

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CARLA BENEDINI RIBEIRO JORGE FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE
DE *Candida albicans* NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS**

Alfenas/MG

2019

CARLA BENEDINI RIBEIRO JORGE FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE
Candida albicans NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Interação Patógeno-hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias

Alfenas/MG

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, MG.
CEP: 37130-901



CARLA BENEDINI RIBEIRO JORGE FERREIRA

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE *Candida albicans* NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE ANTIFÚNGICOS”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 9 de agosto de 2019.

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Amanda B. Tranches

Profa. Dra. Márcia de Souza de Carvalho
Melhem
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura: Márcia M. Melhem

Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Fábio A. Colombo

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Ferreira, Carla Benedini Ribeiro Jorge
F383a Avaliação da expressão de genes da resposta antioxidante de
Candida albicans na ausência e presença de concentrações
subinibitórias de antifúngicos / Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira.
-- Alfenas/MG, 2019.
79 f.: il. --

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Candida albicans. 2. Expressão Gênica. 3. Anfotericina B. 4.
Fluconazol. 5. Caspofungina. I. Dias, Amanda Latercia Tranches . II.
Título.

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

Dedico esse trabalho à minha mãe Flávia, ao Vovô Júlio e à Vovó Tetê (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, persistência e resiliência concedidas a mim durante esses dois anos. Agradeço à minha mãe Flávia, por todo amor, e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos, além de proporcionar condições para que eu chegasse até aqui. Ao meu “avohai” Júlio Cezar, meu exemplo, obrigada por cada conversa e por cada incentivo. À minha avó Maria Thereza, que por pouco não acompanhou neste plano o início dessa jornada que ela tanto apoiava em vida, e por sempre me fazer sentir sua presença nos momentos alegres e nos difíceis. Aos meus tios, primos, “amigos chegados” e meu namorado Ramon por aguentarem meus estresses, minhas irritações e minhas reclamações. Obrigada a todos vocês!

Gratidão à minha orientadora Dra. Amanda Latercia Tranches Dias, pela disponibilidade desde a Iniciação Científica e por ter sido durante todos esses anos muito mais que uma orientadora, mas também uma base e uma referência.

À minha amiga e colega de laboratório doutoranda Josidel Conceição Oliver, os meus mais sinceros agradecimentos por me repassar seus conhecimentos.

Aos demais colegas de laboratório, Alexandre, Daniel, Letícia, Natália, Laís e Naiara, pelas boas conversas e trocas de experiências. Aos meninos do Laboratório de Vacinas, Gabriel e Ezequiel pela amizade, vocês são demais.

Obrigada à doutoranda Juliana Nunes pelas conversas e ensinamentos no laboratório de Biologia Molecular, sentirei muitas saudades.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan, ao Prof. Dr. Marcos José Marques e à Profa. Dra. Gérsika Bitencourt pelas sugestões e atenção na minha qualificação: vocês são grandes exemplos para mim.

Obrigada ao Prof. Dr. Luiz Cosme Malaquias e Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho por disponibilizarem o laboratório de Vacinas sempre que precisei e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, professores do PPGCB, Martha pela convivência nas disciplinas e durante as reuniões do colegiado e todos os técnicos e funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unifal: obrigada a todos vocês.

Agradeço, de antemão, a disponibilidade de todos que compuseram minha banca de defesa da dissertação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, Prof. Dr. Fabio Antonio Colombo, Prof Dra. Hadassa Santos e, novamente, à Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia.”

João Guimarães Rosa.

RESUMO

Infecções fúngicas invasivas são consideradas um grave problema, principalmente no que se refere a pacientes imunocomprometidos e ao tratamento antifúngico. Dentre essas infecções, destacam-se as causadas pelo gênero *Candida* spp., principalmente *C. albicans*, por seus inúmeros fatores associados à virulência. Estas espécies apresentam inúmeros fatores associados à virulência e habilidade em evadir o sistema imune do hospedeiro, fazendo com que haja recorrência de infecções em âmbito hospitalar e na comunidade. No hospedeiro, as células fagocíticas respondem a diversos estímulos microbianos com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis, em parte, pela atividade microbicida dessas células, que atuam a nível proteico, lipídico e genético. Na resposta central frente ao ambiente oxidante encontra-se o gene *CAP1*, do inglês “adenylate cyclase-associated protein”, responsável pela ativação de diversos outros genes associados ao estresse oxidativo, e, cuja requisição à tolerância ao ambiente oxidante por *C. albicans* é conhecida. Ao decorrer da cascata antioxidante, outros genes são ativados, como os da família das *SODs* (*SOD1-6*) e catalase (*CAT1*), cujas funções são dismutar ERO tais como o superóxido e decompor o peróxido de hidrogênio, respectivamente. Os antifúngicos utilizados na clínica, tanto com finalidade profilática ou de tratamento, incluem anfotericina B, fluconazol e caspofungina, sendo de extrema importância os testes de sensibilidade para compor os guias terapêuticos de tratamento de candidíases. Tem sido atribuído a estes antifúngicos, como mecanismo de ação adicional, o aumento da produção de ERO, o que pode contribuir com o efeito positivo do tratamento, mas, em contrapartida, pode colaborar com o aumento da resistência do fungo a essas espécies. O trabalho objetivou avaliar o processo de fagocitose e a capacidade fungicida dos macrófagos frente às amostras tratadas com as concentrações subinibitórias dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina, bem como a expressão diferencial dos genes *CAP1*, *SOD1-6* e *CAT1* em *C. albicans* SC4314, 121 e 221-V por RT-PCR. O tratamento com a caspofungina promoveu a maior expressão de, praticamente, todos os genes estudados, em todos isolados, porém todos os antifúngicos modularam, positiva ou negativamente, a expressão relativa de todos os genes. O pré-tratamento com a caspofungina parece ter protegido o fungo frente ao ataque de macrófagos. O tratamento com doses subinibitórias promove diversos tipos de estresse, dentre eles o oxidativo, o qual ocasiona alterações no perfil de transcrição de genes da resposta antioxidante e isso pode favorecer o fungo na luta contra o sistema imune do hospedeiro, podendo influenciar diretamente na terapia ou profilaxia antifúngica de doenças fúngicas invasivas de interesse médico.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Interação Patógeno-hospedeiro. Expressão gênica. Anfotericina B. Fluconazol. Caspofungina.

ABSTRACT

Invasive fungal infections are considered a serious problem, especially in immunocompromised patients and antifungal treatment. Among these infections, the ones caused by the genus *Candida* spp., Mainly *C. albicans*, stand out because of their innumerable factors associated with virulence. These species present numerous factors associated with virulence and the ability to evade the immune system of the host, causing a predominance of infections in the hospital and the community. In the host, phagocytic cells respond to various microbial stimuli with the production of reactive oxygen species (ROS), which are responsible in part for the microbicidal activity of these cells, which act at the protein, lipid, and genetic levels. In the central response to the oxidant environment is the *CAP1* gene, which is responsible for the activation of several other genes associated with oxidative stress, and whose requisition for tolerance to the oxidant environment by *C. albicans* is known. In the course of the antioxidant cascade, other genes are activated, such as those in the *SOD* family (*SOD1-6*) and catalase (*CAT1*), whose functions are to disrupt ROS such as superoxide and to decompose hydrogen peroxide, respectively. The antifungal agents used in the clinic, both for prophylactic or treatment, include amphotericin B, fluconazole and caspofungin, with sensitivity tests being extremely important for effective administration. It has been attributed to these antifungals, as an additional mechanism of action, the increase of ROS production, which may contribute to the positive effect of the treatment, but, on the other hand, may contribute to the increase of resistance of the fungus to these species. This work aimed to evaluate the phagocytosis process and the fungicidal capacity of macrophages in the samples treated with the subinhibitory concentrations of the antifungal agents amphotericin B, fluconazole and caspofungin, as well as the differential expression of *CAP1*, *SOD1-6* and *CAT1* genes in *C. albicans* SC4314, 121 and 221-V by RT-PCR. Treatment with caspofungin promoted the highest expression of practically all genes studied in all isolates, but all antifungal modulates, either positively or negatively, the relative expression of all genes. Pre-treatment with caspofungin appears to have protected the fungus from macrophage attack. Treatment with subinhibitory doses promotes several types of stress, among them oxidative, which causes alterations in the transcription profile of the antioxidant response genes and this may favor the fungus in the fight against the immune system of the host, being able to directly influence the therapy or antifungal prophylaxis of invasive fungal diseases of medical interest.

Keywords: *Candida albicans*. Pathogen-host interaction. Gene expression. Amphotericin B. Fluconazole. Caspofungin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais morfologias assumidas por espécies de <i>Candida</i> spp.....	20
Figura 2 - Distribuição das infecções por espécies do gênero <i>Candida</i> spp. de 2003 2004 em 11 hospitais terciários de 9 cidades brasileiras.....	22
Figura 3 - Possíveis desfechos durante a interação de <i>C. albicans</i> com o fagócito.....	24
Figura 4 - Manutenção do equilíbrio redox nas células fúngicas.....	26
Figura 5 - <i>CAP1</i> na resposta central ao ambiente oxidante.....	27
Figura 6 - Interior do fagossoma durante a fagocitose de <i>C. albicans</i>	28
Figura 7 - Alguns fatores de virulência associados à <i>C. albicans</i>	32
Figura 8 – Esquema da formação de biofilmes.....	33
Figura 9 - Mecanismo de ação da anfotericina B.....	35
Figura 10 - Mecanismo de ação de fármacos azólicos.....	36
Figura 11 - Mecanismo de ação da caspofungina.....	37
Figura 12 - Integridade do RNA extraído.....	49
Figura 13 - Gel de agarose dos amplificadores da PCR convencional.....	51
Figura 14 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de anfotericina B.....	52
Figura 15 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de fluconazol.....	54
Figura 15 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de caspofungina.....	56
Figura 16 - Porcentagem de morte de <i>C. albicans</i> tratadas com antifúngicos em contato com macrófagos.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade dos isolados de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina	47
Tabela 2 - Concentrações de trabalho dos antifúngicos utilizados nos cultivos dos isolados de <i>C. albicans</i>	48
Tabela 3 – Sequência dos primers	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CuZnSod	Sodp dependente de cobre e zinco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP's	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPEC	Dicarbonato dietila
ERO	espécies reativas de oxigênio
EUCAST	“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
GPI	glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IC	concentração inibitória
MIC	concentração inibitória mínima
M-MLV RT	“Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase”
MnSod	Sodp dependente de manganês
MOI	multiplicidade de infecção
NADPH	nicotiamida adenina dinucleotídeo peroxidase
OH ⁻	radical hidroxila
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PAMPs	padrões moleculares associados aos patógenos
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PRRs	receptores transmembranas de reconhecimento de padrões
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute medium”
SFB	soro fetal bovino.
Sodp	superóxido dismutase - proteína.

SOD1-6 genes codificadores de superóxido dismutase

YEPD – Yeast Extract BacPeptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Espécies de <i>Candida</i> e infecções	20
3.2 O sistema imune frente às infecções fúngicas	24
3.3 Mecanismos antioxidantes em <i>Candida albicans</i>	26
3.4 Fatores de Risco para candidíases.....	31
3.5 Fatores associados à virulência	32
3.6 Tratamento antifúngico em candidíases	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Linhagens fúngicas e celular.....	40
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima	40
4.3 Cultivo de <i>C. albicans</i> com os antifúngicos.....	41
4.4 Cultivo das células fagocíticas THP-1	41
4.5 Carenciamento dos monócitos.....	42
4.6 Diferenciação das células monocíticas THP-1 em macrófagos	42
4.7 Interação patógeno-hospedeiro	43
4.8 Determinação da atividade fungicida dos fagócitos	43
4.9 Extração de RNA	43
4.10 Purificação do RNA.....	44
4.11 Transcrição Reversa (cDNA)	45
4.12 Confeção dos “primers”	46
4.13 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	46
4.14 Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR)....	46
4.15 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	48
5.2 Avaliação da integridade do RNA extraído	49
5.3 Avaliação da purificação do RNA.....	50
5.4 Avaliação dos “primers”	50
5.5 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	52

5.6 Avaliação da capacidade fungicida dos fagócitos	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais pode-se observar que, tanto em âmbito hospitalar quanto na comunidade, as infecções causadas por fungos se tornam mais frequentes. Dentre elas estão as causadas por microrganismos do gênero *Candida* spp. sendo uma das mais preocupantes e de maior incidência (BRAGA-SILVA et al., 2009). Espécies desse gênero pertencem à microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e vaginal, e são classificadas como organismos oportunistas, que vivem em harmonia com o hospedeiro, mas, em alguns casos, como em indivíduos imunodeprimidos ou procedimentos invasivos, podem se tornar patogênicos causando infecções (NAILIS et al., 2010, SARDI et al., 2013).

Em indivíduos saudáveis, a primeira linha de defesa frente a *Candida albicans* inclui fagócitos do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos (DANTAS et al., 2015). Os mecanismos de morte que os fagócitos exercem sobre as células fúngicas incluem mecanismos intra e extracelulares, oxidativo, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e não oxidativos (FRADIN et al., 2005). Quando o fungo é capaz de vencer a barreira imposta pelo sistema imune, surgem as infecções chamadas candidíases.

Segundo o “Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis” de 2016, guia que preconiza os tratamentos para diversos tipos de candidíases e candidemias, tanto a anfotericina B quanto o fluconazol são drogas de escolha, ainda que, no atual cenário os antifúngicos da classe das equinocandinas, como a caspofungina, sejam os elencados para tratamento de candidíases invasivas (PAPPAS et al., 2016).

A anfotericina B, descoberta na década de 1950, continua sendo administrada em infecções graves, tendo como fator limitante sua nefrotoxicidade severa (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). Já o fluconazol é considerado fármaco bem tolerado, com alta biodisponibilidade e boa absorção, entretanto, o tratamento prolongado pode induzir a mutações que levam à resistência ao tratamento (PERON et al. 2016). Na classe das equinocandinas, Caspofungina foi o primeiro agente a ser liberado para o tratamento de candidemia em pacientes neutropênicos e não neutropênicos (BENNETT, 2006). Além dos dos mecanismos

de ação já conhecidos, estudos têm mostrado que, fármacos azólicos, como o fluconazol, e, poliênicos, como a anfotericina B, levam a aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito, moléculas potencialmente oxidantes (FERREIRA et al., 2013). As moléculas oxidantes, às quais *C. albicans* fica exposta durante a colonização do tecido do hospedeiro, podem gerar o chamado estresse oxidativo, o qual leva a danos no material genético e proteínas, sendo tóxico para a maioria dos fungos (HROMATKA; NOBLE; JOHNSON, 2005; MORADAS-FERREIRA; COSTA, 2000).

Candida albicans possui a capacidade em sobreviver quando exposta ao ambiente oxidante. A essa resposta estão relacionadas algumas enzimas, como a catalase (Catp) e a superóxido dismutase (Sodp). As Sodp, uma família composta de seis genes (*SOD1-SOD6*) que codificam seis diferentes enzimas (Sod1p-Sod6p) dismutam os ânions superóxidos, $O_2^{\bullet-}$, convertendo-os em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, subsequentemente, a catalase o converte em H_2O e O_2 , afim de detoxificar o ambiente (FROHNER et al., 2008).

Entender alguns dos mecanismos que regem a relação patógeno-hospedeiro no que se refere ao conhecimento da resposta de *C. albicans* frente ao ambiente oxidante criado por células fagocíticas ou pelo tratamento com antifúngicos, é de extrema importância e relevância. Entender os mecanismos que regem a interação de fármacos x fungo x hospedeiro acabam por auxiliar em esquemas terapêuticos e contribuem para o desfecho clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos tratamentos antifúngicos com anfotericina B, fluconazol e caspofungina na expressão de genes da resposta antioxidante de *C. albicans*.

2.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *C. albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina.

Cultivar *C. albicans* SC5314, 121 e 221-v na ausência e presença de concentrações subinibitórias de anfotericina B, fluconazol e caspofungina.

Avaliar o crescimento de *C. albicans* tratada com os antifúngicos frente a ação de fagócitos.

Avaliar a expressão diferencial dos genes *CAP1*, *CAT1*, *SOD1-SOD6* por PCR em Tempo Real.

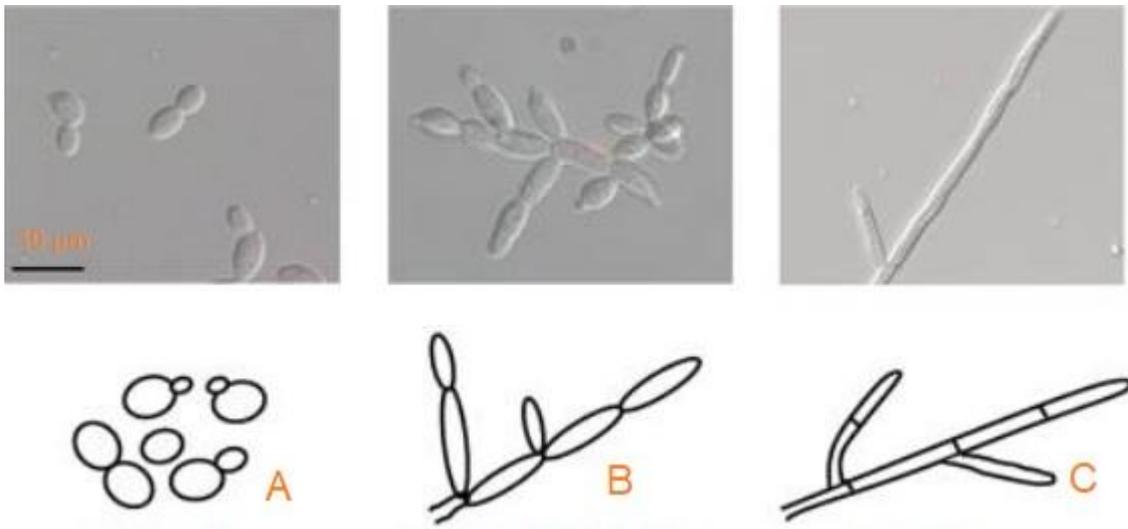
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécies de *Candida* e infecções

As leveduras do gênero *Candida* spp. pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, subclasse Saccharomycetidae, ordem Saccharomycetales (INDEX FUNGORUM). Este gênero compreende as principais leveduras causadoras de infecções, com cerca de 200 espécies (SIDRIM, ROCHA, 2004). Das infecções por *Candida* spp., 90% delas são causadas por cinco espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (TURNER, BUTLER, 2014). São organismos dimórficos que possuem a capacidade de modificar sua morfologia entre a forma de levedura e a forma filamentosa (SANCHEZ-MARTINEZ, PEREZ-MARTIN, 2001).

Os critérios considerados para a identificação através de aspectos morfológicos incluem: septo frágil típicos de blastoconídios e pseudo-hifas, septos maciços caracterizando hifas verdadeiras, áreas privilegiadas de brotamento ou ramificação, relações entre as condições de cultivo e crescimento de formas pleomórficas particulares, aparência fibrosa na superfície externa da parede celular de diferentes morfotipos, organização celular e hifálica como agregados (STANISZEWSKA et al., 2012). A Figura 1 ilustra as principais morfologias assumidas por essas espécies.

Figura 1 - Principais morfologias assumidas por espécies de *Candida* spp.



Fonte: adaptado de THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011.

Legenda: A leveduras, em B, pseudohifas e em C hifas verdadeiras.

São organismos diploides e vivem de forma comensal com o hospedeiro, onde habitam tecidos da cavidade oral, trato gastrointestinal e trato genitourinário, por exemplo, com exceção de *Candida glabrata* que é uma levedura de brotamento haploide. As características morfológicas juntamente do perfil bioquímico e molecular, auxiliam na identificação dessas espécies (LAVANIEGOS-SOBRINO et al., 2009; COLOMBO et al., 2013).

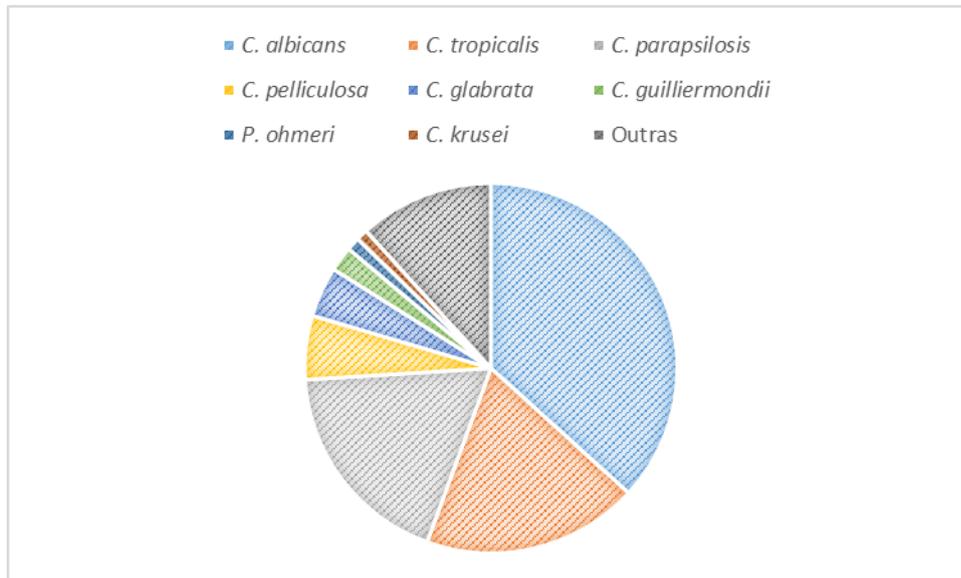
A relação patógeno-hospedeiro se mantém harmônica desde que o sistema imune do hospedeiro esteja íntegro e sem disfunções (CALDERONE, 2002). Por apresentarem relação de comensalismo com o hospedeiro, espécies desse gênero são classificadas como organismos oportunistas já que, em condições específicas e favoráveis, podem causar infecções (NAILIS et al., 2010). O comensalismo é uma das principais razões da versatilidade das candidíases, uma vez que, o fato dessas espécies sobreviverem em diferentes sítios anatômicos, garante a elas adaptações a diferentes tipos de estresse (VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009).

Infecções por *Candida* spp., são chamadas candidíases e são classificadas como localizadas ou sistêmicas. Os mecanismos de transmissão são principalmente, por via endógena, ou seja, quando espécies de *Candida* spp., constituintes da microbiota de diversos sítios anatômicos, se comportam como organismos

oportunistas causadores de doença, ou ainda, pela transmissão exógena, destacando-se a realizada pelas mãos dos profissionais de saúde durante os cuidados realizados em ambientes de atenção à saúde (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

As infecções localizadas podem afetar a superfície epidérmica e mucosa, incluindo a cavidade oral, faringe, intestino, bexiga e vagina. Isto ocorre na forma de candidíase orofaríngea, candidíase cutânea, candidíase esofágica e candidíase vulvovaginal (CALDERONE, 2002). As infecções sistêmicas acometem principalmente pacientes considerados de risco, ou seja, os imunocomprometidos, como aqueles que realizam tratamento imunossupressor para combater tumores ou em cirurgias de transplantes. Além desses, os chamados fatores de risco, incluem o uso de cateter venoso, o qual permite o acesso do fungo diretamente à corrente sanguínea, propiciando assim o surgimento da infecção sistêmica (KOH et al., 2008). Tanto as infecções causadas por *Candida albicans* e espécies não-*albicans* (NAC) de *Candida* spp. são predominantes em relação às infecções fúngicas oportunistas, em todo o mundo, sendo *C. albicans* considerada a principal espécie causadora de patogenias (PFALLER, DIEKEMA, 2007; KABIR, HUSSAIN, AHMAD, 2012; CORNISTEIN et al., 2013). Apesar da prevalência maior de *C. albicans* nas infecções em serviços de assistência à saúde, já foi possível constatar na última década que o somatório de infecções por NACs ultrapassou aqueles causados por *C. albicans*, como foi mostrado no “Brazilian Network Candidaemia Study”, realizado de 2003 a 2004, onde *C. albicans* era responsável por 40,9% dos casos no Brasil, seguindo por *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%), entre outras, como pode ser visualizado na Figura 2 (COLOMBO et al., 2006) As infecções por espécies não *albicans* são relevantes devido a maior virulência e patogenicidade observadas em alguns casos, especialmente em pacientes imunodeprimidos, levando a maior morbidade e mortalidade.

Figura 2 - Distribuição das infecções por espécies do gênero *Candida* spp. de 2003 a 2004 em 11 hospitais terciários de 9 cidades brasileiras.



Fonte: adaptado de COLOMBO et al., 2006.

Nota: *C. albicans* (40,9%) foi a espécie do gênero *Candida* spp. mais isolada, seguido de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%), *C. pelliculosa* (6,2%), *C. glabrata* (4,9%), *C. guilliermondii* (2,4%), *Pichia ohmeri* (1,3%) e *C. krusei* (1,1%) e outras (13%).

A alteração do quadro epidemiológico pelo aumento de NACs pode ser, em parte, devido à seleção de cepas menos sensíveis aos azólicos, como o fluconazol, amplamente utilizados no tratamento e profilaxia de candidíases (SANGUINETTI, POSTERARO, LASS-FLORL, 2015). Essa alteração é vista em vários locais, como no continente Asiático, Sul Europeu e América do Sul, onde somatório de casos envolvendo NACs já ultrapassaram as infecções causadas por *C. albicans*, e, embora essa mudança tenha sido observada nas últimas décadas, as alterações epidemiológicas variam entre hospitais e regiões, a depender das características de risco da população e do uso de antifúngicos (FALAGAS, ROUSSOS, VARDAKAS, 2010; ENOCH, et al., 2017). Por exemplo, das infecções sanguíneas encontradas em dois hospitais terciários no Brasil, um público e um privado, 6,9% eram oriundos de *Candida* spp., e nesses episódios, *C. parapsilosis* foi a espécie mais frequentemente isolada no hospital público, enquanto que, *C. glabrata*, com altos índices de resistência ao fluconazol, foi o agente predominante no hospital privado (COLOMBO et al., 2013).

Para o estabelecimento da infecção, patógenos oportunistas, como *C. albicans*, necessitam escapar do sistema imune, sobreviver, dividir-se no organismo do hospedeiro e serem capazes de migrar para outros tecidos, para aderir, invadir e colonizá-lo (YANG, 2003).

3.2 O sistema imune frente às infecções fúngicas

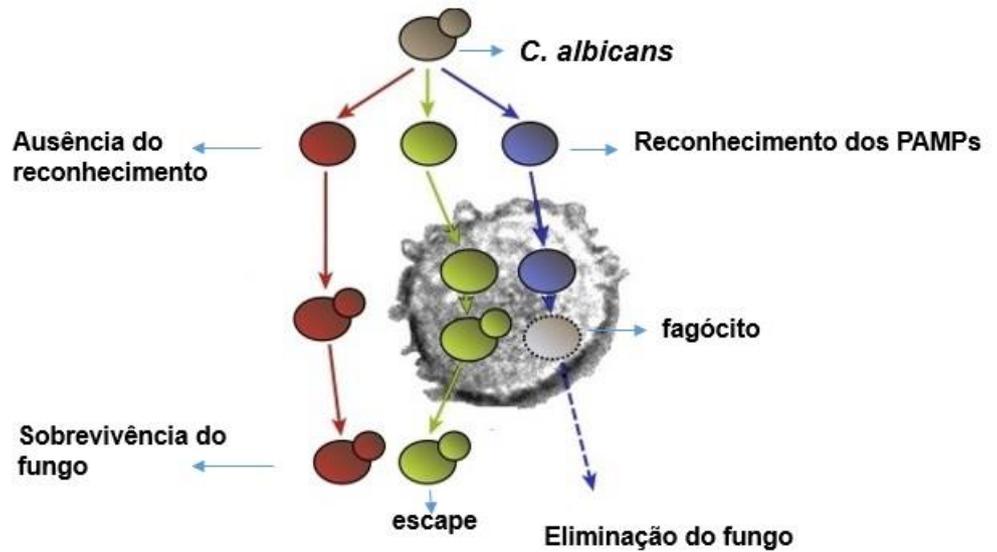
O estado imune do hospedeiro fator chave durante a transição da *C. albicans* de organismo comensal para patogênico (SAMPAIO et. al., 2010). As respostas imunes inata e adaptativa exercem papel majoritário na imunidade para *Candida* spp. A imunidade inata nas infecções de mucosa envolve vários tipos de células, como: neutrófilos, monócitos/macrófagos, células “natural killer”, células dendríticas, entre outras, contudo, o primeiro contato de *Candida* spp. com o sistema imune, é através das células da mucosa epitelial, consideradas barreiras físicas (CONTI; GAFFEN, 2010; LUO et al. 2013).

A indução da resposta imune inata frente aos fungos é dependente do reconhecimento de estruturas conservadas. No fungo, os chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), incluem estruturas como β -glucana, quitina e manoproteínas, as quais são detectadas, pelas células do sistema imune do hospedeiro, através de um conjunto correspondente de receptores transmembranas de reconhecimento de padrões (PRRs). Através do reconhecimento receptor-padrão é que se inicia a cascata de sinalização, que culmina na fagocitose, secreção de componentes microbicidas e produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e mediadores lipídicos (SEIDER et al., 2010). No hospedeiro, dectina-1 interage com β -glucana de *C. albicans*, induzindo a produção de citocinas pro-inflamatórias e ERO (HOHL, RIVERA, PAMER, 2006). Durante a resposta do sistema imune ao fungo, são produzidos diversos tipos de estresse: nutricional, pela privação de carboidrato, nitrogênio e aminoácidos, estresse oxidativo, nitrosativo e, também, estresse osmótico (MIRAMÓN, KASPER, HUBE, 2013).

Wheeler e Fink, demonstraram em 2006, que “desmascarar” *C. albicans* através da remoção da β -glucana altera o reconhecimento do fungo por células do

sistema imune, como macrófagos (WHEELER, FINK, 2006). A ausência do reconhecimento entre receptor-padrão, por diversas causas, pode culminar no desfecho indesejado, como é mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Possíveis desfechos durante a interação de *C. albicans* com o fagócito.



Fonte: adaptado de BROWN et al. 2014.

Nota: As leveduras representadas em azul ilustram o desfecho favorável ao hospedeiro durante a interação, onde ocorre o reconhecimento dos PAMPs pelos PPRs dos fagócitos, fagocitose e eliminação do fungo. As células em verde, demonstram a possibilidade do escape do fungo ao processo da fagocitose por diversos fatores dispostos por *C. albicans*. Em vermelho, estão representadas *C. albicans* com alterações de superfície que impedem o reconhecimento dos PAMPs pelos fagócitos, impossibilitando a fagocitose e a eliminação do fungo. Tanto a situação ilustrada em verde como em vermelho, são consideradas favoráveis para invasão, colonização e infecção de tecidos.

Durante a interação das células fagocíticas com o fungo, no processo de fagocitose, ocorre a formação do fagolisossomo, considerado, por si só, um ambiente microbicida. Nele ocorre a queda do pH, presença de enzimas hidrolíticas, defensinas e outros peptídeos antimicrobianos, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais auxiliam na eliminação dos patógenos e levam ao chamado “burst”

oxidativo (DINAUER, NEWBURGER, 2010; MORGENSTERN et al., 1997, SEIDER et al., 2010).

Tratando-se de ERO, o $O_2^{\cdot-}$ pode ter origem mitocondrial, no retículo endoplasmático ou ainda pela NADPH oxidase. A produção de ERO pela NADPH oxidase, que encontra-se na membrana do fagócito, dá-se quando esta é estimulada, por exemplo, por citocinas, resultando da geração do $O_2^{\cdot-}$. Além deste, são geradas mediante reações enzimáticas, outros subprodutos como H_2O_2 e radical hidroxil (OH^{\cdot}), considerados ainda mais tóxicos (DANTAS et al, 2015). As membranas compostas de ácidos graxos, são susceptíveis à ação dos oxidantes, uma vez que o superóxido é mais solúvel no ambiente apolar da membrana, em relação ao ambiente aquoso do interior da célula. Superóxidos são, portanto, seletivos, não-reativos com a maioria dos componentes das células, mas altamente reativo com sítios específicos (SHENG et al, 2014). Além do papel fungicida que ERO exercem também são capazes de recrutar fagócitos para o local da infecção por *C. albicans*, sendo um importante evento durante a fagocitose (BROTHERS; NEWMAN; WHEELER, 2011).

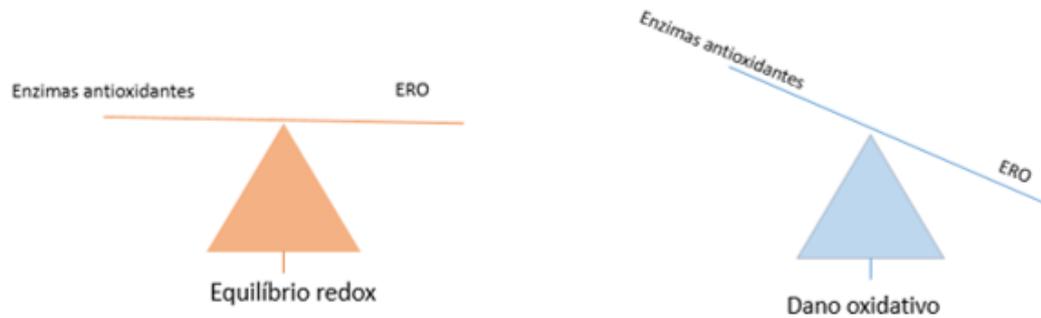
O ambiente no interior do fagossomo é considerado de baixo valor nutricional e isso altera a resposta transcricional de *C. albicans*, fazendo com que estas utilizem fontes alternativas de carbono, tanto em macrófagos como neutrófilos, com a repressão de genes glicolíticos e de síntese proteica e superepressão do ciclo do glioxilato (FRADIN et al., 2005). Frente ao ambiente oxidativo gerado pelos fagócitos através da produção de ERO, não somente durante a interação com o patógeno, mas, também, como produto da respiração celular em células aeróbias, *C. albicans* possui um arcabouço enzimático afim de detoxificar essas espécies na tentativa de manter o equilíbrio redox e sobreviver a essas condições (MIRAMÓN, KASPER, HUBE, 2013).

3.3 Mecanismos antioxidantes em *Candida albicans*

ERO são produzidos, continuamente, em condições normais, seja pelo processo de respiração pelas mitocôndrias, seja pelo retículo endoplasmático. Cabe ao fungo possuir sistemas compensatórios a fim de manter o equilíbrio entre o

oxidante produzido e sua decomposição, evitando o acúmulo e possíveis danos oxidativos por eles produzidos, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Manutenção do equilíbrio redox.

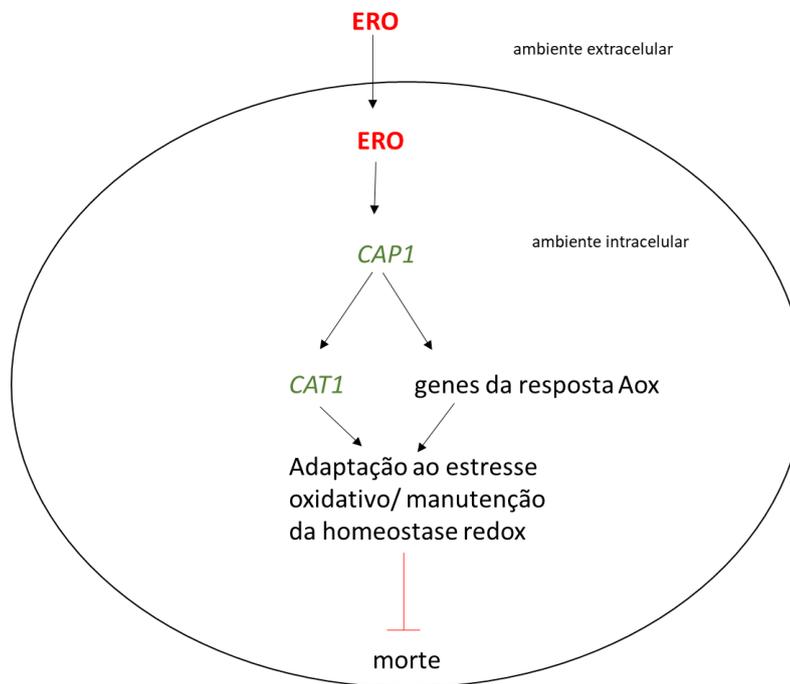


Fonte: da autora.

Nota: Em sistemas em homeostase, ocorre o equilíbrio entre a produção de oxidantes e a atividade de enzimas antioxidante. Não havendo esse equilíbrio, o dano oxidativo a nível proteico, lipídico ou DNA, pode ocorrer.

Na resposta central frente ao “burst” oxidativo, encontra-se o CAP1, do inglês “adenylate cyclase-associated protein”. É um gene responsável pela ativação de diversos genes associados à restauração da homeostase redox, ilustrado na Figura 5, como *CAT1* (catalase), *TRX1* (tiorredoxina) e *TRR1* (tiorredoxina redutase), e, cuja requisição à tolerância ao ambiente oxidante por *C. albicans* é conhecida (ZHANG et al., 2000; BAHN, SUNDSTROM, 2001, KALORITI et al., 2014).

Figura 5 - *CAP1* na resposta central ao ambiente oxidante.



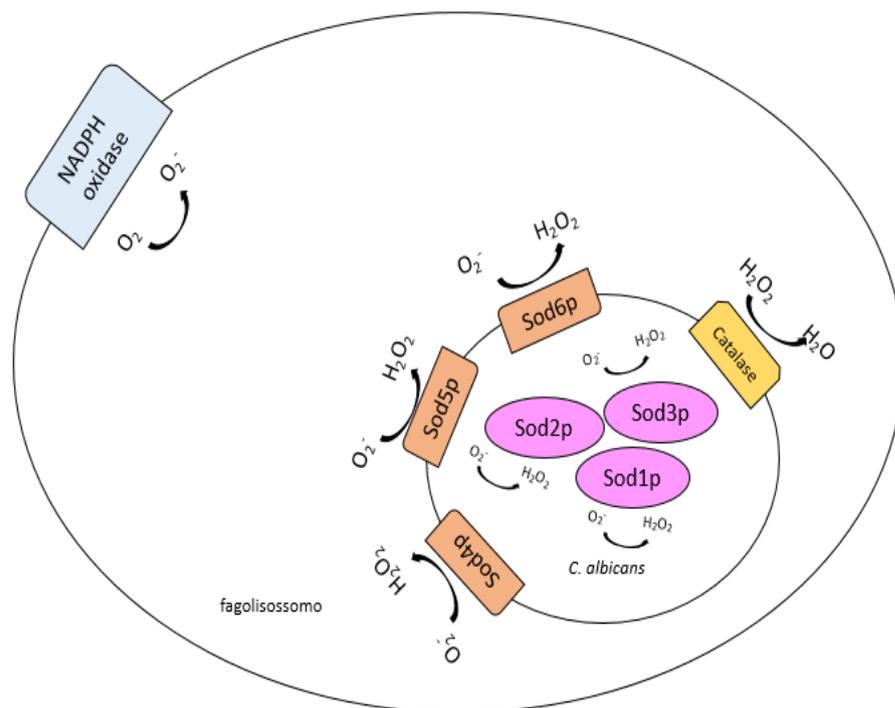
Fonte: adaptado de KALORITI et al. 2014.

Nota: ERO extracelular permeia a membrana do fungo ativando o gene *CAP1*, o qual é responsável pela transcrição de outros genes antioxidantes, como o *CAT1*. A ativação da transcrição dos demais genes promove a adaptação do fungo ao estresse oxidativo e/ou a manutenção da homeostase redox, inibindo, conseqüentemente, sua morte.

Subseqüente à ativação do gene transcritor *CAP1*, encontra-se a expressão do gene responsável pela tradução da catalase, o *CAT1*. A catalase, de localização peroxissomal em eucariotos, é responsável por catalisar a decomposição do H_2O_2 , protegendo *C. albicans* dos danos causados por ERO bem como a morte mediada pela fagocitose. Pradhan e colaboradores (2017) mostraram que a superexpressão de catalase está associada ao aumento da virulência de *C. albicans* na presença do ambiente oxidativo, demonstrando a importância desta para a sobrevivência de *C. albicans* nestes ambientes. Catalase é importante, também, na tolerância à anfotericina B, onde, células com atividade aumentada da enzima, foram resistentes a inibição do crescimento na presença deste antifúngico (SOKOL-ANDERSON, BRAJTBURG, MEDOFF, 1986)

Ainda na manutenção do equilíbrio redox, ou, na luta pela sobrevivência ao ambiente oxidante, existem outras enzimas envolvidas, como as codificadas pelos genes *SOD*. Essas proteínas são responsáveis por dismutar o superóxido em H_2O_2 - (McCORD, FRIDOVICH, 1969; BENOVA et al., 1995). Em *C. albicans*, compõem uma família de 6 genes (*SOD1-SOD6*), que codificam 6 enzimas. *C. albicans* expressa duas Sodp citosólicas, uma dependente de cobre e zinco (CuZnSod), Sod1p, e outra dependente de manganês (MnSod), Sod3p (BROXTON, CULOTTA, 2016). Sod2p, também MnSod, é encontrada na mitocôndria, Sod4p, Sod5p e Sod6p, todas CuZnSods, ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MARTCHENKO et al., 2004). Na Figura 6 estão ilustradas as localizações das enzimas envolvidas no “burst” oxidativo.

Figura 6 - Interior do fagossomo durante a fagocitose de *C. albicans*.



Fonte: Adaptado de de DÜHRING et al., 2015.

Nota: A geração de ERO pela NADPH oxidase do fagócito, e parte do sistema antioxidante da levedura.

Sod1p (CuZnSod), em sua maioria, está localizada no citosol, e, pequena parte ocorre em mitocôndrias eucarióticas, mais precisamente no chamado espaço

intramembranoso, e no núcleo. Sua distribuição entre o citosol e o espaço intramembranoso envolve um sistema de transmissão de dissulfeto e chaperona de cobre para Sod1p (BROXTON; CULLOTA, 2016). Por sua ampla localização nos compartimentos celulares, a função de Sod1p não é limitada a proteção citosólica contra estresse oxidativo, mas possui um papel chave na sinalização celular citosólica, protegendo também as mitocôndrias (BROXTON, 2017).

Sod2p, mitocondrial, não é considerada um fator diretamente associado à virulência. Mutantes Δ sod2 foram considerados mais sensíveis ao calor, álcool e concentrações altas de sais, demonstrando que, embora não se correlacione de maneira direta à virulência de *C. albicans*, é importante em diversas condições de estresse, como térmico e osmótico (HWANG et al. 2003; CHAVES, SILVA, 2012).

Sod3p, MnSod citosólica, não é induzida nem pela transição morfológica de *C. albicans* nem pelo estresse oxidativo ocasionado por fármacos, contudo, durante a fase estacionária do crescimento, Lamarre e colaboradores observaram uma superexpressão do gene SOD3, juntamente da repressão de SOD1, concluindo que, por ambas serem citosólicas, deve haver um equilíbrio entre a expressão dos genes que as codificam, e que Sod3p, é responsável por proteger *C. albicans* do ambiente oxidante durante a fase não replicativa (LAMARRE et al., 2001).

Richard e Plaine (2007), constataram que Sod4p, assim como Sod6p, são ancoradas ao GPI, e essa localização na superfície celular prediz que estão relacionadas à proteção contra oxidantes extracelulares (FRADIN et al, 2005; RICHARD, PLAINE, 2007). Frohner e colaboradores (2008) mostraram que o gene SOD4 foi superexpresso quando um mutante *C. albicans* Δ sod5 foi criado, demonstrando que, há uma relação de regulação compensatória entre esses genes, embora haja uma superexpressão de ambos, SOD4 e SOD5 sob condições indutoras de filamentação (FROHNER et al., 2008). Sod5p é responsável por proteger o fungo contra o estresse oxidativo, e, participa da regulação da transição levedura-hifa. Miramón e colaboradores mostraram que mutantes de *C. albicans* Δ sod5 são mais suscetíveis à morte ocasionada por fagócitos e sabe-se que durante esse contato as leveduras tendem a filamentar, demonstrando a importância de Sod5p durante a interação patógeno-hospedeiro (MARTCHENKO et al., 2004; MIRAMÓN, KASPER, HUBE, 2013). Frohner e colaboradores concluíram que, embora Sod6p possua as mesmas características de Sod4p e Sod5p, esta não

participa do mecanismo compensatório de regulação e sua ausência não interfere nos níveis acumulatórios de ERO intracelular.

3. 4 Fatores de Risco para candidíases

Uma vez que o sistema imunológico do hospedeiro é o principal fator contribuinte para o controle do surgimento das infecções fúngicas invasivas, toda situação que vulnerabiliza o indivíduo, nesse sentido, pode favorecer o surgimento das infecções (YANG, 2003). Os fatores de risco para o surgimento das infecções por *C. albicans* podem ser distribuídos em dois segmentos, sendo o primeiro relacionado com o hospedeiro, e o segundo associado com os cuidados em saúde.

O uso de antibióticos de amplo espectro, o tempo prolongado de internação hospitalar e procedimentos cirúrgicos invasivos, como a utilização de sonda vesical, ventilação mecânica, idade extrema, diabetes, lesão de mucosas, hemodiálise, corticoterapia, uso de próteses dentais e lentes são considerados fatores predisponentes às infecções oportunistas por *Candida* spp. (MONTES et al., 2009, GLOLO, SVIDZINSKI, 2010). Além desses, os chamados fatores de risco, incluem o uso de cateter venoso, o qual permite o acesso do fungo diretamente à corrente sanguínea (KOH et al., 2008). A colonização é considerada um fator de risco à infecção, e não uma infecção propriamente dita. A presença ou ausência de sítios colonizados por *Candida* spp., é mais importante do que o número de regiões colonizadas, para o surgimento de candidíases invasivas.

A predisposições às infecções por *Candida* spp. variam, também, de acordo com a idade. Neonatos, por exemplo, estão mais sujeitos a estas pela imaturidade do sistema imune e o baixo peso ao nascer. O surgimento de candidemias, geralmente se dá de maneira isolada, sem outras comorbidades, e, tratando-se de bebês prematuros, o risco para as infecções é maior devido à internação em unidades de tratamento intensivo (UTI) (BLYTH et al. 2009). Em relação a candidíases localizadas, como a vaginal, a idade tem sido considerada um fator de risco importante, como demonstrado por Dou e colaboradores (2014). Mulheres entre 34-35 anos, ou mais, apresentaram maiores índices de surgimento dessas infecções. A higiene também é, para este caso, um fator importante. A falta de

cuidado ou conhecimento de como realizar a correta higienização vaginal, pode contribuir por exemplo, para uma disbiose, principalmente quando se trata de lactobacilos, o qual compete com *C. albicans* por nutrientes (DOU et al. 2014).

Resumidamente os principais fatores de risco para o surgimento de candidíases invasivas são: neoplasias hematológicas, neutropenia, falência renal, pancreatite aguda severa, transplante de órgãos, longos períodos de internação em UTI, hemodiálise, uso de antibióticos de amplo espectro, uso de agentes antifúngicos, cateter venoso, ventilação mecânica, nutrição parenteral total, uso de fármacos imunossupressivos, colonização por *Candida* spp., procedimentos cirúrgicos, prematuridade, malformação congênita (YAPAR 2014).

3.5 Fatores associados à virulência

Embora o estado imune do hospedeiro e os fatores de risco aos quais ele é exposto favoreçam o surgimento da infecção por *C. albicans*, o fungo expressa vários fatores que contribuem para sua patogênese (CALDERONE, FONZI, 2001). Os principais fatores associados à virulência em *C. albicans* estão dispostos na Figura 7.

Figura 7 - Alguns dos fatores associados à virulência de *C. albicans*.



Fonte: adaptado de DANTAS et al., 2015.

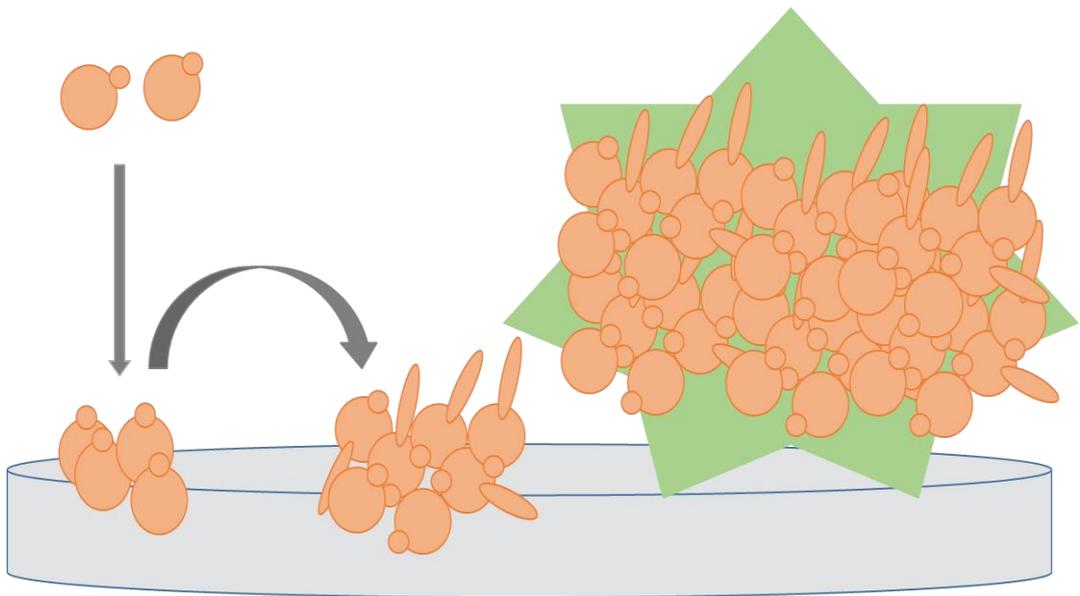
Nota: Os fatores de virulência em *C. albicans*, representam poderosas estratégias que contribuem para o sucesso de suas infecções e incluem a flexibilidade metabólica, escape à fagocitose, alteração morfológica, aderência às superfícies do hospedeiro, formação de biofilme e enzimas hidrolíticas.

A flexibilidade metabólica permite ao fungo utilizar diferentes fontes de carbono, viabilizando sua nutrição mesmo em condições de baixa de nutrientes. O escape à fagocitose se associa tanto a alteração morfológica, uma vez que a filamentação permite que o fungo rompa o macrófago fisicamente em até 40 minutos após o engolfamento, quanto aos processos de “vomitosis”, por exemplo. Além disso, as hifas que escapam da fagocitose, continuam viáveis, podendo formar novas leveduras e continuar o processo de multiplicação e invasão. A aderência à superfície do hospedeiro é um fator de extrema importância, pois, para que haja a infecção, é necessário que, previamente, haja a aderência mediante a expressão de adesinas (Als_p) (DANTAS et al. 2015; OLIVER et al. 2019).

A formação de biofilme é de extrema relevância no que diz respeito ao surgimento de infecções fúngicas invasivas, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV, câncer, neonatos, entre outros. Biofilmes são populações microbianas estruturadas sobre superfícies bióticas as quais produzem sua própria matriz extracelular de polissacarídeos, como ilustrado esquematicamente na Figura 8

(DELATTIN, CAMMUE, THEVISSSEN, 2014). As vantagens neste agrupamento celular incluem a proteção aos estresses impostos pelo ambiente, como físicos e químicos, incluindo fármacos utilizados em terapias antifúngicas, cooperação metabólica e a regulação comunitária da expressão gênica, por exemplo (RAMAGE, MARTINEZ, LÓPEZ-RIBOT, 2012).

Figura 8 – Esquema da formação de biofilmes.



Fonte: da autora.

Nota: As leveduras (em laranja) se depositam sobre a superfície (em azul), se aderem, filamentam e formam microcolônias até formarem grandes populações e secretarem a matriz extracelular (em verde).

Em relação às enzimas hidrolíticas, destacam-se as lipases, fosfolipases e proteases, como as proteases aspárticas, responsáveis em degradar as proteínas da matriz extracelular, imunoglobulinas e outras proteínas do sistema complemento do hospedeiro. Portanto, são fatores associados à virulência de *C. albicans* e estão envolvidas diretamente na patogenicidade, adesão e invasão dos tecidos durante as infecções (COSTA et al., 2010).

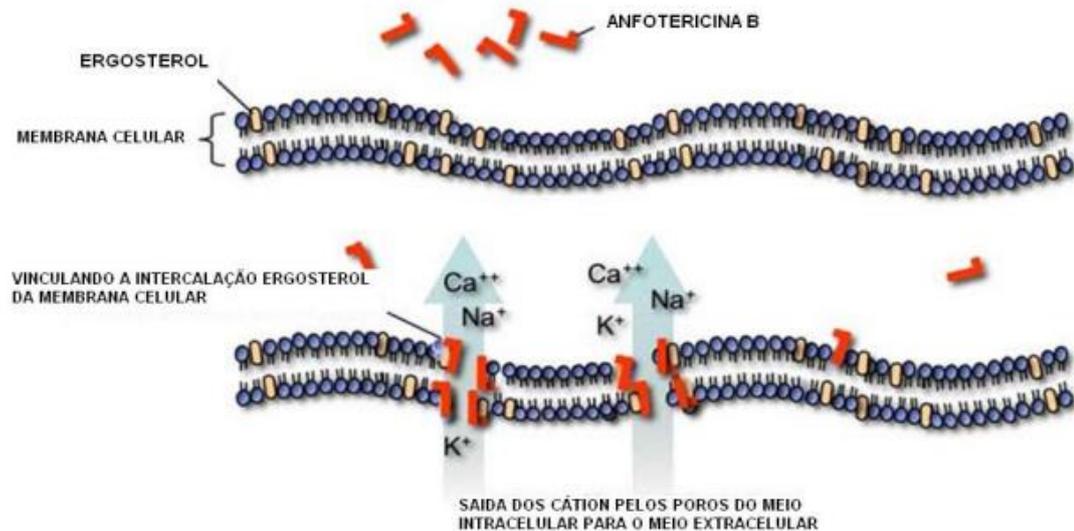
3.6 Tratamento antifúngico em candidíases

Quando o fungo consegue sobressair ao sistema de defesa montado pelo hospedeiro, surgem as infecções, no caso, as candidíases. Os tratamentos antifúngicos variam de acordo com a condição do paciente, como, por exemplo, se é ou não neutropênico, se está exposto a algum fator de risco, como o uso de cateter endovenoso, entre outros. Essas variações estão claramente relatadas no “Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis”, o qual leva em consideração possíveis variáveis que possam influenciar na terapêutica antifúngica, tanto no que diz respeito ao fármaco de escolha, dose, via e tempo de administração, posologia, quanto ao estado do paciente e localização e características da infecção (PAPPAS et al. 2016).

A classe dos polienos foi a primeira a ser disponibilizada para o tratamento de infecções fúngicas, tanto por leveduras quanto por fungos filamentosos. A anfotericina B, pertencente a essa classe, foi descoberta na década de 50 e é um antifúngico natural oriundo de *Streptomyces nodosus*, considerado, portanto, um antibiótico utilizado no tratamento contra infecções fúngicas e também aplicado na terapia frente a viroses e infecções por protozoários. O mecanismo de ação da anfotericina B está demonstrado na Figura 9 (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009; VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010; COLOMBO et al., 2013).

Apesar do seu uso difundido, a anfotericina B é um fármaco pouco solúvel em água e extremamente nefrotóxico, devido à similaridade do ergosterol com o colesterol, presente nas membranas celulares eucarióticas. No entanto, esses problemas são minimizados quando formulações lipídicas são administradas de maneira intravenosa (CAFFREY et al, 2001). Casos de resistência a esse fármaco incluem mecanismos de mutação do gene *ERG3* e alteração nos componentes de membrana como o aumento de esfingolipídeos (LINARES et al., 2013).

Figura 9 - Mecanismo de ação da anfotericina B.



Fonte: Fonte: GONÇALVES, A. H., 2001.

Nota: O mecanismo de ação se baseia na ligação das moléculas do fármaco ao principal lipídeo da membrana celular do fungo, o ergosterol, formando canais que alteram a permeabilidade da membrana, levando ao extravasamento de íons.

Outra classe de fármaco que tem seu uso difundido na terapêutica antifúngica é a classe dos triazólicos, e seu principal representante é o fluconazol, cuja descoberta foi resultado de um programa de pesquisa dirigido ao desenvolvimento de um antifúngico de amplo espectro de ação para infecções locais e sistêmicas (RICHARDISON et al., 1990; PEREIRA, 2017). Seu mecanismo de ação através da inibição da enzima 14- α -desmetilase, impede a conversão de lanosterol a ergosterol, como ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Mecanismo de ação de fármacos azólicos.

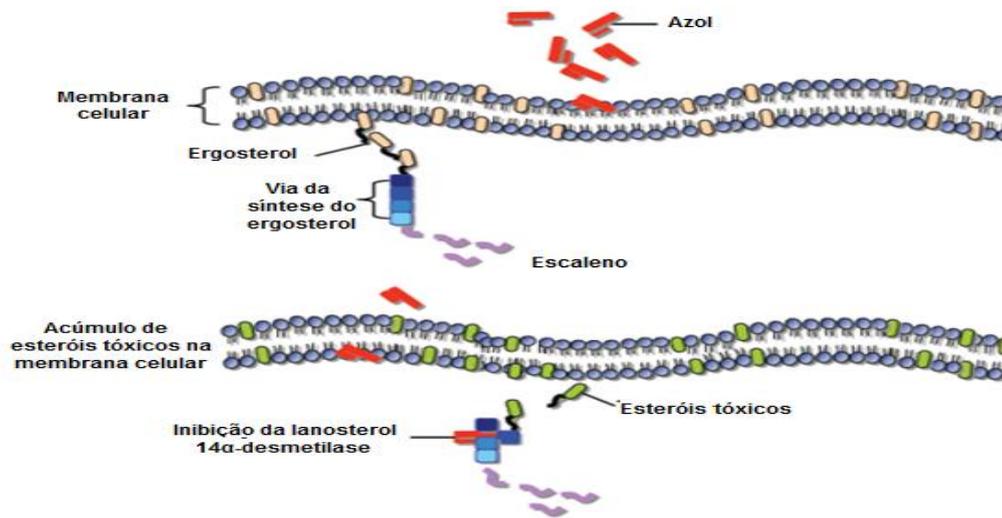


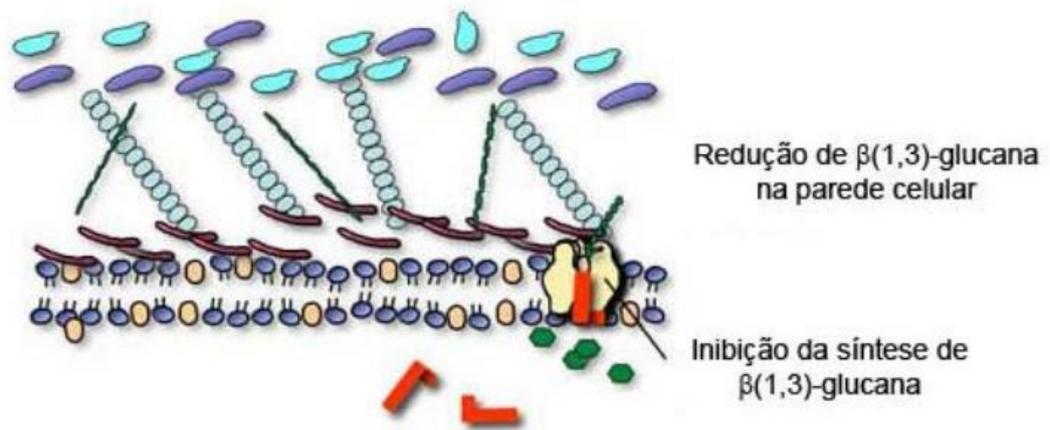
Figura 10: Mecanismo de ação de fármacos azólicos. As moléculas de azol se ligam à enzima 14- α -desmetilase, impedindo que ela converta o lanosterol a ergosterol e levam ao acúmulo de esteróis tóxicos.

Fonte: Adaptado de SAMPAYO, 2010.

O fluconazol é um fármaco bem tolerado, seu mecanismo de ação é considerado fungistático, e por esse motivo, permite ao fungo crescer em sua presença e desenvolver mecanismos de resistência. Nos Estados Unidos, por exemplo, 0,5 a 2% de *C. albicans* é resistente a este fármaco, sendo os maiores índices encontrados em espécies de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. auris* que podem chegar a 93% de resistência ao fluconazol (BERKOW, LOCKHART, 2017).

Atualmente, o fármaco de escolha para infecções fúngicas invasivas é a caspofungina, mais especificamente acetato de caspofungina, pertencente à classe das equinocandinas. Este fármaco é um produto semissintético derivado da substância pneumocandin b0, produto do fungo *Glarea lozoyensis* (CHEN et al., 2015). O mecanismo de ação desta droga está esquematizado na Figura 11.

Figura 21 - Mecanismo de ação da caspofungina.



Fonte: Adaptado de ISHIDA, K.

Nota: Os fármacos oriundos da classe das equinocandinas atuam inibindo de forma não-competitiva a síntese da 1,3- β -D-glucana presente na parede celular de fungos, como *C. albicans*.

O efeito sobre *C. albicans* é fungicida e sua eficácia é equivalente a da anfotericina B em infecções invasivas frente às espécies do gênero *Candida*, porém com efeitos adversos mínimos. Entretanto, seu custo é elevado em relação aos demais antifúngicos disponíveis na terapêutica e tem sido relatado altos valores de CIM para linhagens de *C. glabrata* (SPELLBERG, FILLER, EDWARDS 2006). Juntos, todos esses fatores contribuem para que este fármaco seja elencado como o de primeira escolha em ambiente hospitalar.

Além dos mecanismos de ação conhecidos, nos últimos anos têm-se correlacionado o aumento da produção de ERO com a terapia antifúngica. Em 2013, Ferreira e colaboradores demonstraram que a anfotericina B, fluconazol e itraconazol levaram à produção de ERO frente a *Cryptococcus gattii* como efeito adicional deste fármaco. Guirao-Abad e colegas (2017), utilizando *C. albicans* SC5314, concluíram que, o aumento na produção de ERO pela anfotericina B foi crucial para que seu efeito fungicida fosse efetivo. Para a classe das equinocandinas, *C. albicans* tratadas com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ entraram em um quadro de estresse oxidativo em até 60 minutos após o tratamento devido ao aumento de ERO totais, causando peroxidação lipídica e outros danos (YU et al. 2016). Bink e colaboradores, em 2011, quantificaram a expressão relativa da família dos genes

SOD (*SOD1-SOD6*) em biofilmes de *C. albicans* tratadas com 0,3 mM de miconazol, correlacionando o aumento desses genes, principalmente *SOD5*. Esses e outros estudos, mostram que, o tratamento com antifúngicos das diversas classes, leva ao aumento de ERO e que isso pode ser crucial para o desfecho da terapêutica. De acordo com o exposto, *C. albicans* é um microrganismo de relevância clínica em infecções locais e sistêmicas, relacionadas a serviços de saúde e à comunidade. Estão relacionados à *C. albicans* altos índices de morbidade/mortalidade. Conhecer fatores relacionados à virulência fúngica, no contexto da interação patógeno-hospedeiro, faz-se importante. O efeito oxidante adicional que é atualmente proposto aos fármacos padrões, no tratamento de candidíases/candidemias, é de extrema importância, uma vez que, seu uso está atrelado ao aumento na produção de ERO. Tal produção pode complementar a ação de células do sistema imune, e até mesmo, aos efeitos primários desses fármacos, ou, contribuir para a sobrevivência do fungo mediante à expressão de genes e proteínas antioxidantes. Através do presente trabalho conheceremos a expressão relativa de genes da resposta antioxidante de *C. albicans* em situação de “subtratamento” com antifúngico utilizado na terapêutica para fins profiláticos, bem como seu comportamento frente ao processo fagocitário imposto por macrófagos, podendo gerar novas perspectivas no que diz respeito a importância do tratamento em doses inibitórias adequadas a cada linhagem e na relação patógeno-hospedeiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens fúngicas e celular

As amostras utilizadas nesse estudo fazem parte da coleção de culturas de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. Foram utilizadas linhagens de *C. albicans* SC5314, 121 e 221-V mantidas a -80°C. A linhagem SC5314, isolada em 1984 é considerada de referência para *Candida* spp em estudos de expressão gênica uma vez que seu genoma foi sequenciado. Ela é proveniente de um paciente com candidemia, e, desde seu isolamento, foi distribuída para diversos laboratórios ao redor do mundo (GILLUM, TSAY, KIRSCH, 1984). Os isolados 121 e 221-V são provenientes de casos de infecção hospitalar e foram obtidos localmente por intermédio de outros projetos de pesquisa realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias e que hoje fazem parte da micoteca do laboratório citado. Células monocíticas de linhagem leucêmica humana, THP-1, também mantidas a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, foram cultivadas no Laboratório de Vacinas (UNIFAL-MG). As células THP-1 derivam de uma linhagem leucêmica isolada do sangue de um garoto com leucemia monocítica aguda e foram utilizadas para os ensaios de fagocitose (TSUCHIYA et al., 1980).

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima

As concentrações inibitórias para a anfotericina B, fluconazol e caspofungina, foram determinadas pelo método de diluição em caldo, seguindo as diretrizes preconizadas pelo “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST), no documento “E.DEF 7.3.1” (ARENDRUP et al., 2017; EUCAST 2017). A anfotericina B e caspofungina foram testados entre as concentrações 0,008-4 µg/mL e o Fluconazol a 0,125-6 µg/mL. Arendrup e colaboradores (2017) determinam MIC como a menor concentração que é capaz de inibir o crescimento das leveduras em um tempo determinado. A depender do valor de MIC, a espécie ou linhagem é considerada sensível (S), resistente (R) ou possui perfil de sensibilidade intermediário (I) ao antifúngico. A sensibilidade é considerada quando um nível de atividade antimicrobiana está associado à alta probabilidade de sucesso na terapia.

O perfil intermediário se correlaciona com uma concentração de antifúngico com altas chances do sucesso terapêutico quando pode-se aplicar maiores doses, do que a usual, do agente antifúngico ou quando está concentrado fisiologicamente no local da infecção. Uma levedura é definida como resistente, quando os níveis associados à atividade antimicrobiana estão relacionados à alta probabilidade de falha no tratamento (ARENDRUP et al., 2017).

4.3 Cultivo de *C. albicans* com os antifúngicos

As linhagens de *C. albicans* SC5314, 121 e 221-v foram cultivadas inicialmente em meio ágar “Yeast Extract Peptone Dextrose” (YEPD) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, cultivadas em caldo YEPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) a 37°C, sob agitação (180rpm), durante 24h. O cultivo da levedura no caldo foi realizado em diferentes condições.

- 1- *C. albicans* (SC5314, 121, 221-V) controle;
- 2- *C. albicans* (SC5314, 121, 221-V) tratadas com 1/4 da concentração inibitória do MIC de fluconazol;
- 3- *C. albicans* (SC5314, 121, 221-V) tratadas com 1/4 do MIC de anfotericina B;
- 4- *C. albicans* (SC5314, 121, 221-V) tratadas com 1/8 do MIC de caspofungina.

Para a caspofungina, foram realizados ensaios pilotos, nos quais, constatou-se ser inviável a utilização da ¼ do MIC com a finalidade de se obter a concentração de células viáveis necessárias para o teste, justificando, assim o uso da concentração inibitória menor que os demais.

4.4 Cultivo das células fagocíticas THP-1

As células monocíticas humanas de origem leucêmicas (THP-1), conservadas a -80°C, foram descongeladas e adicionadas a tubos de centrífuga contendo 30mL de meio RPMI 1640, centrifugado a 2000 rpm e por 5 minutos em centrífuga Kindly® KC5, e o sobrenadante descartado, a fim de remover o dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para crioprotéger as células, porém tóxico a temperatura ambiente

(PEREIRA, 2010). Sobre as células foram adicionados 15 mL do meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de estreptomicina (100mg/mL) e penicilina (100U/mL), as células suspensas foram transferidas para garrafas de cultivo celular e incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. O cultivo das células foi realizado até que as células se multiplicassem a concentração de 10⁶ células/mL, com viabilidade constatada mediante contagem em hemocítômetro com o corante azul de Trypan no intervalo de 48 horas (PEREIRA, 2010).

4.5 Carenciamento dos monócitos

Previamente à diferenciação das células THP-1 em macrófagos foi necessário fazer o carenciamento das células, processo este em que as células foram mantidas, em garrafas de cultivo celular que suportam 50mL, por 24h, a 37°C, 5% CO₂ no meio RPMI sem o SFB, para que elas diminuíssem a velocidade de multiplicação. O cultivo foi transferido para um tubo de polipropileno com capacidade para 50mL e centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas, ao mesmo volume do cultivo, com o meio RPMI contendo os antibióticos e sem a suplementação do SFB. A solução de células a 10⁶ células/mL foi transferida, com auxílio de pipeta descartável, para garrafa de cultivo celular, e esta foi incubada em estufa de CO₂ a 5%, 37°C, durante 24 horas (PEREIRA, 2010).

4.6 Diferenciação das células monocíticas THP-1 em macrófagos

Após o carenciamento, o cultivo carenciado foi centrifugado a 2000rpm, por 5 minutos, viabilidade atestada e a concentração ajustada para 10⁶ células viáveis/mL em RPMI suplementado com 10% de SFB e antibióticos. À garrafa, adicionou-se o “phorbol myristate acetate” (PMA) a 100 nM, cuja função é induzir a diferenciação celular. As garrafas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, durante 48 horas.

4.7 Interação patógeno-hospedeiro

Após as 48h de diferenciação, com o auxílio de um raspador celular, foram retiradas alíquotas do cultivo para a contagem de macrófagos viáveis, como já citado. Respeitou-se a proporção de um cultivo celular/condição. Os cultivos de *C. albicans* em caldo YEPD foram contados, e centrifugados a 4000 rpm por 4 minutos, o meio foi retirado, e então, o precipitado foi ressuspendido em RPMI suplementado com 10% de SFB e antibióticos, ajustando-se a concentração de células viáveis a 10^7 células viáveis/mL. A concentração de leveduras e células seguiu a proporção de 10^7 leveduras para 10^6 células humanas, ou seja, MOI (multiplicidade de infecção) 10. A interação ocorreu nas próprias garrafas, e o ensaio foi realizado nas mesmas condições de temperatura e atmosfera de cultivo das células THP-1, durante 1 hora.

4.8 Determinação da atividade fungicida dos fagócitos

Este ensaio foi realizado para avaliar se o tratamento com os antifúngicos favoreceu ou prejudicou a interação patógeno-hospedeiro, quer seja a favor do fungo ou do fagócito. Após as 48h em contato com o agente indutor de diferenciação, a morfologia característica dos macrófagos foi atestada visualmente, e, então, a interação patógeno-hospedeiro se deu por 1 hora. A atividade fungicida dos fagócitos foi avaliada segundo Arana, Nombela e Pla (2017) com alterações. Após 1 hora de interação, os macrófagos foram lisados deixando-os em contato com água pH 11 por 10 minutos. Alíquotas foram retiradas e diluições seriadas foram feitas. 200 μ L de cada diluição foram plaqueados em ágar YEPD para determinar a quantidade de leveduras viáveis após 24 horas de incubação a 37°C. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em unidade formadora de colônia (UFC), e a extensão da morte foi calculada da seguinte forma:

$$[(\text{CFU sem fagócito}) - (\text{CFU+fagócito})] / (\text{CFU sem fagócito}) \times 100$$

4.9 Extração de RNA

A extração de RNA consiste em 3 etapas: lise celular, purificação da amostra e precipitação do ácido nucleico.

A extração de RNA foi feita a partir do precipitado de células obtido por coleta após a realização de ensaios de interação patógeno-hospedeiro e lise dos fagócitos. Inicialmente, sobre o precipitado de células foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Tris HCl 200mM e pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25mM; SDS 0,5%) e 100 µL de pérolas de vidro (450-600 µm) e as amostras foram agitadas por 12 minutos em agitador mecânico alternando-se 30 segundos de agitação e 30 segundos em gelo. Posteriormente, o lisado foi transferido, sem as pérolas, para outro tubo contendo 1 mL de Trizol® Reagente (Ambion®). Após agitação por 10 minutos, alternando-se 30 segundos de agitação e 30 segundos em gelo, adicionou-se 400 µL de clorofórmio e os tubos foram novamente agitados por 3 minutos, com repouso de 3 minutos em gelo seguidos por centrifugação a 14000 rpm e 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi recolhida e a esse conteúdo foi adicionado igual volume de isopropanol. Após 1 hora de incubação a -20°C, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm e 4°C por 30 minutos. O RNA foi lavado duas vezes por adição de 1 mL de álcool 75%, centrifugação por 10 minutos e remoção do álcool. Posteriormente, adicionou-se 30 µL de água com 0,1% de dietilpirocarbonato (água DEPC) em cada amostra de RNA e estas foram quantificadas e qualificadas por densidade óptica a 230, 260 e 280nm em UV/Vis Genova Nano Micro-volume Life Science Spectrophotometer (Jenway®). As amostras foram armazenadas a -80°C.

Para verificar o RNA extraído foi realizada eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando “Orange loading dye” para acompanhar a corrida do material.

4.10 Purificação do RNA

A purificação do RNA extraído e quantificado, foi realizada utilizando a enzima DNase I (Desoxirribonuclease I, Promega®), como já realizado em diversos estudos (NAGLIK et al., 2008). 1 µL de DNase I (1 unidade/mL em 50% de glicerol, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM), 1 µL de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM) e 1000 ng de cada amostra de RNA diluídas em 8 µL de água em tubos para PCR, os quais foram homogeneizados

gentilmente e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A fim de prevenir a catálise do RNA por íons metálicos (Mg/Ca) durante o aquecimento, foi adicionado a cada tubo 1 µL da “Stop Solution” (50 mM EDTA), os quais foram mantidos por 10 minutos a 70°C objetivando a desnaturação a DNase I. A essa etapa, o volume final, para cada amostra, foi de 11 µL de RNA purificado. Para avaliar a purificação do material, foi realizada PCR convencional (semelhante ao item 5.14) com “primer” de DNA, cuja ausência de anelamento confirma que não há resquícios de DNA contaminante no material purificado.

4.11 Transcrição Reversa (cDNA)

Esta etapa foi realizada em Termociclador Amplitherm® TX96. Em 1000 ng de RNA purificado suspensos em 11 µL de água DEPC foram adicionados 1 µL de Oligo (dT)18 “primer” na concentração de 0,5 µg/µL (Thermo Scientific®) e 1 µL de uma mistura contendo os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados “dNTP’s” (dATP - desoxiAdenosina Trifosfatada, dCTP - desoxiCitidina Trifosfatada, dGTP - desoxiGuanosina Trifosfatada, dTTP - desoxiTimidina Trifosfatada) a 10 mM (Invitrogen®). No termociclador, as amostras passaram pelo seguinte ciclo: 4 minutos e 30 segundos a 65°C, para promover a dissociação das estruturas secundárias, em seguida, os tubos contendo a mistura de reação serão colocados no banho de gelo por 20 segundos, para evitar anelamentos inespecíficos. Posteriormente, 2 µL de DTT (1,4-Dithiothreitol, Invitrogen®) e 4 µL de “buffer” (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen®) foram adicionados aos demais componentes como cofatores da reação e os tubos colocados novamente no termociclador. Ao final de 20 segundos a 37°C, temperatura necessária para promover o anelamento dos “primers”, foi adicionado 1 µL da enzima “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV RT) (Invitrogen®), responsável pela transcrição reversa e síntese do c-DNA, a partir do RNA molde. Passados 50 minutos a 37°C, um ciclo de 95°C por 5 minutos promoveu a inativação da enzima e a remoção dos “primers”. Ao final da reação, os tubos contendo as amostras foram retirados do termociclador e armazenados a -20°C para posterior utilização na PCR e PCR quantitativo em Tempo Real.

4.12 Confeção dos “primers”

Os “primers” para este estudo foram obtidos em diferentes artigos de estudo de expressão gênica em *C. albicans*. As sequências e o tamanho dos amplificadores foram confirmados mediante análise do “*Candida* genome Database”. As temperaturas de “melting” (T_m) e as temperaturas estimadas de anelamento dos “primers” foram avaliadas no “ T_m calculator” (Thermo Fisher Scientific®).

4.13 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR convencional foi realizada a fim de determinar a qualidade e a capacidade de anelamento dos “primers” e análise qualitativa do tamanho dos fragmentos amplificados. A PCR foi realizada no Termociclador Amplitherm TX96, onde foram adicionados aos tubos de PCR 12,5 μ L do GoTaq Green Master Mix (Promega®), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, $MgCl_2$ e tampão de reação na concentração ótima para PCR, 1 μ L de c-DNA (40ng/ μ L), 1 μ L “primer senso” e 1 μ L “primer” anti-senso (Thermo Fischer®) (10pmol) e água ultrapura para PCR, quantidade suficiente para 25 μ L de reação. A fim de visualizar os produtos da amplificação da PCR, foi feito eletroforese em gel de agarose (1%). O gel foi feito com 0,5g de agarose, diluindo em tampão TE 1x (tris borato EDTA). Aqueceu-se a mistura para homogeneizá-la, e então foram adicionados 3 μ L de brometo de etídio. O brometo de etídio é utilizado pois, ao ligar-se ao DNA, permite a visualização da banda, relativa ao fragmento amplificado sob luz UV. Uma vez que as moléculas de DNA são dimensionadas pelo seu movimento relativo através de um gel em comparação com um padrão de peso molecular, as medições de mobilidade podem ser críticas para as determinações de tamanho (SIGMON; LARCOM, 1996). Após solidificação do gel foram aplicados marcador de peso Molecular (Ludwig Biotec®) para 100pb, os produtos da PCR, incluindo controles negativos dos “primers”. A corrida ocorreu a 100V, durante 40 minutos. O gel foi visualizado sob luz UV.

4.14 Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para análise da expressão relativa dos genes alvos foram realizadas qPCR em Tempo Real com o sistema “iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix”

(Promega®) no equipamento ABI StepOne™ (Applied Biosystems®). Os valores de expressão dos genes alvo (*CAP1*, *CAT1*, *SOD1-6*) foram normalizados pela expressão do gene constitutivo *ACT1*. Para as reações de amplificação foram adicionados 5 µL de Sybr Green, 1µL de “primers” senso e anti-sensoa 10pmol, 1 µL de cDNA com concentração ajustada para 100ng/µL e 2 µL de água ultrapura para PCR. A expressão relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Nesse trabalho foi realizada quantificação relativa, método no qual não se faz necessária a construção de curva de calibração, já que ocorre a comparação entre duas amostras. O método mais utilizado para esse tipo de quantificação, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi publicado em 2001 por Livak e Schmittgen. O Ct (“Cycle Threshold”) corresponde a um valor logarítmico obtido a partir da curva de amplificação, e, os valores de Ct são gerados a partir da normalização dos valores de quantificação da amostra alvo em relação a amostra constitutiva, ou seja, " $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ controle endógeno})$ ". O segundo valor de "Ct é representado pelo valor de Ct da amostra com a qual se deseja comparar também normalizada $\Delta(Ct \text{ referência} - Ct \text{ controle endógeno})$ (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). A base da função exponencial sendo 2, indica que a amplificação dobra a quantidade a cada ciclo.

Os dados foram analisados e os genes-alvos normalizados pelo gene endógeno *ACT1*. No controle não tratado, a expressão de todos os genes é considerada 1, por isso a expressão nos tratamentos é dita aumentar, ou diminuir em relação à expressão destes no controle não tratado.

4.15 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o Software SigmaPlot versão 12.0. Dados paramétricos apresentados em média \pm desvio padrão e comparados por teste t de Student. Dados não paramétricos apresentados em mediana e intervalo interquartil (25%-75%) e comparados por Mann-Whitney. Diferenças consideradas significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Os resultados para o ensaio de sensibilidade antifúngica estão descritos na Tabela 1, na qual foram consideradas as concentrações inibitórias de 90% ou mais do crescimento para a anfotericina B, e inibição de 50% ou mais do crescimento para o fluconazol e caspofungina.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina.

Amostra	Antifúngico	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Classificação (S,R,I)
SC5314	anfotericina b	0,125	S
SC5314	fluconazol	0,125	S
SC5314	caspofungina	0,063	S
121	anfotericina b	0,031	S
121	fluconazol	0,125	S
121	caspofungina	0,125	S
221-V	anfotericina b	0,125	S
221-V	fluconazol	0,500	S
221-V	caspofungina	1,000	S

Fonte: autora.

Legenda: S: sensível, R: resistente, I: intermediário.

Candida albicans é considerada sensível à anfotericina B, quando apresenta $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ (LASS-FLORL et al., 2011). Segundo Arendrup e colaboradores (2014) *C. albicans* é dita sensível ao fluconazol quando apresenta $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$, e resistente $>4 \mu\text{g/mL}$, portanto, *C. albicans* SC5314 de acordo com os dados apresentados na Tabela 1, é considerada sensível ao fluconazol. Para a caspofungina, os valores de corte oficiais ainda não foram determinados pelo EUCAST, contudo, isolados sensíveis à anidulafungina ($\text{MIC} \leq 0,032 \mu\text{g/mL}$) e micafungina ($\text{MIC} \leq 0,016 \mu\text{g/mL}$), também da classe das equinocandinas, são considerados sensíveis à caspofungina (ARENDRUP, 2017; EUCAST 2017). A partir desses dados, foi possível calcular as concentrações subinibitórias de trabalho para cada antifúngico e isolado, sendo $\frac{1}{4}$ MIC para anfotericina B e fluconazol, e $\frac{1}{8}$ MIC para caspofungina. Dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações de trabalho dos antifúngicos utilizados nos cultivos de *C. albicans*.

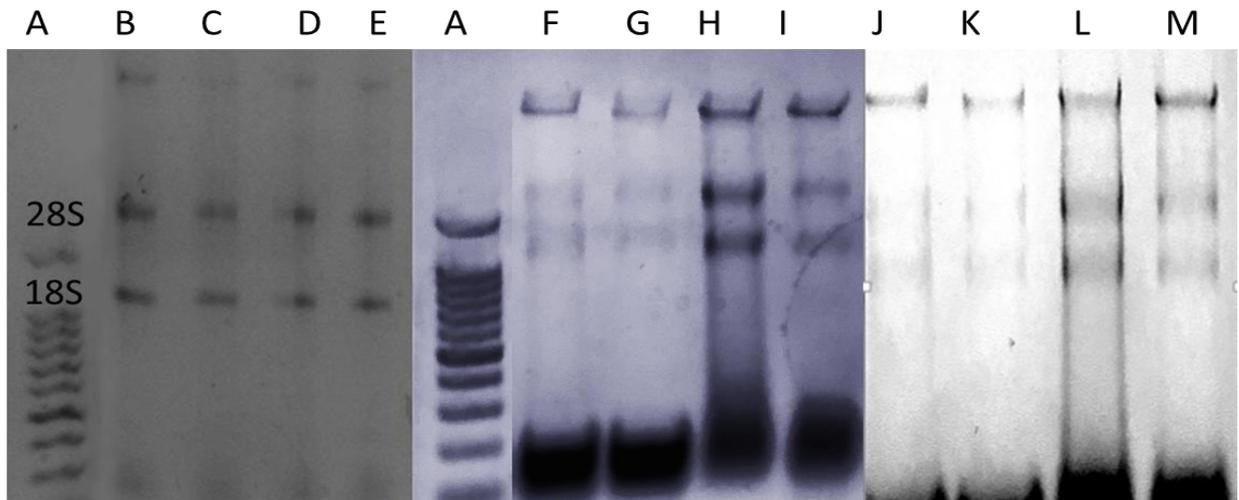
Amostra	Antifúngico	MIC($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de trabalho ($\mu\text{g/mL}$)
SC5314	anfotericina b	0,125	0,0313
SC5314	fluconazol	0,125	0,0313
SC5314	caspofungina	0,063	0,0079
121	anfotericina b	0,031	0,0078
121	fluconazol	0,125	0,0313
121	caspofungina	0,125	0,0157
221-V	anfotericina b	0,125	0,0313
221-V	fluconazol	0,500	0,1250
221-V	caspofungina	1,000	0,1250

Fonte: autora.

5.2 Avaliação da integridade do RNA extraído

O material extraído com a metodologia do TRIzol® foi analisado mediante quantificação espectrofotométrica e eletroforese em gel de agarose. Através da quantificação, é possível se determinar a pureza do material extraído. As relações 260/280 e 260/230 são mensurações de pureza de materiais genéticos e valores próximos a 2,0 classificam o RNA como puro (SCIENTIFIC, 2012). Os produtos das extrações foram julgados de boa qualidade, apresentando média 2,0 (260/280) e 1,8 (260/30). Mediante análise do gel de agarose é possível confirmar a integridade do RNA, através da presença das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, como mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Integridade do RNA extraído.



Fonte: autora.

Nota: A presença das bandas após a eletroforese em gel de agarose, caracterizam as subunidades 28s e 18s do RNA observadas em todas as condições. Tem-se em A marcador de peso molecular (100pb), B, C, D e E RNA extraído de *C. albicans* SC5314 controle, tratada com anfotericina B, fluconazol e caspofungina, respectivamente. F, G, H e I RNA extraído de *C. albicans* 121 controle, tratada com anfotericina B, fluconazol e caspofungina, e o RNA extraído de *C. albicans* 221-V, controle, tratada com anfotericina B, fluconazol e caspofungina em J, K, L e M, respectivamente.

5.3 Avaliação da purificação do RNA

Após constatadas purezas e integridades, foi feita a purificação do RNA com a enzima DNase, crucial para a eliminação de DNA contaminante. Para avaliar a descontaminação, foi realizada PCR semi-quantitativa utilizando “primer” para DNA para *ACT1*. A ausência de anelamento nas amostras confirmou a eficiência do processo de purificação

5.4 Avaliação dos “primers”

A PCR semi-quantitativa foi conduzida para avaliar a capacidade dos “primers” em anelarem com os fragmentos específicos. A Tabela 3 mostra as sequências senso e anti-senso de cada um deles, bem como o tamanho do

fragmento amplificado e as referências a partir das quais as informações foram obtidas:

Tabela 3: Sequências dos "primers"

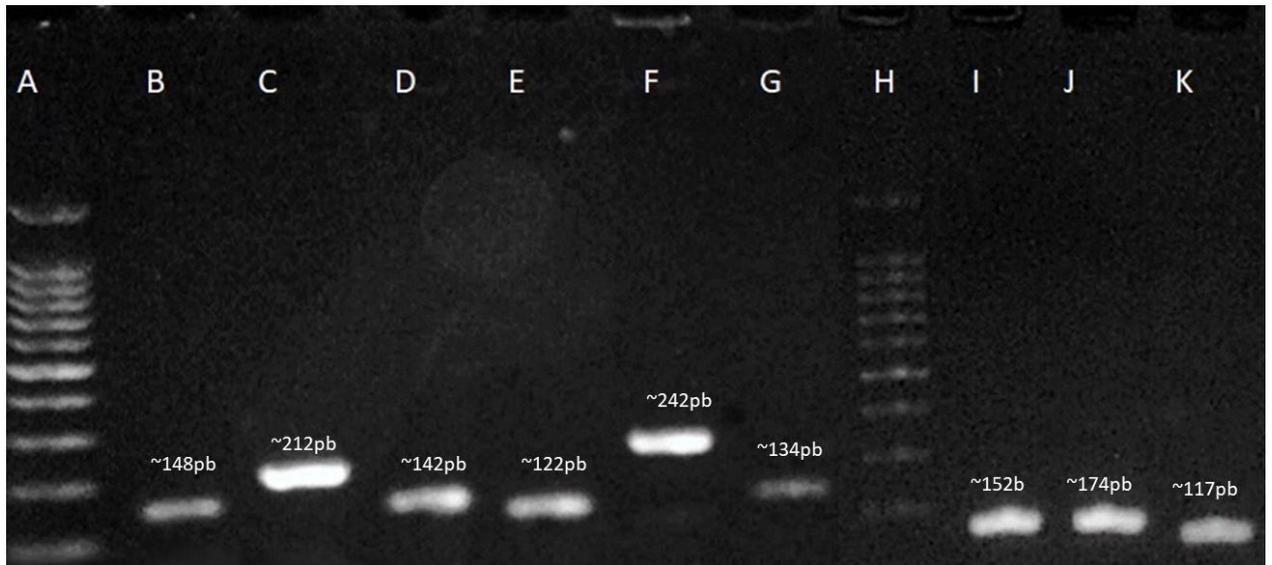
Gene	Sequência	Tamanho do fragmento	Referência
<i>CAP1</i>	F 5' -ACCGTGAACGTAAAGAACG- 3' R 5' -GCTACCACCAGTATATTTAGCC- 3'	152 pb	1
<i>ACT1</i>	F 5'-AGCTCCAGAAGCTTTGTTTCAGACC- 3' R 5'-TGC ATA CGT TCA GCA ATA CCT GGG- 3'	174 pb	2
<i>CAT1</i>	F 5'-GACTGCTTACATTCAAAC-3' R 5'-AACTTACCAAATCTTCTCA-5'	117 pb	3
<i>SOD1</i>	F 5'- TCCAGAAGATGATGAAAGACATG-3' R 5'- GTCTAGCACCAGCATGACCAG-3'	212 pb	4
<i>SOD2</i>	F 5'- TCAATTGAACAAGCCGTTGA-3' R 5'- ACCTTGAGAGACAGGAGCCA-3'	142 pb	5
<i>SOD3</i>	F 5'- CAATGCCGCTATTGACGCAC-3' R 5'- TCCAGAACAACACTGTGGTTG-3'	122 pb	5
<i>SOD4</i>	F 5'- TGA CTCCAAAGGCAAGGCACCA-3' R 5'- TGGGCCAACACCTGAAGGCAAT-3'	148 pb	5
<i>SOD5</i>	F 5'- ATGGGCGAGTCCTACAAAAC-3' R 5'- GGAGCAGTAGAAGCCATACTA-3'	242 pb	4
<i>SOD6</i>	F 5'- TACCATTCTGATACCGACTC-3' R 5'- TGCCGGTGACTCTTTTTG-3'	134 pb	5

Fonte: autora.

Legenda: F = "primer forward"; R = "primer reverse"; pb: pares de bases; 1: WANG et al. 2005, 2: SPURING et al,2010 ; 3: ALONSO et al. 2018; 4: MARTCHENKO et al. 2004; 5: BINK et al. 2011.

Na Figura 13 está demonstrada a eficiência dos mesmos em anelar com o c-DNA de *C. albicans*.

Figura 13 - Gel de agarose dos amplificados da PCR convencional.



Fonte: autora.

Legenda: Em A e H tem-se o marcador de pares de base (100pb). Em B o amplificado de *SOD4*, em C, D E, F, G, amplificados referentes a *SOD1-3*, *SOD5-6*, respectivamente. Em I encontra-se o fragmento referente ao gene *CAP1*, em J à *ACT1* e em K, à *CAT1*.

5.5 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

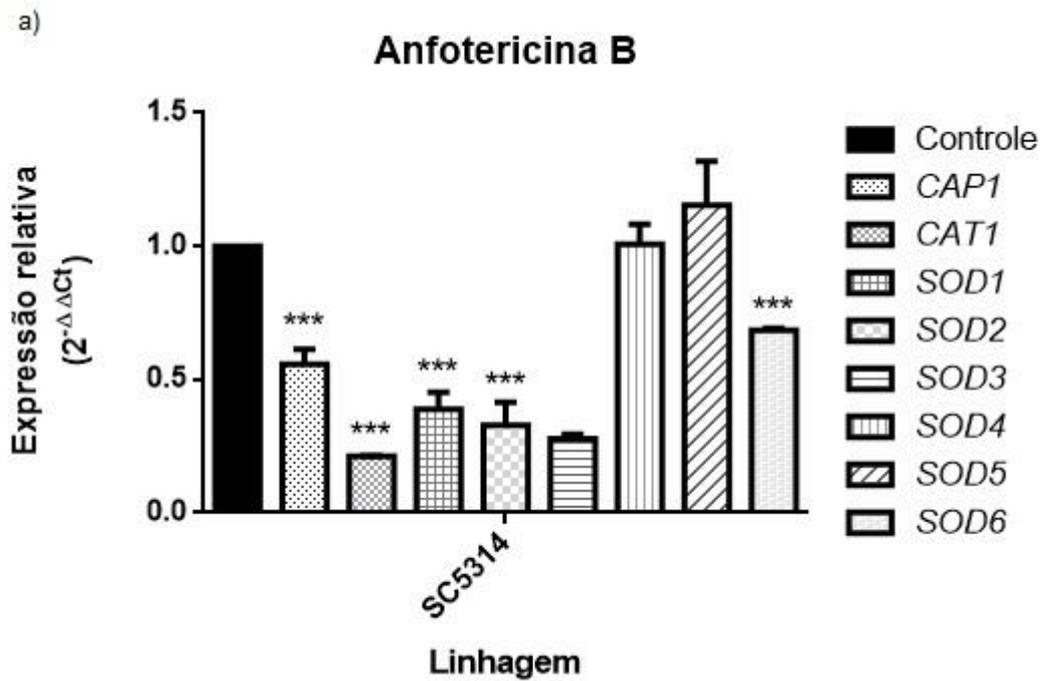
Na qPCR pconduzida com o fluoróforo “Sybr Green” é necessário, ao final dos ciclos de amplificação, a geração da curva de “melting” ou curva de dissociação. Para que ela seja gerada, a temperatura no equipamento é elevada gradativamente, em intervalos de 0,1 e 0,5°C, de 60 a 95°C, geralmente. A partir do princípio de que as fitas dupla de DNA desnaturam a uma determinada temperatura, os fragmentos gerados na reação de qPCR se desnaturam quando é atingida a temperatura de dissociação específica de cada fragmento, e isso garante se o que foi amplificado é ou não específico. O presente trabalho não apresentou incoerência com os valores de T_m , confirmando que o amplificado é referente ao gene pesquisado.

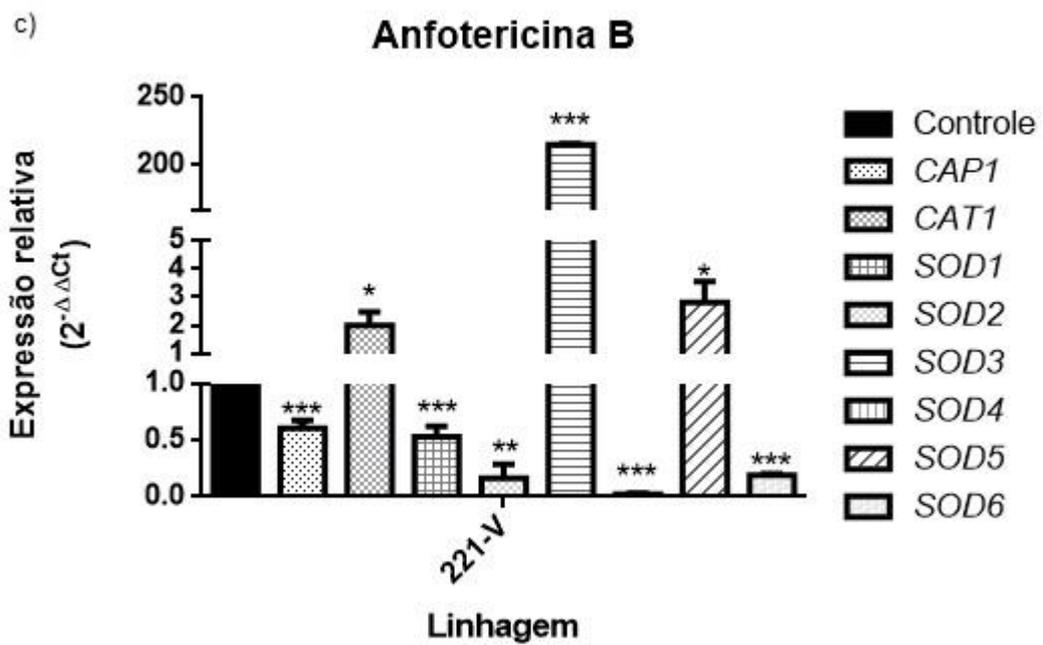
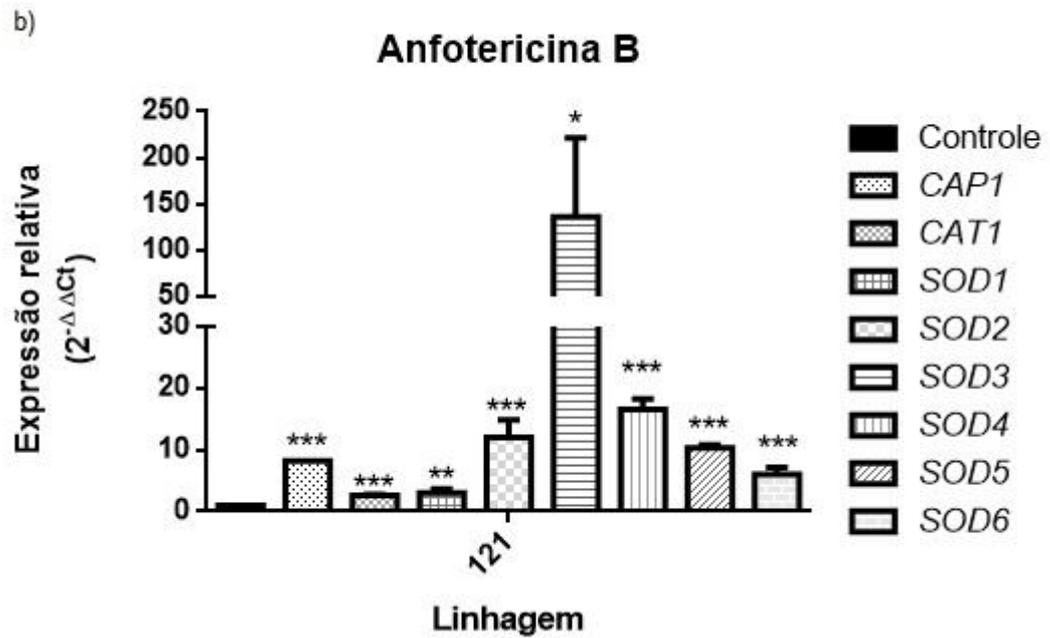
A PCR quantitativa permitiu a análise da expressão gênica diferencial dos genes alvo (*CAP1*, *CAT1*, *SOD1-SOD6*) dos isolados de *C. albicans* nos diferentes tipos de tratamentos. Após o cálculo do perfil de amplificação de cada isolado, utilizou-se o mesmo número mínimo de ciclos para amplificação (“Threshold”) de cada gene para todas as análises. A partir dos dados obtidos, foram gerados gráficos com a expressão relativa dos genes alvo, em cada tratamento e linhagem

estudada, em relação ao gene endógeno *ACT1*. Uma resposta bem caracterizada de micorganismos eucarióticos ao estresse oxidativo é a rápida indução de mRNAs que codificam proteínas relacionadas à detoxificação, como Sodp e Catp (DANTAS et al., 2015).

Primeiramente, na Figura 14 (a, b e c) estão apresentados os gráficos referentes à expressão relativa, ou abundância relativa de mRNA, dos genes alvos das linhagens previamente tratadas com as concentrações subinibitórias de anfotericina B.

Figura 34 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de anfotericina B.





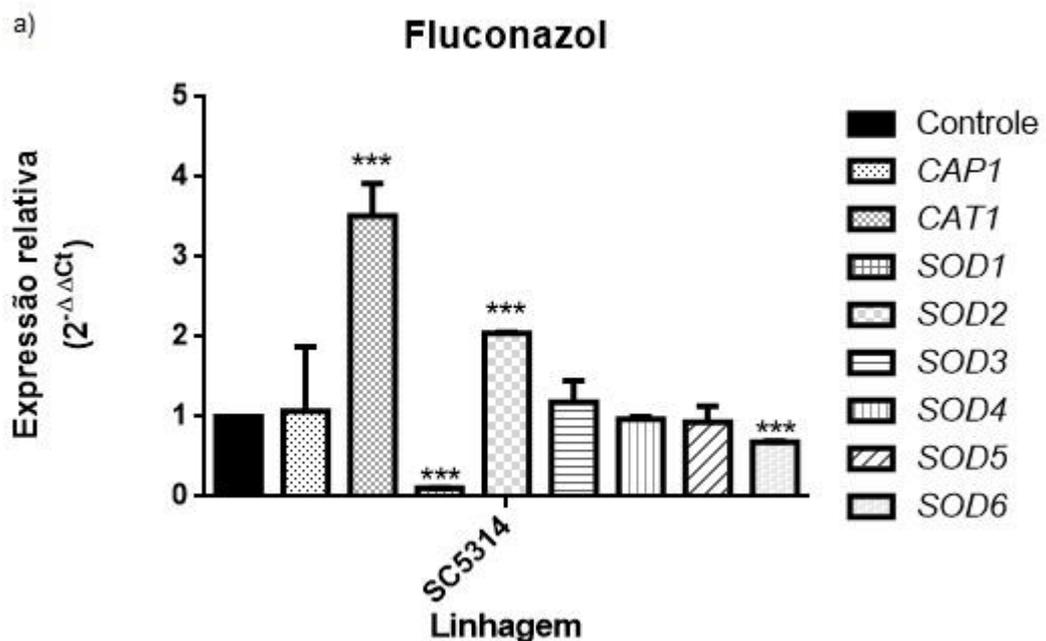
Fonte: autora.

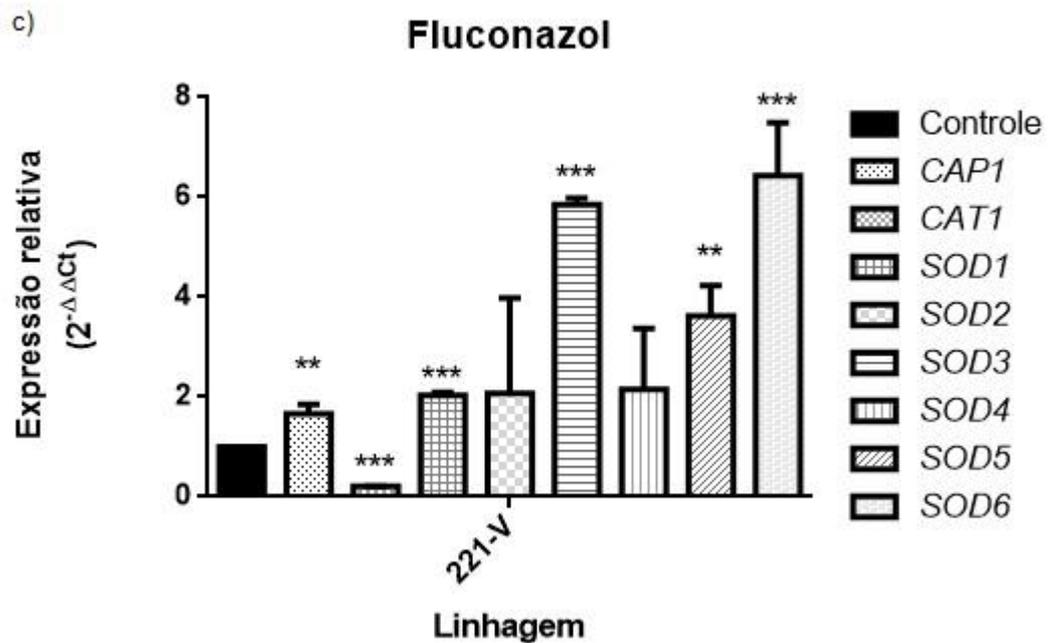
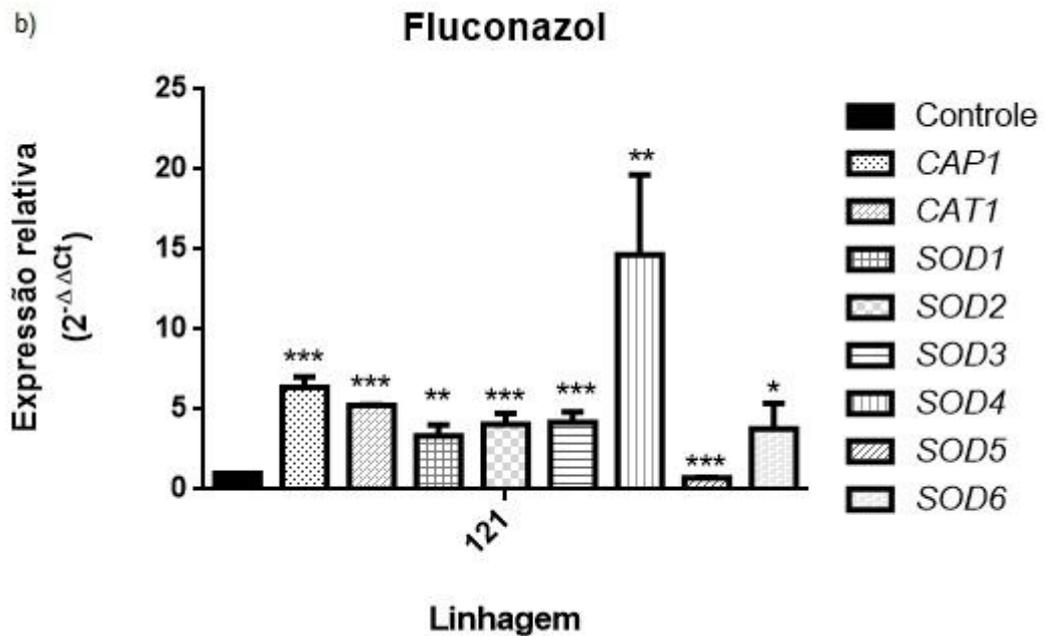
Nota: Em **a** tem-se a expressão relativa dos genes alvos em *C. albicans* SC5314 e em **b** e **c**, nos isolados 121 e 221-V. Os dados (média \pm desvio padrão) são representativos de triplicatas, foram normalizados pelo gene *ACT1* e expressos em relação ao isolado controle, através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Mediante ao apresentado nos gráficos, é possível constatar que o tratamento prévio do isolado SC5314 com anfotericina B não apresentou aumento significativo na expressão de nenhum dos genes analisados, entretanto, *SOD4* e *SOD5* aumentaram de maneira não significativa em relação ao controle não tratado. Em contrapartida, o tratamento reduziu a expressão, de maneira significativa, a expressão dos demais genes (*CAP1*, *CAT1*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3* e *SOD6*). Para o isolado 121 e 221-V, houve o aumento significativo na expressão de todos os genes-alvos com destaque para *SOD3*.

Na Figura 15 (a, b e c) estão expostos os gráficos resultantes da análise da expressão diferencial dos genes alvos com os isolados tratados com as respectivas concentrações subinibitórias do antifúngico fluconazol:

Figura 15 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de fluconazol.





Fonte: autora.

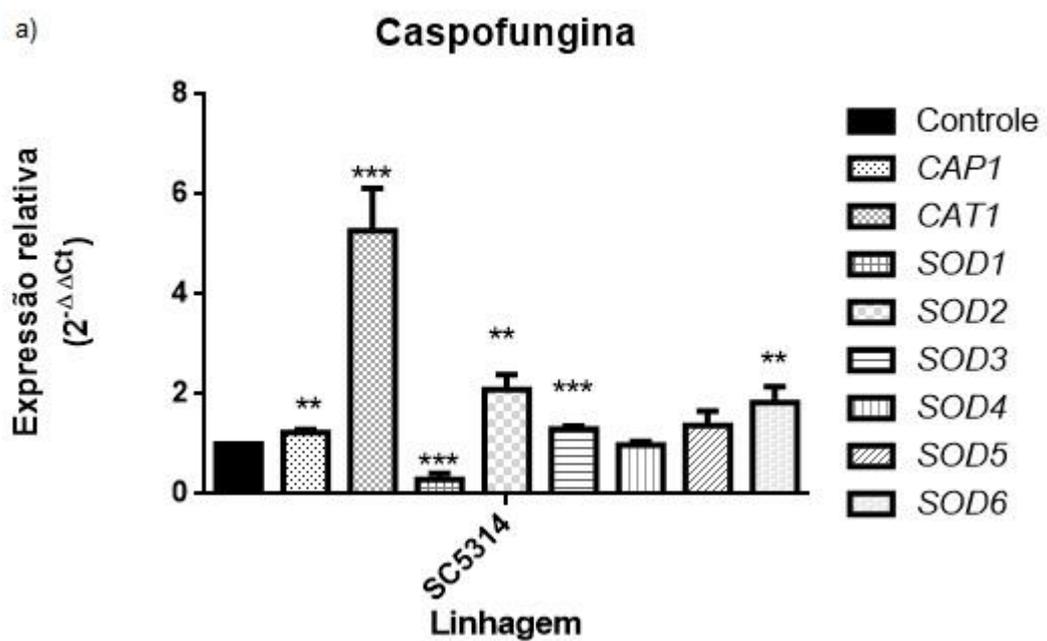
Nota: Em **a** tem-se a expressão relativa dos genes alvos em *C. albicans* SC5314 e em **b** e **c**, nos isolados 121 e 221-V. Os dados (média ± desvio padrão) são representativos de triplicatas, foram normalizados pelo gene *ACT1* e expressos em relação ao isolado controle, através do método 2^{-ΔΔCt} (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

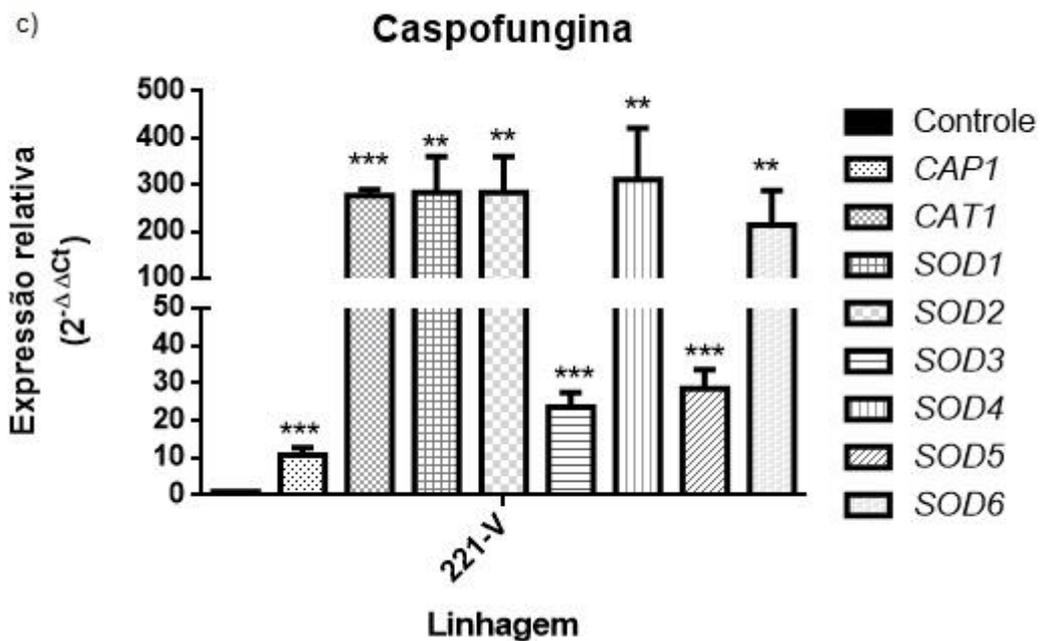
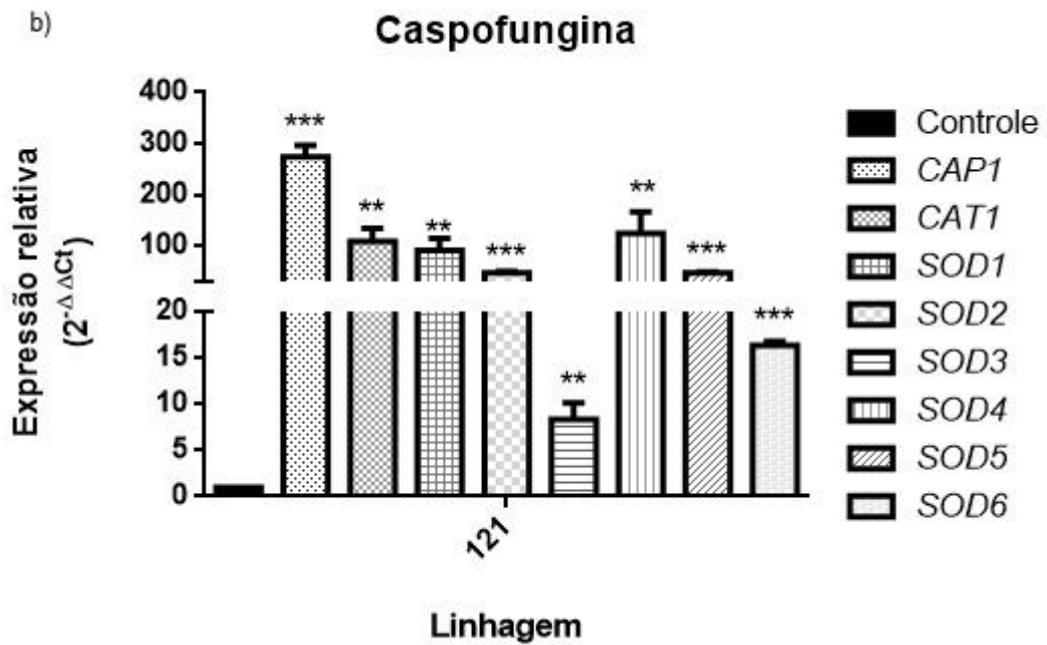
No caso dos isolados tratados com o antifúngico fluconazol, a linhagem SC5314 apresentou uma expressão aumentada, com significância, para os genes

CAT1 e *SOD2*, e uma expressão diminuída para *SOD1* e *SOD6*. No isolado 121, ocorreu uma modulação positiva na expressão de 7 dos 8 genes estudados, *CAP1*, *CAT1*, *SOD1-4* e *SOD6*, enquanto que no 221-V, aumentaram *CAP1*, *SOD1*, *SOD3*, *SOD5* e *SOD6*.

Na Figura 16, estão expostos os gráficos referentes aos dados da expressão relativa dos genes estudados nas linhagens sob tratamento da caspofungina:

Figura 46 - Abundância relativa de mRNA dos isolados tratados com concentrações subinibitórias de caspofungina.





Fonte: autora.

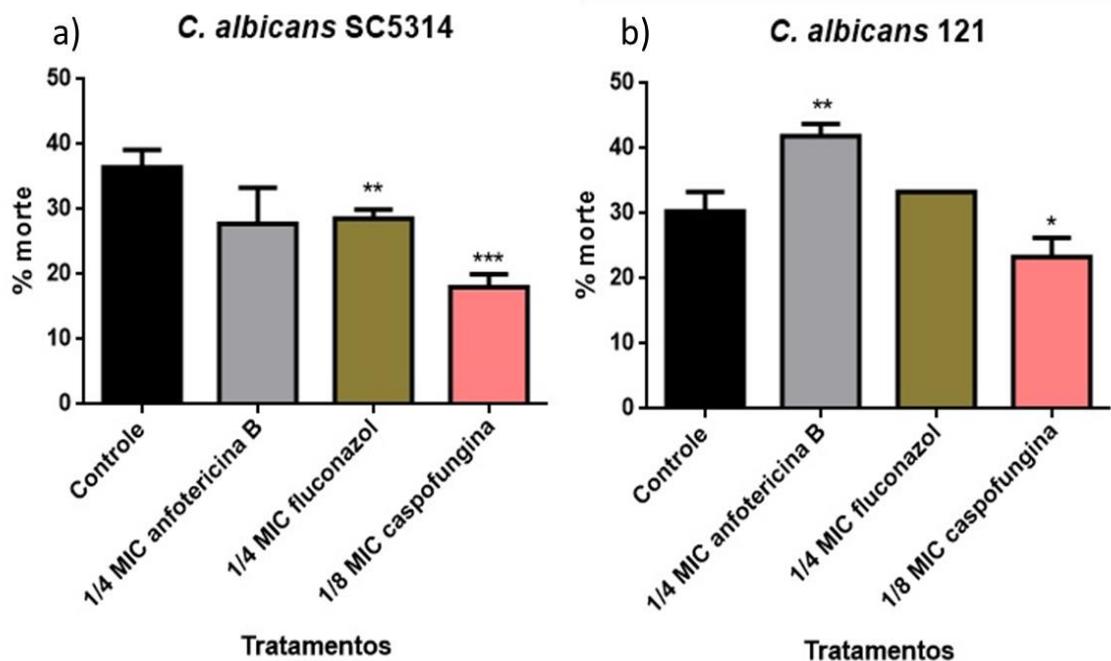
Nota: Em **a** tem-se a expressão relativa dos genes alvos em *C. albicans* SC5314 e em **b** e **c**, nos isolados 121 e 221-V. Os dados (média \pm desvio padrão) são representativos de triplicatas, foram normalizados pelo gene *ACT1* e expressos em relação ao isolado controle, através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

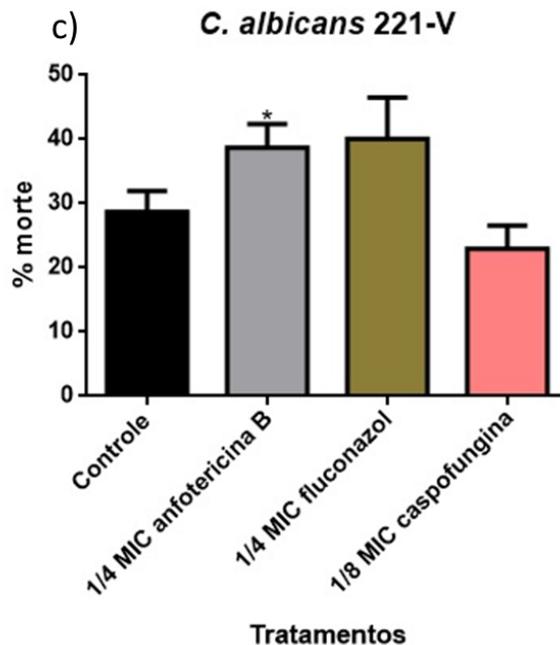
Em relação ao controle não tratado, o isolado SC5314 apresentou aumento significativo na expressão de *CAP1*, *CAT1*, *SOD2*, *SOD3* e *SOD6*, e diminuição significativa em *SOD1*. *SOD4* e *SOD5* apresentaram diminuição e aumento não significativos, respectivamente. Nos dois outros isolados, 121 e 221-V, todos os genes foram significativamente mais expressos quando estes foram tratados com a caspofungina.

5.6 Avaliação da capacidade fungicida dos fagócitos

A porcentagem de morte dos isolados após o contato com os macrófagos estão apresentados na Figura 17.

Figura 17- Porcentagem de morte de *C. albicans* tratadas com antifúngicos e em contato com macrófagos.





Fonte: autora.

Nota: O tratamento prévio das linhagens com os antifúngicos não alterou de maneira significativa a taxa de morte das linhagens de *C. albicans* com exceção da linhagem 121 nos tratamentos com anfotericina B e caspofungina (* $p > 0.005$). Em a, b e c são apresentados os gráficos referentes a *C. albicans* SC5314, 121 e 221-V.

Para o isolado SC5314, os tratamentos com fluconazol e caspofungina diminuíram, de maneira significativa, a porcentagem de morte do fungo quando em contato com o fagócito, em relação ao controle não tratado. No isolado 121, apenas a caspofungina diminuiu significativamente essa taxa, enquanto que, a anfotericina B, aumentou. Em 221-V, é possível constatar a diminuição, porém sem significância, com o tratamento com a caspofungina e aumento significativo com a anfotericina B.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas muito tem-se falado sobre o acúmulo intracelular de ERO a partir do tratamento antifúngico como mecanismo adicional de ação de nomeados fármacos disponíveis. O mecanismo de ação clássico da anfotericina B, embora seja bem conhecido, não é considerado crucial, tão pouco, o único, uma vez que existem mecanismos adicionais que contribuem para o desfecho do tratamento antifúngico. Diferentes estudos confirmam que o tratamento com diferentes concentrações deste antifúngico levam ao acúmulo de ERO intracelular em cepas fúngicas. O primeiro artigo que reporta informações a respeito da indução de ERO como parte da ação antifúngica é de 1986 no qual Sokol-Anderson e colegas mostraram que o tratamento com anfotericina B induzia danos oxidativos associado ao efeito fungicida contra *C. albicans* (SOKOL-ANDERSON et al. 1986). As moléculas de anfotericina B podem se auto-oxidar e como consequência deste evento, está a indução do estresse oxidativo. Mesa-Arango e colegas, em um estudo com diversas linhagens fúngicas, dentre elas *C. albicans* SC5314, concluíram que a produção e acúmulo de ERO são importantes mediadores dos efeitos fungicidas da anfotericina B a concentrações de 2 ou 8 µg/mL e *C. albicans* tratadas com este antifúngico a 2 e 8 µg/mL apresentaram número significativo de células com acúmulo de radicais livres (MESA-ARANGO et al. 2014:). Guirao-Abad e colaboradores, ao tratarem *C. albicans* com concentrações de 0,5-1,0 vezes o valor da MIC de anfotericina B (0,06-0,12 µg/mL), observaram marcada indução de acúmulo de ERO intracelular e maior atividade de peroxidases, como catalase, glutathiona peroxidase e, também, de superóxido dismutase, além de danos celulares e estruturais. Além dos estudos com cepas de *C. albicans*, estudos conduzidos com outras espécies, como *Saccharomyces cerevisiae* pré-tratadas com MIC de anfotericina B, constataram a formação e acúmulo de ERO além da modulação na expressão de genes relacionados à resposta geral ao estresse e alteração no perfil metabólico (BELENKY; CAMACHO, COLLINS, 2013). De acordo com esses e outros demais estudos disponíveis, fica claro que o antifúngico em questão, independente da concentração, promove a produção e o acúmulo intracelular de ERO, e que este é considerado um mecanismo importante e crucial no desfecho da terapia, uma vez que o dano oxidativo severo pode contribuir para a morte do fungo, porém, quando não é efetivo, pode gerar respostas do fungo frente a esse estresse,

contribuindo para sua defesa e sobrevivência. Diante disso, é notório que os pré-tratamentos com este antifúngico, podem alterar o perfil de expressão dos genes relacionados à resposta antioxidante. No isolado padrão, SC5314, houve uma diminuição significativa na expressão de *CAT1* e *CAP1*, indicando que, possivelmente não ocorreu estresse por H_2O_2 ou ainda que, a enzima não tenha sido afetada, não fazendo necessária a transcrição de genes para sua futura tradução. É observado ainda, mesmo que sem significância, o aumento na expressão de *SOD4* e *SOD5* como um possível reflexo da presença de ERO extracelular, já que essas são ancoradas ao GPI (DÜHRING et al., 2015). A menor expressão dos demais genes da família *SOD*, com exceção de *SOD6*, é, possivelmente, devido à ausência do acúmulo intracelular de ERO, uma vez que *Sod1p*, *Sod2p* e *Sod3p* são citosólicas. No isolado 121, foi constatado um aumento significativo na expressão de todos os genes. A MIC para este isolado foi a mais baixa quando em comparação com as outras duas linhagens e, assim sendo, as concentrações de pré-tratamento, também. Uma possibilidade para que seja percebido esse aumento na expressão dos genes, é que, a concentração subinibitória, por ser baixa, possa estar matando menos células, e, por outro lado, estressando-as, fazendo com que essas, a fim de responder aos estímulos, neste caso, oxidantes, ative suas vias transcricionais de genes de defesa antioxidante, como os aqui apresentados. É interessante observar nesse isolado, que *CAP1* e *CAT1* foram mais expressos que o controle, de maneira significativa, porém, discreta. Uma das possibilidades seria a ausência ou baixa concentração de H_2O_2 no meio extracelular. Outra possibilidade seria a ineficiência das *Sodp* ancoradas ao GPI em dismutar o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , implicando na ausência da necessidade de transcrição de genes que codificam *Catp*, ou, ainda, o próprio estresse de membrana celular, implica na destruição das enzimas ancoradas ao GPI, permitindo a internalização de oxidantes, sobrecarregando *Sod3p* citosólica, levando ao aumento marcado da expressão de seu gene codificador. Em um estudo do perfil genômico utilizando a técnica de “microarray” que permite a investigação de milhares de genes em uma dada amostra usando reações de hibridização, Liu e colaboradores constataram que 256 genes foram expressos diferencialmente após a exposição de *C. albicans* à 0,029 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B (IC_{50}) durante 3 horas, sendo que, a expressão diferencial diz respeito tanto a maior quanto a menor expressão dos genes em questão. Com relação aos genes relacionados à resposta antioxidante, constataram uma regulação positiva de *CAT1* e *SOD2* em *C. albicans*

SC5314 tratadas com 0,029 µg/mL de anfotericina B (LIU et al., 2005). Portanto, é esperado que outros genes também estejam mais ou menos expressos. Corroborando a isso, no isolado 221-V é possível ver um quadro de alteração variável na expressão de todos os genes estudados, alguns sendo mais e outros sendo menos expressos de maneira significativa. Desses genes menos expressos, *SOD1* e *SOD2* são responsáveis por codificar enzimas nucleares, sendo que Sod2p está relacionada a outros tipos de estresses, como térmico e osmótico (HWANG et al. 2003). Entretanto, essa subexpressão parece ser compensada pela superexpressão de *SOD3*, que também origina Sod3p citosólica. *SOD4* e *SOD6* são responsáveis pela tradução de duas enzimas ancoradas ao GPI, localizadas na superfície celular, e, portanto, relacionadas à detoxificação de oxidantes extracelulares (DE GROOT; HELLINGWERF; KLIS, 2003). Contudo, *SOD5* foi mais expresso em relação ao controle não tratado, e, por ser responsável pela tradução de Sod5p, também ancorada ao GPI como Sod4p e Sod6p, pode ter reprimido a expressão de *SOD4* e *SOD6*. Sendo assim, aparentemente, na linhagem 221-V, o tratamento com a anfotericina B, levou ao acúmulo intracelular e extracelular de ERO. Devido a essas variações, não é possível criar uma correlação direta entre o tratamento com as concentrações subinibitórias dos antifúngicos e a expressão de genes da resposta antioxidante, mesmo que na literatura hajam estudos concretos acerca da produção e acúmulo intracelular de ERO como mecanismo de ação adicional da anfotericina B, a forma como o fungo responde pode variar.

Em relação ao fluconazol, alguns trabalhos demonstraram que o efeito de fármacos azólicos, como o miconazol, contra *C. albicans* está relacionado à produção de ERO. Um estudo conduzido por Kobayashi e colegas (2002), constatou que tanto o miconazol quanto o fluconazol aumentaram níveis de ERO em *C. albicans* tratadas com MIC 0,125 µg/mL destes antifúngicos (KOBAYASHI et al., 2002). Outro estudo que evidencia este fato demonstrou que o fluconazol induzia tanto o estresse oxidativo quanto nitrosativo em *C. albicans* após 2h de incubação com MIC 16g/L de fluconazol. Além disso, o fungo se tornou mais resistente ao oxidante diamida, sugerindo que o pré-tratamento induziu uma resposta antioxidante eficaz, além de ter aumentado a expressão de genes relacionados a essa resposta, como *TRR1* e *GRE2* (ARANA, NOMBELA, PLA; 2009) Além desses estudos, quando *C. albicans* foi tratada com o IC₅₀ 19,13 µg/mL de cetoconazol, outro

antifúngico azólico, foi observada a expressão diferencial de 82 genes, dentro eles, *SOD2*, mostrando que, assim como a anfotericina B, este também é capaz de alterar o perfil transcricional de genes relacionados ao processo oxidante (LIU et al., 2002). Outro relato da indução de acúmulo de ERO por fármacos azólicos, foi mostrado por Ferreira e colaboradores, porém utilizando como espécie de estudo o fungo *Cryptococcus gattii*. Os resultados evidenciaram que o itraconazol (8 vezes a concentração de MIC) aumentou o acúmulo de ERO, e conseqüentemente, danos a lipídios, além incrementar a atividade de Sodp e enzimas peroxidases (FERREIRA et al. 2013). Linares e colaboradores relataram que cepas resistentes ao fluconazol apresentaram maiores atividades enzimáticas de Sodp e Catp, provavelmente, como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado por este fármaco (LINARES et al. 2013).

Mediante ao apresentado, embora seja menos evidente que para a anfotericina B, os fármacos azólicos também levam ao acúmulo de ERO contra cepas fúngicas, e pode gerar uma adaptação deste em resposta ao ambiente oxidante, seja pelo aumento da atividade de enzimas detoxificantes, seja por alteração na expressão de genes. Dos genes mais expressos, no isolado SC5314, há *CAT1*, demonstrando a provável presença de H_2O_2 no meio extracelular. *SOD4-6*, ancoradas ao GPI, foram menos expressas em relação ao controle não tratado, mostrando que, possivelmente, não houve aumento de $O_2^{\cdot-}$ extracelular, ou que a atividade das enzimas não foi afetada. Em relação aos genes que codificam Sodp citosólica, *SOD1* e *SOD3* foram menos expressos em relação ao controle não tratado, entretanto, houve maior expressão de *SOD2*, evidenciando, novamente, um possível sistema de compensação na expressão destes genes. Ainda, é possível relacionar os resultados ao mecanismo fungistático do fármaco, uma vez que, se ela apenas cessa o crescimento, provavelmente menos células morrem, ocorre menor perturbação da membrana plasmática, e das enzimas nela presentes, parecendo não haver necessidade de novas traduções compensatórias. O isolado 121 apresentou superexpressão de todos os genes, com exceção de *SOD5*. Porém, *SOD4* foi o gene mais expresso dentre todos os outros, levando a crer que, por um mecanismo compensatório, *SOD5* tenha sido menos expresso em relação ao controle. Houve uma correlação positiva no perfil de expressão dos genes *CAP1* e *CAT1*, ambos foram superexpressos, evidenciando a presença de H_2O_2 extracelular,

o qual é detectado por *CAP1* que ativa a transcrição de *CAT1*. Ainda é possível correlacionar com a maior concentração de oxidantes no meio extracelular, já que a maior expressão de *SOD4* junto da expressão aumentada de *CAT1*, tratam de genes que são traduzidos em proteínas ancoradas à membrana. No isolado 221-V, todos os genes tiveram maior expressão em relação ao controle não tratado, com exceção de *CAT1*. Nesse caso, vale a pena salientar que *C. albicans* possui outras enzimas relacionadas à resposta antioxidante frente ao H_2O_2 , como glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase, por exemplo, que, podem ter sido mais expressas compensando a subexpressão de *CAT1*. Entretanto, a maior expressão de *CAP1* em relação ao controle não tratado, demonstra a presença de H_2O_2 e uma possível regulação positiva futura na expressão de *CAT1*. Dentre as peroxidases que *C. albicans* apresentam, *Catp* é a mais estudada, além disso, a possibilidade de correlacionar a expressão de *CAT1* ao gene que ativa sua transcrição, *CAP1*, foi crucial para a escolha deste gene na avaliação da expressão deste na resposta antioxidante aos tratamentos antifúngicos deste trabalho. *SOD3* foi mais expresso que o controle, mesmo que *SOD1* e *SOD2* também tenham sido, porém de maneira mais discreta, salientando, novamente, um possível mecanismo compensatório da expressão dos genes codificadores de *Sodp* citosólicas. *SOD4-6* também tiveram perfil de expressão aumentados possivelmente como um mecanismo de resposta à antioxidantes extracelulares e necessidade de tradução de novas enzimas que mantenham contato com o meio extracelular.

Poucos relatos estão disponíveis na literatura acerca da relação ERO x caspofungina. Dentre os antifúngicos elencados para este trabalho, apenas este apresenta mecanismo de ação envolvendo dano à parede celular. O primeiro estudo que analisa agentes perturbadores de parede e acúmulo de ERO, foi conduzido por Yu e colegas. Foi demonstrado que sequestradores de ERO atenuaram os efeitos de agentes perturbadores de parede como a caspofungina, (YU et al. 2016). Entretanto, diferentemente do encontrado para anfotericina B, para a micafungina, um antifúngico da classe das equinocandinas, o mecanismo fungicida não está associado à produção e acúmulo de ERO. Guirao-Abad e colegas comprovaram isso, pois, para células de *C. albicans* tratadas com a MIC (0.016 $\mu\text{g/mL}$), houve um discreto aumento de ERO, bem como na atividade das enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Os danos celulares e estruturais encontrados

foram significativos, entretanto não é possível correlacioná-los com ERO (GUIRAO-ABAD et al. 2017).

No isolado SC5314, *SOD1* foi menos expresso em relação ao controle, mas, em compensação *SOD2* e *SOD3* foram mais expressos, demonstrando a probabilidade da presença de oxidantes no meio intracelular. *SOD4* foi menos expresso em relação ao controle, enquanto *SOD5* e *SOD6* foram mais expressos em relação ao controle não tratado, demonstrando a necessidade da tradução de enzimas ancoradas ao GPI, provavelmente pela presença de oxidantes no meio extracelular. Isto parece ser evidente pois houve aumento na expressão de *CAT1* também responsável pela detoxificação de H_2O_2 do meio extracelular. No isolado 121 todos os genes foram mais expressos, de maneira significativa e relevante, quando comparado ao controle não tratado. *CAP1* e *CAT1* foram mais expressos em relação ao controle, o que leva a crer que houve a presença de H_2O_2 no meio extracelular. *SOD1*, *SOD2* e *SOD3* também tiveram suas expressões aumentadas como um provável “feedback” da presença de $O_2^{\bullet-}$ no interior da célula fúngicas. A expressão de *SOD4-6* aumentou e isso pode ter sido provocado pela presença de $O_2^{\bullet-}$ no meio extracelular. Dentre os isolados utilizados neste estudo, 121 foi o que apresentou menor MIC. Embora a caspofungina seja um fármaco efetivo, as baixas concentrações podem gerar ainda mais estresse em relação às concentrações mais altas, mesmo que subinibitórias. Possivelmente, menos células morreram, mas, o ambiente se tornou mais hostil com a perturbação ocasionada pela caspofungina, o que ativou vias de transcrição dos genes em questão. No isolado 221-V o perfil de expressão de todos os genes também foi maior que o controle não tratado, o que leva a crer que, a perturbação a nível de parede celular é significativa quando em doses subinibitórias, como mostrado por Liu e colaboradores, estudo no qual *C. albicans* quando tratada com 0,0075 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) apresentou alteração na expressão de 480 genes analisados por “microarray” e destes, 81 foram mais expressos, e, alguns deles, relacionados à resposta antioxidante, como *CAP1*, *CAT1*, *GPX* e *TRX* evidenciando as implicações a nível gênico deste antifúngico (LIU et al. 2005). Embora existam enzimas que atuam em relação a oxidantes intra ou extracelulares, Liu e seus colaboradores, afirmaram que o estresse gerado por agentes que atuam em parede celular, leva a ativação de vias que aumentam a síntese de ERO pelo retículo endoplasmático. Sendo assim, como foi observado

neste estudo, maiores alterações a níveis gênicos da resposta antioxidante frente à caspofungina, pode ter relação com seu mecanismo de ação, mas não que, este, seja dependente da produção de ERO, mas sim que, o aumento nos níveis de ERO seja uma consequência da perturbação de parede.

Em relação ao ensaio de “killing” era de se esperar que a resposta dos isolados frente aos fagócitos fosse incrementada, auxiliando na sobrevivência, principalmente naqueles cuja expressão de *SOD4* e *SOD5* foram mais expressos, como mostrado por Frohner e colaboradores. Neste estudo, eles demonstraram que *Sod4p* e *Sod5p* estão relacionadas à degradação de ERO extracelular, como o que é produzido por células do sistema imune do hospedeiro (FROHNER et al.2008). Contudo, um aumento na expressão gênica do sistema de detoxificação de oxidantes nem sempre significa uma efetiva resposta do fungo. A caspofungina incrementou a defesa do fungo frente aos fagócitos em todos os isolados, porém sem significância no isolado 221-V. Esses dados correlacionam com o encontrado na análise da expressão gênica, na qual esse antifúngico modulou a expressão de praticamente todos os genes de maneira positiva, apresentando menor porcentagem de morte. Mas, novamente, vale salientar que neste caso, a resposta de *Sod4p* e *Sod5p* são as mais relevantes por sua localização na membrana do fungo. Na linhagem SC5314, o fluconazol diminuiu discretamente a porcentagem de morte, porém com significância estatística, corroborando aqui com o encontrado por Arana, Nombela e Plá. Cepa pré-tratada com concentrações subinibitórias de fluconazol apresentou maior resistência à ação de HL60 (linhagem que pode ser diferenciada em fagócito) em relação a não tratada (ARANA, NOMBELA E PLÁ, 2010). Embora os resultados da análise “killing” pelos fagócitos pré-tratados com os antifúngicos não tenha sido como esperado, vale a pena salientar que a ativação de vias transcricionais não leva, necessariamente, ao aumento da tradução de proteínas, cuja função é detoxificar oxidantes internos e externos, a fim de evitar acúmulo de ERO intracelular e o desbalanço redox.

7 CONCLUSÃO

Mediante aos resultados encontrados neste trabalho, foi possível constatar que os tratamentos à concentrações subinibitórias dos antifúngicos modulam a transcrição de genes da resposta antioxidante, fazendo com que esses sejam mais ou menos expressos, a depender do isolado e da concentração de trabalho, destacando-se o tratamento com as subconcentrações de caspofungina. É notório que ocorreu influência na resposta antioxidante do fungo, sendo observado pelos resultados de expressão gênica, onde a maioria dos genes foram mais expressos, de maneira relevante e significativa em relação ao controle, e, também, pela resposta do fungo frente ao contato com os macrófagos, apresentando menor taxa de morte quando comparado ao controle não tratado e aos outros antifúngicos. Cabe salientar que existem outros mecanismos de defesa e evasão do fungo frente às células fagocíticas, como a filamentação e expressão de outros genes e proteínas. Embora resultados não tão relevantes tenham sido encontrados com os demais tratamentos, cabe a hipótese de que o comportamento de cada isolado não é idêntico, não sendo possível correlacionar os tratamentos com a expressão diferencial de genes específicos.

Serão necessários mais estudos acerca da produção e acúmulo de ERO relacionado aos diferentes tratamentos antifúngicos, porém, é notório que as concentrações subterapêuticas, acabam por estressar o fungo, fazendo com que esse ative vias transcricionais de genes importantes de defesa, resistência, evasão e equilíbrio redox.

Vale ressaltar a importância da conscientização do uso de antifúngicos, principalmente os de venda livre, haja visto que o número de cepas resistentes vem aumentando com o decorrer do tempo.

Assim sendo, fica clara a importância de ensaios de sensibilidade para a atualização dos “guidelines” para a terapia antifúngica adequada em infecções por *Candida* spp. Esses guias direcionam os tratamentos para candidíases, sendo de extrema importância para a escolha do tratamento eficaz a fim de sanar a infecção. Caso a concentração do antifúngico não seja a ideal, é perceptível que

concentrações subletais acabam por auxiliar o fungo e deixá-lo mais preparado para vencer as barreiras impostas pelo sistema imune e pelos fármacos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, G. C. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 147, 2018.

AHMAD, Z., HUSSAIN, M. A., KABIR, M. A. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. **International Scholarly Research Notices: Microbiology**, 2012.

ARANA, D. M., NOMBELA, C. PLÁ, J. Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p. 54-62, 2009.

ARENDRUP, M. C. et al. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1, jan. 2017. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing__definitive.pdf> Acesso em: 8 nov. 2017.

ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST technical note on *Candida* and micafungin, anidulafungin and fluconazole. **Mycoses**, n. 57, p. 377-379, 2014.

BAHN, Y.S., SUNDSTROM, P. CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 10, n.2, p. 3211-3223, 2001.

BELENKY, P., CAMACHO, D., COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. **Cell Reports**, v.3, n.2, p. 350-358, 2012.

BERKOW, E.L., LOKHART, L.S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237-245, 2017.

BENNETT, J. E. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 11, p. 1154–1159, 2006.

BLYTH et al. Not Just Little Adults: Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, 2009.

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

BENOV et al., Copper, zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli*: periplasmic localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, n. 1, p. 508-511, 1995.

BINK et al., Superoxide Dismutases Are Involved in *Candida albicans* Biofilm Persistence against Miconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4033-4039, 2011.

BROTHERS, K. M., NEWMAN, Z. R., WHEELER, R. T., Live imaging of disseminated candidiasis in zebrafish reveals role of phagocyte oxidase in limiting filamentous growth. **Eukariotic Cell**, v. 10, n. 7, p. 932-944, 2001.

BROWN et al. Stress adaptation in a pathogenic fungus. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 1, p. 144-155, 2014.

BROXTON, C. Sod enzymes in a human fungal pathogen: oxidative stress protection versus cellular signaling. 2017. 125f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Johns Hopkins University, 2017.

BROXTON, C. N.; CULOTTA, V. C., An Adaptation to Low Copper in *Candida albicans* Involving Sod Enzymes and the Alternative Oxidase. **Plos One**, v. 11, n. 12, 2016.

CAFFREY et al., Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. **Cell Chemical Biology**, v. 8, n. 7, p. 713-723, 2001.

CALDERONE, R. A. Taxonomy and Biology of *Candida*. In: Calderone, RA, *Candida and Candidiasis*. **ASM Press**, Washington, p. 15-27, 2002.

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

CHAVES, G. M., SILVA, W. P. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, 2012.

CHEN et al., Engineering of *Glarea lozoyensis* for Exclusive Production of the Pneumocandin B0 Precursor of the Antifungal Drug Caspofungin Acetate. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n.8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infect Disease**, v 17 n 3, 2013.

COLOMBO et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2813.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 518-527, 2010.

CORNISTEIN, W. et al. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, 2013.

COSTA et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p.91-98, 2010.

DANTAS, A. S. et al. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, pp 142-135, 2015.

DE GROOT, P., HELLINGWERF, K.J., KLIS F.M. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. **Yeast**, v.20, n.9, p.781-796, 2003.

DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6 n. 1, p. 77-90, 2014.

DERVEAUX, S., VANDESOMPELE, J., HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227-230, 2009.

DINAUER, M.C.; NEWBURGER, P. E. The respiratory burst oxidase and the Molecular genetics of chronic granulomatous disease. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v, 2003.. 30, n. 4, 2010.

DÜHRING, S. et al., Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*—understanding and modeling defense and evasion strategies. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

DOU, N. Risk factors for *Candida* infection of the genital tract in the tropics. **African Health Sciences**, v.14, n. 4, 2014.

ENOCH, D.A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods in Molecular Biology**, 2017.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. **Eucast**, p. 1–5, 2017.

FALAGAS, M. E., ROUSSOS, N., VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infect Diseases**. v.14, n.11, p. 954-966, 2010.

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

FRADIN et al. Graulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood, **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 397-415, 2005.

FROHNER et al. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 240-252, 2008.

GILLUM, A. M.; TSAY, E. Y.; KIRSCH, D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. **Molecular and general genetics**, v. 198, n. 2, p. 179-182, 1984.

GLOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GONÇALVES, A. H. Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina b no tratamento de micoses. Monografia apresentada ao Curso de Especialização de Microbiologia – ICB Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Belo Horizonte, MG, 2011.

GUIRAO-ABAD et al., ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 4-5, p. 241-248, 2017.

HAO et al., Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1 p. 326-332, 2013.

HOHL, T.M., RIVERA, A., PAMER, E.G. Immunity to fungi. **Current opinion in Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 456-472, 2006.

HROMATKA, B. S.; KIDELEN, A. F.; KAYSER, O. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4814-4826, 2005.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997–2005, 2001.

HUMPHREY, M. J.; JEVANS, S.; TARBIT, M. H., Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 548-653, 1985.

HWANG C.S. et al. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. **Yeast**, v.20, p. 929-941, 2003.

ISAACSON, et al., Selective inhibition of 14 α -desmethyl sterol synthesis in *Candida albicans* by terconazole, a new triazole antimycotic. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 21, n. 3, p. 333-343, 1988.

ISHIDA, K. Antifúngicos: Mecanismo de Ação e Resistência. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade de São Paulo.

KABIR, M. A., HUSSAIN, M. A., AHMAD, Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. **International Scholarly Research Notices**, 2012.

KALORITTI et al. Mechanisms Underlying the Exquisite Sensitivity of *Candida albicans* to Combinatorial Cationic and Oxidative Stress That Enhances the Potent Fungicidal Activity of Phagocytes. **mBio**, v.5, n.4, 2014.

KAUR, R., MA, B., CORNACK, B.P., A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Boston, v. 104, n. 18, p. 7628-7633, 2007.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225.e1-225.e10, abr. 2011.

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

KOH et al., Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 35, 2008.

LAMARRE, C. et al. *Candida albicans* Expresses an Unusual Cytoplasmic Manganese-containing Superoxide Dismutase (SOD3 Gene Product) upon the Entry and during the Stationary Phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n.4, p. 43784-43791, 2001.

LASS-FLORL C. et al. EUCAST technical note on amphotericin B. **Clin Microbiol Infect.**, n.17, p.27-29, 2011.

LAVANIEGOS-SOBRINO et al., Genotyping of the MTL loci and susceptibility to two antifungal agents of *Candida glabrata* clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 404, n. 5, p. 775-782, 2009.

LEMKE, A.; KIDELEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

LINARES et al. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n. 6, p. 725-758, 2013.

LIU et al. Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole, Polyene, Echinocandin, and Pyrimidine Antifungal Agents in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n. 6, p.2226-2236, 2005.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUMBERAS, C.; LIZASSAIN, M., AGUADO, J. M., Systemic Antifungals Agents. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 21, n. 7, 2003.

MARTCHENKO et al., Superoxide Dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Hyphal-induced SOD5 Gene. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15. n. 2, p. 456-467, 2004.

McCORD; FRIDOVICH, Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MESA-ARANGO et al., The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to

the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrobial Agentes and chemotherapy**, v. 58, n11, p.6627-6638, 2014.

MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 3, n.3, p. 183-195, 2013.

MONTES, H.M.M. et al. Protein glycosylation in *Candida*. **Future Microbiology**, v. 4, p. 1167-1183, 2009.

MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. **Redox Report**, .v 5, p. 557-285, 2000.

MORGENSTERN, et al. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Experimental Medicine**. v. 185, n. 2, p. 207– 218, 1997.

NAILIS et al., Real-time PCR expressing profiles of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. **BMC Microbiology**, 2010.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2290–2303, 2009.

OLIVER et al., *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2019.

PAPPAS et al., Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Guidelines**. 2016

PEREIRA, D. G. The importance of metabolism in drug design. **Química Nova**, v. 30, p. 171-177, 2007.

PEREIRA, E. M. A β 2-glicoproteína I no contexto da resposta inflamatória de fase aguda. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

PERON et al., Resistance Surveillance in *Candida albicans*: a five-year antifungal susceptibility evaluation in a brazilian university Hospital. **Plos One**, 2016.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 1 jan. 2007.

PRADHAN et al., Elevated catalase expression in a fungal pathogen is a double-edged sword of iron. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 5, 2017.

RAEDER, U; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, 1985.

RAMAGE, G., MARTINEZ, J.P., LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS yeasts research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RICHARD, M.L., PLAINE, A. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v.6, n. 2, p. 119-133, 2006.

RICHARDSON et al. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. **Reviews of Infectious Diseases**, 1990.

SAMPAIO et al., Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with recurrent bloodstream infection. **Plos One**, 2010.

SAMPAYO, C. Aula Fármacos Antifúngicos. Farmacologia II Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. 2010.

SANCHEZ-MARTINEZ, C., PEREZ-MARTIN, J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 214-221, 2001.

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., LASS-FLÖR, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, 2015.

SARDI, J. C. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SCIENTIFIC, T. F. Interpretation of Nucleic Acid 260 / 280 Ratios. Thermo Scientific. p. 7707, 2012.

SEIDER, K. et al., Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Current Opinion e Microbiology**, v. 13, n.4, p.395-400, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIGMON, J.; LARCOM, L.L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 17, n. 10, p. 1524-1527, 1996.

SHENG et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3854-3918, 2014.

SOKOL-ANDERSON, M.L., BRAJTBURG, J., MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n, 1, p. 76-83, 1986.

SPELLBERG, B.J., FILLER, S.G., EDWARDS, J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.2, p. 244-251, 2005.

STANISZEWSKA et al., Role of Aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Post. **Mikrobiol**, Tübingen, Germany, v. 51, n. 2, pp 127-135, 2012.

TUNER, S.A., BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 9, 2014.

THOMPSON, D.S., CHARLISLE, P.L., KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-7782, 2011.

TSUCHIYA, S. et al., Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer**, v. 26, p. 171-176, 1980.

VIDIGAL, P. G., SVIDZINSKI, T. I. E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngicas ou não? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n; 1, p. 55-64, 2009.

VOLMER, A. A.; SZPILMAN, A. M.; CARREIRA, E. M. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 9, p. 1329–1349, 2010.

WANG et al., Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 1201-1209, 2006.

WANG et al., Efficacy and safety of echinocandins versus triazoles for the prophylaxis and treatment of fungal infections: a meta-analysis of RCTs. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 651-659, 2014.

WHEELER, R.T., FINK, G.R. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. **Plos Pathogens**, v.2, n.4, 2006.

YAN et al., The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. **Journal of Antimicrobial. Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 764-773, 2009.

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

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 10, p. 95-105.

YU et al., Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*. **Free Radical Biology and Medicine**, p. 572-583, 2016.

ZHANG, X. et al. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618-629, 2000.

