



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

CECÍLIA ROCHA DA SILVA

**Efeito da combinação de amiodarona com fluconazol, *in vitro*,
frente a isolados de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol:
novos olhares para antigos fármacos.**

FORTALEZA-CEARÁ

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

Efeito da combinação de amiodarona com fluconazol, *in vitro*, frente a isolados de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol: novos olhares para antigos fármacos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Drº. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

Mestranda: Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA-CEARÁ

2012

CECÍLIA ROCHA DA SILVA

Efeito da combinação de amiodarona com fluconazol, *in vitro*, frente a isolados de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol: novos olhares para antigos fármacos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará
Examinador

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará
Examinador

Prof^ª. Dr^a. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Esse trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará – FUNCAP

Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LabNOE) do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará

Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela sua luz e seu olhar sobre a minha vida...

Aos meus pais, Pedro e Terezinha, que com todo amor e carinho me ensinaram a cultivar valores importantes como os da amizade, caráter, respeito e amor. Além do incentivo e apoio nessa caminhada.

Às minhas irmãs, Carol e Camila, pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela oportunidade concedida, confiança depositada, orientação, dedicação, companheirismo, conselhos sábios, coragem, incentivo e amizade que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Aos professores do PPGMM, pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães pela paciência, orientação e principalmente pela sua simplicidade como ser humano.

Ao Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti, pela paciência e dedicação para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico Moraes e Prof. Dra. Danielle Silveira Macêdo pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a sua aluna Marina Duarte Pinto Lobo pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

À todos os amigos do Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras (LABEL) que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse projeto (Janaína Siebra, Rose Anny, Letícia, Narjara Figueiredo), em especial, ao João Batista, pela convivência, incentivo, dedicação, apoio e amizade durante esse período.

Às minhas amigas de graduação : Juliana Fernandes, Juliana Catharina, Analu, Isabel, Lívia, Anaiara, e as de mais longa data: Elanny, Fernanda, Raquel, Lídia, cuja amizade é fundamental para tornar a vida mais leve e divertida.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa durante o período de dois anos.

À todos aqueles, que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

Candida tropicalis é uma levedura diplóide causadora de infecções superficiais e/ou sistêmicas, as quais podem ser adquiridas de maneira endógena ou exógena e podem acometer diversos órgãos. No Brasil, dentre as espécies de *Candida* spp., a *C.tropicalis* é a segunda espécie mais comumente isolada e no Ceará é pouco estudada. Nos dias atuais, temos vivenciado um aumento significativo das infecções fúngicas invasivas. Porém as drogas antifúngicas disponíveis no mercado são restritas a um pequeno número quando comparadas as antibacterianas. Logo, este fato unido ao aumento da frequência de resistência cruzada faz necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. A amiodarona (AMD) é usada classicamente para tratar pacientes com arritmia. Trabalhos recentes têm demonstrado uma ampla atividade antifúngica desta droga quando associado ao fluconazol (FLC). No presente estudo induzimos resistência em sete cepas de *Candida tropicalis* e avaliamos um eventual sinergismo entre FLC e AMD. A avaliação da interação das drogas foi determinada através do cálculo da Fractionary Inhibitory Concentration (FICI) e por meio da técnica de citometria de fluxo, onde também avaliamos o provável mecanismo de ação desse sinergismo. Os isolados utilizados no estudo pertencem ao Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras (LABEL) da UFC. Para o cumprimento da metodologia, as cepas foram recuperadas do estoque e identificadas por biologia molecular. A indução foi realizada adaptando-se o protocolo de Pinto e Silva (2009). Os testes de sensibilidade foram realizados utilizando-se o teste de microdiluição em caldo padronizado pelo CLSI, segundo o documento M27-A3. Para avaliar o sinergismo utilizou-se a técnica do checkboard. Por fim, para verificar o possível mecanismo de ação do sinergismo, determinamos a integridade de membrana, potencial transmembrana mitocondrial, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), teste do cometa, análise da oxidação de bases purinas e caspases. As cepas de *C.tropicalis* após ~100 dias atingiram um CIM > 64µg/mL. Os testes de sensibilidade apresentaram CIM > 64µg/mL tanto para o FLC como para AMD. Das cepas testadas, seis apresentaram sinergismo. O tratamento FLC+AMD alterou a integridade da membrana plasmática e mitocondrial, aumentou os níveis de ROS intracelularmente, causou danos ao DNA e, consequentemente, conduziu morte celular por apoptose.

Palavras chave: *Candida tropicalis*, fluconazol, amiodarona, estresse oxidativo, danos ao DNA

ABSTRACT

Candida tropicalis is a diploid yeast causing superficial infections and / or systemic, which can be acquired endogenously or exogenously and can affect several organs. In Brazil, among the species of *Candida* spp. The *C.tropicalis* is the second most common species isolated in Ceará and is rarely studied. Nowadays, we have experienced a significant increase in invasive fungal infections. But antifungal drugs on the market are restricted to a small number when compared to the antibacterial. Therefore, this fact coupled with the increased frequency of cross-resistance is necessary to search for new therapeutic strategies. Amiodarone (AMD) is traditionally used to treat patients with arrhythmia. Recent studies have shown a broad antifungal activity of this drug when combined with fluconazole (FLC). In the present study we induced resistance in seven strains of *Candida tropicalis* and evaluate a possible synergism between FLC and AMD. The evaluation of the interaction of the drugs was determined by calculating the Fractionary Inhibitory Concentration (FICI) and by flow cytometry, where we also evaluated the likely mechanism of action of this synergism. The isolates used in this study belong to the Laboratory of Experimental Bioprospecting in yeast (LABEL) the UFC. For the fulfillment of the methodology, the strains were recovered from stock and identified by molecular biology. The induction was carried out adapting the protocol of Pinto and Silva (2009). Sensitivity tests were performed using the broth microdilution test standardized by the CLSI, the document M27-A3. To evaluate the synergism used the technique of checkboard. Finally, to determine the possible mechanism of action of synergism, we determine the membrane integrity, mitochondrial transmembrane potential, formation of reactive oxygen species (ROS), comet assay, analysis of the oxidation of purine bases and caspases. Strains *C.tropicalis* after ~ 100 days reached an MIC > 64µg/mL. The sensitivity tests were MIC > 64µg/mL both the FLC as AMD. Of the strains tested, six showed synergism. The treatment changed the FLC + AMD plasma membrane integrity and mitochondrial increased levels of intracellular ROS, cause DNA damage and therefore led cell death by apoptosis.

Keywords: *Candida tropicalis*, fluconazole, amiodarone, oxidative stress, DNA damage

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE ANEXOS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Infecções hospitalares	16
2.2 <i>Candida tropicalis</i> : um patógeno emergente	19
2.3 Resistência ao fluconazol	22
2.4 Métodos de detecção de resistência	26
2.5 Fármacos com efeitos antifúngicos	27
2.6 Amiodarona	31
3. PERGUNTAS DE PARTIDA	34
4. HIPÓTESES	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo Geral	35
5.2 Objetivos Específicos	35
6. ARTIGO	36
7. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As diferenças geográficas na proporção de casos que envolvem candidemia. <i>Candida glabrata</i> (a), <i>C. tropicalis</i> (b) e <i>C. parapsilosis</i> (c), respectivamente	18
Figura 2: Morfologia de <i>Candida tropicalis</i> em meios de cultura de rotina. (a) ágar Sabouraud dextrose, (b) CHROMagar <i>Candida</i> TM , (c) ágar corn meal Tween 80...	20
Figura 3. Mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos	25
Figura 4: Alvos potenciais de agentes não antifúngicos em fungos	29
Figura 5: Estrutura química da amiodarona	31
 ARTIGO	
Figura 1. Tempo de indução de resistência ao fluconazol (FLC) em cepas de <i>Candida tropicalis</i> cultivadas em meio RPMI contendo uma concentração de quatro vezes a CIM de cada isolado. Cada ponto de referência representa um teste para avaliar a susceptibilidade a FLC.....	57
Figura 2. Análise de alterações morfológicas (A), integridade da membrana (B) e disfunção mitocondrial (C) em cepas de <i>C. tropicalis</i> (dia 0), tratado com fluconazol (FLC) com 64 µg / mL.....	58
Figura 3. Efeitos do fluconazol (FLC-64 µg / mL) e amiodarona (AMD-64 µM) isolados e em combinação (FLC 16 µg / mL+ AMD 0,20 µM) em cepas de <i>C. tropicalis</i> resistentes ao FLC em alterações morfológicas (A) e da integridade de membrana (B), após 24 h de exposição.....	59
Figura 4. Efeitos de diferentes tratamentos na proliferação celular estimados pelo ensaio de exclusão por iodeto de propídio.....	60
Figura 5. Sobreposição de fluorescência verde de histogramas de parâmetro único de um isolado de <i>C. tropicalis</i> . As células foram marcadas com Rh123 (50 nM). O histograma mostra os efeitos de diferentes tratamentos sobre o potencial transmembrana mitocondrial na cepa expostas a RPMI (a), fluconazol (FLC) com 64 µg / mL (b), amiodarona (AMD) 64 µM (c), e FLC (16 µg / ml) + AMD (0,20 µM) durante 24 horas (d).....	61
Figura 6. Sobreposição de fluorescência amarela de histogramas de parâmetro único de cepa sensível (A) ou resistente ao fluconazol (C) de <i>C. tropicalis</i> , e porcentagens de ROS gerados intracelularmente em cepa sensível (B) ou resistentes (D) expostas ao RPMI (a), fluconazol (FLC) com 64 µg / mL (b),	

amiodarona (AMD) a 64 μ M (c), e FLC (16 μ g / mL) + AMD (0,20 μ M) durante 24 horas (d)..... 62

Figura 7. Efeitos de diferentes tratamentos sobre a distribuição das classes de danos (graus, G), índice e frequência (%) de danos ao DNA utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa em *C. tropicalis* sensível (A) e resistente ao FLC (B) após 24 horas de exposição. As leveduras foram expostas a meio RPMI, fluconazol (FLC) com 64 μ g / mL, amiodarona (AMD) a 64 μ M, e FLC (16 μ g / mL) + AMD (0,20 μ M)..... 63

Figura 8. Efeitos de diferentes tratamentos sobre os danos oxidativos do DNA usando uma versão modificada do ensaio do cometa alcalino, na presença ou na ausência de enzimas FPG, em *C. tropicalis* resistente (A) e sensível ao FLC (B) após 24 horas de exposição. As leveduras foram expostas a meio RPMI, fluconazol (FLC) com 64 μ g / mL, amiodarona (AMD) a 64 μ M, e FLC (16 μ g / mL) + AMD (0,20 μ M)..... 64

Figura 9. Efeitos de diferentes tratamentos sobre a ativação das caspases 3/7 em cepa sensível (A) e resistentes ao FLC (B) de *C. tropicalis* após 24 h de exposição. As leveduras foram expostas a meio RPMI, fluconazol (FLC) com 64 μ g / mL, amiodarona (AMD) a 64 μ M, e FLC (16 μ g / mL) + AMD (0,20 μ M)..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito sinérgico de FLC e AMD contra cepas de <i>C.tropicalis</i> resistentes ao fluconazol isolados no Ceará (MIC 50 – 48H)	66
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\psi_m$ – Potencial transmembrana mitocondrial
- ABC** – ATP-binding cassette
- AMD** – Amiodarona
- ANT** – Antagonismo
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP** – Adesina trifosfato
- ATCC** – American Type Culture Collection
- BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool
- CDR** – *Candida* Drug Resistance
- CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CTAB** – Brometo de cetil-trimetilamônio
- DCF** – 2',7'-diclorofluoresceína
- DCFH** – 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato
- DMSO** – Dimetilsufóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- FICI** – Índice de Concentração Inibitória Fracionária
- FLC** – Fluconazol
- FPG** – Formamidopirimidina glicosilase
- g** – Unidade de gravidade
- H2DCFDA** – 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester
- HCl** – Ácido Clorídrico
- HEPES** – [N-(2-hidroxietyl)-piperazina-N'- ácido (2-etanossulfônico)]
- IND** – Indiferença
- ITS** – Internal Transcribed Spacer Regions
- KV** – kilovolt
- KCl** – Cloreto de potássio
- KH₂PO₄** – Dihidrogenofosfato de potássio
- LABEL** – Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

mA – Miliampere

MDR – Multidrug Resistance

MFS – Major Facilitator Superfamily

MOPS – Acido morfolinopropanosulfônico

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salina

R – Resistente

RNA – Ácido Ribonucléico

RPMI– Roswell Park Memorial Institute

s – Segundos

S – Sensível

SAPs – Aspartil transferases

SDD – Sensível dose dependente

SIN – Sinergismo

SCOPE – Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological

UFC – Unidades formadoras de colônia

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: MATERIAIS E MÉTODOS

ANEXO II: COMITÊ DE ÉTICA

1 INTRODUÇÃO

Durante as duas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas (IFI) aumentou drasticamente em todo o mundo. As IFIs são caracterizadas por alta morbidade e mortalidade e são difíceis de diagnosticar, prevenir e tratar (Petrikkos, et. al., 2007). As infecções causadas por *Candida spp.* resultam do aumento do tempo de internação e juntamente com as despesas médicas constituem um importante problema de saúde pública (Chou, et. al., 2007).

Candida tropicalis é uma levedura diplóide causadora de infecções superficiais e/ou sistêmicas, as quais podem ser adquiridas de maneira endógena ou exógena e podem acometer diversos órgãos (NEGRI et al. 2011). No Brasil, *C. tropicalis* é a segunda espécie mais comumente isolada e no Ceará é pouco estudada (MENEZES, et. al., 2009). Durante os anos 1970 e 1980, vários estudos demonstraram que a fungemia causada por *C. tropicalis* foi comum em pacientes com leucemia e naqueles que receberam um transplante de medula óssea. Em um estudo realizado no Brasil, visando caracterizar a epidemiologia das candidemias, foi observado que em um grupo de 906 pacientes, 20% destes tiveram infecções por *C. tropicalis*. Além disso, foi possível verificar que esta espécie foi a segunda mais frequentemente encontradas em adultos (21,6%) e idosos (23,2%), e a terceira em recém-nascidos (11,9%) e crianças (18,5%) (NUCCI; COLOMBO, 2007).

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo no número de infecções fúngicas invasivas. O tratamento dessas infecções é marcadamente limitado por problemas de segurança dos medicamentos, da resistência e dos perfis de eficácia. Além disso, as drogas antifúngicas disponíveis no mercado são restritas a um pequeno número quando comparadas as antibacterianas. Diante desse fato, unido ao aumento da frequência de resistência cruzada faz-se necessária o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo, o uso de combinações de fármacos com atividade antifúngica juntamente com fármacos não antifúngicos (PINA-VAZ et al., 2005; TOBUDIC et al., 2012).

A AMD é classificada como uma droga antiarrítmica classe III que impede a fibrilação atrial e taquicardia ventricular, e é usada como droga de escolha em pacientes com arritmia. Trabalhos recentes têm demonstrado uma ampla atividade antifúngica desta droga quando associado ao FLC (MUEND; RAO, 2008).

Diante dessa atividade da AMD quando associada ao FLC, este trabalho buscou verificar o efeito sinérgico do FLC e AMD frente a cepas de *C.tropicalis* resistentes ao FLC, além de avaliar o provável mecanismo de ação desse sinergismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

Nas últimas décadas diversos fatores relacionados com o avanço da medicina, como a introdução de novas técnicas diagnósticas e invasivas, a maior eficácia nas técnicas de transplantes e o uso de agentes imunossupressores e quimioterápicos têm sido responsabilizados pelo aumento de sobrevivência dos pacientes (KOTHAVADE et al.,2010, SCHMALRECK et al., 2012; SILVA et al.,2012). Entretanto, infecções oportunistas, como as infecções causadas por fungos, surgiram como complicações nestes pacientes imunocomprometidos. Dentre as infecções fúngicas oportunistas, a candidíase tem sido aquela mais documentada nos diferentes grupos de pacientes portadores de imunodeficiências, apresentando-se como infecções superficiais ou invasivas, com envolvimento de um ou múltiplos órgãos(SILVA et al.,2012).

As infecções causadas por *Candida* spp. tem emergido mundialmente e resultam do aumento do tempo de internação e juntamente com as despesas médicas constituem um importante problema de saúde pública, principalmente em centros médicos terciários (CHOU et al, 2007 ; SCHMALRECK et al., 2012) . Estas infecções destacam-se não apenas por sua prevalência em diferentes centros médicos, como também por suas complicações, difícil diagnóstico, além de estarem associadas à mortalidade atribuída da ordem de 50% (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003, NUCCI; COLOMBO, 2007).

Um estudo conduzido por Wisplinghoff et al., (2004) reuniu dados do Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological (SCOPE) envolvendo 40 hospitais terciários de várias regiões dos Estados Unidos. No período de março de 1995 a setembro de 2002, um total de 24.179 episódios de bacteremias e fungemias foram documentadas e o gênero *Candida* foi o 4º agente mais comum isolado em hemoculturas, respondendo por 9% das infecções da corrente sanguínea o que acarreta altos custos com medicamentos e uma taxa de mortalidade de 40% (WENZEL; GENNINGS, 2005; PETRIKKOS; SKIADA, et. al., 2007)

Já na Espanha, um estudo conduzido de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 documentou 345 episódios de infecções de corrente sanguínea por *Candida* isolados de 341 pacientes. A incidência de candidemia foi de 4,3 casos/100.000. (ALMIRANTE,et al., 2005).Em outro estudo conduzido em 44 hospitais terciários, um total de 1367 episódios de

fungemia foram relatados. A incidência foi de 0.92 por 1.000 internações. *Candida albicans* foi a mais isolada (0.41 episódios/1000 admissões) seguida por *C.parapsilosis sensu stricto* (0.22) (PEMÁN et al., 2012)

Na Suíça, foi realizado um estudo de vigilância entre 1991 a 2000 em 17 hospitais universitários e seus hospitais filiados, que representavam em sua totalidade 79% de todos os hospitais terciários deste país. Observou-se *Candida* spp. como a sétima causa de infecções da corrente sanguínea correspondendo a 2,9% dos isolados de hemoculturas, sendo que sua incidência permaneceu inalterada durante os 10 anos do estudo, 5,4 casos/100.000 habitantes (MARCHETTI et al., 2004).

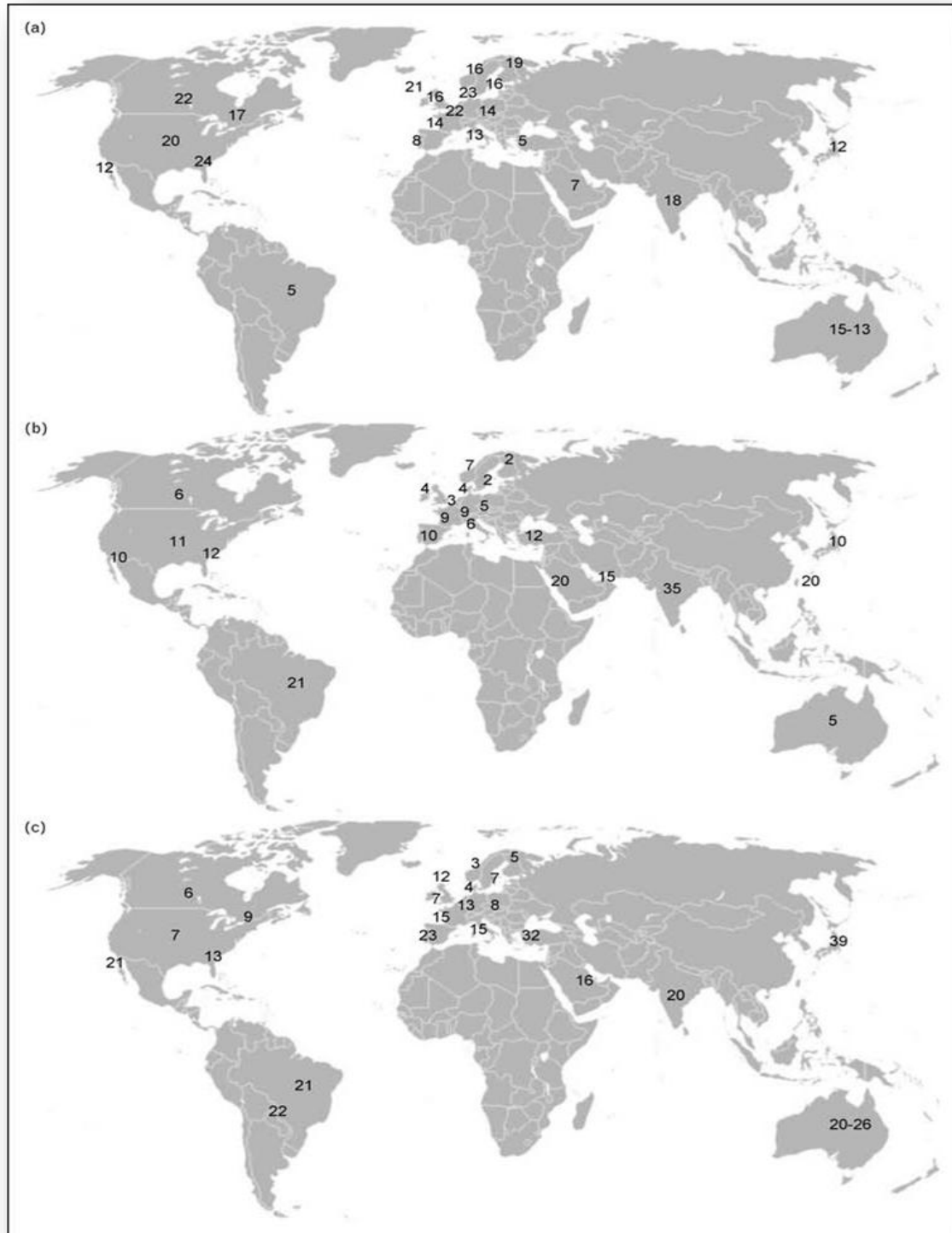
No Brasil, um estudo epidemiológico realizado em hospital terciário, observou que na maioria dos episódios de candidíase a *C. albicans* estava presente em 51,6% dos casos, mas também espécies não-*albicans* como *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,3%), *C.glabrata* (3,3%), *C. krusei* (1,7%) e outras espécies (7,5%) (ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005). Em outro estudo conduzido em um Hospital Universitário de Londrina por um período de três anos, mostrou que infecções por *Candida albicans* foi a mais freqüente, mas outras espécies de *Candida* corresponderam a 64% dos isolados, incluindo predominantemente *Candida tropicalis* (33,2%) e *Candida parapsilosis* (19,2%) (FURLANETO, et al., 2011).

Particularmente no Estado do Ceará, um estudo realizado por Mendrano et al., (2006) analisou 50 culturas de origem sanguínea e mostrou que a espécie mais comumente isolada foi a *C.parapsilosis* (n=18), seguida por *C.albicans* (n=14), *C.tropicalis* (n=8), *C.guilliermondii* (n=6), *C.glabrata* (n=2) e *Candida* spp. (n=2) (NUCCI; COLOMBO, 2007).

A epidemiologia das infecções fúngicas invasivas (IFIs) está mudando, *Candida albicans* continua sendo a levedura mais importante, no entanto, um notável crescimento de infecções por espécies não *albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) tem aumentado e corresponde a 36-63% de todos os casos (HORN, et al, 2009; GAMARRA, 2010; CHI,et al, 2011).

Nos últimos anos a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado. Além disso, existem diferenças marcantes na distribuição das espécies e das sensibilidades de drogas antifúngicas entre os países (**Figura 1**) que necessitam de vigilância continuada em cada país para monitorar as tendências na distribuição de patógenos e padrão de sensibilidade,

a fim de auxiliar na gestão e tratamento de pacientes hospitalizados com candidíase invasiva (SELLAMI et al, 2010; GURCUOGLU et al, 2010).



Fonte: (ARENDRUP, 2010)

Figura 1. As diferenças geográficas na proporção de casos que envolvem candidemia. *Candida glabrata* (a), *C. tropicalis* (b) e *C. parapsilosis* (c), respectivamente.

No Brasil, a *C. tropicalis* é um agente frequente de candidemia em hospitais, sendo a segunda espécie mais comumente isolada (NUCCI; COLOMBO, 2007), como também pouco estudada no Ceará (MENEZES, et. al., 2009).

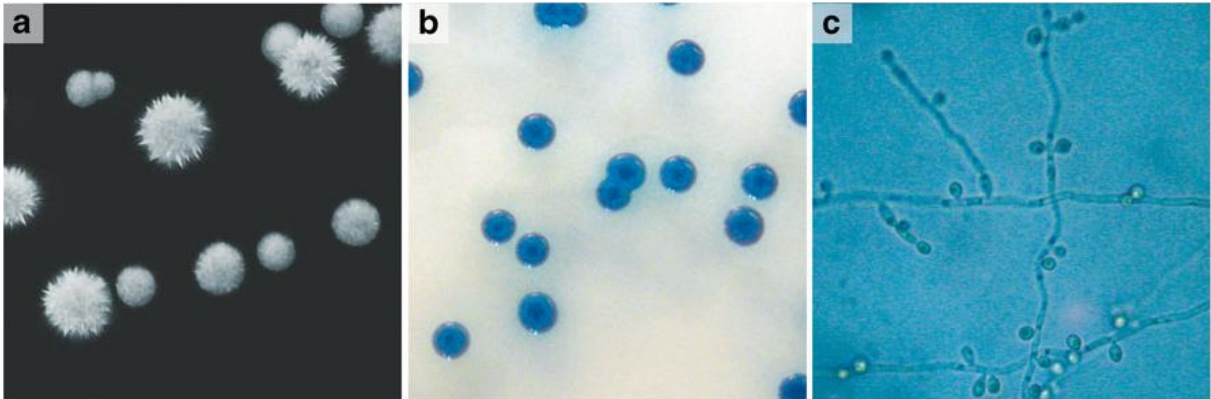
2.2 *Candida tropicalis*: um patógeno emergente

Candida tropicalis, conhecida primeiramente como *Oidium tropicale*, foi diferenciada entre as mais diversas espécies de *Candida* em 1910 por Aldo Castellani. Enquanto isso, vários outros nomes foram sendo atribuídos a esta espécie, como *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis* e outros 58 sinônimos. Somente em 1923, Berkhout introduziu o nome atual. (NEGRI et al. 2011).

Desde 1960, *C. tropicalis* tem sido reconhecida como responsável por causar infecções fúngicas graves (HO, 1960). Ela é uma levedura diplóide pertencente a divisão *Ascomyceta* e é um agente patogênico oportunista humano, que coloniza vários sítios anatômicos distintos, incluindo a pele, trato gastrointestinal e geniturinário podendo também ser encontrado no trato respiratório (KOTHAVADE et al.,2010; NEGRI et al. 2011)

As infecções causadas por essa espécie podem ser adquirida de forma endógena, ou seja, quando o indivíduo já está colonizado pelo microorganismo como parte da microbiota intestinal normal, mas que sob condições adversas essas leveduras podem ser translocadas e se espalhar através do trato gastrointestinal para diferentes sítios anatômicos causando infecção (NUCCI; COLOMBO, 2007). Já as infecções exógenas podem ocorrer através do contato das mãos dos profissionais de saúde com os pacientes ou através de cateteres, próteses implantáveis, bem como soluções parenterais que foram previamente contaminados. (NUCCI; COLOMBO, 2007; NEGRI et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial se baseia basicamente nas características morfológicas, e bioquímicas. Macroscopicamente, as colônias de *C.tropicalis* quando semeadas em ágar Sabouraud dextrose apresentam-se de cor creme com uma borda ligeiramente micelial (**Figura 2a**) e de azul escuro quando semeada em CHROMagar Candida™ (CHOMagar, Paris, França) (**Figura 2b**). Microscopicamente (**Figura 2c**) em ágar corn meal Tween 80, a 25°C, *C. tropicalis* apresenta blastoconídeos isolados ou em pequenos grupos ao longo de toda a pseudohifas podendo também produzir hifas verdadeiras. Já em testes bioquímicos esta levedura difere das outras espécies por ser capaz de fermentar e assimilar sacarose, glucose, galactose, trealose e maltose, mas não a lactose ou rafinose (NEGRI et al. 2011; SILVA et al.,2012).



Fonte: (NEGRI et al, 2011)

Figura 2: Morfologia de *Candida tropicalis* em meios de cultura de rotina. (a) ágar Sabouraud dextrose, (b) CHROMagar Candida™, (c) ágar corn meal Tween 80.

A tecnologia molecular que teve o maior impacto no diagnóstico clínico de infecções por *Candida* foi o PCR. A característica mais importante dessa metodologia é que os *primers* utilizados em amostras clínicas são específicos e não amplificam o DNA do hospedeiro ou de outros microorganismos (SILVA et al.,2012).

A maior parte do genoma haplóide de *Candida* consiste de DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr). Neste DNA existem três regiões codificadoras relativamente conservadas: uma região 18S, com cerca de 1.800 pares de base (pb); uma sequência altamente conservada de 5.8S, com 160pb; e a região 28S com cerca de 3.400pb. Flanqueando a região 5.8S, existem regiões de sequências variáveis denominadas de *internal transcribed spacer regions*(ITS1 e ITS2), cuja função não é completamente conhecida (IWEN, et al.,2002).

Como as regiões ITS1 e ITS2 mostram grande variabilidade entre microorganismos do mesmo gênero, podem ser utilizadas para a identificação das espécies de *Candida* em testes moleculares, além de aumentarem o poder de detecção dos métodos de amplificação por estarem presentes em múltiplas cópias (WHITE et al., 1990; CHEN et al., 2002).

Apesar do desenvolvimento em abordagens moleculares, a grande maioria do diagnóstico clínico das candidíases são baseados em metodologias não moleculares devido a reduzida quantidade de equipamento de PCR em laboratórios hospitalares, os problemas com a preparação da amostra e contaminação ambiental, falta de protocolos padronizados para metodologias de PCR e de profissionais qualificados(SILVA et al.,2012; NEGRI et al.,2011).

Em geral, os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de infecções por *Candida* adquiridas em hospitais estão associados com: longos períodos em UTIs, administração de antibióticos de largo espectro, pacientes imunocomprometidos, queimados, submetidos à ventilação mecânica, múltiplos sítios de colonização e hemodiálise. Estudos têm mostrado, que, em oposição à *C. parapsilosis*, infecções por *C. tropicalis* é menos provável de ocorrer entre as crianças com menos de um ano de idade, entretanto, é mais provável de ocorrer em pacientes com câncer ou neutropênicos e está fortemente associada com a presença de biofilme em cateteres urinários (PFALLER; DIEKEMA, 2007; KOTHAVADE et al., 2010; SILVA et al., 2012; CHONG et al., 2012).

Novos estudos sugerem que a *C. tropicalis* está associada com um maior potencial de difusão e mortalidade em pacientes internados em UTI, especialmente pacientes oncológicos, do que a *C. albicans* ou de qualquer outra espécie não *albicans* (NUCCI; COLOMBO, 2007; KOTHAVADE et al., 2010).

A patogenicidade de espécies de *C. tropicalis* é mediada por um número de fatores de virulência, incluindo a adesão e formação de biofilme no tecido do hospedeiro bem como em dispositivos médicos, a capacidade de evadir as defesas do hospedeiro, produção de hifas e enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas) (KOTHAVADE et al., 2010).

A formação de biofilme é um importante fator de virulência para várias espécies de *Candida*, pois confere resistência significativa à terapia antifúngica, limitando a penetração de substâncias através da matriz e protegendo as células de respostas imune do hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002 ; MUKHERJEE; CHANDRA, 2004). Além disso, biofilmes formados por espécies não *albicans* têm sido associados com maior morbidade e mortalidade em comparação com os isolados não formadores de biofilmes. Supõe-se que a formação de biofilmes maduros e a subsequente produção de matriz extracelular é fortemente dependente da espécie, estirpe e das condições ambientais (pH, composição do meio, oxigênio) (SILVA et al., 2012).

A produção de enzimas hidrolíticas causa destruição dos tecidos dos hospedeiros por espécies de *Candida*. Dentre as enzimas secretadas que implicam na patogenicidade dessas espécies, temos: aspartil proteínases (SAPs), fosfolipases e hemolisinas (SILVA et al., 2012).

As SAPs facilitam a invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro por ruptura das membranas mucosas e por degradar importantes proteínas de defesa imunológica e estrutural. Já as fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolípidos em ácidos graxos. A

produção de todas as classes de fosfolipases têm sido descritos para espécies de *Candidae* sugerem que elas contribuem para o dano na membrana celular do hospedeiro facilitando assim receptores de aderência (SILVA et al.,2012).

Outra importante enzima é a hemolisina. Os microorganismos patogênicos podem crescer no hospedeiro utilizando heme como uma fonte de ferro. Hemolisinas degradam a hemoglobina e facilitam a recuperação do ferro elementar de células hospedeiras. Assim, as hemolisinas são consideradas como fator de virulência chave que permite a sobrevivência do patógeno e persistência no hospedeiro (SILVA et al.,2012).

2.3 Resistência ao fluconazol

Resistência é um fenômeno que ocorre *in vivo*, e pode estar ou não associada à falha terapêutica. Fatores relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do antifúngico, bem como aqueles relacionados ao hospedeiro e à espécie causadora da infecção, estão envolvidos nas diferenças que existem entre sensibilidade *in vitro* e resposta clínica ao tratamento (SANGLARD & ODDS, 2002; PFALLER, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

O fluconazol surgiu no início da década de 90 como o primeiro agente antifúngico triazólico aprovado pela FDA para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida*(SHEEHAN et al., 1999; NUCCI, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2010).É bem tolerado e um agente seguro que tem boa atividade clínica contra *Cryptococcus neoformans* e a maioria de *Candida* spp. isolada. O uso aumentado desta droga deu origem ao desenvolvimento de resistência a *Candida* spp., principalmente *C. glabrata* e *C. krusei* isoladas(JR, et al., 2005).

Esse agente atua especificamente inibindo a enzima lanosterol-14- α -demetilase, pertencente ao sistema enzimático microsomal do complexo citocromo P-450, que promove a conversão de lanosterol a ergosterol. O resultado é a inibição dessa conversão, com a depleção conseguinte de ergosterol, acumulação de precursores e perda da integridade da membrana (AKINS, 2005; JR, et. al., 2005; DÉRY; HASBUN, 2011). O uso excessivo de azólicos (especialmente fluconazol) em tratamentos de pacientes HIV-positivos com infecções fúngicas nas mucosas no período anterior à introdução da terapia antiretroviral tem favorecido a aquisição de resistência aos azólicos de vários fungos patogênicos (SANGLARD, 2002).

Os mecanismos têm sido estudados principalmente em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (VANDEPUTTE, et. al., 2005; PINTO E SILVA et al., 2009). Quatro mecanismos principais são normalmente descritos (**Figura 3**): (i) superexpressão de bombas de efluxo (ii) alterações na biossíntese do ergosterol, (iii) mutações no gene ERG11 e (iv) super expressão no gene ERG11. Estes mecanismos podem ser encontrados separadamente, mas eles também podem ser combinados, contribuindo assim para a aquisição de resistência aos azólicos (LUPETTI et al.,2002; SANGLARD, 2003; VANDEPUTTE, et. al., 2005).

Super expressão de bombas de efluxo: Esse mecanismo é desencadeado pela redução do acúmulo intracelular do medicamento. Nos últimos anos, estudos realizados com fluconazol mostraram evidências de que ele é ativamente transportado ao meio externo pelas células fúngicas, de uma maneira dependente de energia, e que o maior efluxo do antifúngico é causado pela super expressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membrana (MORSCHHÄUSER, 2002).

Os genes CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*) codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que atuam como bombas de efluxo transmembranas e utilizam a hidrólise do ATP para mobilizar uma variedade de compostos hidrofóbicos para fora da células. Além de CDR1 e CDR2, outro gene conhecido como MDR1 (*Multidrug Resistance*) também está envolvido no sistema de transporte dependente de energia. A proteína codificada por MDR1 atua como transportadora de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e utiliza gradiente de prótons para o transporte de compostos. Esta proteína é encontrada em fungos, bactérias e no homem (WHITE et al.,1998; AKINS, 2005; ESPINEL-INGROFF, 2008; TOBUDIC, KRATZER, PRESTERL, 2012).

As bombas de efluxo têm a capacidade de transportar ao meio externo, entre outros compostos, alguns antifúngicos, porém não em quantidades suficientes para conferir resistência. No entanto, algumas linhagens de *Candida* podem apresentar super expressão dos genes CDR e MDR, aumentando o número de bombas transportadoras em suas membranas e reduzindo o acúmulo do antifúngico no meio intracelular (AKINS, 2005).

Alterações na biossíntese do ergosterol: O ergosterol é essencial para manter a integridade e função da membrana plasmática dos fungo e , por esse motivo, a sua biossíntese é alvo para muitos antifúngicos, incluindo o fluconazol. O alvo primário dos azólicos é a 14- α -demetilase (ERG11p), enzima chave na síntese do ergosterol, membro da superfamília dos citocromos P-450. A inibição da ERG11p pelo fluconazol não resulta somente na redução do ergosterol, mas também no acúmulo do seu precursor, o lanosterol. Este é convertido em 14- α -metilfecosterol e, subsequentemente, catalisado pela $\Delta 5,6$ -desaturase (codificada pelo

ERG3) para o esteroide intermediário, 14- α -metilergosta-8,24(28)-dien-3,6diol que um composto tóxico que inibe o crescimento celular (LUPETTI et al., 2002; AKINS, 2005; TOBUDIC, KRATZER, PRESTERL, 2012).

Miyazaki et al.(2001) demonstraram que a deleção do gene ERG3 em *C.albicans* resultou na redução de sensibilidade dos mutantes ao fluconazol, fornecendo evidência direta de que a alteração na biossíntese do ergosterol, em especial a inativação da enzima $\Delta 5,6$ -desaturase pode causar resistência ao fluconazol.

Mutação no gene ERG11: Uma causa frequente de resistência é decorrente da alteração na configuração espacial da enzima alvo dos antifúngicos azólicos, a 14- α -demetilase (ERG11p), enzima chave na via de biossíntese do ergosterol. Mutações em ERG11 podem resultar em alterações pós traducionais na sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, na estrutura tridimensional de ERG11p, ocasionando decréscimo na afinidade de ligação entre o componente azólico e a proteína, sem impedir sua função, porém gerando leveduras com fenótipo alterado resistentes aos azólicos (SANGLARD et al., 2002; TOBUDIC, KRATZER, PRESTERL, 2012).

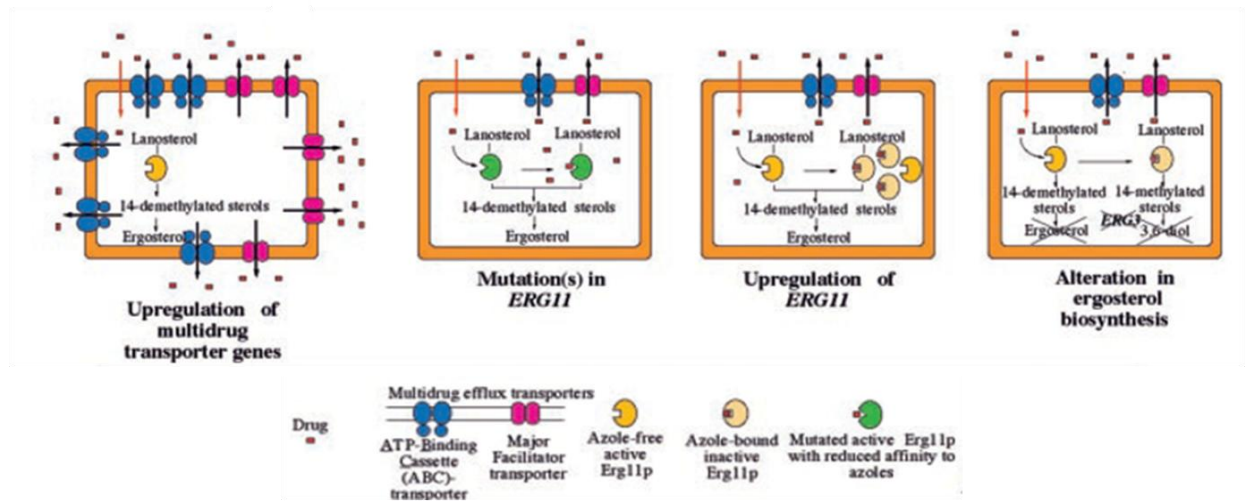
Super expressão do gene ERG11: Em presença de fluconazol, *C.albicans* aumenta a expressão do gene ERG11, provavelmente por mecanismo compensatório à depleção do ergosterol. Entretanto, Franz et al., 1998, relataram que mesmo na ausência de fluconazol, alguns isolados resistentes expressam ERG 11 em níveis superiores aos encontrados em isolados susceptíveis expostos aos antifúngicos.

O aumento da expressão do gene ERG11 resulta em incremento da concentração da enzima 14- α -demetilase no ambiente intracelular, e conseqüentemente, acarreta a necessidade de quantidades maiores de antifúngico para inibir a atividade da enzima (LUPETTI et al.,2002; GOLDMAN et al., 2004; TOBUDIC, KRATZER, PRESTERL, 2012).

Embora a super expressão do gene ERG11 tenha sido descrita como mecanismo de resistência, alguns dados indicam que este fenômeno não está necessariamente relacionado à resistência aos azólicos em *C.albicans*, uma vez que quando detectado, está frequentemente associado ao aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo (GOLDMAN et al., 2004).

A resistência ao fluconazol em isolados clínicos de *C.tropicalis* tem aumentado. Clinicamente, o surgimento desse tipo de resistência é consideravelmente importante porque a *C.tropicalis* é um das espécies de *Candida*, mais comumente isoladas após *C. albicans* e constantemente vem sendo relatada como resistente ao fluconazol(CHOU et al.,2007;

BARCHIESI et al., 2000). Um largo estudo conduzido por Pfaller et al.(2009) mostrou um nível moderado de resistência ao fluconazol por *C.tropicalis*(KOTHAVADE et al., 2010). Apesar de existirem poucas informações acerca da resistência de *C.tropicalis* aos azólicos, o mecanismo de resistência parece ser uma superexpressão do gene CtERG11 associado com uma mutação missense(VANDEPUTTE, et. al., 2005; KOTHAVADE et al., 2010).



(Fonte: Sanglard, 2003)

Figura 3. Mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos

O aumento do uso global de fluconazol em várias condições clínicas (candidíase) é a maior causa de dominância de espécies não *albicans* em relação a *C.albicans*. Portanto, algumas medidas para tentar controlar o aparecimento de espécies resistentes na prática clínica devem ser tomadas, como: aplicação terapêutica de fluconazol deve ser limitado a pacientes de alto risco para minimizar aparecimento da resistência; pacientes com candidíase recorrente que foram tratados recentemente com fluconazol, não devem ser tratados novamente com o mesmo fármaco; utilização de vários agentes antifúngicos e suas interações com outros medicamentos precisam ser cuidadosamente pensado antes da sua aplicação clínica em pacientes de alto risco; nos pacientes cirúrgicos, novos agentes antifúngicos como os azóis (voriconazol) e equinocandinas são opções terapêuticas menos tóxicas para prevenção e terapia de infecções por *Candida* e o aumento do conhecimento dos fatores de risco para espécies não *albicans* pode fornecer orientações para escolhas apropriadas de tratamento antifúngico(KOTHAVADE et al., 2010).

2.4 Métodos de detecção de resistência

O desenvolvimento de métodos de sensibilidade a antifúngicos tem sua história vinculada aos avanços obtidos na quimioterapia antibacteriana. Com o surgimento de espécies patogênicas com resistência intrínseca aos antifúngicos, principalmente pelo uso de terapia antifúngica profilática, tem aumentado a necessidade de desenvolvimento e padronização de testes de sensibilidade aos antifúngicos (CUENCA-ESTRELA et al., 2002).

Como nos últimos anos o arsenal terapêutico antifúngico tem aumentado, há uma crescente preocupação com o aumento da resistência a estas drogas. Mundialmente, estudos de vigilância de resistência a antifúngicos mostram a emergência de leveduras de *Candida* não-*albicans* como causa de infecções superficiais e invasivas, sendo que muitas destas espécies apresentam menor sensibilidade a anfotericina-B e/ou azólicos (REX et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2005; PFALLER et al., 2010).

Diante deste fato, aumentou o interesse da comunidade científica no aperfeiçoamento de testes de sensibilidade para auxiliar na escolha mais adequada na terapêutica antifúngica como também, da indústria farmacêutica para utilizar essa ferramenta no desenvolvimento de novas drogas (REX et al., 2001).

No decorrer do tempo, foram desenvolvidas técnicas para o estudo da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, sendo o método de microdiluição em caldo considerado a técnica de referência. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), antigo NCCLS, após 15 anos de trabalhos colaborativos publicou o primeiro documento, o M27-A (1997) com normas e técnicas da padronização dos testes de sensibilidade. Mais recentemente, foi publicado o documento M27-S3 (2008) (NCCLS, 1997; REX et al., 2001; CLSI, 2008).

Este documento fundamenta a metodologia de diluição em caldo (microdiluição em caldo) como padrão ouro para testes de sensibilidade a antifúngicos. Desta forma, o CLSI (2008), utiliza o meio de cultura sintético RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato e tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) com pH 7,0, um inóculo de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, 24 e 48 horas de incubação a 35°C para leveduras do gênero *Candida* e 72 horas para *Cryptococcus neoformans*. O critério de leitura dos ensaios com azólicos e 5-FC foi definido como a menor concentração capaz de inibir significativamente 50% do crescimento quando comparado com o grupo controle. Para anfotericina-B, a concentração

inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visível. (CLSI, 2008).

O Etest é um método comercial utilizado para determinar quantitativamente a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, baseado em gradientes de concentração dos antifúngicos empregados em fita plástica, através da técnica de difusão em ágar. Este método nos permite determinar uma cepa como sensível ou resistente, pois também determina a concentração inibitória mínima (CIM) (REX et al., 2001). Esta técnica é de fácil e rápida execução e fornece um resultado quantitativo, porém limita o número de antimicrobianos que podem ser testados por placa, além do alto custo das fitas (ANVISA).

A citometria de fluxo tem sido há muito tempo reconhecida como uma possível ferramenta para testes de sensibilidade antifúngica onde pesquisas concentram-se principalmente no gênero *Candida* e *Saccharomyces* (REX, et al., 2001).

Na microbiologia, esta técnica tem mostrado várias potencialidades, nomeadamente no estudo da sensibilidade a antimicrobianos. É uma técnica que permite a contagem, análise e classificação de células suspensas num fluido onde realiza, simultaneamente, uma análise multiparamétrica de características físicas e químicas célula a célula, através de aparelhos de detecção ópticos e/ou eletrônicos (DOS SANTOS, 2010). Essa metodologia pretende que as análises sejam cada vez mais: específicas, com menor probabilidade de falsos positivos; sensíveis, com menor probabilidade de falsos negativos; reprodutíveis; automáticas e rápidas (CÔRTE-REAL et al, 2002).

Trabalhos têm explorado essa possibilidade e mostrou o potencial dessa técnica em relação ao método de referência (microdiluição em caldo). Um estudo sugeriu que essa técnica pode ser especialmente útil para a detecção da resistência a anfotericina B (REX, et al., 2001). Além disso, os estudos de biologia de leveduras estão focando especificamente no que diz respeito à elucidação dos mecanismos celulares e moleculares de resposta à agentes citotóxicos (CÔRTE-REAL et al, 2002; PINA-VAZ & RODRIGUES, 2010).

2.4 Fármacos com efeitos antifúngicos

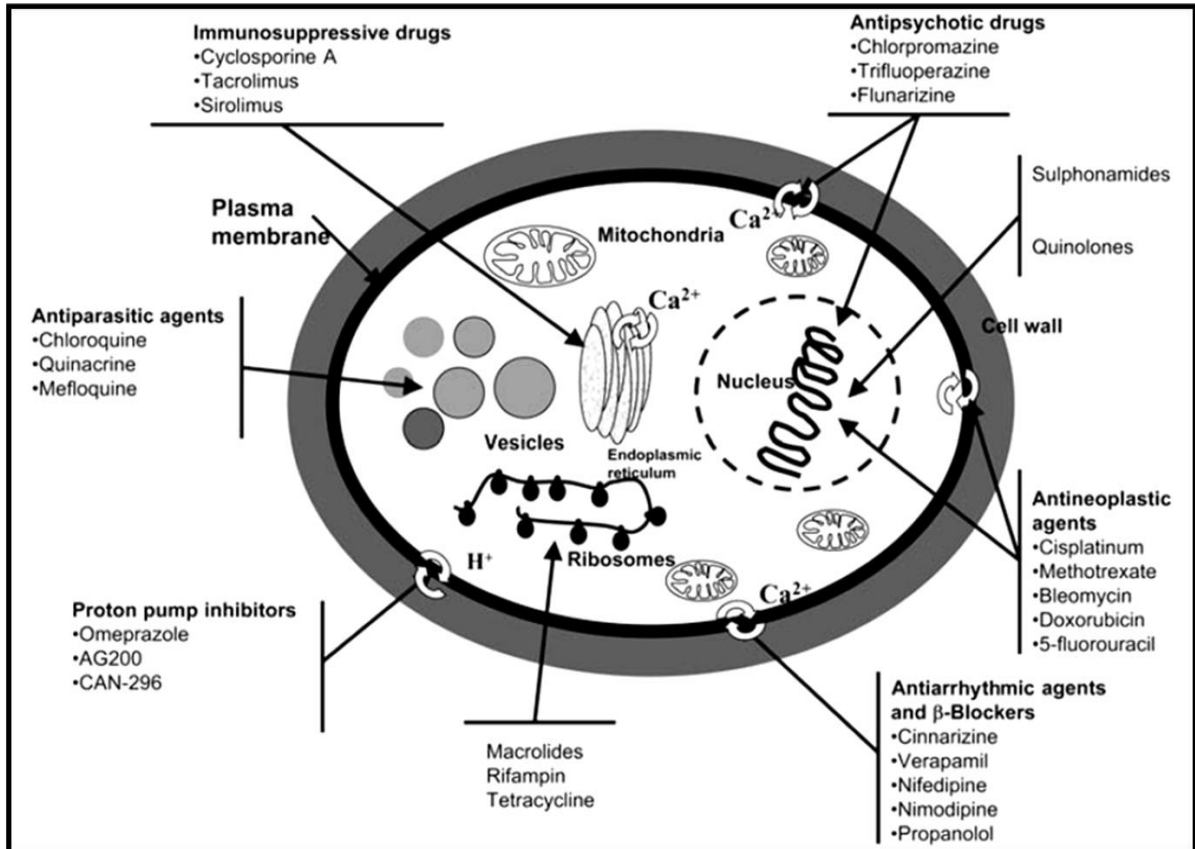
As infecções fúngicas têm sido um importante desafio terapêutico devido ao número limitado de agentes antifúngicos e, além disso, o seu uso tem se restringido devido à toxicidade ou a perfis farmacocinéticos desfavoráveis. Além disso, a resistência tem sido

observada, principalmente após o tratamento de infecções por *Candida albicans* em pacientes infectados pelo HIV com o triazólico fluconazol que é atualmente o antifúngico mais utilizado nesta situação (AFELTRA; VERWEIJ, 2003). Evidências mostram que a epidemiologia das infecções fúngicas invasivas está mudando e que espécies de *Candida* não *albicans* resistentes aos azólicos estão surgindo (AFELTRA; VERWEIJ, 2003; GAMARRA, 2010; CHI, et al, 2011).

Devido a ocorrência de isolados resistentes a azólicos, muito esforço foi e está sendo realizado para solucionar esse problema: (i) a procura de novos antifúngicos, tais como o posaconazol e o ravuconazol, (ii) o desenvolvimento de novas formulações dos agentes estabelecidos, tais como o itraconazol (ITC), através de uma formulação intravenosa que superou os erros de biodisponibilidade da formulação oral da cápsula e (iii) a melhoria da eficácia de antifúngicos usando a terapia de combinação, por exemplo, combinar agentes antifúngicos com diferentes mecanismos ou a combinação de agentes antifúngicos e não antifúngicos (GUO, et. al., 2008).

Achados mostram que algumas drogas usadas para o tratamento de infecções que não sejam ocasionadas por fungos possam exibir atividade antifúngica, uma vez que os fungos e as células humanas dividem vias comuns por ambas serem eucarióticas. Isto é de interesse uma vez que estas drogas podem ser úteis para o tratamento de infecções fúngicas quando utilizadas isoladamente ou em combinação. (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Alguns alvos de agentes não antifúngicos nos fungos já são conhecidos. A presença de bombas localizadas na membrana da célula serve para controlar a homeostase entre o compartimento intra e extracelular, onde essas também se encontram no retículo endoplasmático. A concentração de cálcio livre na célula é essencial para a multiplicação celular, transporte e crescimento. As bombas de cálcio podem ser bloqueadas por drogas antiarrítmicas, antiparasitárias, antipsicóticas, β -bloqueadores, inibidores de bombas de próton e agentes imunossupressores. Outros compostos podem interferir com a divisão ou formação do DNA e alterar a síntese de proteínas. Isto pode ser neutralizada pela inibição de codificação de RNA, especialmente por drogas que interagem nesse alvo, tais como a rifampicina, tetraciclina e os macrolídeos. (**Figura 4**) (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).



(Fonte: Afeltra; Verweij, 2003)

Figura 4: Alvos potenciais de agentes não antifúngicos em fungos

Dentre as drogas antipsicóticas, as fenotiazinas têm vários efeitos, incluindo a modificação das membranas, alteração do metabolismo de nucleotídeos cíclicos e intercalação da droga no DNA. Elas também se ligam à calmodulina, que regula muitos processos intracelulares. A clorpromazina tem atividade fungistática e fungicida contra *Candida albicans* *in vitro* e em combinação com anfotericina B apresenta uma interação sinérgica. Além disso, a trifluoperazina também apresentou atividade *in vitro* contra *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. As concentrações plasmáticas das drogas em humanos variam entre 0,1 e 0,5 g/mL e como se acumulam no sistema nervoso central (SNC), resultando em níveis de 70 vezes superiores às do plasma, podem ser potencialmente úteis para o tratamento de infecções fúngicas do SNC (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Outro alvo para drogas antifúngicas é a membrana plasmática H⁺-ATPase. Os inibidores das bombas de prótons, como omeprazol, lansoprazol, AG200, CAN-296 e NC1175, podem bloquear estas bombas e atuar como agentes com atividade antifúngica ou reverter a resistência adquirida aos azólicos. O omeprazol apresentou atividade antifúngica contra *Saccharomyces*, CAN-296 apresentou atividade fungicida contra *Candida* spp., AG 2000 inibiu, *in vitro*, a formação de hifas em *Candida albicans* e uma cetona conjugada teve uma potente atividade fungicida contra *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*(AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

A cisplatina é um agente eficaz para o tratamento quimioterápico de muitos tipos de tumores sólidos, sua citotoxicidade deriva principalmente da capacidade de formar ligações cruzadas com o DNA. A droga foi ativa *in vitro* contra *Candida albicans*. As CIMs de metotrexato, ciclofosfamida, bleomicina, vincristina e doxorubicina são entre 500 e 1.500 g/mL contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata* e *Trichosporon*. Entre esses agentes, bleomicina e doxorubicina parece ser o mais ativo contra *Candida tropicalis* (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Além disso, uma variedade de diferentes drogas antineoplásicas (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil) foram avaliadas *in vitro*, isoladamente e em combinação com anfotericina B, flucitosina e miconazol contra *Candida* spp. e *Trichosporon*. Em combinação foram ativos contra várias espécies de fungos (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

A combinação de polieno com doxorubicina, metotrexato, ou 5-fluorouracil exibiu interação sinérgica contra leveduras. Isto pode ser devido à perfuração da membrana causada por anfotericina B, permitindo assim que a droga antineoplásica penetre na célula. No entanto, drogas tais como a ciclofosfamida e bleomicina antagonizou a atividade antifúngica do polieno (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Cecoprin A é um peptídeo lítico que provoca a lise das células por induzir a formação de grandes poros em membranas de células bacterianas. A atividade *in vitro* deste composto foi estudada contra conídios germinados e não germinados de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme*. O composto foi letal no prazo de 30 minutos contra conídios germinados de *Aspergillus* spp. e contra conídios não germinados de *Fusarium* spp. em concentrações bem baixas, como 2g/mL (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

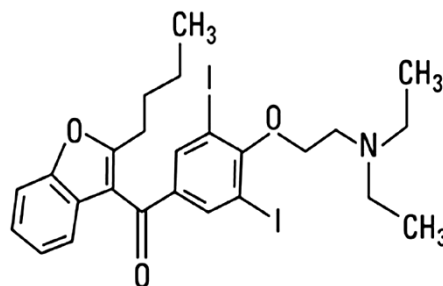
Um estudo realizado por Longhini et al (2007) mostrou que extratos de própolis apresentou um potencial antifúngico contra fungos filamentosos do gênero *Trichophyton* (onicomicoses). Além disso, outro estudo revelou que quando associado a drogas antifúngicas apresentou atividade contra *C.albicans* (MARCUCCI, 1996).

O cálcio e sua proteína de ligação a calmodulina são conhecidos por modular a proliferação, diferenciação e metabolismo de uma variedade de tipos de células. Os antagonistas dos canais de cálcio influenciam o sistema calmodulina. Várias classes quimicamente distintas de compostos orgânicos partilham a capacidade de inibir o influxo de cálcio através do bloqueio dos canais de cálcio. Estes canais estão presentes em leveduras e bolores e, portanto, também é um alvo potencial para novos candidatos antifúngicos (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Cinarizina, verapamil, nifedipina e nimodipina isolados ou em combinação com cetoconazol foram testados contra isolados clínicos de *Candida albicans*. Essas drogas isoladamente só exibiram atividade antifúngica *in vitro* em concentrações elevadas. Em combinação, no entanto, a atividade de cetoconazol foi potenciada (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

2.6 Amiodarona

A amiodarona (2-butil-3-benzofuranil-4-[2-(dietilamino (etoxi)-3,5 hidrocloridrato diiodofenilcetona) (AMD) (**Figura 5**) é classificada como uma droga antiarrítmica classe III que impede a fibrilação atrial e taquicardia ventricular. Estudos demonstraram que a amiodarona apresenta uma potente atividade fungicida contra o *Saccharomyces cerevisiae* e uma série de fungos patogênicos, incluindo *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus nidulans* (MUEND; RAO, 2008).



(Fonte: Serrano-Mártin, 2009)

Figura 5: Estrutura química da amiodarona. A busca por novos mecanismos de antigos fármacos é um achado recente em publicações científicas do mundo inteiro (CORDEIRO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2009).

Estudos farmacológicos têm demonstrado sua propriedade como um bloqueador dos canais de cátions, embora tenha múltiplos alvos e um mecanismo complexo. Estudos de Courchesne (2002) e Courchesne e Ozturk (2003) constataram que a amiodarona é um antiarrítmico e um potente fungicida, agindo através da sua capacidade de aumentar a entrada de Ca^{2+} em células de levedura, que foi confirmado e ampliado por Gupta et al. (2003) e Muend e Rao (2008). Níveis elevados desse cátion no citoplasma podem resultar em danos e morte celulares, conforme relatado pelos autores citados, ou mesmo em rupturas de membranas (PEÑA, et. al., 2009).

Recente investigação *in vitro* em organismos unicelulares demonstrou atividade microbicida da AMD contra uma ampla gama de espécies de fungos, de bactérias, e de protozoários. Em *S. cerevisiae*, verificou que a AMD provocou um influxo imediato de Ca^{2+} e, posteriormente, alteração das membranas mitocôndriais causando morte celular. Da mesma forma, 12,5 μM de amiodarona causou elevação de Ca^{2+} citossólico em *Trypanosoma cruzi* (ZHANG; RAO, 2007). Estudos mostram que 5 μM de AMD bloqueou completamente a proliferação de *C. neoformans* (MUEND; RAO, 2008). A AMD também afeta a viabilidade de *Leishmania mexicana* por desestabilizar a homeostasia do Ca^{2+} , tanto na mitocôndria como nas proteínas acidocalcisomas (MARTÍN, et. al., 2009).

Em contra partida ao seu uso clássico, quando utilizada em baixas concentrações, a AMD juntamente com azólicos apresentaram efeitos sinérgicos contra espécies de fungos patogênicos (*Cryptococcus* e *Candida*) (GUPTA, et. al., 2003) e protozoários (*Trypanosoma*) (GUPTA, et. al., 2003), sugerindo que a droga pode ser útil como um agente de sensibilização na terapia antimicrobiana (ZHANG; RAO, 2007). O mecanismo proposto mais provável de efeito sinérgico da AMD com azólicos seria uma consequência de perturbações na homeostasia do Ca^{2+} como relatado por Gupta et al. (2003). Outros possíveis mecanismos pelo qual a AMD poderia reduzir a superexpressão de genes que codificam bombas de efluxo ainda estão sob estudo (GUO, et. al., 2008).

Um estudo realizado por Gamarra et al., (2010) sugeriu que o efeito antifúngico de AMD contra isolados de *C. albicans* é provavelmente mediado pelo estresse do Ca^{2+} , alteração da organização da parede celular e da perturbação da regulação da transcrição. Além disso, o

sinergismo de AMD com fluconazol parece ser explicado pela modulação de bombas de efluxo devido a superexpressão de CDR (GAMARRA, et al., 2010).

PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Existe um efeito sinérgico *in vitro* de fluconazol com amiodarona contra cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol?
2. Amiodarona quando associada ao fluconazol promove morte por apoptose em cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol?

HIPÓTESES

1. Existe um efeito sinérgico *in vitro* de fluconazol com amiodarona contra cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol.
2. Amiodarona quando associada ao fluconazol promove morte por apoptose em cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol.

OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral:

Avaliar e comparar o efeito sinérgico da amiodarona e do fluconazol frente a cepas de *Candida tropicalis* resistentes e sensíveis ao fluconazol, utilizando diferentes técnicas tais como: Métodos de Microdiluição em Caldo; Procedimentos de Citometria de Fluxo; Ensaio do Cometa.

5.2 Objetivos Específicos:

1. Repicar e identificar por biologia molecular as cepas de *C. tropicalis* pertencentes a micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da Universidade Federal do Ceará;
2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol frente a cepas de *C.tropicalis*;
3. Induzir resistência ao fluconazol em cepas de *C. tropicalis*;
4. Determinar a susceptibilidade das cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol frente a combinações de amiodarona com fluconazol;
5. Determinar o índice de concentração inibitória fracionária (FICI) através da mensuração do sinergismo;
6. Avaliar o possível mecanismo de ação através da citometria de fluxo e teste do cometa.

ARTIGO: Submetido ao periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy

The effect of combining amiodarone with fluconazole in vitro against strains of *Candida tropicalis* resistant to fluconazole: a new look at old drugs

Running title: The effect of combining amiodarone with fluconazole.

Cecília Rocha da Silva^{1,2}, João Batista de Andrade Neto¹, José Júlio Costa Sidrim², Maria Rozzelê Ferreira Ângelo³, Hemerson Iury Ferreira Magalhães^{1,4}, Bruno Coêlho Cavalcanti⁴, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante², Danielle Silveira Macedo⁴, Manoel Odorico de Moraes⁴, Marina Duarte Pinto Lobo⁵, Thalles Barbosa Grangeiro⁵, Hélio Vitoriano Nobre Júnior^{1,2,4}

1. Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil: label_ufc@yahoo.com.br

2. Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

3. Central Public Health Laboratory (LACEN-CE), Fortaleza, CE, Brazil

4. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

5. Molecular Genetics Laboratory, Department of Biology, Center of Sciences, Federal University of Ceará.

Abstract

There have recently been significant increases in the prevalence of systemic invasive fungal infections. However, the number of antifungal drugs on the market is small in comparison to the number of available antibacterial drugs. This fact, coupled with the increased frequency of cross-resistance, makes it necessary to develop new therapeutic strategies. Combination drug therapies have become one of the most widely used and effective strategies to alleviate this problem. Amiodarone (AMD) is classically used for the treatment of atrial fibrillation and is the drug of choice for patients with arrhythmia. Recent studies have shown broad antifungal activity of this drug when administered in combination with fluconazole (FLC). In the present study, we induced resistance to FLC in seven strains of *Candida tropicalis* and evaluated potential synergism between FLC and AMD. The evaluation of drug interaction was determined by calculating the Fractional Inhibitory Concentration and by performing flow cytometry. We conclude that AMD, when administered in combination with FLC, exhibits activity against strains of *C. tropicalis* that are resistant to FLC, which most likely occurs via changes in the integrity of the yeast cell membrane and the generation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and DNA damage that could lead to cell death by apoptosis.

Introduction

In recent decades, there has been an increased incidence of invasive fungal infections (IFIs) in immunocompromised hospitalized patients. These infections have been associated with significant levels of morbidity and mortality and have caused a serious public health problem (22, 23, 36, 38, 45). The epidemiology of IFIs is changing, although *Candida albicans* remains the most important fungal agent. However, a notable increase in infections caused by non-*albicans* species (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*) has been reported, and infections by these species account for 36-63% of all cases (9, 16, 18, 23, 46).

These changes in IFI epidemiology can be explained by the high level of resistance of non-*albicans* species to certain antifungal drugs (17). Resistance can be classified as either primary or intrinsic, according to whether fungal exposure occurs prior to or following exposure to drug treatment, respectively (25, 39, 48, 52).

Fluconazole (FLC) is one of the most commonly used antifungal agents, and it is used both for prophylaxis as well as for therapy to combat candidemia. Various mechanisms of resistance to azoles in *Candida* spp. have been described (39, 49). Far fewer antifungal drugs than antibacterial drugs are available on the market, and most of these exhibit fungistatic effects. This fact, together with the increased frequency of cross-resistance, places greater urgency on the search for new therapeutic strategies (40, 48, 52).

Amiodarone (AMD) represents a promising new class of antifungal drug, the class III antiarrhythmics (16), and this drug is viewed as a potential alternative to currently available antifungal therapies. Various studies have demonstrated the fungicidal activity of AMD against several species, including a variety of clinically important fungi such as *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*, and *Aspergillus nidulans* (12, 55).

The aim of the current study was to evaluate and compare the synergistic effect of AMD and FLC in FLC-sensitive (clinically isolated in Ceará State, Northeastern Brazil) and FLC-resistant (resistance induced secondarily in the present study) strains of *C. tropicalis* using different standard techniques, such as broth microdilution susceptibility methods, flow cytometry procedures and single-cell gel electrophoresis (comet assay).

Materials and methods

Isolates

We used seven strains of *C. tropicalis* for these studies that had been isolated from blood samples between 2009 and 2010 at the Central Public Health Laboratory (LACEN-CE) and were part of the Collection of Yeasts of the Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast affiliated with the School of Pharmacy at Federal University of Ceará (LABEL/FF/UFC). The strains were inoculated on Sabouraud dextrose agar (Himedia Mumbai, India) and incubated at 35°C for 24 h. They were then plated on CHROMagar Candida (Himedia Mumbai, India) to assess purity and submitted for molecular identification.

Molecular identification

Genomic DNA was purified using a CTAB-based protocol, as described previously (50). The nuclear DNA region comprising the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGA-3'), as suggested by Whitet al. (51). Once the specificity of the amplifications was confirmed, the PCR products were purified from the remaining reactions using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Bio-Sciences) (44). The concentrations of the purified PCR products were determined by measuring the absorbance of a ten-fold dilution at 260 nm. DNA sequencing was performed using the DYEnamic ET terminators cycle sequencing kit (GE Healthcare Bio-Sciences), according to the protocol supplied by the manufacturer, and both strands were sequenced using the primers ITS4 and ITS5. The sequencing reactions were then analyzed in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare Bio-Sciences). The parameters for the sequencing runs included injection at 3 kV for 50 s and electrophoresis at 6 kV for 180 min. Automated base calling was performed using the Cimarron 3.12 software, and the electropherograms were visualized with Sequence Analyzer v4.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). The base sequences were then deduced by inspection of each processed data trace, and the complete sequences were assembled using the Cap3 software (24). The determined sequences were compared to those previously deposited in the GenBank database using the program BLAST (3).

Development of FLC resistance

A single, randomly selected colony from each *C. tropicalis* strain was inoculated into 1 mL of RPMI 1640 (Cultilab São Paulo–Brazil) and incubated overnight in a rotating drum at 35°C. A 200- μ L aliquot of this culture was transferred into 1 mL of fresh culture medium (RPMI 1640) with FLC and was further incubated overnight as described above. The following day, an aliquot from each culture was again transferred into fresh medium containing FLC and incubated as described. Each day, a 200- μ L aliquot from each subculture was mixed with 500 μ L of 50% glycerol and frozen at -20°C until testing. In this experiment, the strains were incubated in the presence of FLC at a concentration four times the minimum inhibitory concentration (MIC) for this compound (5, 41).

Antifungal susceptibility test and evaluation of drug interaction

The broth microdilution (BMD) susceptibility test was performed according to the document M27-A3 using RPMI broth (pH 7.0) buffered with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma–USA). FLC (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brazil) and AMD were dissolved in distilled water and dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma), respectively. The fluconazole was tested in the range of 64-0.125 μ g/mL and amiodarone in the range of 64-0.125 μ M. The 96-well culture plates were incubated at 35°C for 48 h, and the results were read visually, as recommended by the CLSI. The MIC was considered the concentration that inhibited 50% of fungal growth. The *in vitro* drug interactions were evaluated according to the MIC, and the strains were classified as susceptible (S), susceptible dose-dependent (SDD), or resistant (R). The *cutoff* points for FLC susceptibility were as follows: strains with a MIC \leq 8 μ g/mL (S), strains with a MIC of 16 or 32 μ g/mL (SDD), and strains with a MIC \geq 64 μ g/mL (R) (10, 26, 37).

After determining the MIC of each drug, the checkerboard technique was performed. In this technique, each well contains a unique combination of concentrations of the different drugs being tested. We determined the percent inhibition of cell growth in the presence of various drug combinations in relation to the control well containing cells only (15, 34). Thus, the strains were exposed to varying concentrations (0.125-64 μ g/mL) of FLC in combination with 0.20 μ M AMD. The evaluation of the interaction between FLC and AMD was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) ($FICI = [FC]/CFS + [AC]/AS$), where [FC] and [AS] represent the concentrations of FLC and AMD that showed action when combined, and [CFS] and [CAS] represent the concentrations of the same drugs acting alone. This interpretation was performed according to the value of

the FICI, where a FICI value < 0.5 indicates synergism (SYN), $0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$ indicates indifference (IND), and $\text{FICI} > 4.0$ indicates antagonism (ANT).

The strains *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as controls (1, 10, 13, 14, 16).

Cell treatments

For the determination of cell density, membrane integrity, mitochondrial transmembrane potential, and caspases activation, resistant strains were treated with FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AMD (64 μM), or FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM), and susceptible strains were treated with FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4, 6, or 24 h at 35°C. For the evaluation of oxidative stress, DNA damage and the induction of apoptosis following treatment, the resistant and sensitive strains of *C. tropicalis* were exposed to FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AMD (64 μM) or FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM) for 24 h. All experiments were performed in triplicate in three independent experiments.

Preparation of yeast suspensions

Cell suspensions were prepared from cultures in the exponential phase of growth. Cells were harvested by centrifugation (1,600 g for 10 min at 4°C), washed twice with 0.85% saline solution (1,200 g for 5 min at 4°C), and then resuspended ($\sim 10^6$ cells/mL) in HEPES buffer [N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] (Sigma-Aldrich) supplemented with 2% glucose at pH 7.2.

Determination of cell density and membrane integrity

The cell density and membrane integrity of the fungal strains were evaluated by the exclusion of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI). Aliquots removed after 4, 6 and 24 h of incubation with drugs were analyzed by flow cytometry. For each experiment, 10,000 events were evaluated, and cell debris was omitted from the analysis. Cell fluorescence was then determined by flow cytometry using a Guava EasyCyte™ Mini System cytometer (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) and CytoSoft 4.1 software.

Measurement of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi\text{m}$)

Mitochondrial transmembrane potential was determined according to retention of the dye rhodamine 123 (Rho 123) by the fungal strains following 4, 6 and 24 h of drug exposure. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated with Rho 123 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 35°C for 15 min in the dark, and then washed twice with PBS. The strains were

then incubated again in PBS at 35°C in the dark for 30 min, and fluorescence was measured using flow cytometry (Guava EasyCyte™ Mini System). For each experiment, 10,000 events were evaluated, and cell debris was omitted from the analysis.

Detection of reactive oxygen species (ROS) in yeast

For the detection of ROS produced over a 24-hour culture period, cells were incubated with 20 μM CM-H2DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester) for 30 min in the dark at 35°C. Then, the cells were harvested, washed, resuspended in PBS and immediately analyzed by flow cytometry (Guava EasyCyte Mini; Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). CM-H2DCFDA readily diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH), which is then rapidly oxidized to highly fluorescent DCF (2',7'-dichlorofluorescein) as a result of a broad range of intracellular oxidative stresses other than H₂O₂ (21). The fluorescence intensity of DCF is proportional to the amount of ROS formed intracellularly (30).

Yeast comet assay

The alkaline comet assay was performed essentially as described by Miloshev et al. (33). Up to 200 μL of 0.5% agarose was spread on each slide, and this supportive agarose layer was air-dried prior to the application of the cell suspension. Yeast cells were collected by centrifugation in an Eppendorf microcentrifuge for 5 min, washed with distilled water, and resuspended in S-buffer (1 M sorbitol, 25 mM KH₂PO₄, pH 6.5). Aliquots of approximately 5×10^4 cells were mixed with 0.7% low-melting agarose containing 2 mg/mL zymolyase 20T (Seikagaku Corp., Japan) and were spread over the slides. The slides were then covered with coverslips and incubated for 20 min at 30°C to disintegrate the yeast cell wall and obtain spheroplasts. To minimize the activity of endogenous cell enzymes, all further procedures were performed in a cold room at 8-10° C. The coverslips were removed, and the slides were incubated in 30 mM NaOH, 1 M NaCl, 0.1% laurylsarcosine and 50 mM EDTA at pH 12.3 for 1 h to lyse the spheroplasts. The slides were rinsed three times for 20 min each in 30 mM NaOH and 10 mM EDTA at pH 12.4 to unwind the DNA, and the slides were then subjected to electrophoresis in the same buffer. Electrophoresis was carried out for 20 min at 0.5 V/cm and 24 mA. After electrophoresis, the gels were neutralized by submerging the slides in 10 mM Tris-HCl at pH 7.5 for 10 min followed by consecutive 10-min incubations in 76 and 96% ethanol. Finally, the slides were left to air-dry and were then stained with ethidium bromide (1 mg/mL) and visualized by fluorescence microscopy. All of the above steps were

conducted in the dark to prevent additional DNA damage. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of 2 replicate slides) were analyzed for each experimental group. The cells were scored visually and assigned to one of five classes according to tail size (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4), and a damage index value was calculated for each sample of cells. The damage index values therefore ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) (11). The frequency of tailed cells, which serves as an indicator of DNA damage, was calculated based on the number of cells with tails (DNA strand breaks) and those without.

Analyses of oxidized DNA purines bases in yeast cells

The levels of oxidized purine bases were estimated using the alkaline comet assay, as described above. Briefly, the slides were removed from the lysis solution and washed three times in enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), drained, and incubated with 70 μ L FPG (30 min at 35°C). Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were visually analyzed per group. The amount of oxidized purines (FPG-sensitive sites) was then determined by subtracting the amount of strand breaks (samples incubated with buffer alone) from the total amount of breaks obtained after incubation with FPG, according to the methods of (46).

Caspase 3/7 activation

Caspase 3/7 activity was determined by flow cytometry using a caspase 3/7 FAM kit. Yeast cells were incubated with Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases (FLICATM) for 1 hour at 35°C in a CO₂ incubator. After incubation, 80 μ L of wash buffer was added, and the yeast cells were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The resulting pellet was re-suspended in 200 μ L of wash buffer and centrifuged again. The cells were then re-suspended in the working solution (PI and wash buffer) and analyzed immediately by flow cytometry.

Statistical analysis

The *in vitro* susceptibility experiments and the profiles of synergism and expression were repeated at least three times on different days. Arithmetic means and standard deviations were used to statistically analyze continuous variables (FICI), whereas geometric means were used to compare the MIC results. The data obtained from the flow cytometry experiments and the alkaline comet assay were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test ($P < 0.05$).

Results

Collection of isolates

Initial monitoring of the clinical isolates was performed using CHROMagar Candida (Himedia Mumbai, India) to assess the purity of the yeast collection in this study. The results indicated that all seven strains were *C. tropicalis*.

Molecular identification

To confirm the identity of the species used in the present work, the complete ITS/5.8S region (ITS1, 5.8S, and ITS2) of the nuclear ribosomal DNA from all yeast strains was amplified, sequenced and compared to sequences deposited in the GenBank database. BLAST searches revealed that the ITS sequences from the seven isolates studied here were identical to the ITS/5.8S sequences from different isolates and strains of *C. tropicalis*, and all matching sequences were also from this species.

Development of FLC resistance

To analyze the development of FLC resistance, the *C. tropicalis* strains were grown in medium containing an FLC concentration equivalent to four times the MIC for each strain. After a period of approximately 100 days, each strain showed a MIC greater than 64 µg/mL (characterized as resistance), as shown in Figure 1.

Antifungal susceptibilities and synergism

For assessing the susceptibility profile of the *C. tropicalis* strains to FLC, the previously described broth microdilution technique was employed. As noted in Table 1, there was no change in the susceptibility of the different strains tested with FLC, and all of the strains studied exhibited MIC 50s greater than 64 µg/ml. In this study, the test of synergism between AMD and FLC was conducted using the checkerboard technique, as previously described (15, 34). Table 1 shows the susceptibility values of the seven strains. Isolates 2, 3, 4, 5, 6 and 7 showed FICIs less than 0.5, indicating a synergistic effect. This effect was not observed with strain 1, which showed a value of 0.63.

Analysis of the mechanisms involved in the synergistic effect between AMD and FLC

The following experiments were performed to elucidate the mechanisms involved in the cytotoxic action of the combined use of AMD and FLC against *C. tropicalis*.

Analysis of morphological alterations

To confirm the induced resistance to FLC, the flow cytometry analysis (side scatter x forward light scatter) demonstrated that FLC treatment caused cell shrinkage and nuclear condensation in susceptible strains, as evidenced by a decrease in forward light scattering and a transient increase in side scattering in the FLC-susceptible strains (Figure 2A and 2B) compared to the FLC-resistant strains (Figure 3A and 3B). Both of these morphological modifications observed in FLC-sensitive strains are compatible with the presence of dying or dead cells.

Regarding FLC-resistant *C. tropicalis*, no morphological alterations were detected at shorter treatment durations (4 and 6 h) with either drug alone or in combination (data not shown). On the other hand, all of the FLC-resistant *C. tropicalis* strains evaluated demonstrated morphological changes that were observed only after 24 h of exposure to both FLC and AMD (Figure 3A).

Proliferation and cell membrane integrity

The PI exclusion assay demonstrated that FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment led to a stronger disruption of the yeast cell membrane in FLC-sensitive strains than FLC-resistant strains of *C. tropicalis* (Figures 2B and 3B), which confirms the induced resistance to FLC generated in the present study. In agreement with the microdilution data, only FLC-resistant yeast strains co-treated with FLC plus AMD for 24 h showed a decreased proliferation rate (Figure 4).

Measurement of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi\text{m}$)

After 24 h exposure, alterations in the $\Delta\psi\text{m}$ were observed in the sensitive strains of *C. tropicalis* treated with FLC (Figure 2C). In contrast, mitochondrial dysfunctions in FLC-resistant strains of *C. tropicalis* were observed only in cultures co-treated with AMD (0.20 μM) plus FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 5).

Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS)

As shown in Figures 6A and 6B, FLC treatment led to the production of ROS in FLC-sensitive *C. tropicalis* strains over a period of 24 h. In these cultures, the use of AMD did not result in enhanced ROS generation. In FLC-sensitive strains, the amounts of ROS produced by AMD alone were similar to the control values. In contrast, the generation of ROS was not observed in FLC-resistant cultures exposed only to FLC. However, when cultures were co-exposed to FLC and AMD, increased ROS levels were detected (Figures 6C and 6D).

DNA damage

The data obtained from our standard alkaline version of the comet assay [damage index (DI) and frequency (DF)] showed that treatment with FLC, AMD or these two drugs in combination did not induce DNA strand breaks in genomic DNA in either FLC-sensitive (Figure 7A) or FLS-resistant strains of *C. tropicalis* (Figure 7B) after 24 h exposure, as compared to the negative control group. On the other hand, the known antifungal agent amphotericin B (4 µg/mL), which was used as a positive control, induced a significant increase in the DI and DF values as compared to the negative control cultures of both sensitive and resistant *C. tropicalis* strains.

Recognition of oxidative DNA damage by DNA repair enzymes

As we had observed FLC to have a pro-oxidative effect, we next sought to evaluate the level of oxidative DNA damage exerted by FLC alone or FLC in combination with AMD. To do this, we performed the alkaline version of the comet assay using the specific endonuclease formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) for the detection of oxidized DNA purines bases. Figure 8 shows that following incubation with FPG, there were significant increases in the DI and DF values from cultures (FLC-sensitive and FLS-resistant strains) treated with FLC alone or FLC+AMD, as compared to cultures not incubated with FPG. Furthermore, AMD did not influence the DNA migration induced by FLC. Interestingly, in cultures treated with FLC or those co-exposed to FLC and AMD, the levels of FPG-sensitive sites were more pronounced in FLC-sensitive strains as compared to resistant strains. Moreover, there were no significant differences in the level of DNA strand breaks between the FLC and FLC+AMD treatments in both sensitive and resistant strains. there were no significant differences in the level of DNA strand breaks between the FLC and FLC+AMD treatments in both sensitive and resistant strains.

Measurement of caspases-3/7 activity

In FLC-sensitive *C. tropicalis* strains (Figure 9A), an expanded population of caspase-positive cells was only detected by flow cytometry following exposure to FLC ($67.39 \pm 1.15\%$) or co-exposure to FLC and AMD ($54.28 \pm 2.56\%$). On the other hand, in FLC-resistant strains, a significant population of caspase-positive cells was detected only among the strains co-treated with FLC and AMD ($61.55 \pm 2.21\%$) (Figure 9B).

Discussion

Non *albicans* species of *Candida* for 43.5 to 56.5% of all cases of candidemia (9) and *C.tropicalis* one of the agents most frequently isolated in episodes of invasive candidiasis, especially in cancer patients (2, 29, 53, 54). Studies have reported that *C.tropicalis* susceptibility azoles can be reduced by exposure to these drugs *in vivo* or *in vitro* (4,5).

In our model, strains of *C.tropicalis* acquired resistance to FLC as shown Figure 1 but the acquisition of resistance was slower (~100 days) than the timeframe cited by Barchiesi et al. (5). This difference was likely due to the lower drug concentration used in our protocol.

Moreover, the synergistic effect of the combined use of AMD with azoles has been demonstrated *in vitro* against strains of *C.albicans* and *Aspergillus fumigates* that are resistant to azoles (1, 16, 20). In a study by Knorre et al. (27) on *Saccharomyces cerevisiae*, azole-resistant strains that were treated with AMD demonstrated decreased multidrug resistance due to an inhibition of cellular efflux pumps. In the present study, this synergistic effect was demonstrated using FLC-resistant strains of *C.tropicalis* (Table 1).

As shown in Figure 4, cultures treated with AMD+FLC showed a cytotoxic effect, which was not significant in cultures treated with AMD or FLC alone. Therefore, by blocking efflux pumps, AMD likely enhances the function of FLC to decrease cell size and increase granularity, as shown in Figure 3A.

The results of the Rho 123 test (Figure 5) confirmed mitochondrial dysfunction, suggesting that treatment with AMD+FLC affects mitochondrial respiratory function. In this case, the $\Delta\psi_m$ value would be expected to collapse and Rho 123 would likely not accumulate in the mitochondria. These findings are similar to those reported in the study by Ludovico et al. (31), who analyzed strains of *Saccharomyces cerevisiae* treated with sodium azide.

Therefore, according to the results shown in Figure 3, 4 and 5, treatment of the strains in question with AMD+FLC altered not only the cell morphology but also the $\Delta\psi_m$ value. These changes were likely due to the different sites of action of the two drugs (16).

Azoles have been suggested to be responsible for the endogenous production of ROS in *Candida* spp. (28, 43), and this role was observed in the susceptible strains treated only with FLC (Figure 6). Our findings suggest that AMD may function to block efflux pumps, which promotes FLC activity as well as downstream events by increasing the FLC concentration within the cell. As a result, these events lead to an increase in the concentration of ROS, as shown in Figure 6.

As shown in Figure 3B, the cell membrane integrity of the *C.tropicalis* strains treated with FLC+AMD was clearly altered, as evaluated by the incorporation of PI, and this finding was likely due to severe membrane damage caused by increased levels of ROS.

Yeast cells exhibit a wide range of dose-dependent responses to increasing concentrations of ROS (19, 35, 47). At higher doses, cell death occurs in a fraction of the cells and results in the acquisition of phenotypes characteristic of caspase-dependent apoptosis (32).

Extensive DNA fragmentation occurs frequently in the early stages of apoptosis and is an irreversible step that leads to cell death (19, 42). The alkaline version of the comet assay (standard protocol) is a sensitive procedure used to quantify the different types of DNA damage in cells, including alkali-labile sites, SSBs, and DSBs (6). Our data revealed that exposure of *C.tropicalis* strains to FLC+AMD (Figure 7) did not induce any significant increase in the DNA migration pattern (DNA fragments). However, the standard comet assay did reveal a significant increase in DNA breaks in *C.tropicalis* strains treated with Amphotericin B (4 µg/mL), which was used as a positive control.

Due to these results, the alkaline version of the comet assay was conducted in the presence of FPG to verify oxidative damage to the DNA (7, 8, 46). The results shown in Figure 8 indicate that significant DNA damage was caused by treatment with the combination of FLC+AMD, and these results are expressed as the index of DNA damage after treatment with the DNA repair enzyme (FPG). Moreover, the results obtained after incubation with FPG clearly show that DNA migration was increased in the treated strains of *C.tropicalis*, and the extent of oxidative DNA damage caused by the synergism between FLC and AMD was significantly higher. This increase was likely due to the ability of FPG to recognize purines (adenine and guanine) within DNA that were oxidized by the ROS produced following FLC+AMD treatment (Figure 6). Based on such results, we suggest that the synergistic effect of FLC+AMD facilitates oxidative damage to DNA via the formation of ROS.

These results prompted further study of the physiological state of the cells, particularly with regard to the occurrence of apoptosis and/or necrosis induced by FLC+AMD via caspase 3/7. As shown in Figure 9, we observed an increase in the number of apoptotic cells in the strains treated with FLC+AMD ($61.55 \pm 2.21\%$) but found no necrotic cells.

Disclosure of interest

The authors declare no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

References

1. **Afeltra J, RG Vitale, JW Mouton, and PE Verweij.** 2004. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1335-1343.
2. **Almirante B, D Rodriguez, BJ Park, M Cuenca-Estrella, AM Planes, M Almela, J Mensa, F Sanchez, J Ayats, M Gimenez, P Saballs, SK Fridkin, J Morgan, JL Rodriguez-Tudela, DW Warnock, and A Pahissa.** 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**:1829-1835.
3. **Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers, and DJ Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
4. **Barchiesi F, D Arzeni, MS Del Prete, A Sinicco, L Falconi Di Francesco, MB Pasticci, L Lamura, MM Nuzzo, F Burzacchini, S Coppola, F Chiodo, and G Scalise.** 1998. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* **41**:541-548.
5. **Barchiesi F, D Calabrese, D Sanglard, L Falconi Di Francesco, F Caselli, D Giannini, A Giacometti, S Gavaudan, and G Scalise.** 2000. Experimental induction

- of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1578-1584.
6. **Burlinson B, RR Tice, G Speit, E Agurell, SY Brendler-Schwaab, AR Collins, P Escobar, M Honma, TS Kumaravel, M Nakajima, YF Sasaki, V Thybaud, Y Uno, M Vasquez, and A Hartmann.** 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res* **627**:31-35.
 7. **Cavalcanti BC, FW Barros, IO Cabral, JR Ferreira, HI Magalhaes, HV Junior, EN da Silva Junior, FC de Abreu, CO Costa, MO Goulart, MO Moraes, and C Pessoa.**2011. Preclinical genotoxicology of nor-beta-lapachone in human cultured lymphocytes and Chinese hamster lung fibroblasts. *Chem Res Toxicol* **24**:1560-1574.
 8. **Cavalcanti BC, DP Bezerra, HI Magalhaes, MO Moraes, MA Lima, ER Silveira, CA Camara, VS Rao, C Pessoa, and LV Costa-Lotufo.**2009. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. *J Appl Toxicol* **29**:560-568.
 9. **Chi HW, YS Yang, ST Shang, KH Chen, KM Yeh, FY Chang, and JC Lin.** 2011. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. *J Microbiol Immunol Infect* **44**:369-375.
 10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. *References Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3*, 3rd ed Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
 11. **Collins AR.** 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* **26**:249-261.
 12. **Courchesne WE.** 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:195-199.

13. **da Silva EN, Jr., BC Cavalcanti, TT Guimaraes, C Pinto Mdo, IO Cabral, C Pessoa, LV Costa-Lotufu, MO de Moraes, CK de Andrade, MR Dos Santos, CA de Simone, MO Goulart, and AV Pinto.** 2011. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem* **46**:399-410.
14. **Diaz M, M Herrero, L García, and C Quirós.** 2005. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Chem Eng J Bioch Eng* **48**:385-407.
15. **Endo E.** 2007 Dissertação de mestrado Universidade Estadual de Maringá Efeito sinérgico do extrato bruto e frações de *Punica granatum* contra *Candida albicans* e sinergismo com o fluconazol
16. **Gamarra S, EM Rocha, YQ Zhang, S Park, R Rao, and DS Perlin.** 2010. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1753-1761.
17. **Gonzalez GM, M Elizondo, and J Ayala.** 2008. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* **46**:2902-2905.
18. **Graybill JR, LK Najvar, JD Holmberg, and MF Luther.** 1995. Fluconazole, D0870, and flucytosine treatment of disseminated *Candida tropicalis* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:924-929.
19. **Guerreiro-Salvador V.** 2009. Dissertação de mestrado Avaliação de Apoptose e Necrose em *Saccharomyces Cerevisiae* em Fermentações Vinárias.
20. **Guo Q, S Sun, Y Li, J Yu, and C Shi.** 2008. In vitro interactions between azoles and amiodarone against clinical *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* **31**:88-90.
21. **Hempel SL, GR Buettner, YQ O'Malley, DA Wessels, and DM Flaherty.** 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants:

- comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **27**:146-159.
22. **Horn D, J Fishman, W Steinbach, E Anaissie, K Marr, A Olyaei, M Pfaller, M Weiss, K Webster, and D Neofytos.** 2007. Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn Micr Infec Dis* **59**:407-414.
 23. **Horn DL, D Neofytos, EJ Anaissie, JA Fishman, WJ Steinbach, AJ Olyaei, KA Marr, MA Pfaller, CH Chang, and KM Webster.** 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**:1695-1703.
 24. **Huang X, and A Madan.** 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**:868-877.
 25. **Kang K, KS Wong, WP Fong, and PW Tsang.** 2011. Metergoline-induced cell death in *Candida krusei*. *Fungal Biol* **115**:302-309.
 26. **Kiraz N, I Dag, Y Oz, M Yamac, A Kiremitci, and N Kasifoglu.** 2010. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *J Microbiol Methods* **82**:136-140.
 27. **Knorre DA, TN Krivonosova, OV Markova, and FF Severin.** 2009. Amiodarone inhibits multiple drug resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **191**:675-679.
 28. **Kobayashi D, K Kondo, N Uehara, S Otokozawa, N Tsuji, A Yagihashi, and N Watanabe.** 2002. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3113-3117.

29. **Kucukates E, Z Erturan, S Susever, and Y Yegenoglu.** 2005. In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. *Apmis* **113**:278-283.
30. **LeBel CP, H Ischiropoulos, and SC Bondy.** 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**:227-231.
31. **Ludovico P, F Sansonetty, and M Corte-Real.** 2001. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology* **147**:3335-3343.
32. **Madeo F, E Herker, C Maldener, S Wissing, S Lachelt, M Herlan, M Fehr, K Lauber, SJ Sigrist, S Wesselborg, and KU Frohlich.** 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**:911-917.
33. **Miloshev G, I Mihaylov, and B Anachkova.** 2002. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutat Res* **513**:69-74.
34. **Odds FC.** 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* **52**:1.
35. **Perrone GG, SX Tan, and IW Dawes.** 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1783**:1354-1368.
36. **Pfaller MA, D Andes, MC Arendrup, DJ Diekema, A Espinel-Ingroff, BD Alexander, SD Brown, V Chaturvedi, CL Fowler, MA Ghannoum, EM Johnson, CC Knapp, MR Motyl, L Ostrosky-Zeichner, and TJ Walsh.** 2011. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**:330-343.

37. **Pfaller MA, M Castanheira, DJ Diekema, SA Messer, and RN Jones.** 2011. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis* **71**:252-259.
38. **Pfaller MA, and DJ Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**:133-163.
39. **Pina-Vaz C, AG Rodrigues, S Costa-de-Oliveira, E Ricardo, and PA Mardh.**2005. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother* **56**:678-685.
40. **Pina-Vaz C, F Sansonetty, AG Rodrigues, S Costa-de-Oliveira, J Martinez-de-Oliveira, and AF Fonseca.**2001. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Med Microbiol* **50**:375-382.
41. **Pinto e Silva AT, S Costa-de-Oliveira, A Silva-Dias, C Pina-Vaz, and AG Rodrigues.**2009. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. *FEMS Yeast Res* **9**:626-633.
42. **Ribeiro GF, M Corte-Real, and B Johansson.** 2006. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell* **17**:4584-4591.
43. **Rogers PD, JP Vermitsky, TD Edlind, and GM Hilliard.** 2006. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* **58**:434-438.

44. **Sambrook J, EF Fritsch, and T Maniatis.** 1989. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
45. **Sellami A, H Sellami, S Neji, F Makni, S Abbes, F Cheikhrouhou, H Chelly, M Bouaziz, B Hammami, M Ben Jemaa, S Khaled, and A Ayadi.** 2011. Antifungal susceptibility of bloodstream Candida isolates in Sfax hospital: Tunisia. *Mycopathologia* **171**:417-422.
46. **Silva S, M Negri, M Henriques, R Oliveira, DW Williams, and J Azeredo.**2012. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **36**:288-305.
47. **Temple MD, GG Perrone, and IW Dawes.** 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**:319-326.
48. **Vanden Bossche H, DW Warnock, B Dupont, D Kerridge, S Sen Gupta, L Improvisi, P Marichal, FC Odds, F Provost, and O Ronin.** 1994. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol* **32 Suppl 1**:189-202.
49. **Wakiec R, R Prasad, J Morschhauser, F Barchiesi, E Borowski, and S Milewski.** 2007. Voriconazole and multidrug resistance in Candida albicans. *Mycoses* **50**:109-115.
50. **Warner S.** 1996. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction p. 51-73 *In* G. Foster and D. Twell (ed.), Plant Gene Isolation: Principles and Practice. John Wiley & Sons Sussex.
51. **White T, T Bruns, S Lee, and J Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322 *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA.

52. **White TC, KA Marr, and RA Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**:382-402.
53. **Wingard JR.** 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* **20**:115-125.
54. **Wingard JR, WG Merz, and R Saral.** 1979. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* **91**:539-543.
55. **Zhang YQ, and R Rao.** 2007. Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. *J Biol Chem* **282**:37844-37853.

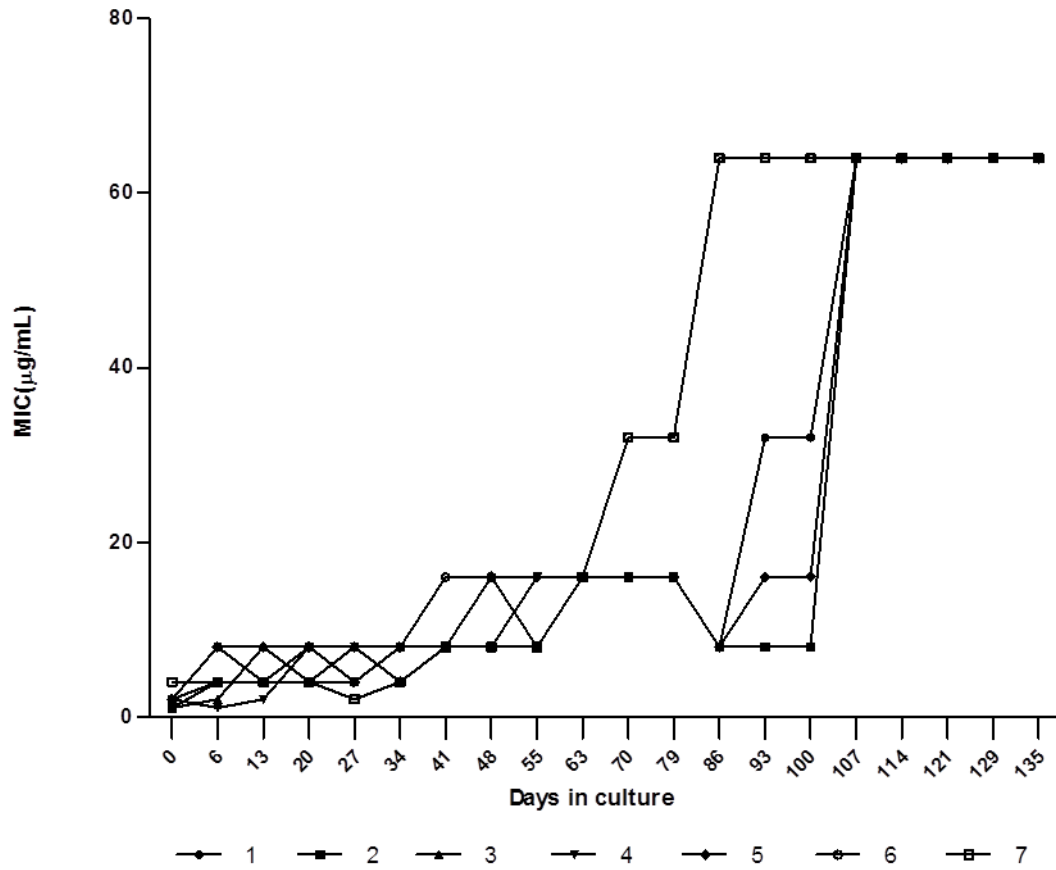


Figure 1. Induction time for resistance to fluconazole (FLC) in strains of *Candida tropicalis* cultured in RPMI containing a concentration of four times the MIC of each isolate. Each point of reference represents a test to assess susceptibility to FLC.

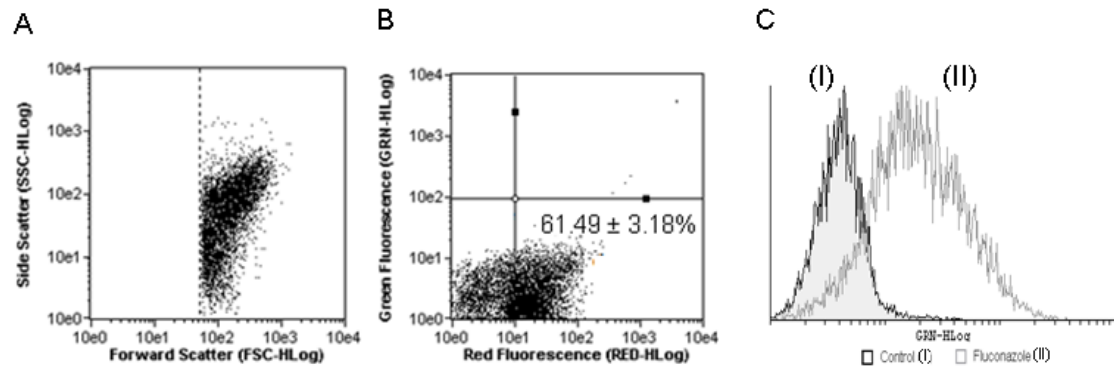


Figure 2. Analysis of morphological changes (A), membrane integrity (B), and mitochondrial dysfunction (C) in strains of *C. tropicalis* (day 0), treated with fluconazole (FLC) at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

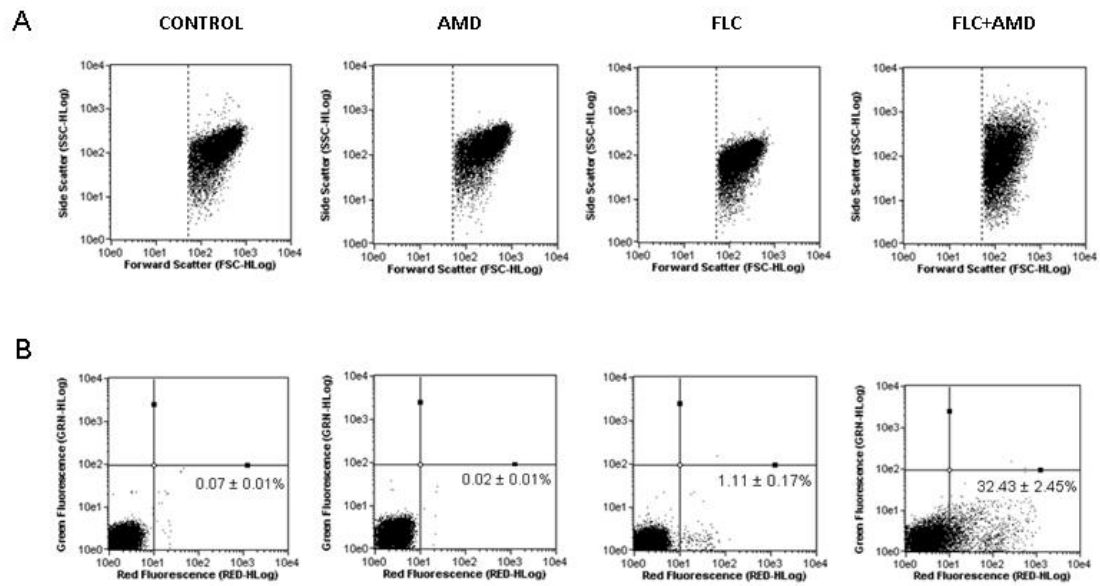


Figure 3. Effects of fluconazole (FLC- 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or amiodarone (AMD- 64 μM) isolated or combined (FLC 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ plus AMD 0.20 μM) in FLC-resistant strain of *C. tropicalis* on morphological alterations (A) and membrane integrity (B), after 24 h exposure.

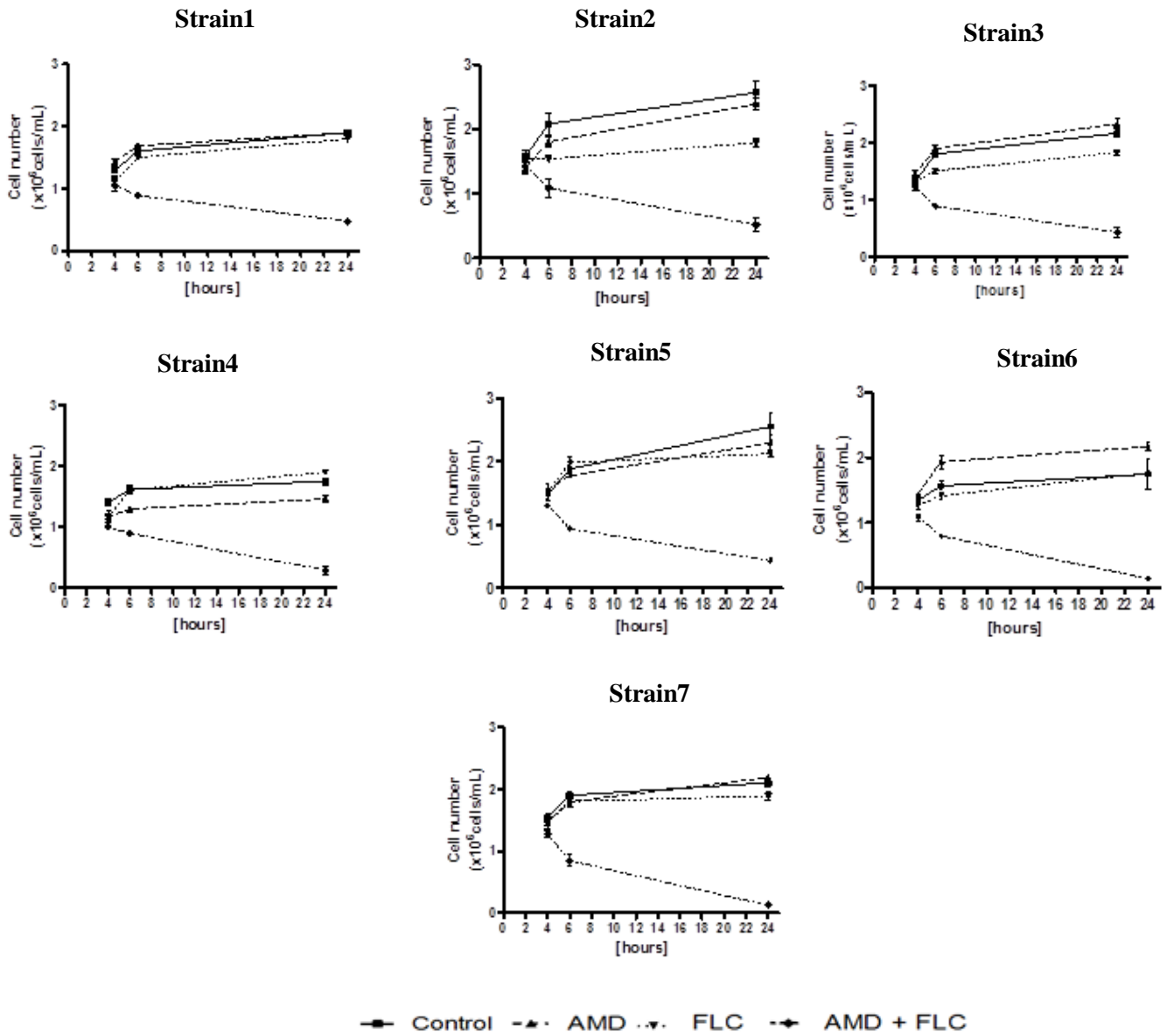


Figure 4. Effects of different treatments in cell proliferation estimated by propidium iodide exclusion assay.

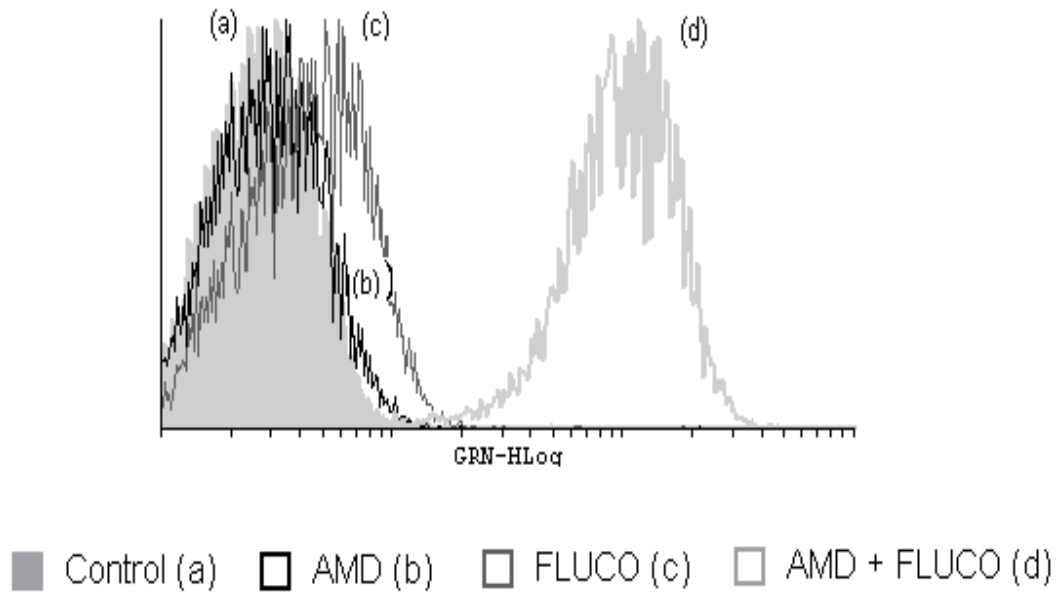


Figure 5. Overlay of green fluorescence single-parameter histograms of an isolate of *C. tropicalis*. Cells were labeled with Rh123 (50 nM). The histograms shows the effects of different treatments on mitochondrial transmembrane potential in the strain exposed to RPMI (a), fluconazole (FLC) at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b), amiodarone (AMD) at 64 μM (c), and FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM) for 24 hours (d).

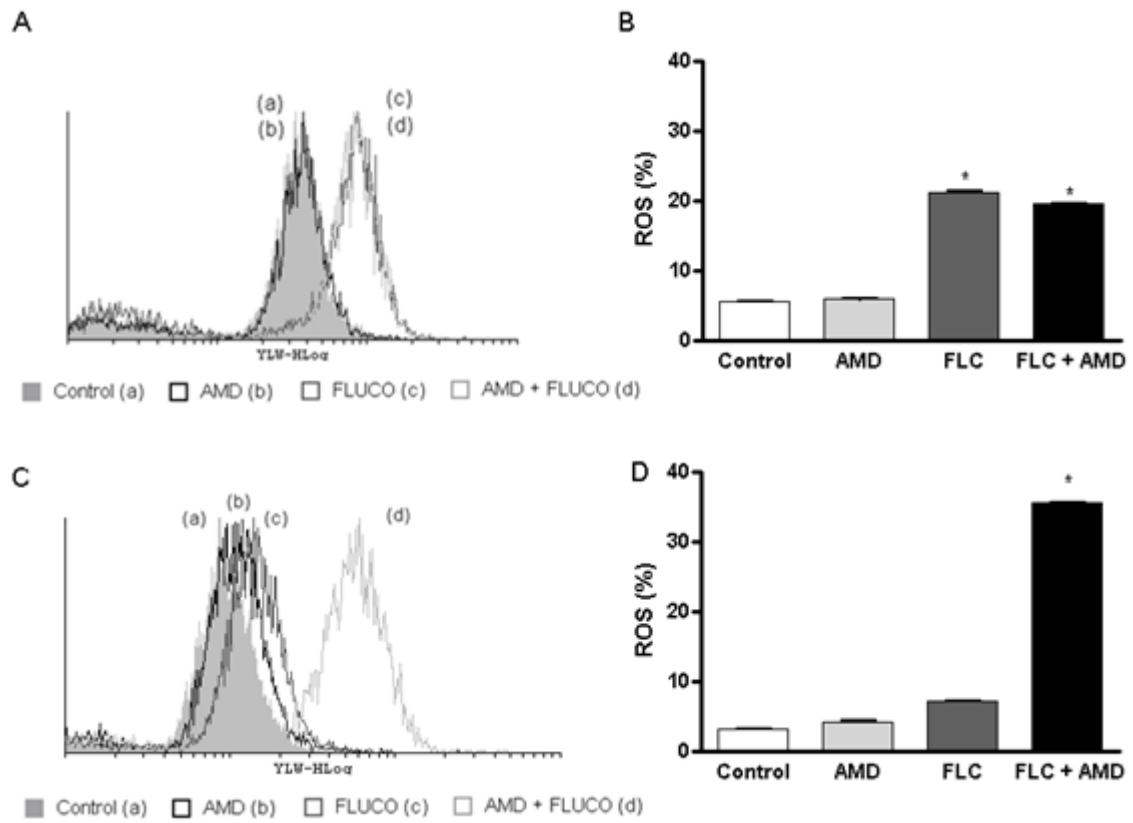


Figure 6. Overlay of yellow fluorescence single-parameter histograms of sensitive (A) or fluconazole-resistant strain (C) of *C. tropicalis*, and percentages of ROS generated intracellularly in sensitive (B) or resistant (D) strains exposed to RPMI (a), fluconazole (FLC) at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b), amiodarone (AMD) at 64 μM (c), and FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM) for 24 hours (d).

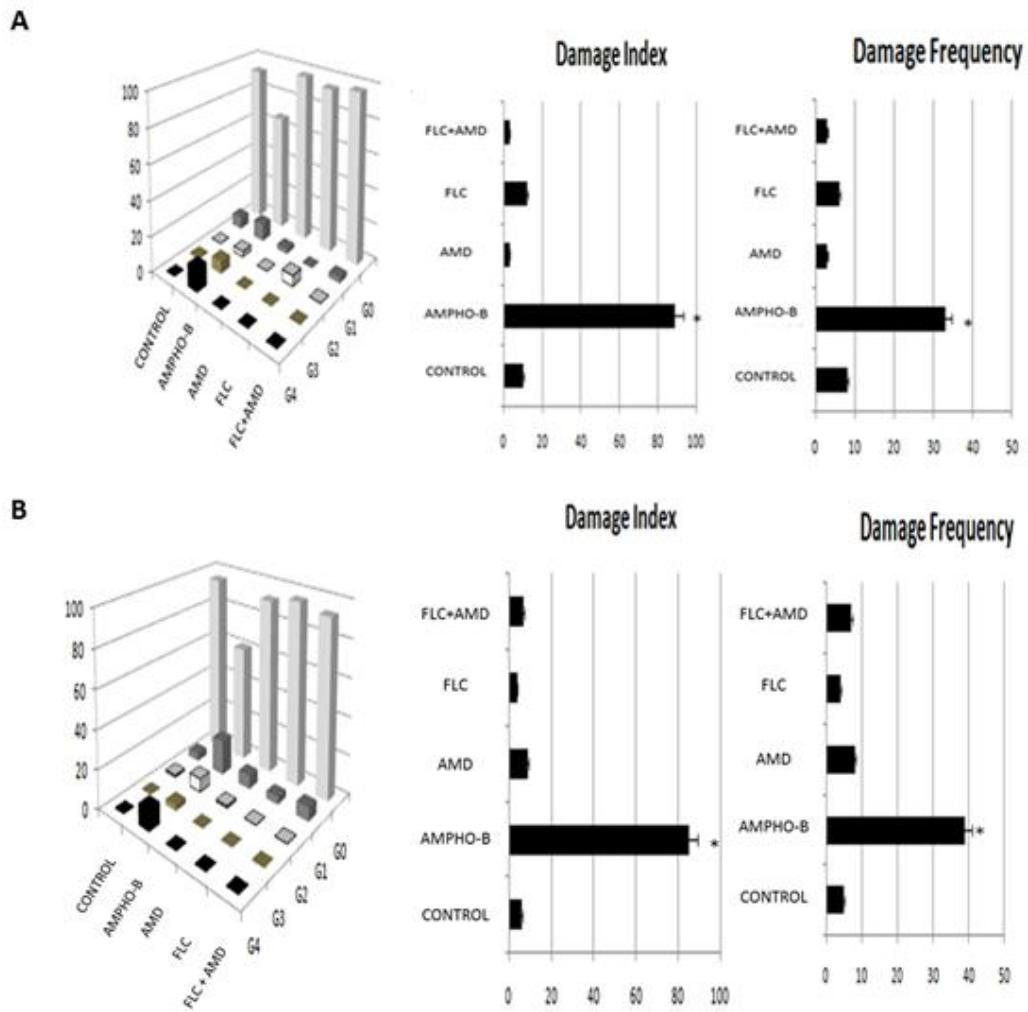


Figure 7. Effects of different treatments on the distribution of damage classes (grades, G), DNA damage index and frequency (%) using the standard alkaline version of comet assay in *C. tropicalis* sensitive (A) to FLC and resistant yeasts (B) after 24 hours exposure. The yeasts were exposed to RPMI, fluconazole (FLC) at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amiodarone (AMD) at 64 μM , and FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM).

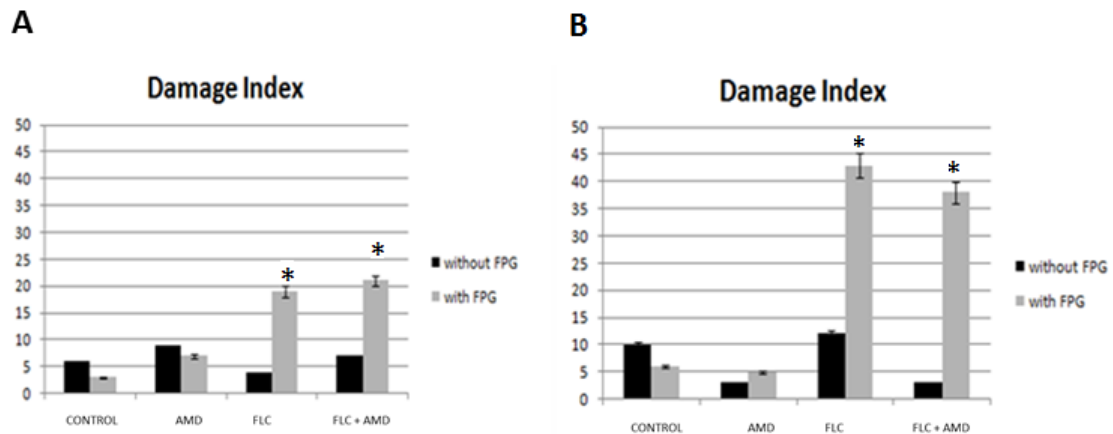


Figure 8. Effects of different treatments on oxidative DNA damage using the modified alkaline version of comet assay, in the presence or absence of FPG enzymes, in *C. tropicalis* resistant (A) to FLC and sensitive yeasts (B) after 24 hours exposure. The yeasts were exposed to RPMI, fluconazole (FLC) at 64 µg/mL, amiodarone (AMD) at 64 µM, and FLC (16 µg/mL) + AMD (0.20 µM).

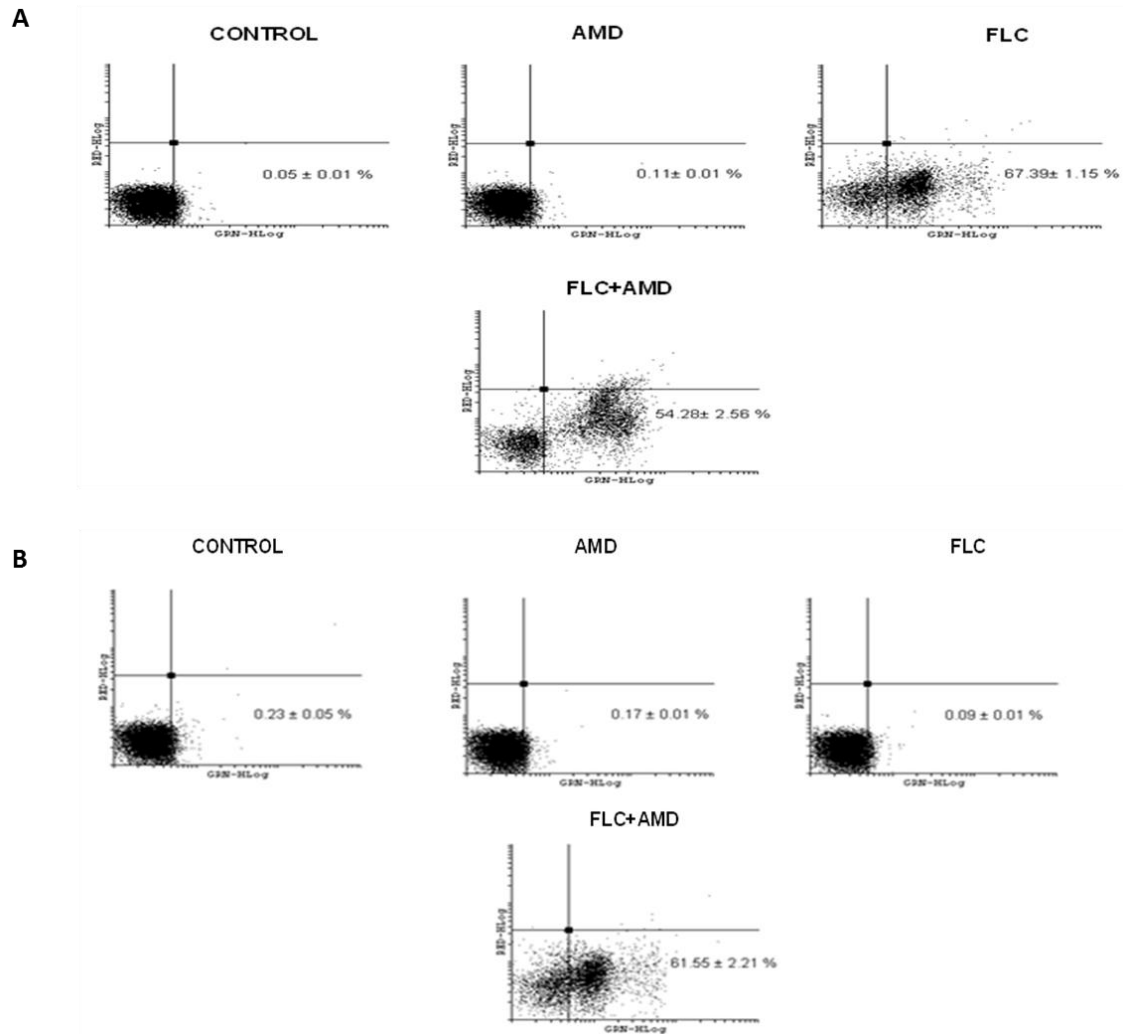


Figure 9. Effects of different treatments on the activation of caspases 3/7 in sensitive (A) and resistant (B) *C. tropicalis* strains to FLC after 24 h exposure. The yeasts were exposed to RPMI, fluconazole (FLC) at 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amiodarone (AMD) at 64 μM , and FLC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + AMD (0.20 μM).

Table 1: Synergistic effect of FLC and AMD against FLC-resistant strains of *C. tropicalis* isolated in Ceará (MIC 50% - 48H).

Strains ^a	MIC ^b				FLC-AMD – interaction ^c	
	Standard MIC		Combination MIC		ΣFICI	Interpretation
	FLC	Amd	FLC	Amd		
<i>C. tropicalis 1</i>	64	>64	40.31	0.20	0.63	IND
<i>C. tropicalis 2</i>	64	>64	32	0.20	0.50	SYN
<i>C. tropicalis 3</i>	64	>64	20.16	0.20	0.32	SYN
<i>C. tropicalis 4</i>	64	>64	20.16	0.20	0.32	SYN
<i>C. tropicalis 5</i>	64	>64	12.7	0.20	0.20	SYN
<i>C. tropicalis 6</i>	64	>64	25.4	0.20	0.39	SYN
<i>C. tropicalis 7</i>	64	>64	12.7	0.20	0.20	SYN

^aFLC-resistant strains of *Candida* isolated from biological samples.

^bFLC – Fluconazole; Amd – Amiodarone. The MIC was defined as the lowest concentration that produced a 50% reduction in growth of fungal cells after 48h of incubation. The procedure was performed according to CLSI protocol M27-A3. Values are expressed in µg/mL for FLC and in µM for AMD. MICs represent geometric means of at least three MICs determined on different days^c. The synergistic effect of FLC and AMD was calculated based on FICI (fractional inhibitory concentration index ($FICI = \frac{[FC]}{[CFS]} + \frac{[AC]}{[CAS]}$), where [FC] and [CAS] are the concentrations of FLC and AMD that showed action when combined; [CFS] and [CAS] are the concentrations of the same drugs acting alone. The interpretation was performed according to the value of $FICI \leq 0.5$ = synergism (SYN); $0.5 < FICI \leq 4.0$ = indifference (IND); and $FICI > 4.0$ = antagonism (ANT).

CONCLUSÕES

Em conclusão, a associação do tratamento com FLC + AMD mostrou causar moderada citotoxicidade *in vitro* em cepas resistentes ao FLC de *C. tropicalis*. Embora esse tratamento tenha alterado a integridade das membranas mitocondriais e plasmáticas, como descrito acima, o sinergismo entre FLC e AMD também pareceu causar danos no DNA, conduzindo à morte celular por apoptose.

REFERÊNCIAS

- AKINS, R. An Update of Antifungal Targets and Mechanisms of Resistance In *Candida Albicans*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 285-318. 2005.
- ALFETRA, J.; VERWEIJ, P.E. Antifungal Activity of Nonantifungal Drugs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.22, n.7, p.397-407. 2003.
- AFELTRA J, RG VITALE, JW MOUTON, AND PE VERWEIJ. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.1335-1343. 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n.4, p.1829-1835. 2005.
- ANTUNES, A.G.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A. & SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.5, p. 239-241. 2004.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. DISPONÍVEL EM: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos4.3.html. Acesso: 15 maio. 2012.
- AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal Infection Disease**, v.9, n.5, p. 411-8. 2005.
- ARENDRUP, M.C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v.16, p.445–452. 2010.

BARCHIESI, F.; CALABRESE,D.; SANGLARD,D.; FALCONI. L.; DI FRANCESCO, CASELLI,F.; GIANNINI,D.; GIACOMETTI,A.; GAVAUDAN,S.; SCALISE.G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.44, p. 1578–1584,june. 2000.

CHEN, S.C.; HALLIDAY, C.L.; MEYER, W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. **Medical Mycology**, v.40, n.4, p. 333-57. 2002.

CHI, H.W.; YANG, Y.S.; SHANG, S.T., KE-HUNG CHEN, K.H.; YEH, K.M.; CHANG, F.Y. *Candida albicans* versus non-albicans bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, xx, p.1-7.2011.

CHONG, Y.; SHIMODA, S.; YAKUSHIJI, H.; IT, Y.; MIYAMOTO, T.; SHIMONO, N.; KAMIMUR, T.; AKASHI, K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. **Journal of Infection and Chemotherapy**. DOI 10.1007/s10156-012-0412-9. 2012

CHOU. H.H.; LO, H.J.; CHEN, K.W.; LIA,M.H.; LI,S.Y. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p. 427–433. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.. References Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed **Clinical and Laboratory Standards Institute**,Wayne, PA. 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v.36, p.599-607. 2003.

CORDEIRO, R. A. ; BRILHANTE, R. S. N. ; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, Z.P. CAMARGO, A. J.; J.J. SIDRIM. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*, **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.575–579. 2006.

CORDEIRO, R. A. ; BRILHANTE, R. S. N. ; ROCHA, M. F. G. ; MEDRANO, D J A ; MONTEIRO, A. J. ; CAMARGO, Z. ; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, p. 1. 2009.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M. J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, v. 71, p. 19-33, 2002.

COURCHESNE, W.E.; OZTURK, S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.47, p.223–234. 2003.

COURCHESNE W.E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, p.195–199. 2002.

COLLINS A.R.. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p.249-261. 2004.

CUENCA-ESTRELA, M.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D.W. Comparative Evaluation on NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, p. 3644-7. 2002.

DA SILVA, C. R.; CAMPOS, R.S.; SANTOS NETA, M.A.; ÂNGELO, M.R.F.; MAGALHÃES, H.I.F.; CAVALCANTI, B.C.; MORAES, M.O.; MACEDO, D.S.; NOBRE-JÚNIOR, H.V.. Susceptibility to caspofungin of *Candida spp.* strains isolated in Ceará, Northeastern Brazil. **Journal of Mycologie Médicâle**, v.21, p.273-276. 2011.

DA SILVA, E.N.JR.; CAVALCANTI, B.C.; GUIMARÃES, T.T.; PINTO, Mdo.C.; CABRAL, I.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M.O.; DE ANDRADE, C.K.; DOS SANTOS, M.R.; DE SIMONE, C.A.; GOULART, M.O.; PINTO, A.V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur J Med Chem**, v. 46, n.1, p.399-410. 2011.

DÉRY, M.; HASBUN, R. Fluconazole-Resistant *Candida*: Mechanisms and Risk Factor Identification. **Current Fungal Infection Reports**, v.5, p. 23–28. 2011.

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L.A.; QUIRÓS, C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p.385–407. 2010.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.167–193. 2002.

DOS SANTOS, R.D.T. Perfil de susceptibilidade e resultados da associação de antifúngicos: um novo método. Tese de mestrado. 2010.

ENDO, E.H. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Maringá. Efeito sinérgico do extrato bruto e frações de *Punica granatum* contra *Candida albicans* e sinergismo com o fluconazol. 2007.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.25, p. 101-106. 2008.

FRANZ, R.; KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; RUHNKE, M.; MORSCHHAUSER, J. Multiple Molecular Mechanisms Contribute To A Stepwise Development of Fluconazole Resistance In Clinical *Candida albicans* Strains. **Agents and Chemotherapy**, v.32, p.3065-72. 1998.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J.F.; QUESADA, R.M.B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M.T.; SERPA, R.; FRANÇA, E.J.G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.5, p. 595-599. 2011.

GAMARRA, S.; ROCHA, E.M.F, ZHANG, Y.Q.; PARK, S.; RAO, R.; PERLIN, D.S. Mechanism of the Synergistic Effect of Amiodarone and Fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1753-1761.2010.

GOLDMAN, G.H.; FERREIRA, M.E.S.; MARQUES, E.R.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; MARTINEZ, P.C.G.; GOLDMAN, M.H.S.; COLOMBO, A.L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, p.25-32, set. 2004.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. **Clinical Infection Disease**, v, 37, p.1172-1177. 2003.

GUO, Q.; SUN, S.; YU, J.; LI, Y.; CAO, L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 457–462. 2008.

GURCUOGLU, E.; ENER, B.; AKALIN, H.; SINIRTAS, M.; EVCI, C.; AKC, S.; HEPER, S. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12- year study. **Epidemiology & Infection**, v.138, p.1328–1335. 2010.

GUPTA, S.S.; TON, V.K.; BEAUDRY, V.; RULLI, S.; CUNNINGHAM, K.; RAO, R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.31, p. 28831–28839. 2003.

HEMPEL, S.L.; BUETTNER, G.R.; O'MALLEY, Y.Q.; WESSELS, D.A.; FLAHERTY, D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p.146-59. 1999.

HO, D. The pathogenicity of *Candida tropicalis*. **Canadian Medical Association Journal**, v.83, n.27, p.1439–1440. 1960.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E.J.; FISHMAN, J.A.; STEINBACH, W.J.; OLYAEI, A.J.; MARR, K.A.; PFALLER, M.A.; CHANG, C.H.; WEBSTER, K.M. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.1695–703, 2009.

HUANG, X.; MADAN, A.. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877. 1999.

IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**, v.40, n.1, p.87-109. 2002.

JR, I.D.S.; SOUZA, I.A.M.; BORGES, R.G.; SOUZA, L.B.S.; SANTANA,W.J.; COUTINHO,H.D. Características gerais da ação,do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3. 2005.

KIRAZ N, I DAG, Y OZ, M YAMAC, A KIREMITCI, AND N KASIFOGLU. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. **J Microbiol Methods**, v. 82, p.136-140. 2010.

KOTHAVADE, M.M.; RAJENDRA, J.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.873–880. 2010

LEBEL, C.P.; ISCHIOPOULOS, H.. BONDY, S.C.. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p.227-31. 1992.

LONGHINI,R.; RAKSA,S.M.; OLIVEIRA,A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO,S.L.. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Revista Brasileira de Farmacognosia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p.388-395, Jul./Set. 2007.

LUDOVICO P, SANSONETTY F, CÔRTE-REAL M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v.147, p. 3335-3343. 2010.

LUPETTI,A.; DANESI,R.; CAMPA,M.; DEL TACCA, M.; KELLY,S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.8, n.2, february. 2002.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M.P.; TÄUBER, M.G.; PIPET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991-2000. **Clinical Infection Disease**, v.38, n.3, p.311-320. 2004.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quimica nova**, v.19, n.5. 1996.

MARTÍN, X.S.; MARCHAN,Y.G.; FERNANDEZ,A.; RODRIGUEZ,N.; ROJAS,H.; VISBAL,G.;BENAIM,G. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and

Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.53, n.4, p.1403-1410. 2009.

MENDRANO, D.J; BRILHANTE, R.S; CORDEIRO, R.A; ROCHA, M.F; RABENHORST, S.H; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.48, n.1, p.17-20. 2006.

MENEZES, E.A; MENDES. L.G; CUNHA,F.A. Antifungal resistance of *Candida tropicalis* isolated in the State of Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3. 2009.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v.513, p.69-74. 2002.

MIYAZAKI, T.; MIYAZAKI, Y.; MIYAZAKI, K.; KAKEYA, H.; NAKAMURA, K.; KOHNO, S. Abstract In 41st Interscience **Conference on Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Chicago, Abstract J-1840. 2001.

MORSCHHÄUSER,J. The genetics basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1587, p.240-8. 2002.

MUEND, S.; RAO, R. Fungicidal activity of amiodarone is tightly coupled to calcium influx. **Federation of European Microbiological Societies**, v.8, p.425–431. 2008.

MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Update**, v.7, p.301–309. 2004

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27-A. Pennsylvania;1997.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*, v.169, n.3, p.175–182. 2010.

NEGRI, M; SILVA, S; HENRIQUES, M; OLIVEIRA,R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **Eur J Clin Microbiol InfectDis**. DOI: 10.1007/s10096-011-1455-z. 2011.

NUCCI, M. Epidemiologia Das Infecções Fúngicas Em Transplante De Células Tronco Hematopoiéticas. **Prática hospitalar**, v.9, n. 52, jul-agos. 2007.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77–82. 2007.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the *checkerboard* puts between them. **Journal Antimicrobial.Chemotherapy**, v.52. 2003.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO,E.; ALCOBA,J.; GINEA, J.; MERINO, P.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M.J.; MARCO, F.; KIRAZ, N.; DAG, I.; OZ, Y.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. **Journal of Microbiology Methods**, v.82, p.136–140. 2012

PEÑA, A.; CALAHORRA, M.; MICHEL, B.;RAMIREZ.J.;SANCHEZ,N.S. Effects of amiodarone on K⁺, internal pH and Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies**, v.9, p. 832–848. 2009.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p. 108–117, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; SHEEHAN, D.J. Interpretative Breakpoints For Fluconazole And *Candida* Revisited: A Blueprint For The Future For Antifungal Susceptibility Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p. 435-47. 2006.

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

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Comparison of results of fluconazole and voriconazole disk diffusion testing for *Candida spp.* with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v.65, p.27– 34. 2009.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiologic Cutoff Values for Fluconazole and *Candida*: Time for New Clinical Breakpoints? **Current Fungal Infection Report**, v.4, p.168–174. 2010.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER,S.A.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Variation in *Candida spp.* distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 278–283. 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiologic *Cutoff* Values for Fluconazole and *Candida*: Time for New Clinical Breakpoints? **Current Fungal Infection Reports**, v.4, p.168-174. 2010.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Citometry. **Molecular and Cell Biology Methods for Fungi, Methods in Molecular Biology**, v.638. 2010.

PINTO E SILVA, A.T.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; SILVA-DIAS, A.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. **FEMS Yeast Research**, v.9, p.626-33. 2009.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI,V.; ESPINEL-INGROFF,A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK. D. W. **Clinical Microbiology Reviews**. Antifungal susceptibility testing: Practical Aspects and Current Challenges, v. 14, n. 4, p. 643–658, Oct. 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.379–385. 2002

SANGLARD,D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v.17, n.2. 2003.

SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; NEJI, S.; MAKNI, F.; ABBES, S.; CHEIKHROUHOU, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; HAMMAMI, M.; BEN JEMAA, M.; KHALED, S.; AYADI,

S. Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia**, v.171, p. 417-422. 2011.

SERRANO-MARTÍN,X.; GARCÍA-MARCHAN,Y.; FERNANDEZ,A.; RODRIGUEZ,N.; ROJAS,H.; VISBAL,G.;BENAIM,G. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1403–1410, April. 2009

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 40-79, jan. 1999.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA,R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.288–305. 2012.

SCHMALRECK, A. F.; WILLINGER,B.; HAASE, G.; BLUM, G.; FEGELER, W.; BECKER, K.. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study for the Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. **Mycoses**, v. 55, p.124–137. 2012.

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

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGE`S, T.; RENIER,G.; CHABASSE, G.; BOUCHARA, G.P. Mechanisms of Azole Resistance in a Clinical Isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4608–4615, 2005.

WARNER, S.A.J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction.. In: Foster, G.D.; Twell, D. (Eds). **Plant Gene Isolation: Principles and Practice**. West Sussex: John Wiley & Sons. p.51-73. 1996.

WENZEL, R.P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. **Clinical Infection. Disease**, v. 41, n. 2, p. 389-393. 2005.

WHITE, T.; BRUNS,T.; LEE, S.; TAYLOR, J.. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322 *In* M. A. Innis, D. H. Gefland, J.

J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, CA. 1990.

WHITE. T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, p. 382-402. April. 1998.

WISPLINGHOFF,H.; BISCHOFF,T.; TALLENT,M.S.; SEIFERT,H.; WENZEL,R.P.; EDMOND,M.B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infection Disease**, v.39, n.3, p. 309-317. 2004.

ZHANG, Y.Q.; RAO, R. Global Disruption of Cell Cycle Progression and Nutrient Response by the Antifungal Agent Amiodarone. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.52, p. 37844–37853. 2007.

ANEXOS

ANEXO I: MATERIAIS E MÉTODOS

Biossegurança

Todos os procedimentos envolvidos na manipulação dos microrganismos foram realizados em capela de fluxo laminar em medidas de contenção de biossegurança nível 2.

Microrganismos

Neste estudo foram utilizados sete cepas de *C. tropicalis*, as quais foram isoladas de sangue, entre os anos de 2009 e 2010, pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-CE), as quais fazem parte da Coleção de Leveduras do LABEL/FF/UFC (Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará). As cepas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia Mumbai-India) e incubadas a 37°C/24 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar® Candida (Himedia Mumbai-India) para avaliar a pureza. A identificação foi realizada por biologia molecular.

Tabela 1: Origem e CIM dos isolados clínicos de *Candida tropicalis*

Cepas	Origem	MIC 50 48h (CLSI, 2008)
<i>C. tropicalis</i> 1	Sangue	1,0µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 2	Sangue	0,5µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 3	Sangue	0,125µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 4	Sangue	2,0 µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 5	Sangue	1,0µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 6	Sangue	1,0 µg/mL
<i>C. tropicalis</i> 7	Sangue	1,0 µg/mL

Identificação molecular

O DNA genômico foi purificado utilizando um protocolo baseado no método CTAB, tal como descrito anteriormente por (WARNER et al.,1996). A região de DNA nuclear compreendendo internal transcribed spacer regions (ITS1 e ITS2) e o gene rRNA 5.8S foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-TCAAGTAAAAGTCGTAACAAGA-3'), tal como sugerido por (WHITE et al.,1990). Uma vez que a especificidade das ampliações foram confirmadas, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se kits de purificação (GFX PCR DNA e o Gel Band Purification kit - GE Healthcare Bio-Sciences) (SAMBROOK et al., 1989). As concentrações dos produtos de purificação da PCR foram determinadas por absorvância em uma diluição de 10 vezes a 260 nm. O seqüenciamento do DNA foi realizado utilizando o DYEnamic ET terminators cycle sequencing kit (GE Healthcare Bio-Sciences), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e ambas as cadeias foram seqüenciadas utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5. As reações de seqüenciamento foram analisadas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthcareBio-Sciences). Os parâmetros de corrida utilizados para o seqüenciamento foram injeção em 3 kV por 50s e eletroforese em 6 kV por 180 min. O *base calling* foi realizado utilizando o software Cimarron 3.12, e os eletroferogramas foram visualizados no Sequence Analyzer v4.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, EUA). As seqüências de bases foram deduzidas a partir dos eletroferogramas e as seqüências completas foram montadas utilizando o software Cap3 (HUANG et al.,1999). As seqüências determinadas foram comparadas com aquelas previamente depositadas na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al.,1990).

Indução de resistência ao fluconazol

Uma única colônia selecionada aleatoriamente a partir de cada cultura das cepas de *C. tropicalis* foi inoculada em 1 mL de RPMI 1640 (Cultilab São Paulo-Brasil) e incubadas *overnight* em agitador a 35°C. Uma alíquota de 200µL desta cultura foi transferida para 1 mL de meio de cultura (RPMI 1640) com FLC e foi novamente incubada *overnight* como descrito acima. No dia seguinte, uma alíquota de cada cultura foi novamente transferida para o meio de cultura contendo a mesma concentração da droga antifúngica FLC e incubou-se como descrito. A cada passagem, uma alíquota de 200µL de cada subcultura foi misturada com 500 µl de glicerol a 50% e congeladas a -20°C para testes posteriores. Neste experimento, as cepas foram incubadas na presença de FLC a uma concentração de quatro vezes a concentração

inibitória mínima (CIM) para este composto (BARCHIESI et al., 2000; PINTO E SILVA et al., 2009).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de susceptibilidade de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o documento M27-A3, utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH $7,0 \pm 0,1$) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). FLC (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brasil) e AMD foram dissolvidos em água destilada e dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma), respectivamente. O FLC foi testado no intervalo de concentração de 64-0,125 $\mu\text{g/ml}$ e a AMD de 64-0,125 μM . No poço 2, foram colocados 200 μL da droga e em seguida realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo desejado das drogas. As placas foram estocadas a -20°C , até sua utilização, por no máximo 6 meses.

Para o experimento, as placas de microtitulação foram retiradas do freezer com antecedência de 30 minutos. A partir de um cultivo de 24h da levedura a ser testada, realizado em ágar Sabouraud-dextrose foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml. Um volume de 100 μL desta suspensão padronizada foi adicionada em cada poço contendo a droga antifúngica. As microplacas foram incubadas por um período de 48 horas a uma temperatura de $35^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$. As leituras foram realizadas após 24 e 48 h de incubação, para minimizar o efeito “trailing”.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado. Os pontos de corte para a susceptibilidade de FLC são: cepas com $\text{MIC} \leq 8 \text{ ug / mL}$ (S), cepas com MIC entre 16 e 32 ug / mL (SDD), e cepas com $\text{MIC} \geq 64 \text{ ug / mL}$ (R) (CLSI, 2008; KIRAZ et al, 2010; PFALLER et al, 2010).

Após a determinação do CIM de cada droga isolada, foi realizada a técnica do *chekboard* (ENDO, E.H., 2007;ODDS, F.C.,2003). Nesta técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações das drogas testadas, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações das drogas em relação ao poço controle. Assim as cepas foram expostas a concentrações variadas (64-0.125 $\mu\text{g/mL}$) de FLC combinado com uma concentração fixa (0.20 μM) de AMD. A avaliação da interação entre FLC e AMD foi determinada através do cálculo da *Fractionary Inhibitory Concentration* (FICI) ($\text{FICI} = [\text{FC}]/\text{CFS} + [\text{AC}]/\text{AS}$), onde [FC] e [AS] são as

concentrações do FLC e da AMD que apresentaram ação quando combinados, [CFS] e [CAS] concentração das mesmas drogas agindo isoladamente. A interpretação foi realizada de acordo com o valor de FICI. $FICI < 0,5$ -sinergismo (SIN), $0,5 < FICI \leq 4,0$ - indiferença (IND) e $FICI > 4,0$ - antagonismo (ANT). Em todos os testes foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 (ALFETRA et al.,2004;CLSI, 2008; DA SILVA et al.,2011; DÍAZ et al., 2010;GAMARRA et al.,2010).

Tratamento das células

Para os experimentos de determinação da densidade celular, integridade da membrana e potencial transmembrana mitocondrial, as cepas de *C.tropicalis* resistentes ao fluconazol foram tratadas isoladamente com FLC (64 ug / mL), AMD (64 uM), e em associação com FLC (16 ug / mL) + AMD (0,20 uM), e as cepas sensíveis tratadas com FLC (64 ug / mL) durante 4, 6, e 24 h, a 37°C. Para a avaliação do stress oxidativo (EROs), danos no DNA e indução de apoptose (ativação das caspases) o tratamento proposto foi: as cepas resistentes e sensíveis de *C.tropicalis*, foram expostas a FLC (64 ug / mL), AMD (64 uM) e FLC (16 ug / mL) + AMD (0,20 uM) durante 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

Preparo das suspensões de *C.tropicalis*

As suspensões de *C.tropicalis* foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células foram centrifugadas (1,600g por 10 min a 4°C), lavadas duas vezes com solução salina 0,85% (1,200g por 5 min a 4°C) e, em seguida ressuspensas (aproximadamente 10^6 células/mL) em tampão HEPES [N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-ácido (2-etanossulfônico)] (Sigma-Aldrich) suplementado com 2% de glicose, pH 7.2.(PINA-VAZ; RODRIGUES, 2010).

Determinação da densidade celular e integridade da membrana

A densidade celular e a integridade da membrana das células fúngicas foram avaliadas utilizando-se iodeto de propídio (PI) 2 ug / mL. O iodeto de propídio é um marcador nuclear, que penetra exclusivamente nas células que têm a membrana celular danificada e por isso, é adicionado às células alvo, permitindo a identificação das células mortas. Alíquotas removidas após 4, 6 e 24 h de incubação com as drogas foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados e os detritos celulares foram

omitidos da análise. A fluorescência celular foi então determinada pelo citômetro Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, EUA) que utiliza o software CytoSoft 4.1. (PINA-VAZ; RODRIGUES, 2010).

Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado utilizando-se o corante rodamina 123, que marca as mitocôndrias devido a alta diferença de potencial entre suas membranas, pelas cepas de *C.tropicalis* após exposição de 4, 6 e 24 h ao fármaco. As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 ug/mL) a 37°C por 15 min no escuro, e, em seguida, lavada duas vezes com PBS. As cepas foram novamente incubadas em PBS a 37°C no escuro por 30 min e a fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise. (Adaptado de LUDOVICO, SANSONETTY, CÔRTE-REAL, 2001)

Deteção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a detecção de EROs após um período de 24 h, as células foram incubadas com 20uM H2DCFDA por 30 min no escuro a 37°C. Em seguida, as células colhidas, lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas imediatamente por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). H2DCFDA se difunde prontamente através da membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares no composto não fluorescente diclorofluoresceína (DCFH), que, por sua vez, é rapidamente oxidado a um composto altamente fluorescente, o DCF (2',7'-diclorofluoresceína (HEMPEL et al., 1999). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formado intracelularmente (LEBEL et al., 1992).

Teste do cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por MILOSHEV et al (2002). Até 200 uL de agarose 0,5% foi espalhada em cada lâmina e seca a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas. As células de *C.tropicalis* foram centrifugadas em uma microcentrífuga de eppendorf durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH₂PO₄, pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10⁴ células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37°C) contendo 2mg/ mL de Zymolyase 20T (Seikagaku Corp, Japão) e espalhado sobre as lâminas, coberto com lamínulas e incubadas durante 20 min

a 30°C para desintegrar a parede da célula de levedura e obter os esferoplastos. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados numa sala fria a 8-10°C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em 30 mM de NaOH, 1M de NaCl, laurilsarcosina 0,1%, EDTA 50 mM , pH 12,3 durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min cada em 30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4 para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 min a 0,5 V/cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris-HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas 10 min em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisados para cada grupo experimental. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS et al., 2004). A frequência de dano ao DNA, foi calculada com base no número de células com caudas (quebras no DNA) versus aqueles sem cauda.

Análise da oxidação de bases purinas do DNA

Esse teste é uma outra versão do ensaio do cometa. Ele utiliza a enzima FPG que detecta a oxidação de bases purinas. O método é semelhante ao do cometa alcalino, mas com pequenas modificações. Resumidamente, as lâminas foram removidas da solução de lise, e lavadas três vezes em tampão de enzima (40 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 0,5 mM de Na₂EDTA, 0,2 mg/mL de BSA, pH 8.0), secas, e incubadas com 70µL de FPG (30 min a 37°C). Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas visualmente por grupo. A quantidade de purinas oxidadas (FPG-sensíveis) foi então determinada pela subtração da quantidade de quebras de fita (amostras incubadas somente com tampão) com a quantidade de quebras totais obtidas após incubação com FPG de acordo com da Silva Júnior et al (2011).

Ativação de caspases 3/7

A atividade de caspase 3/7 foi analisada por citometria de fluxo utilizando um kit comercial (caspase 3/7 Kit FAM). As células de *C.tropicalis* foram incubadas com FLICA™, que é uma sonda fluorescente utilizada para quantificar a apoptose através da atividade da caspase, e mantida durante 1 hora a 37°C numa incubadora de CO₂. Após a incubação, 80 uL de tampão de lavagem foi adicionado e as células foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min. O sedimento resultante foi ressuspensão em 200 uL de tampão de lavagem e novamente centrifugado. As células foram novamente ressuspensas na solução de trabalho (PI e tampão de lavagem) e analisadas imediatamente por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System).

Análise estatística

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram feitos em triplicata em diferentes dias. As médias aritméticas e desvio-padrão foram utilizados para analisar estatisticamente as variáveis contínuas (FICI). As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM. Os dados obtidos pelos experimentos de citometria de fluxo e ensaio do cometa alcalino foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste do Newman-Keuls ($p < 0,05$).

ANEXO II: COMITÊ DE ÉTICA