxidante, em *S. cerevisiae*. Talvez essa diferença relacione-se com a maior sensibilidade de *S. cerevisiae* ao estresse oxidativo e a diferenças na regulação da resposta ao estresse oxidativo entre as espécies (GONZÁLEZ-PÁRRAGA *et al.*, 2008).

As observações com a GSH estimulam a continuidade dos estudos a fim de caracterizar melhor a função antioxidante desta molécula em espécies de *Candida*.

## 5.5. Capacidade antioxidante total

Considerando a crescente busca de marcadores únicos da capacidade antioxidante total (em inglês TAC) de líquidos biológicos (YOUNG, 2001; EREL, 2004), utilizamos um teste empregado com frequência, principalmente em soro humano (EREL, 2004), para verificar o desempenho deste em extratos celulares de *Candida* submetidos ao estresse oxidativo descrito anteriormente.

Os resultados de TAC foram variados, mesmo dentro de cada espécie (Artigo 3 – Resultados). Isto concorda com as nossas observações de variações intra-específicas na sensibilidade aos oxidantes e com observações anteriores em *C. albicans* (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Os resultados de TAC não apresentaram correlação ( $\rho = 0,051$ ) com os resultados dos testes de disco difusão em ágar, assim como não se correlacionaram com os níveis de GSH total em amostras não-tratadas ( $\rho = 0,042$ ) e tratadas ( $\rho = 0,058$ ).

De acordo com YOUNG (2001), os testes de TAC excluem a contribuição de antioxidantes enzimáticos e de proteínas ligadoras de metal. Em conjunto com a observação da ausência de correlação com os resultados de disco difusão em ágar e os níveis de GSH, isto pode indicar que um único marcador não é suficiente para comparar a capacidade antioxidante de diferentes microrganismos.

## 5.6. Resistência ao estresse oxidativo e enzimas hidrolíticas em *Candida* spp.

Foi exposto anteriormente que a produção de enzimas hidrolíticas (particularmente de fosfolipase e protease), é considerada importante na patogenicidade de *Candida* spp. Métodos de avaliação da produção de fosfolipase e protease de execução relativamente simples estão disponíveis e validados (PRINCE *et al.*, 1982; FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2005; DA COSTA *et al.*, 2009). Por isso, resolvemos verificar se havia uma relação entre a produção destas enzimas e o grau de resistência a oxidantes. Para tal, utilizamos dois isolados de referência e dez isolados clínicos de *C. albicans* (Artigo 4 - Materiais e Métodos).

Todos os isolados de *C. albicans* ( $n=12$ ) testados produziram fosfolipase e 83,3% ( $n=12$ ) produziram protease (Artigo 4 - Resultados). Estes dados estão em concordância com observações prévias (PRINCE *et al.*, 1982; FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2005; GOKCE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

KANTARCIOGLU & YUCEL (2002) estudaram a produção de fosfolipase e protease em 95 isolados clínicos de várias espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* e *C. tropicalis*). *C. albicans* apresentou um percentual significativamente maior de isolados produtores de protease e fosfolipase. Da mesma forma, LINARES *et al.* (2007), estudaram a atividade enzimática e capacidade hemolítica de *C. dubliniensis* ( $n=18$ ) frente à *C. albicans* ( $n=30$ ). Claramente *C. albicans* produziu mais fosfolipase e protease e também apresentou maior capacidade hemolítica que *C. dubliniensis*.

Estas observações estão de acordo com os resultados de uma avaliação comparativa realizada previamente na mesma coleção de isolados de *Candida* spp. utilizada no presente trabalho, com relação a diferentes aspectos da virulência (produção de protease e fosfolipase, amilase, crescimento a 39 e 42°C e atividade hemolítica) (RÖRIG *et al.*, 2009). Os dados obtidos nesses trabalhos apontam para um maior potencial de virulência de *C. albicans* frente a espécies não-*albicans*.

Outra espécie que possui um considerável arsenal de fatores de virulência é *C. parapsilosis*. TAMURA *et al.* (2007) avaliaram a produção de fatores de virulência (hidrofobicidade da superfície celular, aderência, atividades de protease e de fosfolipase) em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata*. A maior atividade de fosfolipase e de protease (Pz menor) foi de *C. parapsilosis* isolada de cateter venoso central. *C. albicans* apresentou atividade levemente inferior. Também, em avaliação prévia mencionada, somente *C. parapsilosis* e *C. albicans* apresentaram atividade hemolítica (RÖRIG *et al.*, 2009).

De forma interessante, houve correlação positiva entre a produção de fosfolipase e de protease ( $\rho=0,496$ ). NAGLIK *et al.* (2003) encontraram esse mesmo padrão em isolados de *C. albicans* obtidos de infecções orais. É possível inferir que essa correlação esteja relacionada à expressão conjunta desses fatores em etapas iniciais do processo de invasão de *Candida*, pois ambos são necessários em momentos próximos (DALLE *et al.*, 2010).

De modo geral, a resistência a oxidantes não se correlacionou com a produção de enzimas hidrolíticas em isolados de *C. albicans* (Artigo 4 – Resultados e Discussão). A resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verificada através de teste de disco difusão em ágar e da mancha não se correlacionou com a atividade de fosfolipase e se correlacionou negativamente com a atividade de protease ( $\rho = -0,720$ ). A resistência a menadiona não se correlacionou com a

produção de fosfolipase e apresentou correlação negativa com a produção de protease ( $\rho = -0,672$ ). A resistência ao paraquat não se correlacionou com a produção de fosfolipase, mas sim com a produção de protease ( $\rho = 0,802$ ). O comportamento de resistência ao paraquat foi diferente, concordando com outras observações desse trabalho (Artigos 1 e 2).

SAMARANAYAKE *et al.* (2005) não encontraram relação entre a produção de fosfolipase B e quatro outros fatores de virulência (formação de tubo germinativo, hidrofobicidade celular, adesão a células epiteliais bucais e produção de hemolisina). Em contrapartida, em outros estudos, os níveis mais elevados de atividade de fosfolipase extracelular apresentaram correlação positiva com a adesão, invasão dos tecidos do hospedeiro e formação de tubos germinativos. Leveduras não-patogênicas, incluindo isolados de *C. albicans*, que não aderiram e não mataram os ratos, apresentaram também baixa atividade de fosfolipase (BARRETT-BEE *et al.*, 1985). Essas diferenças podem estar relacionadas com diferenças na metodologia empregada.

FEKETE *et al.* (2008) descreveram que mutantes de *C. albicans* tolerantes ao t-BOOH apresentaram atividade de fosfolipase consideravelmente menor (32,1 a 73,3%) que os tipos selvagens. Isto está aparentemente de acordo com as nossas observações de que os isolados de *C. albicans* com maior resistência ao estresse oxidativo produzem menos fosfolipase e protease (Artigo 4 - Resultados). Os autores citados postulam que a seleção natural de mutantes de *C. albicans* altamente tolerantes ao estresse oxidativo é improvável (nenhum dos nossos isolados aparentemente apresentou tal fenótipo). Isso ocorreria em função de que, em mutantes resistentes ao estresse oxidativo (t-BOOH) desenvolvidos em laboratório, os fenótipos de tolerância aumentada ao estresse oxidativo e produção reduzida de atributos de virulência sempre emergem concomitantemente. JUHNKE *et al.* (1996) conseguiram isolar mutantes de *S. cerevisiae* sensíveis ao estresse oxidativo causado por  $H_2O_2$ . Já FEKETE *et al.* (2008) não observaram esse fenótipo. Esses autores postulam que um sistema de defesa com eficiência exagerada pode ser desvantajoso para *C. albicans*, impedindo a ação de ERO como reguladores do envelhecimento, de programas de morte celular, *etc.*

A ausência de correlação entre a produção de enzimas hidrolíticas e o grau de resistência a oxidantes não pode ser conclusivamente explicada por essas observações preliminares. Uma possibilidade seria que isolados previamente adaptados ao estresse oxidativo reajam mais rapidamente ao estresse experimental e regulem mais notavelmente a



produção de antioxidantes para cima enquanto paralelamente diminuíam a produção de enzimas hidrolíticas.

Os resultados observados nas amostras de referência não foram discrepantes em relação aos obtidos com amostras clínicas (Artigo 4 - Resultados). É conhecida a influência do pH e da privação de nutrientes na atividade de fosfolipase e protease (CALDERONE, 2002). Também seria recomendável verificar outros fatores de virulência, como a adesividade, embora isso não tenha sido executado.

No presente trabalho, outras tentativas de caracterizar a resposta ao estresse oxidativo foram realizadas, sem sucesso. Buscamos verificar se a capacidade de proteção cruzada observada em *C. albicans* (ENJALBERT *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004) e *C. dubliniensis* (TOSELLO *et al.*, 2007) se estendia às demais espécies usadas nesse trabalho. Os resultados obtidos, utilizando metodologia proposta por SMITH *et al.* (2004) não apresentaram-se reprodutíveis.

WESTWATER *et al.* (2005) apresentaram evidências de que *C. albicans* é capaz de regular sua resposta ao estresse oxidativo em nível da população celular global, pela liberação de moléculas protetoras no meio circundante (atualmente conhecidas como moléculas *quorum-sensing*, particularmente farnesol e tirosol). Estes autores demonstraram que um meio condicionado (definido como o sobrenadante, esterilizado em filtro, de cultura de *C. albicans* em fase estacionária) é capaz de proteger células do estresse oxidativo. Com a intenção de verificar se esse efeito estende-se a outras espécies de *Candida*, obtivemos o chamado meio condicionado de *C. albicans*, mas não foi possível reproduzir as observações do trabalho citado.

Conforme exposto anteriormente, *C. albicans* aparenta produzir quantidades significativamente maiores de farnesol que outras espécies de *Candida* (WEBER *et al.*, 2008). Buscamos verificar a influência das moléculas de sinalização (*quorum sensing*) farnesol e tirosol na multiplicação de diferentes espécies de *Candida*, utilizando protocolos propostos por ROSSIGNOL *et al.* (2007). Aparentemente a taxa de multiplicação não foi alterada, mas a reprodutibilidade igualmente não foi aceitável.

A virulência dos isolados utilizados nesse trabalho não foi verificada em modelo animal em função de dificuldades técnicas. Mas, além disso, sabe-se que a virulência de espécies de *Candida* é multifatorial, daí que uma maior resistência ao estresse oxidativo não necessariamente implicaria em mudança na virulência global em animais imunocompetentes. Porém, parece possível presumir que isolados incapazes de atingir um

determinado limiar de defesa antioxidante não possam evitar a fagocitose e morte promovida pelos fagócitos no início do processo de invasão da corrente circulatória (BROWN *et al.*, 2009), embora este limiar seja desconhecido até o momento.

LOPES DA ROSA *et al.* (2010) recentemente demonstraram resultados obtidos com um duplo mutante de *C. albicans* para o gene *rtt109* que codifica uma histona acetiltransferase importante para a sobrevivência a dano em DNA. Este mutante foi menos patogênico em camundongos e resistiu menos a morte por macrófagos *in vitro*. Através de inibição farmacológica da enzima NADPH oxidase nos animais, foi possível demonstrar que a sensibilidade maior dos mutantes duplos dependia da capacidade do hospedeiro de gerar ERO. Isto aparentemente comprova a importância de mecanismos de reparo a dano oxidativo na virulência de *C. albicans* e, segundo os autores, seus dados enfatizam especificamente a importância de ERO geradas nos fagossomos de hospedeiro mamífero para matar *C. albicans*.

Sugere-se que a exposição frequente ao estresse oxidativo, como a que ocorre com *C. albicans*, diferentemente de espécies que sobrevivem no ambiente externo, como *S. cerevisiae*, resulte em maior resistência ao estresse oxidativo. A exposição de certas espécies de *Candida* é possivelmente mais frequente do que outras.

Durante o processo infeccioso, observações recentes (CHENG *et al.*, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2010), apontam para adaptações que envolvem, à medida que o paciente fica mais imunocomprometido e o ambiente menos estressante, redução progressiva da virulência, embora a questão da atenuação ou elevação do grau de resistência ao estresse oxidativo nesse processo, não esteja bem estabelecido. CHENG *et al.* (2007) observaram desacoplamento da fosforilação oxidativa com gradual aumento na resistência ao estresse oxidativo e colonização ampla do hospedeiro, enquanto SAMPAIO *et al.* (2010), estudando variantes genéticas de uma cepa isolada sequencialmente do mesmo paciente, observaram redução na resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, é possível que a avaliação da resposta ao estresse oxidativo nesse último trabalho tenha sido pouco detalhada, uma vez que a exposição prévia ao estresse oxidativo teoricamente induziria a uma adaptação da cepa e ainda, uma atenuação nesse aspecto prejudicaria em tese a manutenção da cepa no interior do hospedeiro.

Assim, sugere-se que ocorra uma adaptação ao estresse oxidativo com maior tolerância ao mesmo no processo de doença, paralelamente a uma repressão de outros fatores de virulência, como a produção de enzimas hidrolíticas, para que as células resistam

à fagocitose e proliferem, sem, no entanto, agredirem os tecidos do hospedeiro. Estas idéias apontam, ao menos para *C. albicans* (SAMPAIO *et al.*, 2010), para um ajuste ao hospedeiro em favor do comensalismo em lugar de um aumento na virulência. Esta pode ser uma estratégia para manter seu hospedeiro vivo e prolongar sua sobrevivência para a manutenção da espécie, considerando que os únicos hospedeiros dessa espécie parecem ser animais de sangue quente.

É possível que *C. albicans* esteja mais bem adaptada a interagir com o sistema imune do hospedeiro e penetrar na corrente circulatória e realizar colonização comensal em contato com bactérias produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (no ambiente geniturinário feminino, por exemplo), considerando o repertório de fatores de virulência que seus isolados demonstram possuir.

Demonstramos nesse trabalho que espécies de *Candida* clinicamente relevantes têm capacidades distintas para lidar com o estresse oxidativo *in vitro*. Isso estimula a caracterização ainda mais detalhada da resposta ao estresse oxidativo nessas espécies, a fim de inibir mecanismos de resposta de forma específica ou, como sugerem FEKETE *et al.* (2007) desenvolver drogas ou combinações de drogas que mantêm um estresse oxidativo sob células de *Candida* como abordagem antifúngica futura.

Em conclusão, observou-se diferença no grau de resistência ao estresse oxidativo *in vitro* entre as oito espécies do gênero *Candida* aqui estudadas (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Embora o emprego de um maior número de isolados por espécie seja recomendável em estudos futuros para melhor caracterizar os dados obtidos neste estudo, as respostas a oxidantes indicam que *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam maior resistência ao estresse oxidativo nas condições testadas, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistência média e *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. guilliermondii* maior sensibilidade. As espécies mais resistentes ao estresse oxidativo, de modo geral apresentaram menor dano em proteínas.

Todas as espécies estudadas demonstraram capacidade adaptativa e indução de enzimas antioxidantes. A catalase mostrou-se claramente induzida frente a estresse oxidativo (0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e parece ser a enzima mais importante para detoxificar este oxidante nas espécies estudadas. Os níveis de glutatona total mostraram redução intracelular frente ao estresse oxidativo e os níveis em amostras não tratadas de *C. albicans* foram superiores aos observados nas demais espécies. A capacidade antioxidante total foi variável entre espécies e os resultados obtidos indicam que o uso deste como marcador

único de capacidade antioxidante é inadequado neste sistema. Ainda, os resultados indicaram ausência de correlação entre o grau de resistência ao estresse oxidativo e a produção das enzimas proteinase e fosfolipase. Considerando as observações realizadas neste estudo e sua relação com situações observadas na clínica, acreditamos que o presente trabalho estimule a investigação da resposta ao estresse oxidativo em espécies patogênicas de *Candida* para compreendermos melhor o processo infeccioso e para o desenvolvimento futuro de novos antifúngicos.

## 6. REFERÊNCIAS

ABBAS, J.; BODEY, G.P.; HANNA, H.A.; MARDANI, M.; GIRGAWY, E.; ABI-SAID, D.; WHIMBEY, E.; HACHEM, R. & RAAD, I. *Candida krusei* Fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients. *Archives of Internal Medicine*, 160(17): 2659-2664, 2000.

ABE, S.; TSUNASHIMA, R.; IJIMA, R.; YAMADA, T.; MARUYAMA, N.; HISAJIMA, T.; ABE, Y.; OSHIMA, H. & YAMAZAKI, M. Suppression of anti-*Candida* activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiology and Immunology*, 53(6): 323-330, 2009.

ABIKA, C.; AL-AWADI, F. & OLUSI, S. Effect of prolonged storage on the activities of superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase. *Clinical Chemistry*, 46(4): 2000.

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D. & HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3): 111-118, 2005.

ALARCO, A.M. & RAYMOND, M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *The Journal of Bacteriology*, 181(3): 700-708, 1999.

ALBY, K. & BENNETT, R.J. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 20(14): 3178-3191, 2009.

ALONSO-MONGE, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; ROMÁN, E.; NEGREDO, A.I.; EISMAN, B.; NOMBELA, C. & PLA, J. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2(2): 351-361, 2003.

ALVAREZ-PERAL, F.J.; ZARAGOZA, O.; PEDREÑO, Y. & ARGÜELLES, J.C. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology*, 148(Pt 8): 2599-2606, 2002.

ALVES, S.H.; HORTA, J.A.; MILÁN, E.P.; SCHEID, L.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTURIO, J.M. & COLOMBO, A.L. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(2): 109-111, 2005.

ALVES, S.H.; LORETO, E.S.; LINARES, C.E.; SILVEIRA, C.P.; SCHEID, L.A.; PEREIRA D.I.B. & SANTURIO, J.M. Comparison among tomato juice Agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(3): 119-121, 2006.

ANDRUTIS, K.A.; RIGGLE, P.J.; KUMAMOTO, C.A. & TZIPORI, S. Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6): 2317-2323, 2000.

ANTUNES, F.; SALVADOR, A.; MARINHO, H.S.; ALVES, R. & PINTO, R.E. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes I. An integrative kinetic model. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(7): 917-43, 1996.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.I.; SUZUKI, K.; KURA, F. & MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity*, 67(4): 1828-1836, 1999.

ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; SUZUKI, K.; MAEDA, N. & KOYAMA, H. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(4): 1276-1279, 2000.

ARATANI Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; SUZUKI, K.; DINAUER, M.C.; MAEDA, N. & KOYAMA, H. Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, 185(12): 1833-1837, 2002.

ARENDRUP, M.; HORN, T. & FRIMODT-MOLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection*, 30(5): 286-291, 2002.

AVERY, S.V.; MALKAPURAM, S.; MATEUS, C. & BABB, K.S. Copper/Zinc-superoxide dismutase is required for oxytetracycline resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Bacteriology*, 182(1): 76-80, 2000.

BALDRIDGE, C.W. & GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology*, 103: 235-236, 1933.

BALISH, E.; WARNER, T.F.; NICHOLAS, P.J.; PAULLING, E.E.; WESTWATER, C. & SCHOFIELD, D.A. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. *Infection and Immunity*, 73(3): 1313-1230, 2005.

BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G. & RYLEY, J.F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology*, 131(5): 1217-1221, 1985.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, X.M.; VILLA-TANACA, L. & HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1): 414-420, 2003.

BELOZERSKAYA, T.A. & GESSLER, N.N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5): 506-515, 2007.

BERMAN, J. & SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*, 3(12): 918-930, 2002.

BILLACK, B.; SANTORO, M. & LAU-CAM, C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazol-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbial Drug Resistance*, 15(2): 77-83, 2009.

BORMAN, A.M.; LINTON, C.J.; MILES, S.J. & JOHNSON, E.M. Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(supp. 1): i7-i12, 2008.

BRANCO, M.R.; MARINHO, H.S.; CYRNE, L. & ANTUNES, F. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8): 6501-6506, 2004.

BROWN, A.J.P.; HAYNES, K. & QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4): 384-391, 2009.

BUSCHELMAN, B.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A.; KOONTZ, F.P. & DOERN, G.V. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(1): 89-91, 1999.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M.D.; LIN, M.F.; SANTOS, M.A.S.; SAKTHIKUMAR, S.; MUNRO, C.A., *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(4): 657-662, 2009.

CABISCOL, E.; PIULATS, E.; ECHAVE, P.; HERRERO, E. & ROS, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35): 27393-27398, 2000.

CAESAR-TONTHAT, T.C. & CUTLER, J.E. A monoclonal antibody to *Candida albicans* enhances mouse neutrophil candidacidal activity. *Infection and Immunity*, 65(12): 5354-5357, 1997.

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

CALERA, J.A.; ZHAO, X.J. & CALDERONE, R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 68(2): 518-525, 2000.

CAO, Y.; HUANG, S.; DAI, B.; ZHU, Z.; LU, H.; DONG, L.; CAO, Y.; WANG, Y.; GAO, P.; CHAI, Y. & JIANG, Y. *Candida albicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2): 183-189, 2009.

CARBALLAL, S.; RADI, R.; KIRK, M.C.; BARNES, S.; FREEMAN, B.A. & ALVAREZ, B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*, 42(33): 9906-9914, 2003.

CARLISLE, P.L.; BANERJEE, M.; LAZZELL, A.; MONTEAGUDO, C.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. & KADOSH, D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(2): 599-604, 2009.

CARMEL-HAREL, O. & STORZ, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, 54: 439-461, 2000.

CHAUHAN, N.; INGLIS, D.; ROMAN, E.; PLA, J.; LI, D.; CALERA, J.A. & CALDERONE, R. *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryotic Cell*, 2(5): 1018-1024, 2003.

CHAUHAN N.; LATGE, J.P. & CALDERONE, R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6): 435-444, 2006.

CHAVES, G.M.; BATES, S.; MACCALLUM, D.M. & ODDS, F.C. *Candida albicans* *GRX2*, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genetics and Molecular Research*, 6(4): 1051-1063, 2007.

CHELIKANI, P.; FITA, I. & LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2): 192-208, 2004.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J. & FINK, G.R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(14): 5048-5052, 2004.

CHENG, S.; CLANCY, C.J.; ZHANG, Z.; HAO, B.; WANG, W.; ICZKOWSKI, K.A.; PFALLER, M.A. & NGUYEN, M.H. Uncoupling of oxidative phosphorylation enables *Candida albicans* to resist killing by phagocytes and persist in tissue. *Cellular Microbiology*, 9(2): 492-501, 2007.

COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J.; BENNETT, D.E.; MORAN, G.P.; BARRY, H.J. & SHANLEY, D.B. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*, 11(5): 557-567, 1997.

COSTA, V. & MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(4-5): 217-246, 2001.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; GONÇALVES-RODRIGUES, A. & LUDOVICO, P. *Candida krusei* showed promoted resistance to oxidative stress. *15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Abstract Number: 1135-204, 2005.

COWEN, L.E.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M.S.; THOMAS, D.Y.; TESSIER, D.C.; KOHN, L.M. & ANDERSON, J.B. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(14): 9284-9289, 2002.



CUÉLLAR-CRUZ, M.; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO, M.; CAÑAS-VILLAMAR, I.; MONTALVO-ARREDONDO, J.; RIEGO-RUIZ, L.; CASTAÑO, I. & DE LAS PEÑAS, A. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by the single catalase, Cta1p, and controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p. *Eukaryotic Cell*, 7(5): 814-825, 2008.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; CASTAÑO, I.; ARROYO-HELGUERA, O. & DE LAS PEÑAS, A. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4): 649-654, 2009.

DA COSTA, K.R.; FERREIRA, J.C.; KOMESU, M.C. & CANDIDO, R.C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia*, 167(2): 73-79, 2009.

DAILLY, E.; URIEN, S. & TILLEMENT, J.P. Chain-breaking antioxidants and ferriheme-bound drugs are synergistic inhibitors of erythrocyte membrane peroxidation. *Free Radical Research*, 28(2): 205-214, 1998.

DALLE, F.; WÄCHTLER, B.; L'OLLIVIER, C.; HOLLAND, G.; BANNERT, N.; WILSON, D.; LABRUÈRE, C.; BONNIN, A. & HUBE, B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, 12(2): 248-271, 2010.

DASSANAYAKE, R.S.; SAMARANAYAKE, Y.H.; YAU, J. & SAMARANAYAKE, L.P. DNA fingerprinting elicited evolutionary trend of oral *Candida tropicalis* isolates from diverse geographic locales. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(3): 186-194, 2006.

DAVIES, A.N.; BRAILSFORD, S.R. & BEIGHTON, D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. *Oral Oncology*, 42(7): 698-702, 2006.

DE REPENTIGNY, L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4): 324-329, 2004.

D'ENFERT, C. & HUBE, B. eds. *Candida: comparative and functional genomics*. Caister Academic Press, 2007.

DHINDSA, R.S. Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortula ruralis*. *Plant Physiology*, 83(4): 816-819, 1987.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUMML, T.; PICHOVÁ, I. & HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *Journal Clinical Microbiology*, 41(2): 712-16, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1): 47-95, 2002.

EMRI, T.; POCSI, I. & SZENTIRMAI, A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology & Medicine*, 23(5): 809-814, 1997.

ENJALBERT, B.; NANTEL, A. & WHITEWAY, M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4):1460-1467, 2003.

ENJALBERT, B.; SMITH, D.A.; CORNELL, M.J.; ALAM, I.; NICHOLLS, S.; BROWN, A.J. & QUINN, J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 17(2): 1018-1032, 2006.

ENJALBERT, B.; MacCALLUM, D.M.; ODDS, F.C. & BROWN, A.J.P. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 75(5): 2143-2151, 2007.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4): 277-285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12): 1103-1111, 2005.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10): 820-832, 2004.

FEKETE, A.; EMRI, T.; GYETVAI, A.; GAZDAG, Z.; PESTI, M.; VARGA, Z.; BALLA, J.; CSERHÁTI, C.; EMÖDY, L.; GERGELY, L. & PÓCSI, I. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decrease pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 7(6): 834-847, 2007.

FEKETE, A.; PÓCSI, I.; EMRI, T.; GYETVAI, A.; GAZDAG, Z.; PESTI, M.; KARÁNYI, Z.; MAJOROS, L.; GERGELY, L. & PÓCSI, I. Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *Journal of Basic Microbiology*, 48(6): 480-7, 2008.

FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico Laboratorial – das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

FIALKOW, L.; WANG, Y. & DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(2): 153-164, 2007.

FIDEL JR., P.L. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends in Microbiology*, 12(5): 220-227, 2004.

FLANNAGAN, R.S.; COSÍO, G. & GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5): 355-366, 2009.

FOTEDAR, R. & AL-HEDAITHY, S.S. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, 48(1): 62-67, 2005.

FRADIN, C.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; SCHALLER, M.; KLIS, F.; ODDS, F.C. & HUBE, B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology*, 56(2): 397-415, 2005.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112, 1995.

FROHNER, I.E.; BOURGEOIS, C.; YATSYK, K.; MAJER, O. & KUCHLER, K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular Microbiology*, 71(1): 240-252, 2009.

FUJII, S.; DALE, G.L. & BEUTLER, E. Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood*, 63(5): 1096-1101, 1984.

FUJITA, S. & HASHIMOTO, T. DNA fingerprinting patterns of *Candida* species using HinfI endonuclease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(Pt 3): 1381-1389, 2000.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C. & KORTING, H.C. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today*, 14(3/4): 214-222, 2009.

GERSHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P. & FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119: 623-626, 1954.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N. & YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, 164(6): 265-269, 2007.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; HERNÁNDEZ, J.A. & ARGÜELLES, J.C. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast*, 20(14): 1161-1169, 2003.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; MARÍN, F.R.; ARGÜELLES, J.C. & HERNÁNDEZ, J.A. Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722(3): 324-330, 2005.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; MARTÍNEZ-ESPARZA, M. & ARGÜELLES, J.C. Stress responses in yeasts: what rules apply? *Archives of Microbiology*, 189(4): 293-296, 2008.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; ALONSO-MONGE, R.; PLÁ, J. & ARGÜELLES, J.C. Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS Yeast Research*, 10(6): 1-10, 2010.

GRANT, C.M.; PERRONE, G. & DAWES, I.W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3): 893-898, 1998.

GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39(3): 533-541, 2001.

GROPP, K.; SCHILD, L.; SCHINDLER, S.; HUBE, B; ZIPFEL, P.F. & SKERKA, C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Molecular Immunology*, 47(2-3): 465-75, 2009.

GUNASEKARAN, S.; IMBAYAGWO, M.; MCDONALD, L.; GUNASEKARAN, M. & MANAVATHU, E. Influence of carbon and nitrogen sources on glutathione catabolic enzymes in *Candida albicans* during dimorphism. *Mycopathologia*, 131(2): 93-97, 1995.

GUNASEKARAN, U.; YANG, R. & GUNASEKARAN, M. Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 141(2): 59-63, 1998.

GÜNDES, S.G.; GULENC, S. & BINGOL, R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. *Journal of Medical Microbiology*, 50(12): 1105-1110, 2001.

GYETVAI, A.; EMRI, T.; FEKETE, A.; VARGA, Z.; GAZDAG, Z.; PESTI, M.; BELÁGYI, J.; EMÖDY, L.; PÓCSI, I. & LENKEY, B. High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide-generating agent menadione. *FEMS Yeast Research*, 7(2): 265-275, 2007.

HALLIWELL, B. & WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. *Free radicals in biology and medicine*. 4<sup>th</sup> edition. Oxford University Press, 2007.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 9(12): 591-596, 2001.

HELMERHORST, E.J.; TROXLER, R.F. & OPPENHEIM, F.G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(25): 14637-14642, 2001.

HERRERO, A.B.; UCCELLETTI, D.; HIRSCHBERG, C.B.; DOMINGUEZ, A. & ABEIJON, C. The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affect morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryotic Cell*, 1(3): 420-431, 2002.

HIPLER, B. & HIPLER, U.C. Chemiluminescence measurement of the generation of reactive oxygen species. *BMG Labtech*, application note 111, 2005.

HORN, D.L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E.J.; FISHMAN, J.A.; STEINBACH, W.J.; OLYAEI, A.J.; MARR, K.A.; PFALLER, M.A.; CHANG, C.H. & WEBSTER, K.M. Epidemiology and

outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical Infectious Diseases*, 48(12): 1695-1703, 2009.

HORNBY, J.M.; JENSEN, E.C.; LISEC, A.D.; TASTO, T.T.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P. & NICKERSON, K.W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2982-2992, 2001.

HROMATKA, B.S.; NOBLE, S.M. & JOHNSON, A.D. 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*, 16(10): 4814-4826, 2005.

HUA, X.; YUAN, X.; MITCHELL, B.M.; LORENZ, M.C. & O'DAY, D.M. Morphogenic and genetic differences between *Candida albicans* strains are associated with keratomycosis virulence. *Molecular Vision*, 15: 1476-1484, 2009.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4): 336-341, 2004.

HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4): 347-349, 2009.

HWANG, C.S.; RHIE, G.E.; OH, J.H.; HUH, W.K.; YIM, H.S. & KANG, S.O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, 148(Pt 11): 3705-3713, 2002.

HWANG, C.S.; BAEK, Y.U.; YIM, H.S. & KANG, S.O. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast*, 20(11): 929-941, 2003.

INGRAM, P.; PITT, A.; WILSON, C.; OLEJNIK, O. & SPICKETT, C. Mechanisms of oxidative damage in ocular preservative action. *World Congress Oxidants and Antioxidants in Biology Oxygen Club of California*, 130-131, 2001.

ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; OSAFUNE, T.; VIDOTTO, V. & PIENTHAWEECHAI, K. Oxidative stress sensitivity and superoxide dismutase of a wild-type parent strains and a respiratory mutant of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 37(5): 307-314, 1999.

IZAWA, S.; INOUE, Y. & KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 368(1): 73-76, 1995.

JABRA-RIZK, M.A.; BRENNER, T.M.; ROMAGNOLI, M.; BAQUI, A.A.M.A.; MERZ, W.G.; FALKLER J.R., W.A. & MEILLER, T.F. Evaluation of a reformulated CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5): 2015-2016, 2001.

JAKUBOWSKI, W. & BARTOSZ, G. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11): 1297-1301, 1997.

JACOBSEN, M.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; SHAW, D.J. & ODDS, F.C. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2): 317-323, 2007.

JACOBSEN, M.D.; DUNCAN, M.D.; BAIN, J.; JOHNSON, M.E.; NAGLIK, J.R.; SHAW, D.J.; GOW, N.A. & ODDS, F.C. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Research*, 8: 1334-1338, 2008.

JAMIESON, D.J.; STEPHEN, D.W.S. & TERRIÈRE, E.C. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1): 83-88, 1996.

JAMNIK, P. & RASPOR, P. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(6): 316-323, 2003.

JAMNIK, P. & RASPOR, P. Methods for monitoring oxidative stress response in yeasts. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(4): 195-203, 2005.

JOHNSON, F. & GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5): 340-352, 2005.

JUHNKE, H.; KREMS, B.; KÖTTER, P. & ENTIAN, K.D. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Molecular and General Genetics*, 252(4): 456-464, 1996.

KANTARCIOGLU, A.S. & YUCEL, A. Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45(5-6): 160-65, 2002.

KELLING, P.L. & SMITH, L.L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochemical Pharmacology*, 31(20): 3243-3249, 1982.

KERRIDGE, D. & NICHOLAS, R.D. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *C. glabrata*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18(Suppl B): 39-49, 1986.

KIM, H.J.; BYOUNG-KUK, N.; KIM, M.B.; CHOI, D.Y. & SONG, C.Y. Protective effects of antioxidant enzymes of *Candida albicans* against oxidative killing by macrophages. *The Journal of Microbiology*, 37(2): 117-122, 1999.

KOBAYASHI, S.; MIYABE, S.; IZAWA, S.; INOUE, Y. & KIMURA, A. Correlation of the OSR/ZRC1 gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 23(Pt 1): 3-6, 1996.

KOBAYASHI, D.; KONDO, K. & WATANABE, N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10): 3113-3117, 2002.

KOGA-ITO, C.Y.; KOMIYAMA, E.Y.; DE PAIVA MARTINS, C.A.; VASCONCELLOS, T.C.; CARDOSO JORGE, A.O.; CARVALHO, Y.R.; DO PRADO, R.F. & BALDUCCI, I. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *Mycoses* (no prelo)

KOH, A.Y.; KÖHLER, J.R.; COGGSHALL, K.T.; ROOIJEN, N.V. & PIER, G.B. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathogens*, 4(2): e35, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. & JANDA, W.M. *Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido*. 5ª Edição, Medsi, 2001.

KOVACIC, P. & BECVAR, L.E. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Pharmaceutical Design*, 6(2): 143-167, 2000.

KREMERY, V. & BARNES, A.J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50(4): 243-260, 2002.

KUMAMOTO, C.A. & VINCES, M.D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*, 7(11): 1546-1554, 2005.

KUSCH, H.; ENGELMANN, S.; ALBRECHT, D.; MORSCHHÄUSER, J. & HECKER, M. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics*, 7(5): 686-697, 2007.

KUSCH, H.; ENGELMAN, S.; BODE, R.; ALBRECHT, D.; MORSCHHÄUSER, J. & HECKER, M. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3-4): 291-318, 2008.

LAMARRE, C.; LEMAY, J. D.; DESLAURIERS, N. & BOURBONNAIS, Y. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43784–43791, 2001.

LAN, C.Y.; NEWPORT, G.; MURILLO, L.A.; JONES, T.; SCHERER, S.; DAVIS, R.W. & AGABIAN, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(23): 14907-14912, 2002.

LARSEN, B. & WHITE, S. Antifungal effect of hydrogen peroxide on catalase-producing strains of *Candida* spp. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 3(2): 73-78, 1995.

LEE, Y.Y.; KIM, S.J.; PARK, E.H. & LIM, C.J. Glutathione content and the activities of glutathione-synthesizing enzymes in fission yeast are modulated by oxidative stress. *The Journal of Microbiology*, 41(3): 248-51, 2003.

LEES, E. & BARTON, R.C. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(1): 13-17, 2003.

LEHRER, R.I. Antifungal effects of peroxidase systems. *Journal of Bacteriology*, 99(2): 361-365, 1969.

LEMAR, K.M.; AON, M.A.; CORTASSA, S.; O'ROURKE, B.; MÜLLER, C.T. & LLOYD, D. Diallyl disulphide depletes glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon microscopy. *Yeast*, 24(8): 695-706, 2007.

LIGUORI, G.; GALLÉ, F.; LUCARIELLO, A.; DI ONOFRIO, V.; ALBANO, L.; MAZZARELLA, G.; D'AMORA, M. & ROSSANO, F. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. *New Microbiologica*, 33(1): 63-67, 2010.

LINARES, C.E.B.; GRIEBELER, D.; CARGNELUTTI, D.; ALVES, S.H.; MORSCH, V.M. & SCHETINGER, M.R.C. Catalase activity in *Candida albicans* exposed to antineoplastic drugs. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 3): 259-262, 2006.

LINARES, C.E.B.; LORETO, E.S.; SILVEIRA, C.P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L.A.; SANTURIO, J.M. & ALVES, S.H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49(4): 203-206, 2007.

LINARES, C.E.B. Avaliação da atividade da superóxido dismutase e catalase de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* expostas a antineoplásicos, íons metálicos e antifúngicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DiDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A. & FINK, G.R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5): 939-949, 1997.

LOPES DA ROSA, J.; BOYARTCHUK, V.L.; ZHU, L.J. & KAUFMAN, P.D. Histone acetyltransferase Rtt109 is required for *Candida albicans* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(4): 1594-1599, 2010.

LORETO, E.S.; SCHEID, L.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; SANTURIO, J.M. & ALVES, S.H. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*, 169(6): 431-443, 2010.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P. & YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8): 2971-2974, 2001.

LUO, G. & MITCHELL, T.G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8): 2860-2865, 2002.

LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; BOLDRINI, A.; CAMPA, M. & SENESI, S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7): 2363-2369, 2002.

MACCALLUM, D. 9<sup>th</sup> ASM conference on *Candida* and candidiasis. *FEMS Yeast Research*, Conference Report, 2008.

MAGER, W.H. & HOHMANN, S. Yeast stress responses. First edition. Kluwer Academic Publishers Group, 1997.



MANAVATHU, M.; GUNASEKARAN, S.; PORTE, Q.; MANAVATHU, E. & GUNASEKARAN, M. Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(1): 76-79, 1996.

MANFREDINI, V.; ROEHRS, R.; PERALBA, M.C.; HENRIQUES, J.A.; SAFFI, J.; RAMOS, A.L. & BENFATO, MS. Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* sod1deltasod2delta double mutants against oxidative damage. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(2): 159-165, 2004.

MANFREDINI, V.; DUARTE MARTINS, V.; RUARO PERALBA, M. do C. & BENFATO, M.S. Adaptive response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276(1-2): 175-181, 2005.

MARINHO, S.A.; TEIXEIRA, A.B.; SANTOS, O.S.; CAZANOVA, R.F.; FERREIRA, C.A.S.; CHERUBINI, K. & de OLIVEIRA, S.D. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2): 286-294. 2010.

MAVOR A.L.; THEWES, S. & HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*, 6(8): 863-874, 2005.

MICHÁN, 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*, 9(7): 1078-1090, 2009.

MICHELIS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O. & REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine*, 17(3): 235-248, 1994.

MIYASAKA, N.R.S.; UNTERKIRCHER, C.S.; CARVALHO, P.O. & SHIMIZU, M.T. Electrophoretic variants of intracellular catalase of different *Candida* species. *Mycopathologia*, 158(2): 187-193, 2004.

MILAN, E.P. & ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G., ed. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. p. 89-101.

MOCHON, A.B.; YE, J.; KAYALA, M.A.; WINGARD, J.R.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; FELGNER, P.; BALDI, P. & LIU, H. Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathogens*, 6(3): e1000827.

MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P. & MAGER, W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19(4): 651-658, 1995.

MORAN, G.P. & JABRA-RIZK, M.A. 8<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and candidiasis: molecular tools provide insights into host-pathogen interactions. *Mycopathologia*, 162(1): 17-24, 2006.

MOSCA, C.O.; MORAGUES, M.D.; LLOVO, J.; AL MOSAID, A.; COLEMAN, D.C. & PONTÓN, J. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3): 1259-1262, 2003.

MOYE-ROWLEY, W.S. Transcription Factors Regulating the Response to Oxidative Stress in Yeast. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1): 123-140, 2002.

MOYE-ROWLEY, W.S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell*, 2(3): 381-389, 2003.

MURAYAMA, S.Y.; NEGISHI, Y.; UMEYAMA, T.; KANEKO, A.; OURA, T.; NIIMI, M.; UBUKATA, K. & KAJIWARA, S. Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology*, 152(Pt 5): 1551-1558, 2006.

NAGLIK, J.R.; RODGERS, C.A.; SHIRLAW, P.J.; DOBBIE, J.L.; FERNANDES-NAGLIK, L.L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N. & CHALLACOMBE, S.J. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(3): 469-479, 2003.

NANTEL, A.; DIGNARD, D.; BACHEWICH, C.; HARCUS, D.; MARCIL, A.; BOUIN, A.P.; SENSE, C.W.; HOGUES, H.; VAN HET HOOG, M.; GORDON, P.; RIGBY, T.; BENOIT, F.; TESSIER, D.C.; THOMAS, D.Y. & WHITEWAY, M. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Molecular Biology of the Cell*, 13(10): 3452-3465, 2002.

NAOUM, P.C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 18: 75-81, 1996.

NASUTION, O.; SRINIVASA, K.; KIM, M.; KIM, Y.J.; KIM, W.; JEONG, W. & CHOI, W. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 7(11): 2008-2011, 2008.

NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J. & GOW, N.A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1): 67-78, 2008.

NETT, J.E.; GUTE, K.M.; RINGEISEN, A.; HOLOYDA, K.A. & ANDES, D.R. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9): 3411-3413, 2008.

NIKOLAOU, E.; AGRAFIOTI, I.; STUMPF, M.; QUINN, J.; STANSFIELD, I. & BROWN, A.J.P. Phylogenetic diversity of stress signaling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 44, 2009.

NG, C.F.; SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. & RODGERS, V.G. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into *in vivo* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GPx concentrations. *Free Radical Research*, 41(11): 1201-1211, 2007.

ODDS, F.C. *Candida* and candidosis. 2<sup>nd</sup> edition. W.B. Saunders Company, 1988.

OKUNGBOWA, F.I.; GHOSH, A.K.; CHOWDHURY, R.; CHAUDHURI, P.; BASU, A. & PAL, K. Mechanical lysis of *Candida* cells for crude protein and enzymatic activity estimation: comparison of three methods. *World Journal of Medical Sciences*, 2(2): 101-104, 2007.

PACHECO, C.C.; PASSOS, J.F.; CASTRO, A.R.; MORADAS-FERREIRA, P. & DE MARCO, P. Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*, 189(3): 271-280, 2008.

PANG, S.Y.M.; TRISTRAM, S. & BROWN, S. The contribution of growth rate to the pathogenicity of *Candida* spp. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(2): 80-86, 2010.

PEDREÑO, Y.; GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; CONESA, S.; MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; AGUINAGA, A.; HERNÁNDEZ, J.A. & ARGÜELLES, J.C. The cellular resistance against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is independent of neutral trehalase (Ntc1p) activity in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 6(1): 57-62, 2006.

PEDREÑO, Y.; GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; SENTANDREU, R.; VALENTÍN, E. & ARGÜELLES, J.C. Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology*, 153(Pt 5): 1372-1381, 2007.

PENNINCKX, M.J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*; 2(3): 295-305, 2002.

PEREIRA, M.D.; HERDEIRO, R.S.; FERNANDES, P.N.; ELEUTHERIO, E.C. & PANEK, A.D. Targets of oxidative stress in yeast *sod* mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620(1-3), 245-251, 2003.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L. & HOLLIS, R.J. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1,586 Recent Clinical Isolates of *Candida* Species Determined by Broth Microdilution, Disk Diffusion, and Etest Methods: Report from The ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1440-1446, 2003.

PFALLER, M.A. & DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1): 133-163, 2007.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D. & COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Microbiology*, 36(7): 2093-2095, 1998.

PIPER, P.W.; ORTIZ-CALDERON, C.; HOLYOAK, C.; COOTE, P. & COLE, M. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones*, 2(1): 12-24, 1997.

POTOKA, D.A.; TAKAO, S.; OWAKI, T.; BULKLEY, G.B. & KLEIN, A.S. Endothelial cells potentiate oxidant-mediated Kupffer cell phagocytic killing. *Free Radical Biology & Medicine*, 24(7-8): 1217-1227, 1998.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D. & GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20(1):7-14, 1982.

QUINN, J.; FINDLAY, V.J.; DAWSON, K.; MILLAR, J.B.; JONES, N.; MORGAN, B.A. & TOONE, W.M. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of Cell*, 13(3): 805-816, 2002.

REDDING, S.W. Emerging Yeast Pathogens. *ISHAM*: 177-178, San Antonio, Texas, 2003.

RIPPON, J.N. *Medical Mycology*. Saunders, Philadelphia, 1988.

RODAKI, A.; BOHOVYCH, I.M.; ENJALBERT, B.; YOUNG, T.; ODDS, F.C.; GOW, N.A.R. & BROWN, A.J.P. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 20(22): 4845-4855, 2009.

RODRIGUES, A.G.; PINA-VAZ, C. & COSTA-DE-OLIVEIRA, S. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5792-5793, 2003.

ROGERS, P.D. & BARKER, K.S. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11): 3412-3417, 2002.

ROGERS, P.D. & BARKER, K.S. 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*, 47(4): 1220-1227, 2003.

ROILIDES, E.; WALSH, T.J.; RUBIN, M.; VENZON, D. & PIZZO, P.A. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2): 196-201, 1990.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J. & ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2): 225-227, 2009.

ROSSIGNOL, T.; LOGUE, M.E.; REYNOLDS, K.; GRENON, M.; LOWNDES, N.F. & BUTLER, G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7): 2304-2312, 2007.

RUBIN-BEJERANO, I.; FRASER, I.; GRISAFI, P. & FINK, G. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(19): 11007-11012, 2003.

RUIS, H. & SCHÜLLER, C. Stress signaling in yeast. *Bioessays*, 17(11): 959-965, 1995.

SABLE, C.A.; STROHMAIER, K.M. & CHODAKEWITZ, J.A. Advances in antifungal therapy. *Annual Review of Medicine*, 59: 361-379, 2008.

SAIJO, T.; MIYAZAKI, T.; IZUMIKAWA, K.; MIHARA, T.; TAKAZONO, T.; KOSAI, K.; IMAMURA, Y.; SEKI, M.; KAKEYA, H.; YAMAMOTO, Y.; YANAGIHARA, K. & KOHNO, S. Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 169(2): 81-90, 2010.

SAMARANAYAKE, Y.H.; DASSANAYAKE, R.S.; JAYATILAKE, J.A.; CHEUNG, B.P.; YAU, J.Y.; YEUNG, K.W. & SAMARANAYAKE, L.P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 54(Pt 6): 583-593, 2005.

SAMPAIO, P.; NOGUEIRA, E.; LOUREIRO, A.S.; DELGADO-SILVA, Y.; CORREIA, A. & PAIS, C. Increased number of glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the resistance to stress agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4): 395-404, 2009.

SAMPAIO, P.; SANTOS, M.; CORREIA, A.; AMARAL, F.E.; CHAVÉZ-GALARZA, J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CASTRO, A.G.; PEDROSA, J. & PAIS, C. Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with recurrent bloodstream infection. *PLoS ONE*, 5: e10155, 2010.

SASADA, M. & JOHNSTON JR., R.B. Macrophage microbicidal activity – correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 152(1): 85-98, 1980.

SCHALLER, M.; MAILHAMMER, R.; GRASSL, G.; SANDER, C.A.; HUBE, B. & KORTING, H.C. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(4): 652-657, 2002.

SCHULZE, J. & SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(51-51): 837-842, 2009.

SCOTT, B. & EATON, C.J. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 488-493, 2008.

SENEVIRATNE, C.J.; WANG, Y.; JIN, L.; ABIKO, Y. & SAMARANAYAKE, L.P. *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics*, 8(14): 2936-2947, 2008.

SHAPIRA, E.; BEN-YOSEPH, Y. & AEBI, H. Nature of residual erythrocyte catalase activity in Swiss-type acatalasemia. *Enzyme*, 17(5): 307-318, 1974.

SHUPPE-KOISTINEN, I.; GERDES, R.; MOLDEUS, P. & COTGREAVE, I.A. Studies on the reversibility of protein S-thiolation in human endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(2): 226-234, 1994.

SILVA, J.O.; FERREIRA, J.C. & CANDIDO, R.C. Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(3): 354-355, 2007.

SOBEL, J.D. Changing trends in the epidemiology of *Candida* blood stream infections: a matter for concern? *Critical Care Medicine*, 38: 990-992, 2010.

SOKOL-ANDERSON, M.; SLIGH JR., J.E.; ELBERG, S.; BRAITBURG, J.; KOBAYASHI, G.S. & MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(5): 702-705, 1988.

SMITH, D.A.; NICHOLLS, S.; MORGAN, B.A.; BROWN, A.J. & QUINN, J. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(9): 4179-4190, 2004.

SPOLIDORIO, D.M.P.; BORIOLLO, M.F.G.; ESTRELA, C. & SPOLIDORIO, L.C. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. *Robrac*, 18(45): 18-16, 2009.

SRIKANTHA, T.; ZHAO, R.; DANIELS, K.; RADKE, J. & SOLL, D.R. Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryotic Cell*, 4(8): 1434-1445, 2005.

STADTMAN, E.R. & LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4): 207-218, 2003.

STRUS, M.; BRZYCHCZY-WLOCH, M.; KUCHARSKA, A.; GOSIEWSKI, T. & HECZKO, P.B. Inhibitory activity of vaginal *Lactobacillus* bacteria on yeasts causing vulvovaginal candidiasis. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 57(1): 7-17, 2005.

SUDBERY, P.; GOW, N. & BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7): 317-324, 2004.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E. & COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141(Pt 7): 1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C. & COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 4(4-5): 369-76, 2004.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A. & SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1): 91-93, 2007.

TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G. & DAWES, I.W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15(6): 319-326, 2005.

THEWES, S.; KRETSCHMAR, M.; PARK, H.; SCHALLER, M.; FILLER, S.G. & HUBE, B. *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida*

*albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Molecular Microbiology*, 63(6): 1606-1628, 2007.

THOMAS, A.H. Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 17(3): 269-279, 1986.

THOMPSON, H.L. & WILTON, J.M.A. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clinical and Experimental Immunology*, 87(2): 316-321, 1992.

THORPE, G.W.; FONG, C.S.; ALIC, N.; HIGGINS, V.J. & DAWES, I.W. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(17): 6564-6569, 2004.

TOSELLO, M.E.; BIASOLI, M.S.; LUQUE, A.G.; MAGARÓ, H.M. & KRAPP, A.R. Oxidative stress response involving induction of protective enzymes in *Candida dubliniensis*. *Medical Mycology*, 45(6): 535-540, 2007.

URBAN, C.F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V. & ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4): 668-676, 2006.

URSO, M.L. & CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2): 41-54, 2003.

VAN ASBECK, E.C.; CLEMONS, K.V. & STEVENS, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4): 283-309, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S. & KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30(5): 1323-1338, 2007.

VÁZQUEZ-TORRES, A. & BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2): 170-192, 1997.

VOS, M.C.; ENDTZ, H.P.; HORST-KREFT, D.; DOORDUIJN, J.; LUGTENBURG, E.; VERBRUGH, H.A.; LÖWENBERG, B.; DE MARIE, S.; VAN PELT, C. & VAN BELKUM, A. *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3): 1111-1114, 2006.

WALLACE, M.A.; BAILEY, S.; FUKUTO, J.M.; VALENTINE, J.S. & GRALLA, E.B. Induction of phenotypes resembling CuZn-Superoxide dismutase deletion in wild-type yeast cells: an *in vivo* assay for the role of superoxide in the toxicity of redox-cycling compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 18(8):1279-86, 2005.

WEBER, K.; SOHR, R.; SCHULZ, B.; FLEISCHHACKER, M. & RUHNKE, M. Secretion of *E,E*-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5): 1859-1861, 2008.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K. & KRYSAN, D.J. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infection and Immunity*, 77(1): 405-413, 2009.

WESTWATER, C.; BALISH, E. & SCHOFIELD, D.A. *Candida albicans* conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic cell*, 4(10): 1654-1661, 2005.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases*, 20(1): 115-125, 1995.

WYSONG, D.R.; CHRISTIN, L.; SUGAR, A.M.; ROBBINS, P.W. & DIAMOND, R.D. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection and Immunity*, 66(5): 1953-1961, 1998.

XIONG, J.; KANG, K.; LIU, L.; YOSHIDA, Y.; COOPER, K.D. & GHANNOUM, M.A. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infection and Immunity*, 68(5): 2464-2469, 2000.

XU, J.; MILLAR, B.C.; MOORE, J.E.; McCLURG, R.; WALKER, M.J.; EVANS, J.; HEDDERWICK, S. & McMULLAN, R. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections. *Journal of Clinical Pathology*, 55(10): 774-777, 2002.

YANG, R.; MOHAN, N.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN, N. & GUNASEKARAN, M. Influence of cultural conditions on glutathione peroxidase synthesis in *Candida albicans*. *Asian Journal of Biochemistry*, 4: 99-105, 2009.

YOUNG, I.S. Measurement of total antioxidant capacity. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5): 339, 2001.

ZHANG, H.Y.; LI, X.J.; GAO, N. & CHEN, L.L. Antioxidants used by *Deinococcus radiodurans* and implications for antioxidant drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6): 476-476, 2009.

ZIEGELHOFFER, E.C. & DONOHUE, T.J. Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12): 856-63, 2009.



*Curriculum Vitae*

**ABEGG, M.A.**

**1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Maxwel Adriano Abegg

Local e data de nascimento: Três Passos – RS, Brasil em 30/08/1976

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 9500, prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: 51 3308 7603

E-mail: maxabegg@click21.com.br

**2. FORMAÇÃO:** curso de graduação em Farmácia e Bioquímica (Análises Clínicas – Universidade Católica de Pelotas, UCPEL, Pelotas – RS, Brasil, 1994-1998); curso de mestrado em Biologia Celular e Molecular (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre – RS, Brasil, 2001-2003); curso de doutorado em Biologia Celular e Molecular (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre – RS, Brasil, 2006).

**3. ESTÁGIOS:** estágio no Laboratório Escola de Análises Clínicas da Universidade Católica de Pelotas – UCPEL (1998-1998); Estágio de Análises Clínicas no Laboratório de Análises Clínicas Fora de Hora, Pelotas – RS, Brasil (08/1997-01/1998).

**4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

**2008** - Professor Homenageado - Nome de Turma. Curso de Farmácia, Universidade Paranaense - Campus Toledo – PR

**2002** - Co-autor de Trabalho Destaque: "Isolamento e Caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras fecais de aves no RS" no XIV Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

**1998** - Diploma Dom Zattera (UCPel) - Modalidade - Análises Clínicas: Melhor Rendimento Acadêmico, Universidade Católica de Pelotas, UCPel, Pelotas, Brasil

**1997** - Diploma Dom Zattera (UCPel) - Curso de Farmácia: Melhor Rendimento Acadêmico, Universidade Católica de Pelotas, UCPel, Pelotas, Brasil

**1990** - Certificado de Conhecimentos Básicos na Língua Alemã, Fachberatung für Deutsch in Rio Grande do Sul - Santa Catarina - Paraná - Goethe Institut

**5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

**União de Ensino do Sudoeste do Paraná – UNISEP 2005 – 2005** - Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 8, Regime: Parcial

**Universidade Paranaense – UNIPAR 2004 – 2009** - Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor Adjunto - Horista, Carga horária: 33, Regime:

Parcial

**Drogaria Guapuruvu – MAIAS 2003 – 2004** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Prolabho Distribuidora de Produtos para Saúde Ltda – PROLABHO 2000 – 2001** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Assessor Científico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Ecofarmi - Farmácias Ltda - Osório-RS – ECOFARMI 2000 – 2001** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Serviço Social da Indústria do Estado do Rio Grande do Sul - SESI/RS 1999 – 2000** Vínculo: Farmacêutico-volante, Enquadramento funcional: Farmacêutico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Drogaria Farmaeconômica Ltda. – ECONÔMICA 1999 – 1999** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Farmácia Guajuvira Ltda. - FARMÁCIA MARIM 1998 – 1999** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Darci de Mello & Cia Ltda. – DROGABEL 1998 – 1998** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Vithória Comercial Distribuidora e Importadora Ltda. – VITHORIA 1998 - 1998** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Santa Casa de Misericórdia de Pelotas/RS - SCM/PELOTAS-RS 1998 – 1998** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 10, Regime: Parcial

**Farmácia Batista Flores - BATISTA FLORES 1998 – 1998** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**Universidade Católica de Pelotas – UCPEL 1998 – 1998** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Laboratório de Análises Clínicas Fora de Hora - Pelotas/RS - FORA DE HORA 1997 – 1998** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**E. V. Silveira Ltda - Farmácias - E. V. SILVEIRA 1997 – 1998** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Farmacêutico Responsável Técnico, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

## 6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

ABEGG, M.A.; LUCIETTO, R.; ALABARSE, P.V.G.; MENDES, M.F.A. & BENFATO, M.S. Differential resistance to oxidants and production of hydrolytic enzymes in *Candida albicans*. *Mycopathologia* (no prelo)

ABEGG, M.A.; ALABARSE, P.V.G.; CASANOVA, A.; HOSCHEID, J.; SALOMON, T.B.; HACKENHAAR, F.S.; MEDEIROS, T.M. & BENFATO, M.S. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, 170: 11-20, 2010.

RORIG, K.C.O.; COLACITE, J. & ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência *in*

*vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42: 1-3, 2009.

SCHUTZ, M.V.; VELAZQUEZ, C.C. & ABEGG, M.A. Avaliação da qualidade microbiológica das drogas vegetais mais comercializadas em farmácias de manipulação de Toledo - Pr. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 12: 181 - 186, 2008.

MAIER, C.R. & ABEGG, M.A. Avaliação da utilização de antibióticos por profissionais de saúde e pela população na cidade de Toledo, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 11: 19 - 25, 2007.

ZANCONATO, R.V.; PEREIRA, W.K.V. & ABEGG, M.A. Condição microbiológica de colchões hospitalares antes e após a sua desinfecção. *Prática Hospitalar* (Online), v.IX, 2007.

da MATA, P.T.G. & ABEGG, M.A. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. *Arquivos do Mudi* (Online), 11: 20-25, 2007.

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia*, 161: 83-91, 2006.

## **7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

MENDES, M.F.A.; ABEGG, M.A.; MEDEIROS, T.M.; HACKENHAAR, F.S.; ALABARSE, P.V.G.; SALOMON, T.B.; SHULLER, A.R. & BENFATO, M.S. "Protein and lipid damage sensitive in *Candida* sp." In: Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009; VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009, Santiago - Chile.

ABEGG, M.A.; ALABARSE, P.V.G.; HACKENHAAR, F.S.; SALOMON, T.B.; MENDES, M.F.A.; SCHÜLLER, A.R.; MEDEIROS, T.M. & BENFATO, M.S. "Response to oxidative stress in eight human pathogenic species of the Genus *Candida*". In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS"., 2009, Porto Alegre - RS.

ABEGG, M.A.; HONORATO, R.R. & BENFATO, M.S. "Response to oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in seven human pathogenic *Candida* species". In: Free Radicals in Montevideo - V Meeting of SFRBM and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideu.

ABEGG, M.A. & BENFATO, M.S. "Resposta ao estresse oxidativo em oito espécies patogênicas do gênero *Candida*". In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Centro de Biotecnologia - RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2007, Porto Alegre.

MAIER, C.R.; OLIVEIRA, C.L. & ABEGG, M.A. "Avaliação da utilização de antibióticos pela população de Toledo - PR". In: 5o Encontro de Iniciação Científica e 5o Fórum de Pesquisa, 2006, Umuarama - PR.

ABEGG, M. A. & HORTA, J. "Avaliação da resposta imune humoral frente a proteínas da levedura *Cryptococcus neoformans*" In: XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2003, Rio de Janeiro RJ.

ABEGG, M. A. & HORTA, J. "Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras fecais de aves no Rio Grande do Sul" In: XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2003, Rio de Janeiro.

ABEGG, M. A. "Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras fecais de aves no RS" In: XIV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2002, Porto Alegre.

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L. & VAINSTEIN, M.H. "Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais fontes ambientais inexploradas no RS" In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002, Porto Alegre/RS.