



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**EFEITOS DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E DA FOTOTERAPIA
ANTIFÚNGICA SOBRE UM ISOLADO CLÍNICO DE *Candida tropicalis*
RESISTENTE AO FLUCONAZOL**

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

**Salvador – Brasil
2014**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

EFEITOS DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E DA FOTOTERAPIA
ANTIFÚNGICA SOBRE UM ISOLADO CLÍNICO DE *Candida tropicalis*
RESISTENTE AO FLUCONAZOL

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Brasil
2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G633e Gomes Júnior, Rafael Araújo
Efeitos de compostos naturais, sintéticos e da fototerapia antifúngica sobre
Candida tropicalis resistente ao fluconazol / Rafael Araújo Gomes Junior. -
2014.

56 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Prof.Dr. Marcos André Vannier dos Santos,
Laboratório de Biologia Parasitária.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2014.

1. Candidíase. 2. Rapamicina, 3. Fluconazol. 4. Antígenos. I.Título.

CDU 582.28

* EFEITOS DE COMPOSTOS NATURAIS, SINTÉTICOS E DA FOTOTERAPIA ANTIFÚNGICA SOBRE
Candida Tropicalis FLUCONAZOL - RESISTENTE.*

RAFAEL ARAÚJO GOMES JÚNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

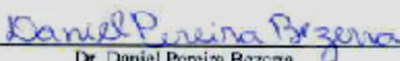
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Tânia Fraga Barros
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Frederico Guare Cruz
Professor
UFBA



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as realizações em minha vida

A minha esposa Cely pelo valioso e grande incentivo.

Aos meus filhos Maria Luiza e Miguel Guilherme pela compreensão especialmente pelos sacrifícios dos finais de semana de lazer.

Ao meu avô João pelos conselhos.

A meus pais e minhas irmãs Rafaela e Priscila pelo precioso carinho.

Ao meu orientador Dr. Marcos André Vannier dos Santos, pelos seus ensinamentos e paciência para minhas contestações.

À Dra. Adriana Lanfredi Rangel, Dr. Cláudio Figueira e Dra. Ana Lúcia, pela amizade e apoio na ultramicrotomia.

A família LBP pelo carisma de todos, especialmente a Mara e Anderson pelo apoio crucial no momento em que mais precisei. A Ana Paula pela amizade e discussões de trabalho. A nossa eficiente secretária Carla.

A Fabio (LACEN) pela colaboração.

A Prof. Renata Galvão pelos compostos

Aos professores do curso de Pós-graduação, que contribuíram para minha formação.

A nossa bibliotecária Fiscina pela boa vontade e paciência.

GOMES-JUNIOR, Rafael Araújo. Efeitos de compostos naturais, sintéticos e da fototerapia antifúngica sobre *Candida tropicalis* resistente ao fluconazol. 56 fls. Tese – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A candidíase é uma infecção oportunista provocada por diversas espécies de fungos do gênero *Candida*, frequentemente encontrados integrando a microbiota, da superfície cutânea, no trato gastrointestinal e cavidades mucosas do ser humano desde o seu nascimento. A incidência das infecções fúngicas sistêmicas têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas em função do grande número de pacientes com SIDA, a grande quantidade de transplantes e condições crônicas como o câncer, a terapia prolongada com imunossuppressores e o uso de agentes corticosteroides. Além disso, a exposição prolongada aos antifúngicos azólicos promove a seleção de patógenos resistentes. No presente estudo avaliou-se a atividade antifúngica do complexo Rutênio-pirocatecol (RPC) frente a um isolado clínico de *Candida tropicalis* resistente ao fluconazol. A metodologia empregada para os testes de susceptibilidade foi de acordo com o documento M27-A3 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2008). Esplenócitos de camundongos Balb/c foram obtidos de forma asséptica para avaliar a citotoxicidade do composto para células de mamíferos. O estresse oxidativo promovido pelo composto foi avaliado através da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ensaios de fluorescência com a sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂DA). O Calcofluor White foi empregado para avaliar a integridade da parede celular. A análise ultraestrutural foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados encontrados para os testes de atividade antifúngica foram analisados através do teste estatístico ANOVA e pós-teste Dunnett. Os resultados encontrados para os testes de atividade antifúngica do RPC mostraram uma Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) de 20,3 µM, enquanto em esplenócitos a concentração efetiva de 50% foi de 325 µM mostrando um índice de seletividade igual a 16. O referido composto também mostrou um elevado efeito pró-oxidante quando avaliamos os níveis de estresse oxidativo através da TBARS e por meio da sonda DCFH₂DA. Quando as leveduras foram tratadas por 24 h com o referido composto, observamos na microscopia de varredura o desenvolvimento de pseudo-hifas com 9 µM, a formação de fissuras em sua parede e uma forte agregação das células com 18 µM, além disso, encontramos uma intensa redução na quantidade de células e muito debris celular com 38 µM. Na microscopia de transmissão observamos estruturas vesiculares no espaço periplasmático associado a grânulos eletrondensos, os quais também foram vistos associados a parede celular, quando tratadas por 3h com 40 µM. No tratamento por 24h com 60 µM observamos a referida estrutura granular eletrondensa no citoplasma envolta por membrana, uma grande quantidade destas estruturas no espaço citoplasmático e associado a parede da célula, além disso, também observamos trechos de membrana associado a estas estruturas no espaço extracelular. Em conclusão, a atividade antifúngica e o índice de seletividade do RPC contra uma cepa resistente é consideravelmente interessante devido as suas possibilidades de aplicações na descoberta de novos antifúngicos.

Palavras-chave: Candidíase, Complexo Rutênio Pirocatecol (RPC), Rapamicina, Compostos Fenotiazínicos.

GOMES-JUNIOR, Rafael Araújo. Effects of natural compounds, synthetic antifungal and phototherapy of *Candida tropicalis* Fluconazole-Resistant. 56 fls. Thesis – Oswaldo Cruz Foundation Research Center Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic infection caused by several species of fungi of the genus *Candida*, often found in the microbiota, on the skin, gastrointestinal tract and mucous cavities of the human beings birth. The incidence of systemic fungal infections have increased considerably in recent decades due to the large number of AIDS patients, the large number of transplants and chronic conditions such as cancer, prolonged therapy promotes the selection of resistant pathogen with immunosuppressant and corticosteroid agents. Also prolonged exposure azole antifungals to make them strong candidates for patients resistance. In the present study we evaluated the antifungal activity of Ruthenium-pyrocatechol complex (RPC) against a clinical isolate of *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. The methodology for susceptibility testing was in accordance with the M27-A3 document of there National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2008). Splenocytes from Balb/c mice were obtained aseptically to evaluate the cytotoxicity of the compound to mammalian cells. Oxidative stress caused by the compound was assessed by reaction to thiobarbituric acid (TBARS) and fluorescence assays with the probe diclorodihidrofluoresceína diacetate (DCFH₂DA). The Calcofluor White was used to evaluate the integrity of the cell wall. The ultrastructural analysis was performed by scanning and transmission electron microscopy. The results for the antifungal activity tests were analyzed using ANOVA and pos-test Dunnett test statistic. The results for the tests of antifungal activity of the RPC showed a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 20.3 μ M while in splenocytes the 50% effective concentration was 325 μ M showing a selectivity index of 16. The compound also showed that a high pro-oxidant effect when evaluated levels of oxidative stress by TBARS and through DCFH₂DA staining. When yeast cells were treated for 24 h with this probe, in scanning microscopy we observed the development of pseudohyphae 9 μ M, the formation of cracks on their fungal walls and in these cell aggregation with 18 μ M furthermore found a remarkable reduction in the number of cells, and cell debris with 38 μ M. In transmission microscopy vesicular structures observed in the periplasmic space associated with electrondense granules, which were also seen associated with the cell wall, when there cells were treated for 3 h with 40 μ M. In the treatment for 24h with 60 μ M observed that the grain structure in the clusters in periplasmic, a large amount of these structures in the cytoplasmic space and associated with the cell wall, moreover, we also observe membrane portions associated with these structures in the extracellular space. In conclusion, the antifungal activity and the selectivity index RPC against a resistant strain is pretty interesting because of its possible applications in the discovery of new antifungal agents.

Keys word: Candidiasis, Ruthenium Complex Pyrocatechol (RPC), Rapamycin, Phenothiazines Compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura das moléculas do Azul de Metileno e Azul de Toluidina	19
Figura 2	Inibição sobre a proliferação da cepa resistente ao fluconazol de <i>C. tropicalis</i> . O complexo Rutênio-Pirocatecol apresentou uma IC ₅₀ de 20,3 µM (a), enquanto a Rapamicina demonstrou uma concentração inibitória de 0,029 µg/mL (b).	25
Figura 3	Citotoxicidade do complexo Rutênio-Pirocatecol em células de mamífero: Esplenócitos de Camundongo BALB/c foram expostos a diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol e avaliados pela conversão dos sais de MTT à Formazan e analisado em espectrofotômetro ($\lambda = 570$ nm). Apresentou uma Concentração Efetiva de 50% (EC ₅₀) de 325 µM. Significância estatística calculada pelo teste não-paramétrico ANOVA e pós-teste Dunnett, com p valor < 0,05	26
Figura 4	Viabilidade da <i>C. tropicalis</i> tratadas com Complexo Rutênio-Pirocatecol. Após tratamento por 24 h com diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol e semeadura em Agar Batata Dextrose. Foi demonstrado por quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), que a concentração de 38 µM apresentou significância estatística em relação ao controle, com p valor < 0,05 calculado pelo teste não-paramétrico ANOVA e pós-teste Dunnett	26
Figura 5	IC ₅₀ do Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina O (ATO) sobre <i>C. tropicalis</i> . Os compostos fenotiazínicos isolados obtiveram o IC ₅₀ de 8,04 µg/mL para o AM (a) e 25,04 µg/mL para o ATO (b).	33
Figura 6	Avaliação da peroxidação lipídica causada pelo Complexo Rutênio-Pirocatecol.. Utilizando o método de TBARS, foi possível observar que diferentes concentrações do Complexo Rutênio-Pirocatecol em 1 h de incubação promove em leveduras de <i>C. tropicalis</i> fluconazol-resistente um aumento da peroxidação lipídica, indicando aumento do estresse oxidativo nessas células. As concentrações foram analisadas estatisticamente pelo teste não-paramétrico ANOVA e pós-teste Dunnett com p valor <0,05.	34

- Figura 7 Efeito reversível do estresse oxidativo causado pelo complexo Rutênio-Pirocatecol. Utilizando um pré-tratamento com *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) e posterior incubação com o Complexo Rutênio-Pirocatecol, foi possível observar que o efeito inibitório da formação de colônias é revertido, sugerindo que o estresse oxidativo é um dos mecanismos pelo qual o Complexo Rutênio-Pirocatecol interfere na viabilidade das leveduras de *C. tropicalis* fluconazol-resistente. A análise estatística foi realizada com o teste não-paramétrico ANOVA e pós-teste Dunnet com p valor $<0,05$. 35
- Figura 8 Microscopia de Fluorescência para detecção de Radicais Livres. Utilizando a sonda DCFH₂DA, que tem afinidade por radicais livres e possui coloração verde, observamos no controle absoluto (A), que não há marcação significativa da cultura de *C. tropicalis*, com a presença de H₂O₂ (5 mM) (C) uma marcação mais evidente pode ser observada. Em E, utilizamos como controle negativo o antioxidante Ácido Ascórbico (5 mM) e obtivemos uma marcação semelhante ao demonstrado em A. Na presença de 38 μM do Complexo Rutênio-Pirocatecol (G) uma forte marcação demonstra aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio, o que pode ser discretamente evitado com o pré-tratamento das leveduras com ácido Ascórbico (I). As imagens B, D, F, H e J, são a observação do campo em contraste de fase. 36
- Figura 9 Avaliação da integridade da parede celular por Calcofluor White. A fluorescência em azul mostra a presença de uma parede celular íntegra como observado no controle (A). As leveduras de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol tratadas com 70 μM do Complexo Rutênio-Pirocatecol, obtiveram uma marcação branda (C) e apresentaram agregação celular e formação de pseudohifas (D). Na concentração de 140 μM o Complexo Rutênio-Pirocatecol demonstra uma redução da marcação do Calcofluor White (E) e uma diminuição da quantidade celular (F). 37
- Figura 10 Efeito do Complexo Rutênio-Pirocatecol avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura em 24h. Estruturas ovoides e com superfície íntegra são características observadas nas leveduras do grupo controle (A e B). Na presença de 4 μM do Complexo Rutênio-Pirocatecol alterações como formação de pseudo-hifas e agregação celular (C e D) são observadas. Com o aumento da concentração para 18 μM observa-se uma diminuição na quantidade de leveduras (E) e presença de alterações como fissuras na superfície celular (F). Na Concentração de 38 μM as alterações são mais severas e as leveduras apresentam grande quantidade de *debris* celular (G e H). 39

- Figura 11 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão das alterações celulares tratadas com Complexo Rutênio-Pirocatecol por 3 h. Em A uma levedura não tratada com núcleo (n) disforme e mitocôndrias integra (m). Com o tratamento são observados estruturas vesiculares no espaço periplasmático (B e D setas brancas) e a presença de estruturas pigmentadas secretadas na parede celular (C e D setas pretas). 40
- Figura 12 Avaliação Ultraestrutural do tratamento da *C. tropicalis* com Complexo Rutênio-Pirocatecol. O controle (A) apresentam duas leveduras com parede celular íntegra, núcleo (n), mitocondria (m) e vacúolo (v). O tratamento com 60 μ M do Complexo Rutênio-Pirocatecol por 24 h, apresenta estruturas pigmentadas sendo secretadas pela levedura (B e C setas pretas) além de estruturas vacuolares no espaço periplasmático (C seta branca), com conteúdo pigmentado sugerindo transporte dos pigmentos da parede celular (C ponta de seta). 41
- Figura 13 Avaliação dos efeitos ultraestruturais da Rapamicina. Células do controle apresentando núcleo disforme, mitocôndria (m) conservada e vacúolo (v) (A). Em B, tratamento por 24 h na concentração de 0,1 μ g/mL é possível observar a formação de estruturas membranosas próximas ao vacúolo da levedura, essas estruturas apresentam membranas duplas e irregulares sugerindo formação de autofagossomos (D e F setas brancas). Um tratamento na mesma concentração por 3 h é observado os efeitos preliminares como a formação estruturas membranosas na região periférica da levedura, (C e E setas brancas). 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ATO	Azul de Toluidina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standarts Institute</i>
DCFH ₂ DA	Diclorodihidrofluoresceína Diacetato
EC ₅₀	Concentração Efetiva de 50%
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FS	Fotosensibilizadores
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
PFO	Polifenol Oxidase
RPC	Complexo Rutênio Pirocatecol
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
TBARS	Reação ao Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CANDIDÍASE.....	14
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	14
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>Candida sp.</i>	16
1.4	ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA CANDIDÍASE	16
1.5	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS	18
1.6	MECANISMOS DE MORTE EM <i>Candida sp.</i>	19
1.7	COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	20
1.7.1	Complexo Rutênio Pírocatecol (RPC).....	20
1.7.2	Compostos fenotiazínicos.....	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	CONDIÇÕES DE CULTIVO	23
3.2	DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀	23
3.3	CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL (RPC).....	23
3.4	MEDIDAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	23
3.5	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	24
3.6	FOTOTERAPIA UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS.....	24
3.7	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	25
3.7.1	Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio	25
3.7.2	Avaliação da Parede Celular	25
3.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	25
3.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.	26
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4	RESULTADOS	27
4.1	IC ₅₀ DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL (RPC) E RAPAMICINA.....	27
4.2	CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL	28
4.3	EFEITO INIBITÓRIO DA FOTOTERAPIA ANTIFÚNGICA	30
4.4	IC ₅₀ DOS COMPOSTOS FENOTIAZINICOS.....	36
4.5	AUMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM <i>C. tropicalis</i> RESISTENTE AO FLUCONAZOL	37

4.6	PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM O N-ACETIL-L-CISTEÍNA E O ÁCIDO ASCÓRBICO.....	37
4.7	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR.....	39
4.8	EFEITOS ULTRAESTRUTURAIS.....	41
4.8.1	Complexo Rutênio-Pirocatecol	41
4.8.2	Rapamicina.....	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 CANDIDÍASE

A candidíase é uma infecção provocada por diversas espécies de fungos do gênero *Candida*, frequentemente encontrados como membros da microbiota, na superfície cutânea, no trato gastrointestinal e cavidades mucosas do ser humano desde o seu nascimento. Estas infecções podem ser agudas ou crônicas, localizadas ou sistêmicas. Este gênero compreende aproximadamente 200 espécies de leveduras dentre as quais a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente identificada como responsável por este tipo de infecção, enquanto as outras espécies, não-*albicans* mais comumente encontradas em humanos são: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, consideradas como emergentes. As manifestações clínicas mais comuns são candidíase oral, infecção mucocutânea crônica, intertrigo, onicomicose, balanopostites, infecção da vagina e da vulva. As espécies deste gênero, principalmente a *Candida albicans*, são microrganismos cosmopolitas considerados comensais da microbiota de pessoas saudáveis. No entanto, em situações que levem ao desequilíbrio do sistema imunológico como pacientes transplantados, neoplasias, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e diabetes, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo, bem como, modificações do estado de equilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal como o uso de quimioterápicos, oclusão intestinal, jejum prolongado, nutrição parental total e hipotensão potencializam o fenômeno da translocação da *Candida* sp. até os capilares mesentéricos, resultando assim, na maioria dos casos de candidemia adquirida por via endógena (TAKAHASHI *et al.*, 2003).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

C. albicans bem como outras espécies do gênero apresentam diferentes fatores de virulência como a aderência, dimorfismo (transição entre a forma leveduriforme e pseudo-micelial), variabilidade fenotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

A aderência das leveduras às células epiteliais é um pré-requisito para a sua invasão e imunomodulação da resposta do hospedeiro. A interação levedura-receptor é mediada por adesinas do agente infectante e receptor protéico do hospedeiro. Um polímero de manose covalentemente associado a proteínas, um dos constituintes da parede celular, chamado

manoproteína, tem se mostrado com potente atividade imunomoduladora (ALEXANDER *et al.*, 1990). A sua aderência em superfícies de tecidos gastrointestinal ou endotelial tem um papel relevante na infecção sistêmica, podendo via corrente sanguínea infectar outros órgãos. Além disso, também são capazes de se ligar em várias superfícies inertes, como por exemplo, resinas e polímeros empregados em vários materiais médicos atuando como uma importante fonte de candidíase sistêmica. Do mesmo modo, a hidrofobicidade da superfície celular também é reconhecida como um dos fatores determinantes na adesão microbiana a vários substratos (AHIMOU *et al.*, 2001). A interação levedura-hospedeiro também é influenciada pela temperatura, pH e secreção de imunoglobulina A (IgA).

A produção de enzimas hidrolíticas pela *Candida*, tais como, proteases, lipases ou fosfolipases é considerada como fator importante nas diferentes fases da interação fungo-célula hospedeira. A atividade enzimática da aspartil proteinase detém a capacidade de clivar anticorpos IgA e imunoglobulina G (IgG), queratina, hemoglobina, colágeno e mucina. As fosfolipases A, B, C e lisofosfolipase, podem lisar os fosfolipídios de membrana facilitando a adesão e a penetração através do tecido infectado (KAMINISHI *et al.*, 1995; RÜCHEL, 1986).

A capacidade de transição entre as formas de levedura e hifal é denominada dimorfismo. Ambas as formas podem ser encontradas tanto no crescimento comensal quanto em uma infecção, porém sabe-se que as formas micélicas estão associadas com os estados patológicos e a velocidade desta transição está correlacionada com a sua infecciosidade. A forma filamentosa permite maior interação do fungo com o hospedeiro, propicia a invasão da mucosa e dificulta a ação fagocitária de macrófagos e neutrófilos em virtude da variabilidade antigênica de sua superfície (BIRSE *et al.*, 1993; GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990). Em adição, a alteração de sua morfologia deve-se a condições ambientais, podendo ser influenciada pela temperatura, pH, nutrientes presentes no meio, fontes de carbono e substâncias químicas. Normalmente, as leveduras predominam em ambientes ricos em nutrientes, enquanto a filamentosa em ambiente escasso. Desta forma, a capacidade de morfogênese deste fungo contribui para o aumento do seu potencial patogênico (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

O epitélio estratificado da mucosa oral forma uma barreira mecânica que protege os tecidos subjacentes. Esta proteção depende do grau de queratinização e da descamação contínua das células epiteliais. Adicionalmente, a microbiota comensal bacteriana serve como um mecanismo de modulação da candidíase oral, podendo inibir a aderência destas leveduras, tanto por competição por locais de aderência como pela disponibilidade de nutrientes (NAIR;

SAMARANAYAKE, 1996). Além disto, a saliva é um potente antifúngico e antibacteriano natural e seu fluxo constante inibe, mecanicamente, o acúmulo de microrganismos na cavidade oral (SAMARANAYAKE; HUGHES; MACFARLANE, 1984). Vários elementos na saliva inibem o crescimento da *Candida*, tais como proteínas ricas em histidina ou prolina, sistema peroxidase salivar, lactoferrina e lisoenzima (SAMARANAYAKE *et al.*, 1997).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO EM *Candida* sp.

Como forma de minimizar as alterações causadas pelos fungos o sistema imune utiliza mecanismos indutores de estresse oxidativo como a indução da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO). Essas moléculas altamente reativas podem causar danos a organelas e interagir com moléculas importantes para a homeostase celular. Contudo, estes microrganismos possuem sistemas de neutralização dessas ERO, como a “*Mitogen-Activated Protein Kinases*” (MAPK) em *Candida albicans*. O estresse gerado pela ação de células imunológicas ou modificações do ambiente promove ativação de um sensor de membrana, Sln1p, uma proteína cinase que inicia uma sinalização celular com a finalidade da ativação da Hog1p, uma MAPK que é translocada para o núcleo e promove a transcrição de genes de adaptação, outro mecanismo com a mesma finalidade é a ativação de outra proteína membranar a Shop1p, que interage com uma MAPK cinase – Pbs2p – e ativa a Hog1p desencadeando a ativação dos genes de adaptação do patógeno as novas condições (BOISNARD *et al.*, 2008).

1.4 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA CANDIDÍASE

A eficácia no tratamento das infecções fúngicas está diretamente correlacionada a precocidade do diagnóstico. Tendo como dificuldades diagnósticas a identificação dos fungos, testes de sensibilidade, antimicótico de amplo espectro, baixa toxicidade, e a resistência dos fungos as drogas. Os testes de susceptibilidade *in vitro* para fungos estabelecidos pelo “*Clinical Laboratory Standarts Institute*” (CLSI) tem um papel primordial na escolha de uma droga eficaz. Porém, apesar de apresentarem uma boa reprodutibilidade são mais empregados em pesquisa, devido à complexidade de execução e algumas vezes de difícil interpretação, tornando a sua rotina laboratorial ainda inviável (FLECK; HOF, 2008).

Os principais antifúngicos empregados no tratamento das infecções provocadas pela *Candida* são os imidazólicos (cetoconazol, miconazol), os triazólicos (itraconazol, fluconazol) os quais possuem respectivamente 2 e 3 átomos de nitrogênio no anel azólico e os poliênicos (anfotericina B e nistatina). Os derivados azóis tem como mecanismo de ação a inibição da 14 α -desmetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a síntese do ergosterol, principal esterol encontrado na membrana destas células. A depleção do ergosterol além de levar ao acúmulo de esteróis metilados interfere tanto na ação de enzimas associadas à membrana quanto na fluidez da membrana, resultando tanto na inibição de sua replicação quanto na transformação de leveduras para hifas, forma invasiva do patógeno (GHANNOUM; RICE, 1999; HITCHCOCK *et al.*, 1990).

O fluconazol é um antifúngico bastante hidrossolúvel que permite administração via oral e intravenosa, atingindo concentrações elevadas no líquido cefalorraquidiano e concentrações fungicidas no tecido vaginal, pele, unhas e saliva, podendo ser utilizado na prevenção de infecções fúngicas invasivas, sendo nos dias de hoje muito utilizado. O itraconazol é um fármaco administrado por via oral que sofre intenso metabolismo hepático, não atingindo concentrações desejáveis no líquido cefalorraquidiano. Possui espectro de ação maior que o fluconazol, podendo ser ativo contra cepas resistentes (DEBRUYNE; RYCKELYNCK, 1993; HAN *et al.*, 2013).

A anfotericina B é um antifúngico produzido pelo *Streptomyces nodosus* que possui atividade contra a maioria dos fungos e leveduras, permanecendo como o agente mais eficaz para as infecções sistêmicas, porém, não mostra atividade para dermatofitoses superficiais, a sua principal desvantagem é a nefrotoxicidade presente em mais de 80% dos pacientes, além das reações transfusionais é uma droga de difícil administração, indicada para a infecção do trato gastrointestinal devida a sua baixa absorção, quando administrada via oral, na infecção sistêmica esta deve ser complexada com desoxicolato para uma lenta administração endovenosa. A anfotericina é uma droga poliênica que exerce ação seletiva ligando-se avidamente ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica. Como é uma molécula com porções hidrofílicas e hidrofóbicas forma-se um canal iônico transmembrana através do qual componentes celulares são perdidos, principalmente íons de potássio, desequilibrando o gradiente de prótons da membrana (GÜLAY *et al.*, 2002).

As equinocandinas constituem uma nova classe de antifúngicos os quais possuem como mecanismo de ação a inibição da beta (1,3)-D-glucano sintase, enzima responsável pela síntese da parede celular, a micafungina, caspofungina e anidulafungina são as mais comuns (MORRIS; VILLMANN, 2006). Foram inicialmente descritas como pneumocandinas devido

ao seu efeito contra *Pneumocystis carinii* (WAGNER *et al.*, 2006), são formadas por hexapeptídeos cíclicos obtidos a partir da fermentação de diversos cogumelos (ESCHENAUER; DEPESTEL; CARVER, 2007). As equinocandinas são atualmente aprovadas pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) para os casos de candidíase invasiva têm demonstrado excelente espectro de ação e potência devido a sua especificidade de ação na célula fúngica, somada a baixa toxicidade permitem a combinação com outros agentes que atuam na membrana celular (DAS; SHIVAPRAKASH; CHAKRABARTI, 2009). Devido a sua baixa disponibilidade oral, devem ser administrado intravenosamente em paciente seriamente comprometido (CORTÉS L; RUSSIN, 2011).

1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS

Os principais mecanismos de resistência aos derivados azólicos envolvem mutações em ERG 11, gene que codifica a lanosterol 14 α -desmetilase, a superexpressão desse gene, leva a uma grande produção da enzima ou o efluxo da droga por proteínas transportadoras. Já no que se refere a resistência à anfotericina B, alguns mecanismos recentemente descritos estão associados a mutações na via de biossíntese do ergosterol, produzindo componentes semelhantes ao ergosterol com baixa afinidade pela droga ou associados a um decréscimo na concentração de ergosterol presente na membrana (SANGLARD, 2002; VANDEN BOSSCHE, 1997). Além disso, é comumente observado que a resistência aos antifúngicos pode ser influenciada pelo estado imunológico do paciente, podendo não responder, de forma satisfatória, ao tratamento independentemente das propriedades da droga, como é observado na terapia em paciente com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (LATTIF *et al.*, 2004) (SAMARANAYAKE; HUGHES; MACFARLANE, 1984). O risco do paciente apresentar uma candidíase resistente também aumenta com a terapia prolongada ou o uso indiscriminado destes agentes. O atual cenário destas infecções, a incidência de patógenos resistentes e o surgimento da SIDA, deflagram a necessidade da descoberta de novos antifúngicos.

1.6 MECANISMOS DE MORTE EM *Candida* sp.

Autofagia é um processo fisiológico para manutenção da homeostase celular, em condições adversas (privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas) ou reciclagem de componentes do citosol e organelas. Porém, este processo pode levar a morte autofágica ou morte celular programada tipo II. Atualmente, 32 genes são descritos relacionados a este processo que pode ser definido como macro-autofagia, micro-autofagia e autofagia, todos mediado por chaperonas. Na macro-autofagia ocorre a fusão do lisossomo com componentes do citoplasma envolto por dupla membrana, enquanto na micro-autofagia estes componentes citoplasmáticos são diretamente ligados ao lisossomo por invaginações de sua membrana (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; NAKATOGAWA *et al.*, 2009).

O processo autofágico tem início com a formação do fagoporo ou nucleação, este se associa com outras vesículas fechando-se em autofagossomo, ocorre interação com Atg5-Atg12 e por fim, a proteína citosólica associada a microtúbulos LC3-I sofre uma clivagem C-terminal passando para a forma LC3-II, a qual se liga à membrana do autofagossomo sinalizando a sua fusão com o lisossomo, seguido por degradação proteolítica (BARTH; GLICK; MACLEOD, 2010; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Em leveduras, muitas das proteínas do processo autofágico são homólogas aos eucariontes. A proteína Atg2 é covalentemente conjugada com Atg5 por uma reação de ubiquitinação durante o passo de inicialização do autofagossomo (KLIONSKY, 2007).

Apesar da necrose ter sido, há algum tempo, um processo de morte celular acidental hoje sabe-se, a partir de experimentos tendo as leveduras como modelo, que várias proteínas tem um papel regulatório de forma positiva ou negativa na morte celular necrótica. Endonucleases G, poliaminas, organelas homeostáticas, como o vacúolo ou peroxissomos são inibidores potentes da necrose enquanto nas mitocôndrias, a diminuição de pH e envelhecimento estimulam a liberação de fatores de necrose (EISENBERG *et al.*, 2010).

Vários agentes como com o ácido acético, o peróxido de hidrogênio, o cobre e o manganês induzem a apoptose quando em baixas concentrações, e morte necrótica, em elevadas concentrações, sugerindo que o gatilho dependente da concentração seja algo comum entre a necrose e apoptose (JOBE *et al.*, 2014).

1.7 COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

1.7.1 Complexo Rutênio Pirocatecol (RPC)

O catecol, também conhecido como pirocatecol, é um benzenodiol. A sua oxidação em benzoquinona, por enzimas como a polifenol oxidase, pode gerar espécies químicas como as quinonas e superóxidos tendo assim um potencial efeito antimicrobiano. Este núcleo faz parte da estrutura química das catecolaminas, importantes neurotransmissores, produzidos e secretados no sistema nervoso central e na medula da glândula supra-renal. São aminas biogênicas derivadas do aminoácido tirosina, solúveis em água, circulam no sangue ligadas a proteínas plasmáticas, sendo as mais abundantes a adrenalina, a noradrenalina e a dopamina. São liberadas pela glândula suprarrenal em situações de estresse psicológico ou hipoglicemia. A catecol-orto-metiltransferase é uma enzima naturalmente presente no organismo, que degrada o catecol e as catecolaminas, o seu polimorfismo foi demonstrado como fator de risco para o desenvolvimento do leiomioma uterino (OLIVEIRA, 2009). Nesse contexto, agentes farmacêuticos contendo complexos de metais como o RPC tem sido consideravelmente interessante devido as suas possibilidades de aplicações (AHER *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

1.7.2 Compostos fenotiazínicos

Os compostos fenotiazínicos são moléculas catiônicas, aromáticas, tricíclicas, que constitui um sistema altamente conjugado, tendo como compostos mais conhecidos o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina O (ATO), os fenotiazínicos atuam modificando lipídios de membrana, inativando proteínas de membrana indispensáveis para processos biológicos, provocando a morte celular. Estes dois corantes possuem características semelhantes, contendo na sua estrutura (Figura 1) três átomos de nitrogênio, podendo um atuar reagindo com prótons e os demais estabilizando a molécula (BUCK, 2009).

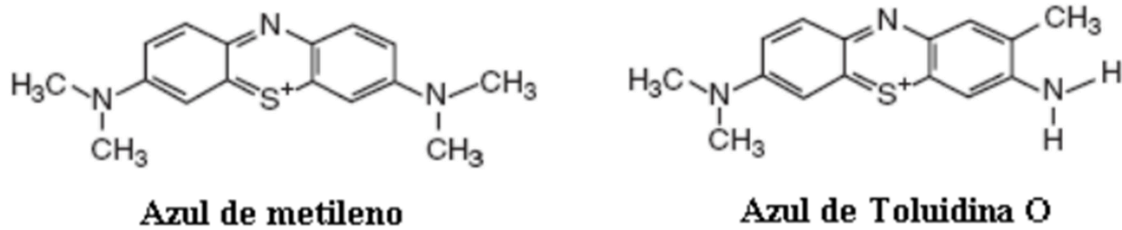


Figura 1. Estrutura das moléculas do Azul de Metileno e Azul de Toluidina O (Adaptado, BUCK, 2009).

Esses compostos podem ser considerados potentes fotosensibilizadores (FS) e quando irradiados no comprimento de onda de 660 nm tem maior penetração nos tecidos (BUCK, 2009). Os FS de maneira geral podem agir intracelularmente em duas vias. A primeira é a interação dos FS com componentes celulares produzindo radicais livres que podem interagir com oxigênio e gerar espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO); a outra via está relacionada com a interação direta do FS com o oxigênio molecular (estado triplete) tornando-o uma molécula mais reativa, oxigênio singlete. Ambas as vias podem acontecer simultaneamente, dependendo do tipo de FS, da disponibilidade de substratos moleculares e de oxigênio (CASTANO AP, DEMIDOVA TN, 2004; VUMMIDI et al., 2013) e assim induzirem alterações celulares importantes sinalizando a morte celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do Complexo Rutênio-Pirocatecol (RPC), Rapamicina e dos Compostos Fenotiazínicos como fotosensibilizadores sobre *Candida tropicalis* resistente ao fluconazol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito fungicida do RPC sobre *C. tropicalis* resistente ao fluconazol;
- Avaliar os efeitos dos compostos fenotiazínicos (AM e ATO) e da fototerapia sobre *C. tropicalis* resistente ao fluconazol;
- Identificar possíveis alterações ultraestruturais em *C. tropicalis* resistente ao fluconazol tratadas com RPC;
- Analisar possíveis alterações ultraestruturais em *C. tropicalis* resistente ao fluconazol tratadas com rapamicina;
- Determinar os efeitos relacionados ao estresse oxidativo em *C. tropicalis* resistente ao fluconazol tratadas com RPC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa utilizada neste trabalho foi um isolado clínico de *Candida tropicalis* resistente ao fluconazol obtida de paciente do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN – BA). Esta cepa foi mantida em ágar batata dextrose (4%) e cultivada em *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI 1640) para os experimentos com os diferentes compostos.

3.2 DETERMINAÇÃO DA IC₅₀

Para determinação da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) 2,5 x10⁵ leveduras/mL foram tratadas com de diferentes concentrações dos compostos estudados em meio de cultura RPMI 1640 a 37°C durante 24 h. Após isso, as leveduras foram quantificadas por leitura em câmara de Neubauer (KRIPPENDORFF *et al.*, 2009).

3.3 CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL (RPC)

Para avaliação do efeito citotóxico removemos o baço de camundongos BALB/c sacrificados com 8 a 10 semanas de idade. As células foram incubadas em placas de cultura de 24 poços em atmosfera de 5% de CO₂ a, 37°C, por 24h em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, onde diferentes concentrações do composto (125, 250, 500 e 1000 µM) foram adicionadas. Após incubação foi adicionado MTT (5 mg/mL, em PBS) por um período de 2 hs, logo em seguida foi acrescentado DMSO para a dissolução dos cristais formazan e leitura da absorbância a 540 nm (BOUNOUS; CAMPAGNOLI; BROWN, 1992).

3.4 MEDIDAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os testes de suscetibilidade *in vitro* para as leveduras foram realizadas de acordo com o documento M27-A3 (2008) proposto pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), utilizando a metodologia: macrodiluição em caldo para leveduras. A metodologia foi adaptada para leitura dos resultados o crescimento nos diferentes tubos contendo o agente

antifúngico foi quantificado por uma câmara de Neubauer e comparado com o crescimento no tubo controle. Para acompanhar a viabilidade das células, alíquotas de 100 µL foram retiradas do meio de cultivo e plaqueadas em meio sólido, após uma diluição seriada. O número de colônias foi contado após 24h de incubação a 35°C e multiplicado pelo seu respectivo fator de diluição, tendo como resultado a unidade formadora de colônias por mL (CFU/mL).

Os isolados de leveduras foram cultivados em ágar batata dextrose a 35°C por 24h antes dos ensaios a fim de garantir a viabilidade. Uma suspensão inicial de microrganismos foi obtida em água estéril correspondendo a 1×10^6 por meio da câmara de Neubauer, esta suspensão foi posteriormente diluída a 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 resultando em uma concentração final do inóculo de 1 a 5×10^3 .

3.5 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Após o tratamento com diferentes concentrações (24, 70 e 140 µM) do composto por 1 hora as amostras correspondentes foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com 200 µL de ácido tiobarbitúrico (1%) diluído em 50% de ácido acético glacial. Em seguida as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2h, após a incubação foi utilizado banho de gelo por 15 minutos para parar a reação a qual foi medida no espectrofotômetro em 532 nm (HUANG *et al.*, 2014).

3.6 FOTOTERAPIA UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS

Em placas de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células/mL as leveduras de *C. tropicalis* foram incubadas com 50 µg/mL e 100 µg/mL de fenotiazina e pré-incubadas em diferentes tempos (5 e 10 min) e posterior irradiação com Luz Laser de acordo aos parâmetros especificados na tabela 1. A proliferação celular foi avaliada por contagem de células após 24 h de incubação a 35 °C.

Tabela 1: Parâmetros utilizados da Luz Laser.

Parâmetros	Valores
Comprimento de Onda	660 nm
Potência	40 mW
Densidade de Energia	2,4 J/cm ²
Tempo de Irradiação	60 segundos

3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

3.7.1 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio

Para detecção de espécies reativas as leveduras foram cultivadas tanto presença quanto na ausência do RPC (38 μM) durante o período de uma hora a 37°C. Em seguida as células foram lavadas em tampão PBS e marcadas com 10 μM da sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂DA), por 30 min. Após a marcação as lâminas foram observadas em um comprimento de onda entre 460 a 495nm no microscópio de fluorescência Olympus. Como controle positivo foi usado 5 mM de H₂O₂ por uma hora e como controle negativo as células previamente tratadas 5 mM de ácido ascórbico por duas horas antes do H₂O₂ (MIAO *et al.*, 2012)

3.7.2 Avaliação da Parede Celular

Para determinar se o composto compromete a integridade da parede celular tratamos as leveduras com diferentes concentrações (70 e 140 μM) do composto em questão por 1 h, em seguida as células foram lavadas em PBS e marcadas com calcofluor branco (30 $\mu\text{g/mL}$) e as lâminas observadas em 355 nm no microscópio de fluorescência Olympus (OVADJE; HAMM; PANDEY, 2012).

3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O processamento da microscopia eletrônica de varredura foi feito a partir das leveduras tratadas e posteriormente fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato

de sódio 0,1M pH 7,2, em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M. Após a aderência, pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1%, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30- 100%) por 10 minutos em cada concentração. As amostras foram processadas e secadas em sistema de ponto crítico de CO₂, montadas em suportes metálicos, revestidas com ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV a 15 kV (DE CAMPOS RASTEIRO *et al.*, 2014).

3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

As células foram fixadas em 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. A pós-fixação foi realizada utilizando 1,5 % de permanganato de potássio (KMnO₄) durante 60 minutos ao abrigo da luz. A desidratação foi feita em séries de acetona e a infiltração em resina Spurr (Ted Pella). Cortes ultrafinos foram obtidos por ultramicrotomia, coletados em grades (malha 300) e contrastados em acetato de uranila 5 % por 40 min. e citrato de chumbo 3 % por 5 min. A análise ultraestrutural foi feita em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109 e JEOL JEM a 80 kV (LEE *et al.*, 2012).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa Prism 5.01 GraphPad utilizando o teste One-Way ANOVA e o pós-teste Dunnett com nível de significância de $p < 0,05$ considerando três experimento independentes. Os valores plotados nos gráficos representam média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 IC₅₀ DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL (RPC) E RAPAMICINA

O complexo Rutênio-Pirocatecol (RPC) apresentou uma inibição do crescimento destas leveduras de forma significativa demonstrando ser concentração-dependente entre as concentrações testadas e uma IC₅₀ de 20,3 μM mostrando que o RPC possui um elevado efeito fungicida (Figura 2A). De modo semelhante, estas leveduras mostraram-se bastante sensíveis a rapamicina, obtendo-se dessa forma uma IC₅₀ de apenas 0,029 $\mu\text{g/mL}$.

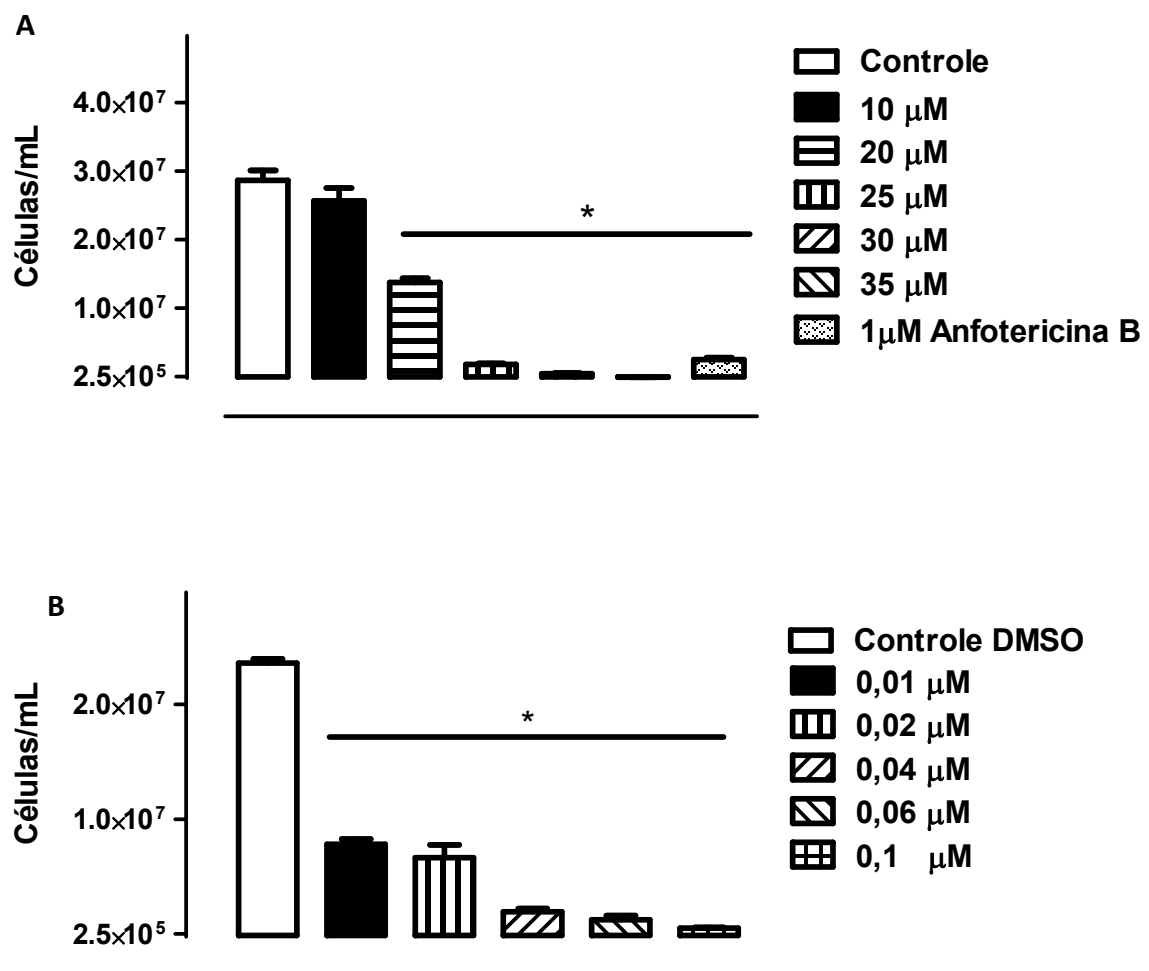


Figura 2. Suscetibilidade *in vitro* de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol em meio RPMI 1640 a 35°C por 24h. O isolado apresentou uma IC₅₀ de 20,3 μM para o complexo Rutênio-Pirocatecol em (A) e uma IC₅₀ de 0,029 $\mu\text{g/mL}$ para a Rapamicina em (B). Análise estatística one-way ANOVA pós-teste Dunnett [* representa a análise estatística em relação ao controle ($p < 0,05$)].

4.2 CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO RUTÊNIO-PIROCATECOL

Os esplenócitos de camundongos BALB/c tratados com diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol por um período de 24h mostrou uma inibição estatisticamente significativa nas concentrações de 500 e 1000 μM , sendo assim, a concentração efetiva de 50% (EC_{50}) foi de 325 μM (Figura 3).

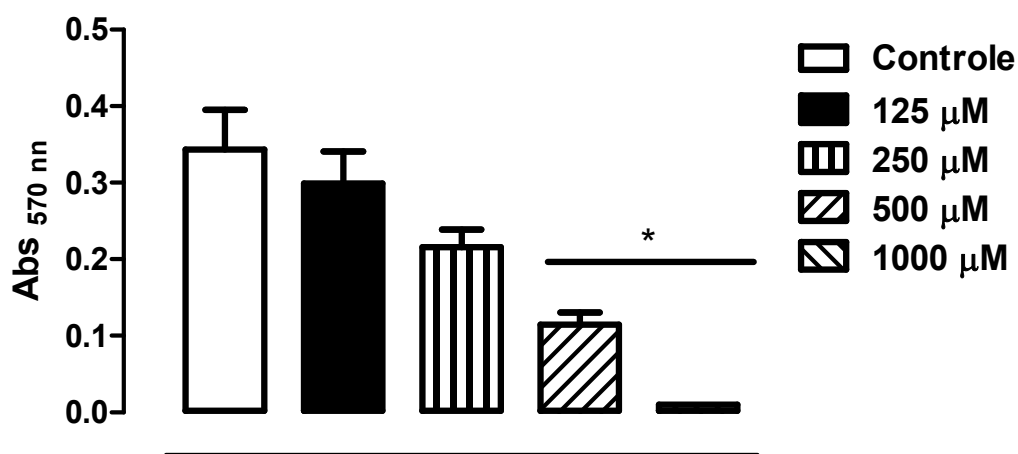


Figura 3 Citotoxicidade do complexo Rutênio-Pirocatecol em células de mamífero: Esplenócitos de camundongo BALB/c foram expostos a diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol e avaliados pela conversão dos sais de MTT à Formazan lido em espectrofotômetro ($\lambda = 570 \text{ nm}$). O composto apresentou uma Concentração Efetiva de 50% (EC_{50}) de 325 μM . Significância estatística foi calculada pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Dunnett, com p valor $< 0,05$.

Como observado na figura 4, avaliamos o efeito do RPC na viabilidade da *C. tropicalis* resistente ao fluconazol após 24 h de tratamento. A concentração de 38 μM do referido composto apresentou-se bastante efetiva quando comparada ao controle por isso, foi utilizada em outros ensaios para avaliar parâmetros que indicassem os possíveis mecanismos de ação.

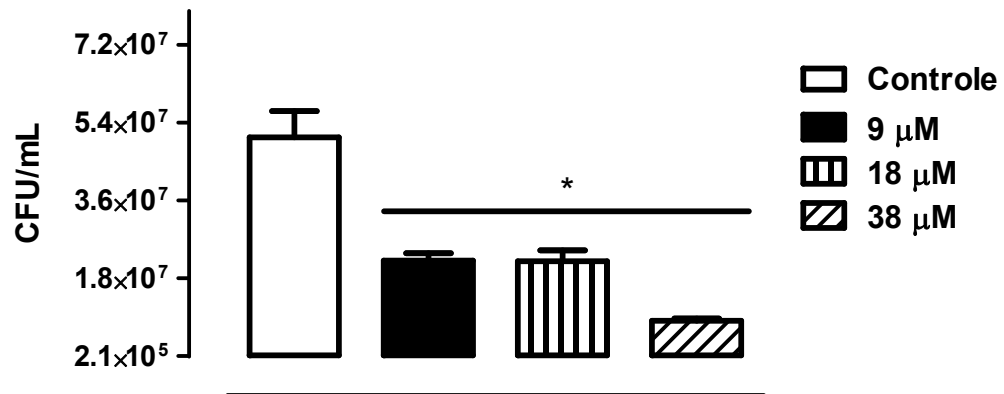


Figura 4 Viabilidade da *C. tropicalis* tratadas com complexo Rutênio-Pirocatecol. Após tratamento por 24 h com diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol as leveduras foram semeadas em Agar Batata Dextrose. A viabilidade foi demonstrada por quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC). A concentração de 38 μM apresentou significância estatística em relação ao controle, com p valor $< 0,05$ calculado pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Dunnett.

4.3 EFEITO INIBITÓRIO DA FOTOTERAPIA ANTIFÚNGICA

Os dados produzidos e publicados a seguir tiveram como propósito de atender o objetivo avaliar os efeitos da Fototerapia Antifúngica sobre a proliferação da cultura de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol.

GOMES-JUNIOR, R. A.; OLIVERA, S.C.P.S; MONTEIRO, J. S. C.; SANTOS, G. M. P.; SAMPAIO, F. J. P.; GESTEIRA, M. F. M.; ZANIN, F. A. A.; BRUGNERA, A.; PINHEIRO, A. L. B.; VANNIER-SANTOS, M. A.; Association phenothiazine and laser on growth of *C. tropicalis* fluconazole-resistant. **Proc. of SPIE**, vol. 8932, p. 89320G1-5, 2014.

Association phenothiazine and laser on growth of *C. tropicalis* fluconazole-resistant

Rafael Araújo Gomes Júnior^c, Susana C. P. S. de Oliveira^{a,b}, Juliana S. C. Monteiro^{a,b,e}, Gustavo M. P. Santos^c, Fernando J. P. Sampaio^{a,b}, Maria F. M. Gesteira^{a,b}, Fátima A. A. Zanin^{a,b,d}, Aldo Brugnera^{a,b,d}, Antônio L. B. Pinheiro*^{a,b,d} and Marcos A. Vannier-Santos^c

^aCenter of Biophotonic, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-150; ^bNational Institute of Optics and Photonics, São Carlos, SP, Brazil, 13560-970;

^cLaboratory of Parasite Biology, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ, Salvador, BA, INCT-INPeTAM, Brazil. ^dBrugnera & Zanin Institute, São Paulo, SP, Brazil 01434-000; ^eDepartment of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil, 44036-900.

ABSTRACT

Candidiasis is caused by *Candida* species found on the skin, gastrointestinal tract and mucous cavities of the humans and may be acute, chronic, localized or systemic. Although *C. albicans* is the species most often identified as responsible for this type of infection *C. Tropicalis* has been considered an emerging cause. The effect of the association of phenothiazine - PTZ and laser on fluconazole-resistant *C. tropicalis* growth was tested. 2.5×10^6 CFU/mL 100mg/mL of phenothiazine with the pre-irradiation time of 10 min were irradiated with laser light (660 nm; 4.8 and 12 J/cm² (L1 and L2 respectively) 40 mW) followed by incubation in RPMI for 24h. The following conditions were tested: control (control), laser (L1 and L2), phenothiazine (F1 and F2), and PACT (F1L1 and F2L2). Statistically significant differences were seen between groups (L-F +) and (F + L +) for both conditions of the laser, with a growth inhibition of the yeast around 67 and 51%, respectively, however, when using only the laser there was an increase of 18% in the survival of these cells. PACT's efficacy on fluconazole-resistant *C. tropicalis* depended on both the time of pre-irradiation and concentration of the PTZ.

1. INTRODUCTION

Candidiasis is a fungal infection that usually occurs in situations where there is a reduction of the immune response, and therefore this condition is considered an opportunistic infection. This condition can be a problem for immuno-incompetent host, which may be caused by various *Candida* species such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, among others^{1,2}. *Candida* species can be found on the skin, gastrointestinal tract and mucous cavities of the humans and may be acute, chronic, localized or systemic.

The levels of incidence in Brazil can be up to 15 times more than in developed countries. Moreover, currently there are reports of resistance among different species, moreover different resistance mechanisms have been observed, including mechanisms of action that reduce the effectiveness of Amphotericin B, an antifungal of choice for the treatment of ringworm. In this case there is a modulation in ergosterol biosynthesis. Other resistance mechanisms such as antioxidant enzymes and increase in efflux of compounds are examples of other pathways of cell adaptation by this fungus³.

Recently, antimicrobial resistance has lished a problem, however the photodynamic therapies are showing great promise in combating localized infections. Currently cases of microbial control and microbial inactivation have been described in different strains, resistant or not^{4,5}.

* albp@ufba.br; phone 55 71 3283-9010; fax 55 71 3283-9010; www.laser.odontologia.ufba.br

The effectiveness of this treatment is due to the combination of a non-toxic compound and a length of wave harmless, but able to activate the photosensitizer. This activation allows the generation of oxygen 'singlet' and / or superoxide that can act on several cellular targets and change organelles such as the nucleus, membrane, mitochondria^{6,7,8}.

The objective of this study was to evaluate in vitro the efficacy of photodynamic therapy Antifungal associating a phenothiazine compound at concentrations of 50µg/mL and 100µg/mL the Red Laser (λ660nm) at doses of 4.8 and 12 J/cm² on populations of fluconazole resistant *Candida tropicalis*.

2.METHODOLOGY

Cultivation and experimental conditions

The culture was maintained on potato agar at 37 ° C for 24 hours.

For the experiments cells were counted 2.5×10^5 cells / ml and incubated under different conditions for 24 hours at 37°C and then recounted. In these tests four groups [(G1= 50µg/mL phenothiazine and 5 minutes pre-irradiation) (G2= 50µg/mL phenothiazine and 10 min pre-irradiation) (G3= 100µg/mL and phenothiazine were assessed 5 minutes pre-irradiation) (G4= 100µg/mL phenothiazine and 10 minute pre-irradiation), and each seven conditions [control, L1 (4.8 J/cm²), L2 (12 J/cm²), F1 (phenothiazine)*; F2 (phenothiazine)*; F1L1 and F2L2].

* **phenothiazine: F1 = F2 (this new group was created just to respect the pre irradiation time)**

Photosensitizer and light source

Phenothiazinium dye at a concentration of 1000µg/ml was used for photosensitization of the *C. tropicalis* fluconazole resistant strains. (Fórmula Laboratory, Salvador, BA, Brazil). The dye solution at a concentration of 1µg/ml was prepared by dissolving in sterile PBS (pH = 7.4) and filtering it through a 0.22-µm membrane filter (Millipore, São Paulo, SP, Brazil). After filtration, the dye solution was stored in the dark for a maximum of 2 weeks at 4°C before use.

A diode laser (Twin Flex®, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil), emitting light at 660 nm (visible red), was used as the light source. The wavelength of the laser corresponds to the maximum absorption of phenothiazinium dye. The laser settings were as follows on Table 1.

Table 1: Summary of the parameters used on the study.

Parameters	Laser
Wavelength (nm)	660
Mode	CW
Spot of the probe (mm ²)	4
Power Output (W)	40
Exposure Time (s, per session)	120 / 360
Energy density (J/cm ²)	4,8 /12

Statistical analysis

Comparisons between means of groups were analyzed using the One-Way ANOVA and Dunnett's tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

The application of laser energy at different doses, 4.8 and 12 J/cm², were unable to inhibit the growth of yeasts, as was expected (Fig. 1). The different groups were efficiencies that varied with the concentration of the photosensitizer and the time of pre-irradiation.

There was a statistically significant inhibition in proliferation between the control and treatment conditions, however between treatments there were no statistically significant differences.

The lethal effect of the photo activation of phenothiazine may be in group 4 where the pre-irradiation time was 10 minutes and the concentration of the compound was 100 µg/mL. In this group, L1F1 condition showed a percentage inhibition of about 70% in the control grating and approximately 40% compared to the condition F1 (phenothiazine) (Figure 1D).

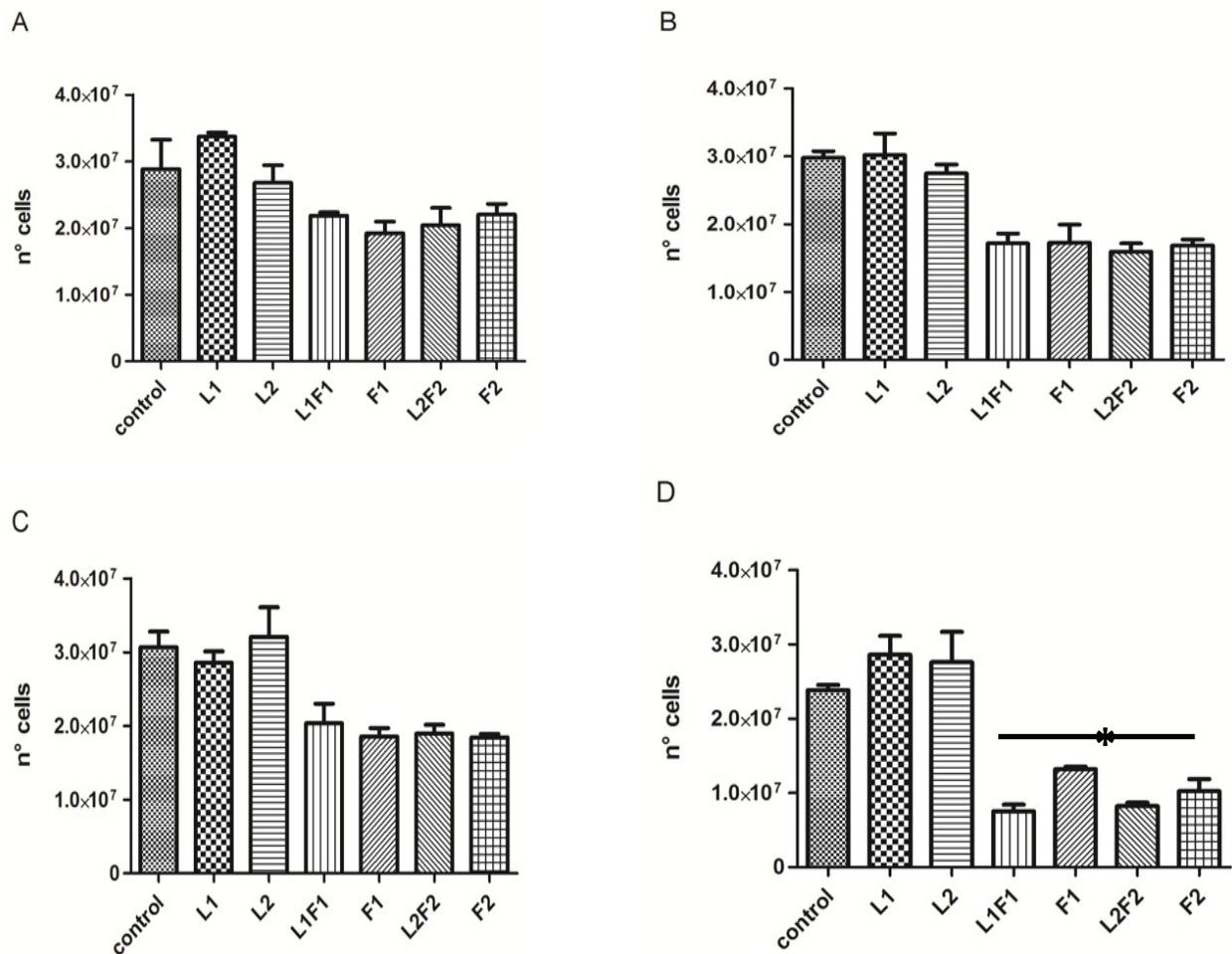


fig. 1: Microbial growth. A) Yeast growth in the group phenothiazine 50 µg/mL and the time to 10 minutes as pre-irradiation. B) Growth of yeast in phenothiazine group 100 µg/mL and the time to 5 minutes as pre-irradiation C) Growth of yeast in phenothiazine group 50 µg/mL and the time to 5 minutes as pre-irradiation D) Growth of yeast in phenothiazine group 100 µg/mL and the time to 10 minutes as pre-irradiation

4. DISCUSSION

Laser therapy is still controversial about the results on microorganisms. There are articles showing that laser radiation as biostimulator or promoter of proliferation, probably supplying power to the biological system, where the target molecules, the chromophores are part of respiratory chain. However, there are descriptions of microbicides static or from microbial growth in the generation of structural and conformational changes in molecules some effects and production of ROS, which are connected to cell death. However, studies indicate that cultures of microorganisms as laser irradiated in the presence of phenothiazine compounds result in reducing microbial growth⁹⁻¹².

The PDT is used as an alternative for the inhibition of proliferation of microorganisms and depends upon photoactivation of the compounds for the therapeutic success. Yet these mechanisms of resistance to therapeutic protocols have been described, however there is a possibility that organisms overexpressing antioxidants may be less responsive to contain higher concentrations of superoxide dismutase, for example^{5,13,14}.

Successful PDT always involves the optimization of a large number of parameters. Obviously, selection of an effective photosensitizer is essential for the success of the technique. As well as being non-toxic to humans, the ideal photosensitizer needs to absorb a laser beam at the compatible wavelength and has to produce high excitation efficiency¹⁵.

For a photosensitizer act optimally in yeast cells it needs, before crossing the membrane, pass through a cell wall. Consequently, fungi are organisms that may require a longer period of pre-irradiation. Therefore, it is believed that the protocols presented in this study may be improved with the increase of time of pre-irradiation.

Phenothiazine when photoactivated can induce cell death by different pathways, because it can interact with the plasma membrane and nucleus. This may be related to the ability of the fungicide compound tested the same microorganism in question presents a production of efflux proteins or even greater resistance to ROS.

As mentioned above the action on two important targets for the yeast may be the key to successful treatment. It is worth remembering that the release of ROS in the nucleus can induce programmed cell death similar to apoptosis, whereas membrane lesions may be linked to necrotic events. Therefore the activation of different cell death pathways may enhance the effectiveness of the model¹⁶.

It is important to remember that the polymerization occurs in the compounds inside and outside the cell (data don't show). Therefore, when photoactivated outside the yeast phenothiazine compounds can cross biological membranes and therefore can trigger more toxic response of yeast. This response is secondary to PDT. This secondary pathway may act without the release of singlet oxygen and other ROS by photoactivation (fig 1).

Adaptation of the protocols in order to increase the fungicidal effect is important. However, it is noteworthy that the above protocol was interesting since it was able to inhibit about 70%, compared to the negative control, and about 40%, compared to the phenothiazine, of the fungal growth of a resistant strain, which has potential mechanisms as redox defense (fig. 1)¹. In this sense, studies esclareçam and elucidate the mechanisms of cell death are themselves important.

5. CONCLUSION

The study showed that there is the prospect of using PDT as a treatment alternative to candidiasis, however increase the potential fungicides is required, as well as the elucidation of mechanisms of cell death should be performed

ACKNOWLEDGMENTS

Work at the author's laboratories was supported by grants from Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

REFERENCES

- [1] Mascelino, M. T., Raponi, G., Oliva, A., Mastroanni, C. M., Vullo, V. "Candidaemia in immune-compromised hosts: incidence and drug susceptibility," *J. Clin. Exp. Pathol.* 2, 131. 2:131. doi: 10.4172/2161-0681.1000131 (2012).
- [2] Pfaller, M. A. "Epidemiology and control of fungal infections," *Clin. Infect. Dis.* 19(1), 8-13 (1994).
- [3] Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., Colombo, A.L. "Epidemiology and control of fungal infections in Latin America" *Clin. Infect. Dis.* 23(1), 317-322 (2010).
- [4] Wainwright, M., Phoenix, D.A., Laycock, S.L., Wareing, D.R., Wright, P.A. "Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*," *FEMS Microbiol. Lett.* 160(2), 177– 81 (1998).
- [5] Lauro, F.M., Pretto, P., Covolo, L., Jori, G., Bertoloni, G. "Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates," *Photochem. Photobiol.Sci* 7(1), 468–470 (2002).
- [6] Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. "Mechanisms in photodynamic therapy. Part one. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization," *Photodiag. Photodyn Ther.* 1 (1), 79-93 (2004).
- [7] Wainwright, M. "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)," *J. Antimicrob. Chemother.* 42(1), 13-28 (1998).
- [8] Hamblin, M.R., Hasan, T. "Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?," *Photochem. Photobiol. Sci.* 3(5), 436-450 (2004).
- [9] Kawamoto, K., Senda, N., Shimada, K., Itol, K., Hirano, Y., Murai, S. "Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyrromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess," *Lasers Med. Sci.* 15(4), 257-262 (2000).
- [10] Karu, T.I. "Primay and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *J. Photochem. Photobiol. Part B.* 49, 1-17 (1999).
- [11] DeSimone, N.A., Hristiansen, C., Dore, D. "Bactericidal effect of 0.95-mw helium-neon and 5-mw indiumgalliumaluminum- phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa in vitro*," *Phys. Ther.* 79(9), 839-846 (1999).
- [12] Oliveira, S. C. P. S., Pires-Santos, G. M., Monteiro, J. S. C., Miranda, A. F. S., Sampaio, F. J. P., Gesteira, M. F. M., Zanin, F. A. A., Vannier-Santos, M. A., Pinheiro, A. L. B. "Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) Using Phenothiazines Derivatives Associated with the Red Laser against *Staphylococcus aureus*" *Proc. SPIE* 8569, 1-6 (2013).
- [13] Tegos, G.P., Masago, K., Aziz, F., Andrew Higginbotham, A, Stermitz, F.R., Hamblin, M.R. "Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation," *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(9), 3202-3209 (2008).
- [14] Wainwright, M., Phoenix, D.A., Laycock, S.L., Wareing, D.R., Wright, P.A. "Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*," *FEMS Microbiol. Lett.* 160(2), 177– 81 (1998).
- [15] Calin, M.A., Parasca, S.V. "Light sources for photodynamic inactivation of bacteria," *Lasers Med. Sci.* 24(3), 453-460 (2009).
- [16] Ramos, E.; Olivos-García, A.; Nequiz, M.; Saavedra, E.; Tello, E.; Saralegui, A.; Montfort, I.; Tamayo, R. P. "*Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species" *Exp. Parasitol.* 116(3), 257-65 (2007).

4.4 IC₅₀ DOS COMPOSTOS FENOTIAZINICOS

Após observar uma inibição significativa da proliferação pelos compostos fenotiazínicos associados ao laser na proporção 1:1 (Azul de Metileno : Azul de Toluidina O), determinamos a Concentração Inibitória de 50% das células expostas a diversas concentrações dos compostos isoladamente. Para o Azul de Metileno foi determinado uma IC₅₀ de 8,04µg/mL (Figura5 A) e 25,04 µg/mL para o Azul de Toluidina O (Figura5 B)

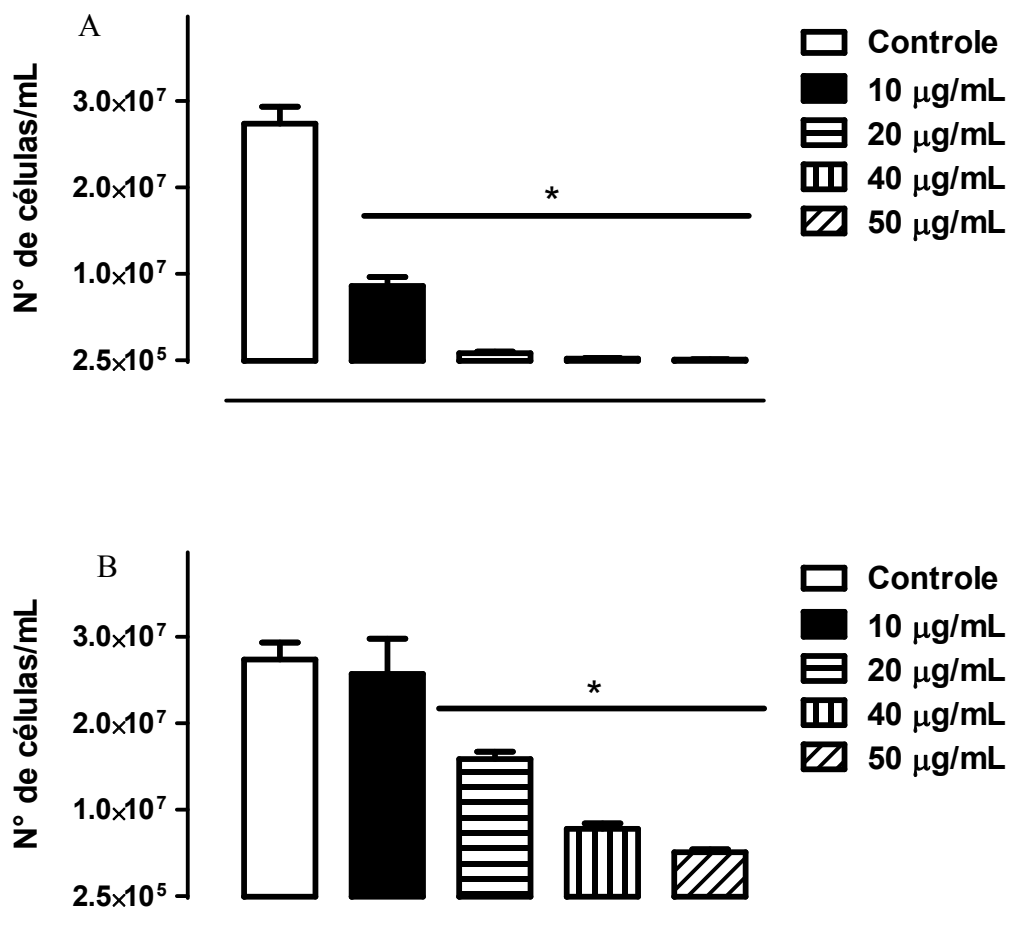


Figura 5: IC₅₀ do Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina O (ATO) sobre *C. tropicalis* resistente ao fluconazol. Os compostos fenotiazínicos isolados obtiveram o IC₅₀ de 8,04 µg/mL para o AM em (A) e 25,04 µg/mL para o ATO em (B). Significância estatística foi calculada pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Dunnett, com *p* valor < 0,05.

4.5 AUMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM *C. tropicalis* RESISTENTE AO FLUCONAZOL

Através da mensuração das espécies reativas complexadas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi possível avaliar alterações nos mecanismos de peroxidação lipídica. Um aumento dessas espécies reativas indicam aumento do estresse oxidativo e danos membranares. Na Figura 6, foi avaliada com 1h de exposição em diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol, a formação dessas TBARS e como podem ser observado em todas as concentrações testadas (24, 70 e 140 μM) houve significância estatística com $p < 0,05$.

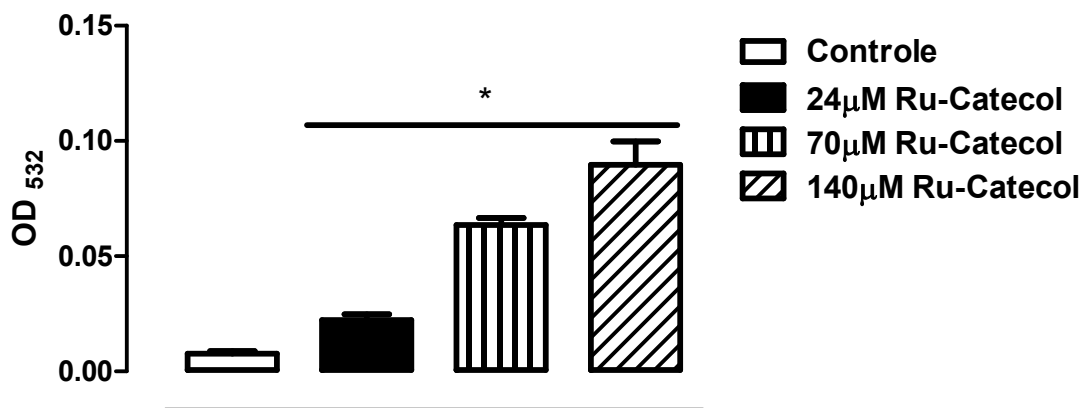


Figura 6: Avaliação da peroxidação lipídica causada pelo Complexo Rutênio-Pirocatecol. Pelo método de TBARS avaliamos diferentes concentrações do complexo Rutênio-Pirocatecol em 1h de incubação. O gráfico mostra um aumento da peroxidação lipídica, indicando o estresse oxidativo nas células. A análise estatística foi feita pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Dunnett com p valor $< 0,05$.

4.6 PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM O N-ACETIL-L-CISTEÍNA E O ÁCIDO ASCÓRBICO

Observando o estresse oxidativo gerado pela peroxidação lipídica com o tratamento do complexo Rutênio Pirocatecol, avaliamos a possibilidade de prevenção dessa condição de estresse. Utilizamos diferentes concentrações (20, 50 e 100 mM) de N-acetil-L-cisteína (NAC), por 2h, como antioxidante, após esse período, as leveduras de *C. tropicalis* foram tratadas com 150 μM do complexo Rutênio-Pirocatecol por uma hora, posteriormente, estas

leveduras foram semeadas em meio sólido ágar batata dextrose e o número de colônias contados com 24 h. Obtivemos uma redução do efeito oxidante do complexo Rutênio-Pirocatecol, em todas as concentrações com o pré-tratamento com NAC, demonstrando uma prevenção do efeito promovido pelo complexo Rutênio-Pirocatecol (Figura 7).

Para corroborar os dados observados, utilizamos como sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) com o intuito de mostrar o estresse oxidativo promovido por 38 μM do complexo Rutênio-Pirocatecol durante 1 hora (figura 8). Como controle positivo, utilizamos 5 mM de H_2O_2 por 1 hora. Para reverter o estresse oxidativo produzido pelo rutênio-catecol ou H_2O_2 usamos 5 mM de ácido ascórbico com pré-tratamento de 2 h e posterior tratamento com o complexo Rutênio-Pirocatecol. A presença do complexo Rutênio-Pirocatecol induz um aumento na produção de ERO (Figura 8G) em comparação com o controle absoluto (Figura 8A) e o controle positivo (Figura 8C) demonstrando que esse complexo tem um efeito oxidante elevado, entretanto com o pré-tratamento realizado com ácido ascórbico pudemos observar uma discreta redução na marcação das leveduras, contribuindo para a sugestão de que o efeito oxidativo gerado pelo complexo Rutênio-Pirocatecol, pode ser evitado com um pré-tratamento com antioxidantes.

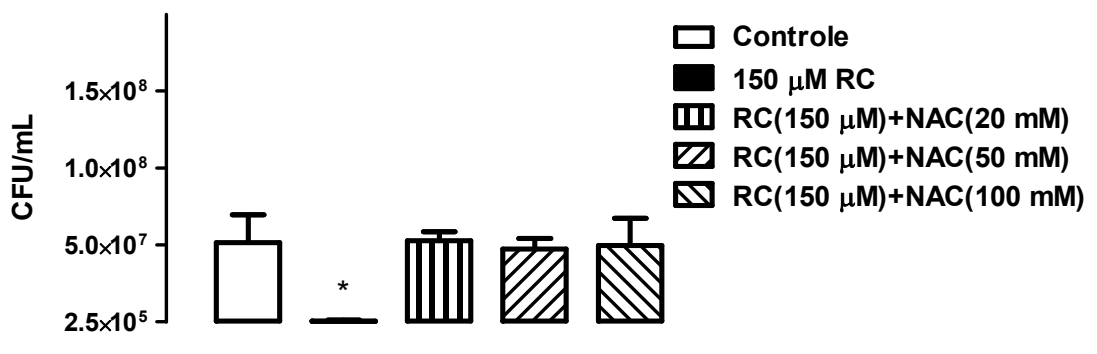


Figura 7. Efeito reversível do estresse oxidativo causado pelo complexo Rutênio-Pirocatecol. Utilizando um pré-tratamento com *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) e posterior incubação com o complexo Rutênio-Pirocatecol foi possível observar que o efeito inibitório da formação de colônias é revertido, sugerindo que o estresse oxidativo é um dos mecanismos pelo qual o complexo Rutênio-Pirocatecol interfere na viabilidade das leveduras de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol. A análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA e pós-teste Dunnet com *p* valor <0,05.

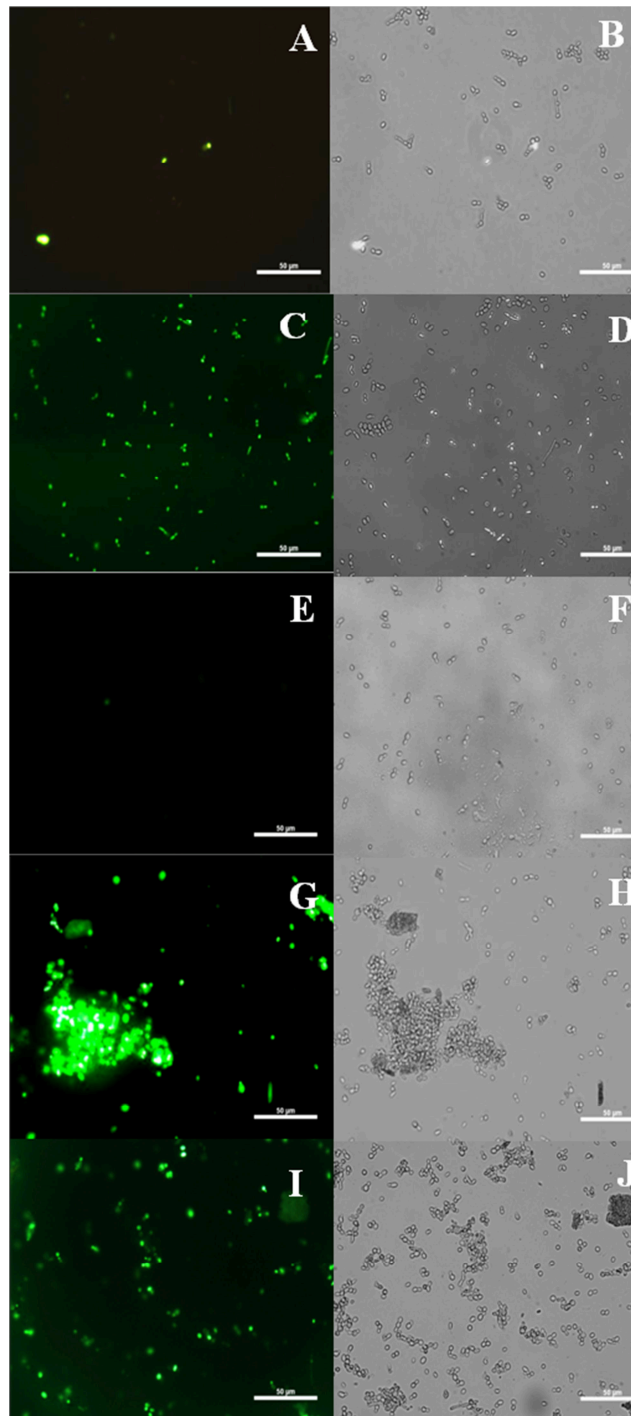


Figura 8: Microscopia de Fluorescência para detecção de Radicais Livres. Utilizando a sonda DCFH₂DA, que emite fluorescência, na faixa verde, em presença de radicais livres, observamos no controle absoluto (A), que não há marcação significativa da cultura de *C. tropicalis*, enquanto que com a presença de H₂O₂ (5 mM) (C) uma marcação mais evidente pode ser observada. Em E, utilizamos como controle negativo o antioxidante Ácido Ascórbico (5 mM) e obtivemos uma marcação semelhante à demonstrada em A. Na presença de 38 μM do complexo Rutênio-Pirocatecol (G) uma forte marcação demonstra aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio, o que pode ser discretamente evitado com o pré-tratamento das leveduras com ácido ascórbico (I). As imagens B, D, F, H e J, são a observação do campo em contraste de fase. Barras correspondem a 50 μm.

4.7 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR

O calcofluor White foi utilizado para verificar a integridade da parede celular, devido à sua afinidade de ligação à quitina. Analisamos as leveduras depois de 2 h de tratamento com 70 e 140 μM do composto. As leveduras não tratadas são fortemente marcadas com calcofluor White (Figura 9A), quando tratadas com 70 μM do composto observamos a formação de pseudohifas, agregação celular (Figura 9D) e uma marcação branda, demonstrando perda parcial da parede celular (Figura 9C). Quando tratadas com 140 μM do composto houve uma redução considerável da população de células (Figura 9F) e da marcação com calcofluor White sugerindo aumento da perda da parede celular e da viabilidade das leveduras (Figura 9E).

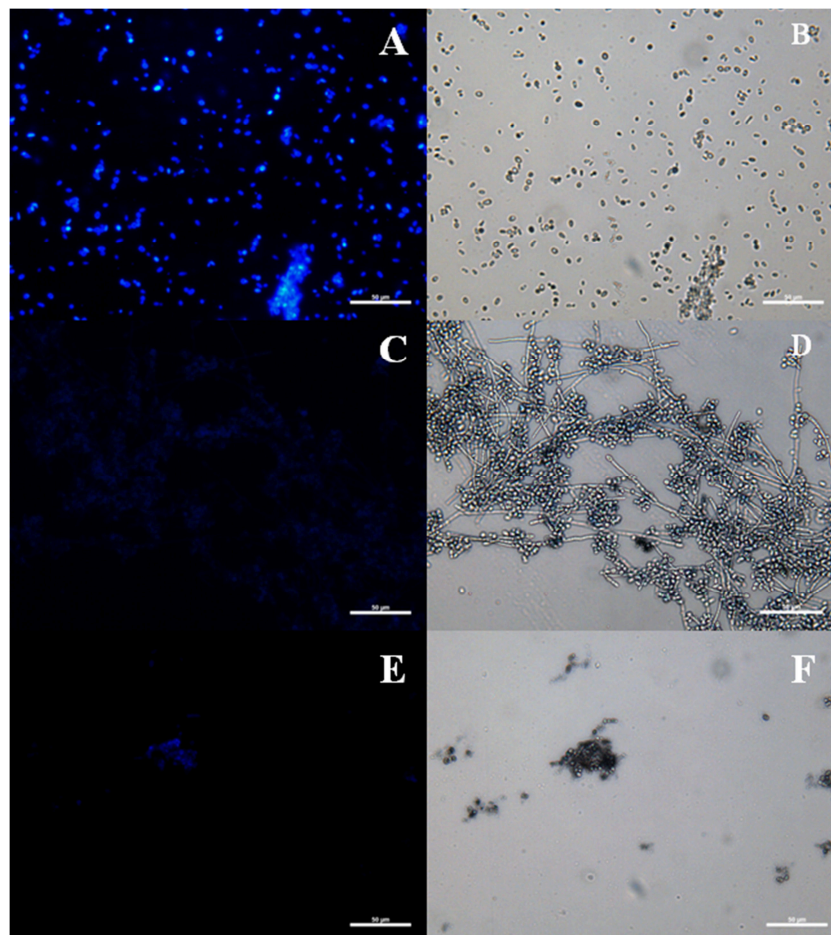


Figura 9: Avaliação da integridade da parede celular por Calcofluor White. A fluorescência em azul mostra a presença de uma parede celular íntegra como observado no controle (A). As leveduras de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol tratadas com 70 μM do Complexo Rutênio-Pirocatecol, obtiveram uma marcação branda (C) e apresentaram agregação celular e formação de pseudohifas (D). Na concentração de 140 μM o Complexo Rutênio-Pirocatecol demonstra uma redução da marcação do Calcofluor White (E) e uma diminuição da quantidade celular (F). Barras correspondem a 50 μm .

4.8 EFEITOS ULTRAESTRUTURAIS

4.8.1 Complexo Rutênio-Pirocatecol

Para avaliar a estrutura tridimensional através da MEV, utilizamos as concentrações de 9, 18 e 38 μM do complexo Rutênio-Pirocatecol durante 24h, onde observamos grande número de leveduras no Controle (Figura 10A), mostrando sua superfície íntegra e formato ovoide (Figura 10B). A concentração de 9 μM estimulou a formação de pseudohifas (Figura 10C e D), com 18 μM houve uma aparente diminuição da população devido a forte agregação destas células (Figura 10E), quando observadas em grande aumento, encontramos fissuras em sua superfície (Figura 10 F), com 38 μM encontramos células escassas e grande quantidade de restos celulares (Figura 10G e H). Quando observamos o efeito destas alterações na viabilidade celular (Figura 4), não encontramos diferenças significativas entre as concentrações de 9 e 18 μM apesar das notáveis alterações ultraestruturais.

O tratamento com o complexo Rutênio-Pirocatecol em 3 h com na concentração de 40 μM demonstra alterações celulares sugestivas de resposta ao estresse oxidativo gerado pelo composto. O controle apresenta parede celular com estrutura íntegra e regular apresentando o núcleo disforme e mitocôndrias conservadas (Figura 11A). Com o tratamento, estruturas vesiculares são aparentes na região periplasmática (Figura 11B e D seta branca), além de moléculas pigmentadas que estão presentes na parede celular (Figura 11C e D setas pretas).

Para contribuir com a compreensão dos principais efeitos do Complexo Rutênio-Pirocatecol responsáveis pela morte destas leveduras avaliamos as possíveis alterações ultraestruturais provocadas pelo composto na concentração de 60 μM durante 24h. Como mostra a Figura 12A, temos a demonstração de duas leveduras apresentando o seu núcleo com formato irregular, algumas mitocôndrias, a presença de vacúolos e parede celular íntegra. Quando tratadas com o complexo Rutênio-Pirocatecol, estas leveduras mostraram a presença de estruturas esféricas com pigmentação escuras associadas à parede celular, alterações mitocondriais além de estruturas vesiculares eletrodensas que não são observadas no controle (Figura 12B). Na Figura 13C, o espaço periplasmático está alterado mostrando aspectos vesiculares contendo estruturas semelhantes à pigmentação secretada. Essa pigmentação escura forma uma estrutura em cadeia.

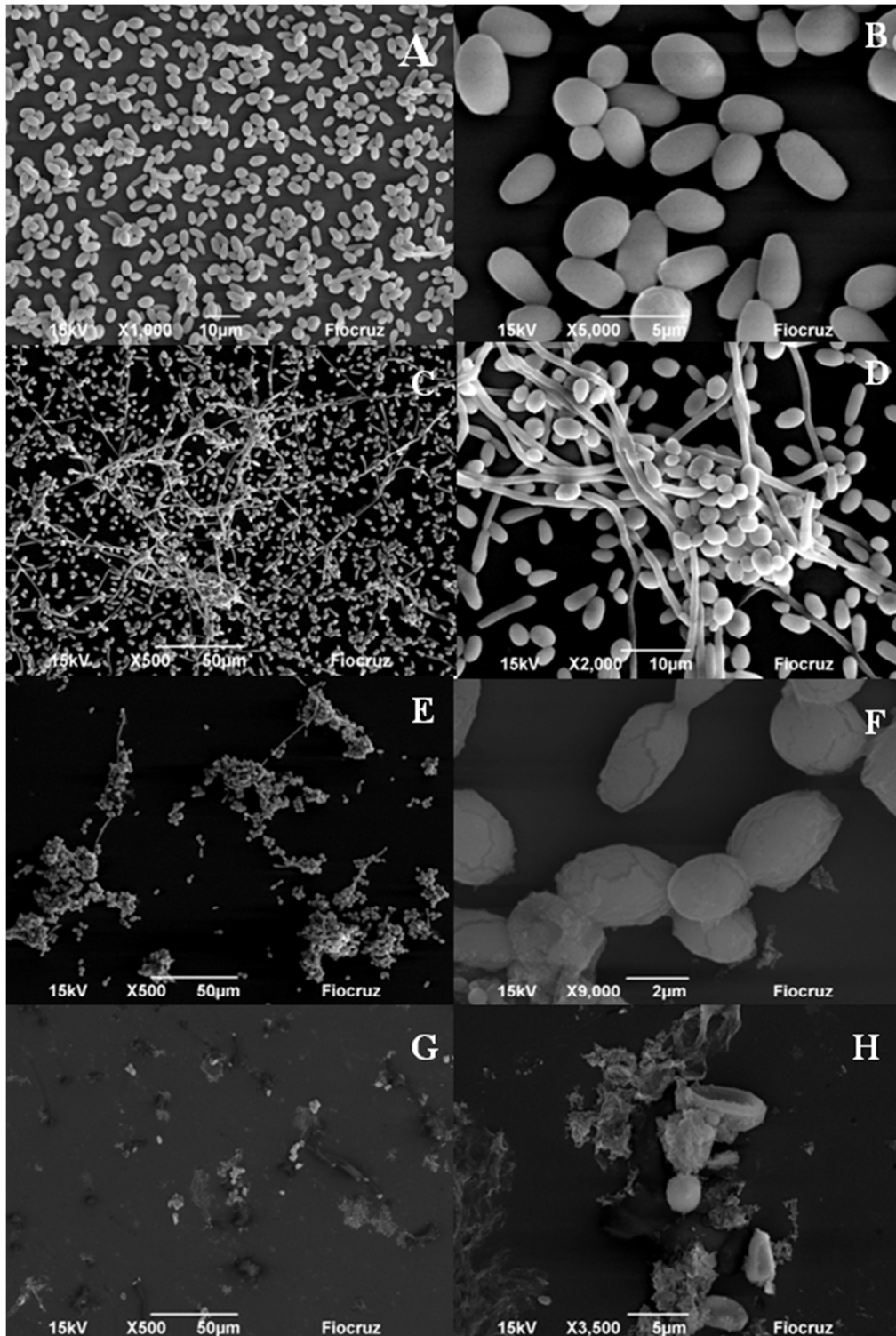


Figura 10: Efeito do Complexo Rutênio-Pirocatecol avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura em 24h. Estruturas ovoideas e com superfície íntegra são características observadas nas leveduras do grupo controle (A e B). Na presença de 9 μM do Complexo Rutênio-Pirocatecol alterações como formação de pseudo-hifas e agregação celular (C e D) são observadas. Com o aumento da concentração para 18 μM observa-se uma diminuição na quantidade de leveduras (E) e presença de alterações como fissuras na superfície celular (F). Na Concentração de 38 μM as alterações são mais severas e as leveduras apresentam grande quantidade de restos celulares (G e H).

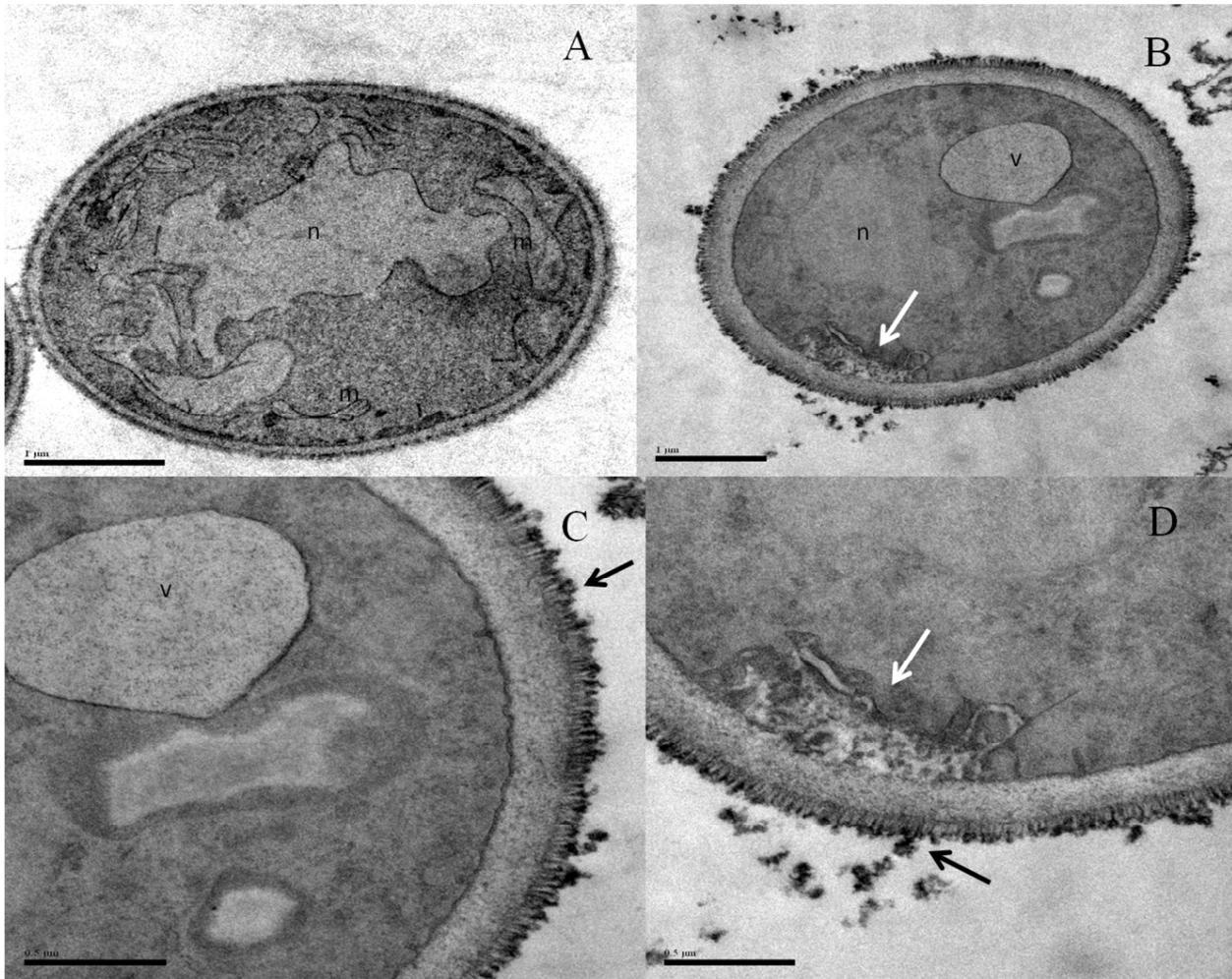


Figura 11: Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão das alterações celulares tratadas com Complexo Rutênio-Pirocatecol por 3 h. Em A uma levedura não tratada com núcleo (n) disforme e mitocôndrias integra (m). Com o tratamento são observados estruturas vesiculares no espaço periplasmático (B e D setas brancas) e a presença de estruturas pigmentadas secretadas na parede celular (C e D setas pretas).

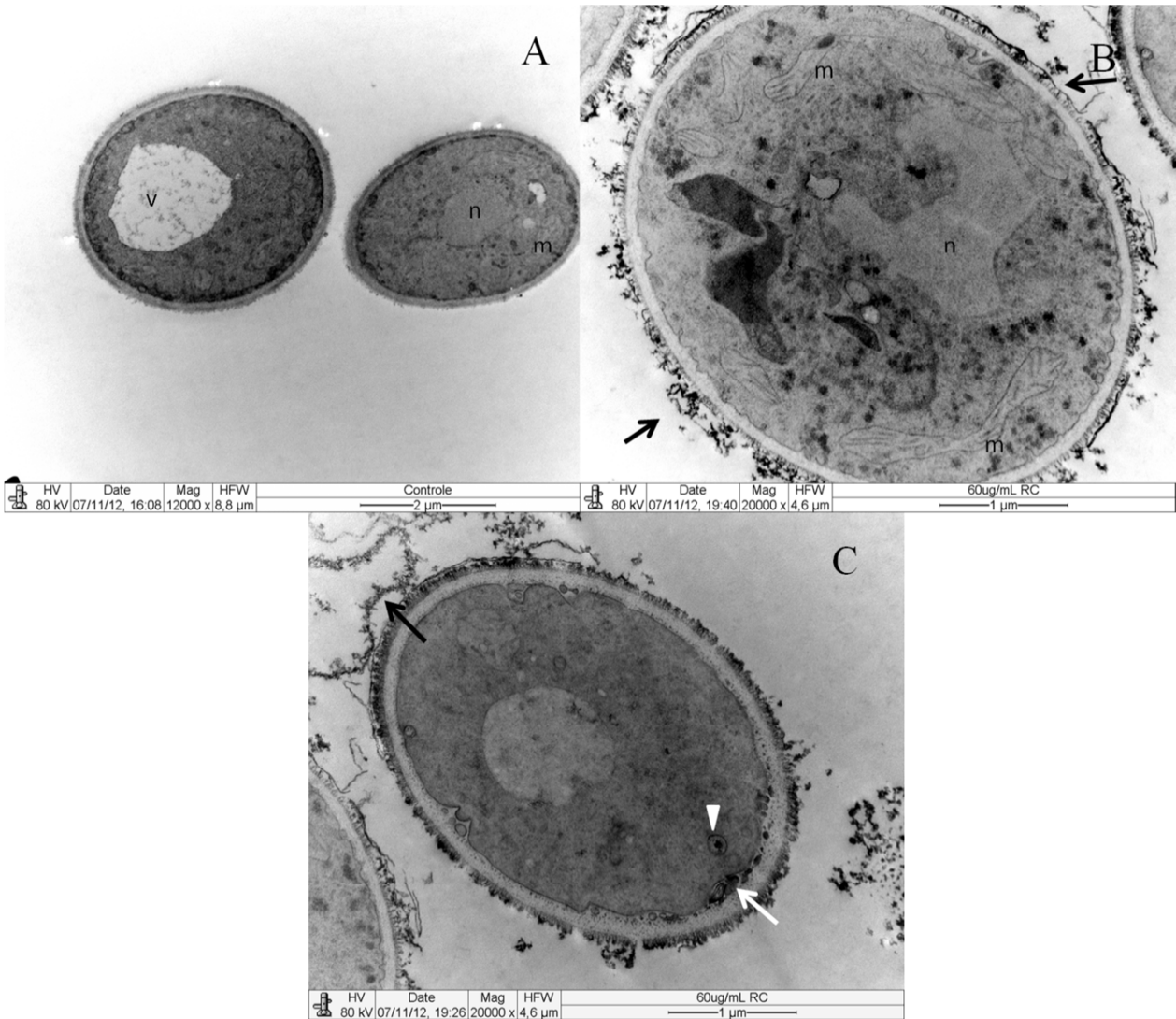


Figura 12: Avaliação Ultraestrutural de *C. tropicalis* após Complexo Rutênio-Pirocatecol. O controle (A) apresenta duas leveduras com parede celular íntegra, núcleo (n), mitocôndria (m) e vacúolo (v). O tratamento com 60 µM do complexo Rutênio-Pirocatecol por 24 h, apresenta estruturas pigmentadas sendo secretadas pela levedura (B e C setas pretas) além de estruturas vacuolares no espaço periplasmático (C seta branca), com conteúdo pigmentado sugerindo transporte dos pigmentos da parede celular (C ponta de seta).

4.8.2 Rapamicina

A avaliação dos efeitos celulares originados pela ação da rapamicina foi observada por microscopia eletrônica de transmissão, na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 3 e 24 h. O controle apresentou estrutura semelhante ao demonstrado nos experimentos com complexo Rutênio-Pirocatecol (Figura 13A). No tratamento com rapamicina por 3 h, foi possível observar formação de estruturas membranosas na região periférica da levedura (Figura 13C e D setas brancas) além de ser observada uma estrutura membranosa eletrodensa (Figura 13C, cabeça de seta). O tratamento durante 24 h mostra alterações mais tardias como formação de estruturas vacuolares concêntricas próximas ao vacúolo (Figura 13B, seta branca) aumento da espessura da parede celular (Figura 13B, seta preta). As estruturas vacuolares próximas aos vacúolos apresentam membranas irregulares (Figura 13D e F, setas brancas).

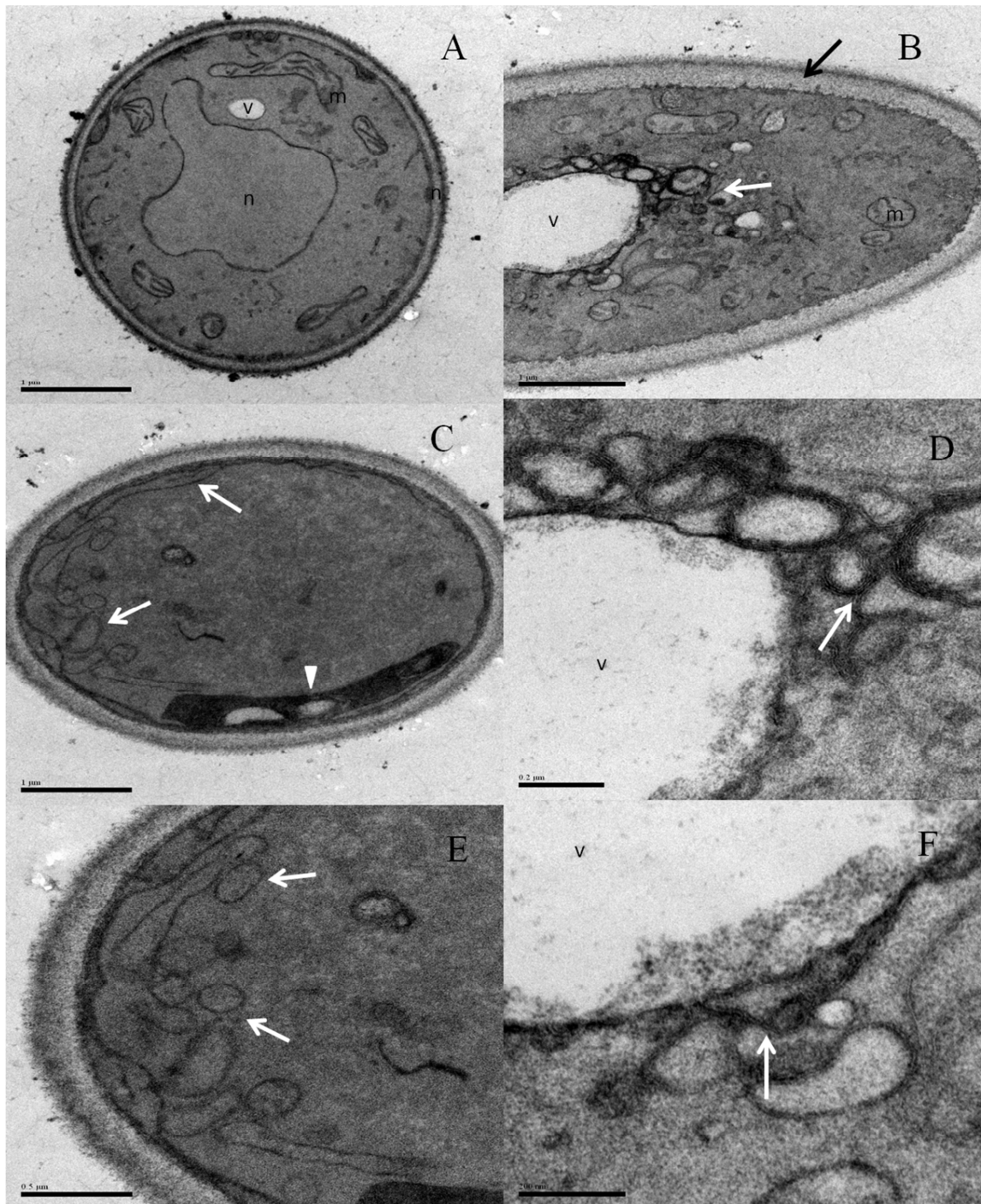


Figura 13: Avaliação dos efeitos ultraestruturais da Rapamicina. Em A, Células do controle apresentando núcleo disforme, mitocôndria (m) conservada e vacúolo (v). Em B, tratamento por 24 h na concentração de 0,1µg/mL é possível observar a formação de estruturas membranosas próximas ao vacúolo da levedura, apresentando membranas duplas e irregulares (D e F, setas brancas). Em um tratamento na mesma concentração por 3 h, são observados os efeitos anteriores como a formação estruturas membranosas na região periférica da levedura, (C e E, setas brancas)

5 DISCUSSÃO

A candidíase é uma infecção oportunista muito comum, sendo responsável por 70 a 90% das infecções em ambientes hospitalares (BILLE; MARCHETTI; CALANDRA, 2005; STATES; BECK-SAGUE; JARVIS, 1993), o considerável aumento da incidência destas infecções nos últimos 20 anos fez com que as espécies do gênero *Candida* ocupassem a quarta posição entre os patógenos isolados de hemoculturas (NUCCI; ANAISSIE, 2001). O aumento do número de pacientes com AIDS, a grande quantidade de transplantes e condições crônicas como a terapia prolongada com imunossupressores, o uso de agentes corticosteroides e o câncer são fatores importantes para elevação destas infecções, além da exposição aos antifúngicos azólicos que tornam estes pacientes fortes candidatos de resistência a esta terapia (MASIÁ CANUTO *et al.*, 2000).

Neste cenário, novas abordagens terapêuticas contra a candidíase tornaram-se necessárias trazendo novos compostos ao arsenal terapêutico experimental a exemplo dos agentes contendo diferentes complexos de rutênio utilizados neste estudo. Estes compostos estão descritos na literatura como alternativa para o tratamento de infecções fúngicas e da doença de Chagas (DONNICI *et al.*, 2014; GUEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009, 2010).

Nogueira e colaboradores (NOGUEIRA *et al.*, 2011) destacam que os complexos de rutênio apresentam maior atividade antifúngica do que os correspondentes ligantes livres, resultado que corrobora nosso estudo, no qual a atividade antifúngica *in vitro* foi significativamente melhor do que as do ligante livre, o que nos leva a supor que o íon metálico provavelmente desempenhe algum papel na interação com o fungo.

O rutênio pode formar um número variado de complexos e sua importância tem crescido em função das diversas aplicações como sensibilizadores em eventos de degradação fotocatalítica com compostos orgânicos, como catalisadores, dentre outras aplicações (ALVES, 2010).

Nossos resultados revelam que o rutênio pirocatecol apresentou uma baixa citotoxicidade para esplenócitos murinos mostrando-se favorável para o tratamento de infecções fúngicas, uma vez que sua EC_{50} foi de 325,6 μM e, portanto, com uma diferença de concentração de 16 vezes maior quando comparado a IC_{50} de 20,6 μM encontrada para as leveduras.

Os mecanismos de ação dos complexos de rutênio testados ainda não foram completamente esclarecidos, mas em nossas avaliações pudemos constatar alterações do conteúdo lipídico (peroxidação lipídica) a qual se apresentou reversível por mecanismos

antioxidantes e alterações ultraestruturais em nível de parede celular com possível desorganização desta, além do aumento da secreção de melanina.

A melanina é um pigmento disseminado em bactérias, fungos, plantas e animais. Trata-se de um biopolímero polifenólico com coloração de amarela e preta, sendo que esta distinção está baseada em seus constituintes dos quais os principais são: feomelanina (pigmento vermelho) que apresenta enxofre em sua composição e resíduos de benzotiazinas e a eumelanina (pigmento preto) composto por resíduos indólicos (SIMON; PELES, 2010). Eumelanina e feomelanina são fundamentais para a cor dos olhos, cabelos e da pele. Enquanto a neuromelanina está presente em regiões distintas do cérebro, podendo diversas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer ser correlacionada com a sua presença (KELLER, 2006).

A produção de melanina pelos fungos é de fundamental importância, constituindo-se num fator de virulência relevante para algumas espécies a exemplo de *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans* dentre outros contribuindo, assim, para sua proteção contra danos oxidativos causadas por fagócitos, ação de substâncias antifúngica e radiações ionizantes (LEVITZ, [s.d.]; MITCHELL; PERFECT, 1995; PEDROSO et al., [s.d.]; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Cabe destacar que a própria cápsula polissacarídica, a capacidade de crescer à temperatura de 37°C, a produção de enzimas fosfolipase, proteinase e uréase (MITCHELL; PERFECT, 1995) também compõem elementos de virulência para estes microrganismos.

A enzima polifenol oxidase (PFO) está presente no cérebro de mamíferos e em leveduras atua sobre substratos difenólicos como diidroxifenilalanina além do catecol gerando quinonas como produtos os quais sofrem autopolimerização e se transformam em melanina que fica depositada na parede celular do fungo (*loc.cit* IZABELLA RODRIGUES CHAVES DOS SANTOS, 2009) (VAUGHN & DUKE, 1988 *loc.cit.* Santos, 2009).

Células que apresentam melanina como cobertura celular adicional apresentam-se mais tolerantes a espécies reativas (nitrogênio e oxigênio) do que aquelas não melanizadas (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

Walker e colaboradores (WALKER *et al.*, 2010) comprovaram que a *Candida* é capaz de externalizar melanina quando induzida por L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta evidência foi também observada em nossas avaliações que mostraram que o fungo pode estar produzindo e secretando melanina no tratamento com composto fenólico (rutênio-catecol) mostrada em nível ultraestrutural e este evento, pode ter sido majoritário no comprometimento da viabilidade celular.

O catecol é um fenol biologicamente importante presente em lignina e resinas e apresenta dois grupos hidroxílicos ligados a um anel de benzênico o que lhe confere propriedades pró-oxidantes gerando assim espécies reativas do oxigênio (CHEN; AHMED; FRUK, 2013).

Diferentes denominações são associadas a enzima PFO como tirosinase, catecolase, difenolase dentre outros que suscitam sua habilidade de fazer uso de múltiplos compostos fenólicos como substrato. Esta enzima pertence ao grupo de oxiredutases e dispõe em seu sítio ativo íons cobre que agem como cofatores catalizando duas reações distintas: hidroxilação de monofenóis a orto-difenóis e a oxidação destes a orto-quinonas (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Cabe destacar que em organismos humanos existe uma isoforma da catecol metil orto-transferase não identificada em *Candida albicans* tornando os estudos com a polifenoloxidase seletivo nas abordagens de quimioterapia antiproliferativa para *Candida*.

Os vacúolos em leveduras são organelas extremamente complexas, envolvidas em uma grande variedade de funções, desempenham um papel equivalente ao lisossoma das células animais e ao vacúolo das células vegetais. Estes realizam processos de degradação proteica, armazenamento de precursores biossintéticos (aminoácidos básicos e polifosfato), regulação osmótica, homeostase iônica, armazenamento de íons e metabólitos, regulação da concentração citosólica de aminoácido básico e do pH intracelular, resposta à privação de nutrientes, estresse osmótico e iônico, autofagia e na apoptose, além disso, participam de ambas as vias secreção e endocitose. O vacúolo é a maior organela da célula, é uma estrutura dinâmica formada por uma única membrana que pode modificar rapidamente sua morfologia.

Estudos recentes revelaram que os vacúolos não são apenas compartimentos terminais das vias de biossíntese ou endocitose, mas sim pontos de encontro bastante sensíveis e receptivos às mudanças do ambiente extracelular (LI; KANE, 2009), 27% do total de proteínas, que são identificadas como vacuolares tem a função de transportador, os quais têm uma grande variedade de substratos, variando desde aminoácidos a metais de transição, onde estão presentes hidrolases, proteínas envolvidas na autofagia, segmentação vacuolar, ou fusão vacúolo-vacúolo. Em relação a sua composição lipídica, diferentemente da membrana plasmática que possui jangadas lipídicas ricas em esfingolipídios, os vacúolos de leveduras apresentam baixos níveis de ergosterol e esfingolipídios. A presença de lipídios, tais como reguladores do ergosterol, diacilglicerol, fosfatidil-inositol-3-fosfato e fosfatidilinositol-4 fosfato são necessários para fusão entre as membranas vacuolares (SCHNEITER, 1999). O número de compartimentos e tamanho corresponde à absorção ou liberação de água e íons do

vacúolo, na fase logarítmica, as leveduras metabolicamente ativas apresentam vacúolos com múltiplos lobos que se fundem na fase estacionária ou privação de glicose.

Praticamente todas as funções dos vacúolos em leveduras e lisossomos em mamíferos estão associadas ao pH ácido do lúmen ou gradiente de pH através da membrana. O pH lisossomal está geralmente entre 4,5 e 5,0 e o pH vacuolar, entre 5,0 e 6,5, dependendo das condições de crescimento (MARTÍNEZ-MUÑOZ; KANE, 2008). Em ambas as células, a acidificação do lisossomo e do vacúolo são feitas por meio de bombas conhecidas como as H⁺ ATPases, as quais constituem uma grande família de enzimas que transportam H⁺ para fora da célula e/ou para o lúmen do vacúolo contra o gradiente eletroquímico às custas da hidrólise do complexo ATP Mg. A diferença de pH entre o citoplasma e o lúmen do vacúolo funciona como força motriz do sistema antiporte de substrato na membrana do mesmo. As H⁺ ATPases do tipo F estão presentes nas mitocôndrias, na membrana de bactérias e cloroplastos; as do tipo P membrana plasmática de leveduras, fungos filamentosos e plantas; e as do tipo V inicialmente descritas nas membranas vacuolares também encontram-se em lisossomos e endossomo (LI; KANE, 2009). Em nossos experimentos as leveduras tratadas com rapamicina mostraram de maneira bastante evidente em sua ultraestrutura a compartimentalização de material em seus vacúolos, sugerindo tratar-se de autofagossomos maduros. Também foi encontrada de forma frequente tumefação mitocondrial mostrando um possível prejuízo de suas funções.

A interação entre compostos fenotiazínicos e a luz Laser promoveu uma inibição do crescimento celular. A fototerapia antifúngica utilizando os compostos fenotiazínicos sobre fungos do gênero *Candida* sp. já vem demonstrando efeito redutor nas unidades formadoras de colônia e apresentando características potenciais para introdução dessa metodologia como terapêutica para a candidíase (PUPO *et al.*, 2011). Estes compostos são estudados em diversos modelos obtendo resultados significantes, como a interação do AM com laser em culturas de *Escherichia coli* e *Staphyococcus aureus* (PHOENIX; HARRIS, 2003) e como demonstrado por BARBOSA e colaboradores (BARBOSA *et al.*, 2012), estes corantes tem efeito antiparasitário. Estes compostos já apresentam efeito conhecido sobre diversas linhagens neoplásicas, induzindo apoptose em células de câncer de pulmão (LIM *et al.*, 2013) e demonstrando redução da proliferação de células de melanoma (MIRANDA *et al.*, 2014; WAGNER *et al.*, 2012), mas se faz necessário investigar as alterações que envolvem este processo para melhor entender como essa redução acontece nas células fúngicas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados identificamos que os compostos testados são inibidores da proliferação e viabilidade da *Candida tropicalis* resistente ao fluconazol por diferentes mecanismos.

O Complexo Rutênio-Pirocatecol promove um aumento do estresse oxidativo induzindo a morte destas leveduras.

A rapamicina, um clássico indutor de processo autofágico, apresentou elevada atividade antifúngica.

A fototerapia antifúngica é um potente inibidor da proliferação destas leveduras, porém outras abordagens ainda são necessárias para elucidação do seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- AHER, S. B. et al. Recent developments of metal N-heterocyclic carbenes as anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 81, p. 408–419, 23 jun. 2014.
- AHIMOU, F. et al. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. **Journal of microbiological methods**, v. 45, n. 2, p. 119–126, jun. 2001.
- ALEXANDER, J. W. et al. The process of microbial translocation. **Annals of surgery**, v. 212, n. 4, p. 496–510, out. 1990.
- BARBOSA, A. F. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n. 10, p. 850–855, dez. 2012.
- BARTH, S.; GLICK, D.; MACLEOD, K. F. **Autophagy: Assays and artifacts** *Journal of Pathology*, 2010.
- BILLE, J.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Changing face of health-care associated fungal infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 314–319, ago. 2005.
- BIRSE, C. E. et al. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 9, p. 3648–3655, set. 1993.
- BOISNARD, S. et al. Role of Sho1p adaptor in the pseudohyphal development, drugs sensitivity, osmotolerance and oxidant stress adaptation in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. **Yeast**, v. 25, p. 849–859, 2008.
- BOUNOUS, D. I.; CAMPAGNOLI, R. P.; BROWN, J. Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes. **Avian diseases**, v. 36, n. 4, p. 1022–7, 1992.
- BUCK, S. T. G. **Relação entre Eficiência Fotodinâmica, Citotoxicidade e Propriedades Moleculares de Corantes Para Aplicação em Terapia Fotodinâmica**; Dissertação. SP: Universidade de São Paulo, 2009.
- CASTANO AP, DEMIDOVA TN, H. M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 14, p. 279–293, 2004.
- CHEN, C.; AHMED, I.; FRUK, L. Reactive oxygen species production by catechol stabilized copper nanoparticles. **Nanoscale**, v. 5, n. 23, p. 11610–11614, 7 dez. 2013.
- CLSI Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard — 3^a. ed.v. 22, n. 15 Pennsylvania EUA, 2008.

- CORTÉS L, J. A.; RUSSIN, J. A. Echinocandins. **Revista chilena de infectología**, v. 28, p. 529–536, 2011.
- DAS, S.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. New antifungal agents in pediatric practice. **Indian pediatrics**, v. 46, p. 225–231, 2009.
- DE CAMPOS RASTEIRO, V. M. et al. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 489, jan. 2014.
- DEBRUYNE, D.; RYCKELYNCK, J. P. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. **Clinical pharmacokinetics**, v. 24, p. 10–27, 1993.
- DONNICI, C. L. et al. In vitro studies of the activity of dithiocarbamate organoruthenium complexes against clinically relevant fungal pathogens. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 4, p. 5402–5420, jan. 2014.
- EISENBERG, T. et al. Necrosis in yeast. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, p. 257–268, 13 jan. 2010.
- ESCHENAUER, G.; DEPESTEL, D. D.; CARVER, P. L. Comparison of echinocandin antifungals. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, p. 71–97, 2007.
- FLECK, R.; HOF, H. Breakpoints for posaconazole susceptibility testing: background and discussion about the need of establishing values. **Mycoses**, v. 51 Suppl 2, p. 1–4, set. 2008.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, out. 1999.
- GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 265–282, jun. 1990.
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, F. K. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.
- GUEDES, P. M. M. et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 270–282, maio 2010.
- GÜLAY, Z. et al. Molecular epidemiologic surveillance and antifungal agent sensitivity of *Candida albicans* isolated from anesthesia intensive care units. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 36, n. 3-4, p. 309–16, 2002.
- HAN, S. et al. Population pharmacokinetic analysis of fluconazole to predict therapeutic outcome in burn patients with candida infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1006–1011, 2013.

HITCHCOCK, C. A. et al. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **The Biochemical journal**, v. 266, n. 2, p. 475–480, 1 mar. 1990.

HUANG, Z. et al. Comparative studies of tri- and hexavalent chromium cytotoxicity and their effects on oxidative state of *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Current microbiology**, v. 68, n. 4, p. 448–56, abr. 2014.

IZABELLA RODRIGUES CHAVES DOS SANTOS. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**. SP: Universidade Estadual Paulista, 2009.

JOBÉ, K. A. et al. Epidemiology of Sexually Transmitted Infections in Rural Southwestern Haiti: The Grand'Anse Women's Health Study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 5, p. 881–886 set. 2014.

KAMINISHI, H. et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and immunity**, v. 63, n. 3, p. 984–988, mar. 1995.

KELLER, J. N. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. **Ageing research reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–13, fev. 2006.

KLIONSKY, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, p. 931–937, 2007.

KRIPPENDORFF, B.-F. et al. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. **Journal of biomolecular screening**, v. 14, n. 8, p. 913–23, set. 2009.

LATTIF, A. A. et al. Susceptibility pattern and molecular type of species-specific *Candida* in oropharyngeal lesions of Indian human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1260–1262, mar. 2004.

LEE, Y. J. et al. Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 10, p. 881–893, jan. 2012.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Reviews of infectious diseases**, v. 13, n. 6, p. 1163–1169, 1991.

LI, S. C.; KANE, P. M. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1793, n. 4, p. 650–663, abr. 2009.

LIM, E. J. et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology reports**, v. 30, n. 2, p. 856–862, ago. 2013.

MARTÍNEZ-MUÑOZ, G. A.; KANE, P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20309–20319, 18 jul. 2008.

MASIÁ CANUTO, M. et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 593–601, ago. 2000.

MIAO, H. et al. Inhibitory effect of Shikonin on *Candida albicans* growth. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1956–63, jan. 2012.

MIRANDA, A. F. S. et al. Phenothiazinium dyes in association with diode red laser against B16F10 melanoma cells: in vitro study. **Proceedings - SPIE**, v. 8932, p. 8932121–8932126, 2014.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, out. 1995.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. **American journal of health-system pharmacy**, v. 63, p. 1693–1703, 2006.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, p. 400–428, table of contents, 2003.

NAIR, R. G.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to human buccal epithelial cells in vitro. **Journal of medical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 179–185, set. 1996.

NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, p. 458–467, 2009.

NOGUEIRA, L. J. et al. In vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. to dithiocarbamate organoruthenium compounds. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e323–329, set. 2011.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 12, p. 1959–1967, 15 dez. 2001.

OLIVEIRA, E. DE. Avaliação do polimorfismo do gene da catecol-orto-metiltransferase (COMT) como fator relacionado ao desenvolvimento do leiomioma do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, p. 210–210, 2009.

OVADJE, P.; HAMM, C.; PANDEY, S. Efficient induction of extrinsic cell death by dandelion root extract in human chronic myelomonocytic leukemia (CMML) cells. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e30604, jan. 2012.

PEDROSO, R. DOS S. et al. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 566–568, 2007.

PHOENIX, D. A.; HARRIS, F. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 7, p. 283–285, jul. 2003.

PUPO, Y. M. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. **Acta odontológica latinoamericana**, v. 24, n. 2, p. 188–192, jan. 2011.

RÜCHEL, R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. **Microbiological sciences**, v. 3, n. 10, p. 316–319, out. 1986.

SAMARANAYAKE, L. P.; HUGHES, A.; MACFARLANE, T. W. The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. **Journal of medical microbiology**, v. 17, n. 1, p. 13–22, fev. 1984.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 105, n. 11, p. 875–883, nov. 1997.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 4, p. 379–385, ago. 2002.

SCHNEITER, R. Brave little yeast, please guide us to thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae*. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 21, n. 12, p. 1004–1010, dez. 1999.

SILVA, J. J. N. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4414–4421, out. 2009.

SILVA, J. J. N. et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 260–269, maio 2010.

SIMON, J. D.; PELES, D. N. The red and the black. **Accounts of chemical research**, v. 43, n. 11, p. 1452–1460, 16 nov. 2010.

STATES, U.; BECK-SAGUE, C. M.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J Infect Dis**, v. 167, p. 1247–1251, 1993.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 73, p. 317-324. 2004.

TAKAHASHI, K. et al. Translocation model of *Candida albicans* in DBA-2/J mice with protein calorie malnutrition mimics hematogenous candidiasis in humans. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, p. 179–187, 2003.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and

caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 14, p. 44–49, 1997.

VUMMIDI, B. R. et al. Photodynamic agents with anti-metastatic activities. **ACS Chemical Biology**, v. 8, p. 1737–1746, 2013.

WAGNER, C. et al. The echinocandins: Comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. **Pharmacology**, v. 78, p. 161–177, 2006.

WAGNER, M. et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and experimental dermatology**, v. 37, n. 5, p. 527–533, jul. 2012.

WALKER, C. A. et al. Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 9, p. 1329–1342, set. 2010.

ZHANG, P. et al. Metal-based 2,3-indolinedione derivatives as proteasome inhibitors and inducers of apoptosis in human cancer cells. **International journal of molecular medicine**, v. 34, n. 3, p. 870–879, set. 2014.