

UNIVERSIDADE DE TRÁS OS-MONTES E ALTO DOURO

Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados de *Candida albicans*

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Cátia Vanessa Casimiro Palito

Orientadoras: Professora Doutora Ana Cristina Sampaio

Doutora Lia-Tânia Dinis



Vila Real, 2017

A orientadora:

(assinatura)

Prof. Doutora Ana Sampaio

A co-orientadora:

(assinatura)

Doutora Lia-Tânia Dinis

Composição do Júri:

Classificação: _____

Data: ___/___/___

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos supera-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

- Dalai Lama

Agradecimentos

Está a terminar uma etapa muito importante e desejada da minha vida, por isso, não podia deixar de agradecer às pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a supera-la.

Antes de mais, queria agradecer à minha orientadora, **Prof. Dr.^a Ana Sampaio**, por me ter dado a oportunidade de desenvolver a minha dissertação com este tema tão interessante, pois sem ela não seria possível. Agradeço por todo o tempo despendido, por toda a prestabilidade, transmissão de conhecimentos, pela confiança depositada e pela simpatia.

Agradeço à **Dr.^a Lia-Tânia**, minha coorientadora, que foi fundamental em todo o trabalho desempenhado no laboratório. Um obrigada, por todas as horas passadas por trás de protocolos, bata branca, todo o equipamento necessário, pela paciência e por todo o conhecimento transmitido. Obrigada também por melhorar a minha capacidade de autonomia e de resolução de pequenos problemas que sempre surgem neste meio.

Não podia deixar de agradecer, à **Mestre Cheila Pereira**, minha colega de laboratório, pelas horas e horas de trabalho, por toda a ajuda e apoio, não esquecendo de todo o conhecimento passado e toda a confiança, pois foi, sem dúvida, fundamental.

Agradeço também ao **Doutor Luís Félix** pela paciência e tempo despendido.

Por fim, um agradecimento especial à **família** e **amigos** que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu sucesso. Aos **pais** e **avós** um enorme obrigado, porque sem eles nada disto seria possível.

Resumo

Candida albicans é um fungo comensal responsável por infecções no Homem, como as candidíases oral e vaginal. Por ser o agente causal de várias patologias, o seu estudo tem despertado um particular interesse uma vez que as infeções causadas por este fungo oportunista são umas das principais causas de morte em pacientes com imunodeficiência. Adicionalmente, *C. albicans* tem a particularidade de se adaptar facilmente a diferentes nichos biológicos e apresenta elevada resistência aos antifúngicos devido à sua capacidade de defesa antioxidante. O stresse oxidativo e a sua desintoxicação, através dos sistemas biológicos que agem de modo a remover ou reparar os danos causados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS), pode ser desencadeado em *C. albicans* pelas defesas do hospedeiro ou por agentes químicos exógenos. O presente trabalho tem como objetivo compreender os mecanismos associados ao stresse oxidativo provocado pelo isotiocianato de benzilo (BITC) em *C. albicans*. Assim, dois isolados (O33 e O51) da mucosa oral de *C. albicans* e uma estirpe de coleção (*C. albicans* ATCC 90028) foram colocados a crescer em meio líquido Yeast Malt com e sem BITC (0,03 M) ao longo de 24 horas de ensaio, tendo sido avaliadas as suas respostas ao stresse oxidativo: de defesa antioxidante enzimática (superóxido dismutase, SOD, e catalase, CAT) e não enzimática (ROS totais, peróxido de hidrogénio, peroxidação lipídica, glutathiona reduzida/glutathiona oxidada, ácido eritro-ascórbico, compostos fenólicos totais e prolina), intra e extracelularmente. Em geral, na presença do BITC e no meio intracelular, a atividade das enzimas SOD ($p < 0,001$) e CAT ($p < 0,05$) aumentaram, diminuindo a concentração das ROS existentes ($p < 0,001$) e a peroxidação lipídica ($p < 0,01$). Contudo, as respostas não enzimáticas, como o ácido eritro-ascórbico, prolina e compostos fenólicos variam muito com a estirpe.

Em conclusão, o BITC induz stresse oxidativo em *C. albicans*, sendo a intensidade e a resposta estirpe-dependente.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigénio (ROS), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), isotiocianato de benzilo (BITC), defesas não enzimáticas

Abstract

Candida albicans is a commensal fungus responsible for infections in man, such as oral and vaginal candidiasis. Because it is the causal agent of several pathologies, its study has aroused a particular interest since the infections caused by this opportunistic fungus are one of the main causes of death in patients with immunodeficiency. Additionally, *C. albicans* has the peculiarity of easily adapting to different biological niches and presents high resistance to antifungals due to its capacity of antioxidant defense.

Oxidative stress and its detoxification, through biological systems that act to remove or repair damage caused by reactive oxygen species (ROS), can be triggered in *C. albicans* by host defenses or by exogenous agents. The present work aims to understand the mechanisms associated with oxidative stress caused by benzyl isothiocyanate (BITC) in *C. albicans*. Thus, two isolates (O33 and O51) from the oral mucosa of *C. albicans* and a collection strain (*C. albicans* ATCC 90028) were grown in Yeast Malt broth with (0.03 M) and without BITC over 24-hour assay and evaluated their responses to oxidative stress: enzymatic (superoxide dismutase, SOD, and catalase, CAT) and non-enzymatic (Total ROS, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, reduced glutathione/oxidized glutathione, erythro-ascorbic acid, total phenolic compounds and proline), antioxidant defenses, both in intra- and extracellularly.

In general, in the presence of BITC and in the intracellular medium, the activity of SOD ($p < 0.001$) and CAT ($p < 0.05$) enzymes increased, decreasing the total ROS ($p < 0.001$) and lipid peroxidation (< 0.01). However, non-enzymatic responses, such as erythro-ascorbic acid, proline and phenolic compounds vary greatly among strains.

In conclusion, BITC induces oxidative stress in *C. albicans*, and the intensity and type of response seemed strain-dependent.

Key words: reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), benzyl isothiocyanate (BITC), non-enzymatic defenses

Siglas, abreviaturas e acrónimos

AITC – Isotiocianato de alilo

AP-1 – Proteína 1 ativadora - “*Activating protein-1*”

APX – Ascorbato peroxidase

APX-GR – Ascorbato peroxidase-glutationa redutase

AA – Ácido ascórbico

BCR1 – “*Breakpoint Cluster Region protein 1*”

BITC – Isotiocianato de benzilo

CAT – Catalase

Cap1 – Ciclase associada à proteína 1 reguladora do citoesqueleto de actina - “*Cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1*”

DCIP – 2,6-Diclorofenolindofenol

DHA – Desidroascorbato

DHAR – Desidroascorbato redutase

DTT – Ditiotreitól

efg1 – “*Enhanced filamentous growth protein 1*”

EMT – Transição epitelial mesenquimal

GCS1 – Gama-glutamilcisteína

GLR1 – Glutationa-dissulfureto-redutase - “*Glutathione-disulfide reductase*”

GFP – Proteína verde fluorescente

GR – Glutationa redutase

GRX – Glutarredoxina

GSSG – Glutationa oxidada

GSH – Glutationa reduzida

GPx – Glutationa peroxidase

HSF1 – Fator de transcrição de choque térmico – “*Heat Shock Transcription Factor*”

HSPs – Proteínas de choque térmico - “*heat shock proteins*”

HWP1 – Proteína 1 da parede da hifa - “*Hyphal wall protein 1*”

ITCs – Isotiocianatos

LAP – fagocitose associada a LC3 - “*LC3-associated phagocytosis*”

LC3 – Cadeia 3 leve de proteína associada a microtúbulos - “*microtubule-associated protein light chain 3*”

LPO – Peroxidação lipídica

MDHA – Monodesidroascorbato

MDHAR – Monodesidroascorbato redutase

MIC – Concentração inibitória mínima

mTOR – “*mechanistic target of rapamycin*”

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*”

NBT – Azul de Nitrotetrazólio

NEM – N-Etilmaleimida

O₂^{••} – Anião radical superóxido

OPT – o-Ftalaldeído

OSR – Resposta ao stresse oxidativo – “*Stress Oxidative Response*”

PEITC – Isotiocianato de fenilo

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo - “*Phenylmethylsulfonyl fluoride*”

PVPP – Polivinilpirrolidona

RNS – Espécies reativas de azoto

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SAPKs – Proteínas Cinase Ativadas por
stresse

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência
Adquirida

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TEC1 – “*Transposon Enhancement Control*”

TRX1 – Tioredoxina

ULK1 – Serina/treonina-proteína cinase -
“*Serine/Threonine-protein kinase*”

WST – 2- (4-iodofenil)-3- (4-nitrofenil) -5-
(2,4-dissulfonil) -2H-tetrazólio

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	I
ABSTRACT	V
SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	VII
ÍNDICE GERAL	IX
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>CANDIDA ALBICANS</i>	3
1.1.1. Fatores de virulência	4
1.1.2. Interação com o hospedeiro	5
1.1.3. Fatores que afetam a adesão <i>C. albicans</i> /célula animal.....	6
1.1.4. Formação de biofilmes.....	6
1.1.5. Stresse oxidativo dos macrófagos	7
1.1.6. Papel da Autofagia	8
1.2. STRESSE OXIDATIVO E <i>CANDIDA ALBICANS</i>	9
1.2.1. Stresse oxidativo	13
1.2.2. Sistema enzimático de defesa antioxidante.....	14
1.2.2.1. Superóxido dismutase (SOD).....	14
1.2.2.2. Catalase (CAT).....	15
1.2.3. Sistema não enzimático de defesa antioxidante	15
1.2.3.1. Razão GSH/GSSG.....	15
1.2.3.2. Ácido Ascórbico.....	16
1.2.3.3. Prolina	16
1.2.3.4. Compostos Fenólicos	17
1.3. GLUCOSINOLATOS	17
1.3.1. Isotiocianato de benzilo	18
1.4. ROS E MECANISMOS DE DEFESA	19
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
3.2. EXPOSIÇÃO AO ISOTIOCIANATO DE BENZILO (BITC).....	27

3.3. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DO MEIO EXTRACELULAR E INTRACELULAR.....	27
3.4. AVALIAÇÃO DO STRESSE OXIDATIVO	28
3.4.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS totais)	28
3.4.2. Peróxido de hidrogénio	28
3.4.3. Peroxidação Lipídica	28
3.5. PROTEÍNA SOLÚVEL E EXTRAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	29
3.6. ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	29
3.6.1. Superóxido dismutase	29
3.6.2. Catalase	30
3.7. SISTEMA NÃO ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	30
3.7.1. Glutathiona reduzida / Glutathiona oxidada	30
3.7.2. Ácido Ascórbico*	31
3.7.3. Compostos fenólicos totais	31
3.8. PROLINA	31
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS.....	33
4.1. ROS TOTAIS.....	35
4.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS).....	36
4.3. SISTEMA ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE	37
4.3.1. Superóxido dismutase	37
4.3.2. Catalase	39
4.5. RAZÃO GSH/GSSG.....	43
4.6. ÁCIDO ERITRO-ASCÓRBICO	45
4.7. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	47
4.8. PROLINA	49
4.9. INTEGRAÇÃO SIMPLIFICADA DO OBSERVADO PARA CADA ESTIRPE DE <i>C. ALBICANS</i> EM ESTUDO.....	51
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO.....	55
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	62
6.1. CONCLUSÕES	65

6.2. PERSPETIVAS FUTURAS	66
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	I
1. RETAS-PADRÃO	III
1.1. BSA	iii
1.2. GSH.....	iii
1.3. GSSG.....	iv
1.4. Peróxido de hidrogénio	iv
1.5. Ácido ascórbico.....	iv
1.6. Ácido gálico	v
1.7. Prolina	v
1.8. ROS	v

Índice de Figuras

- Figura 1** – Pleomorfismo em *Candida albicans*; A- Forma unicelular, B- Pseudo- micélio, C- Micélio verdadeiro (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010) 4
- Figura 2** – Fatores de virulência em *C. albicans* (Adaptado de Dantas *et al.*, 2016) 5
- Figura 3** – Modelo simplificado de autofagia, e degradação de componentes celulares (Adaptado de Tam *et al.*, 2016) 8
- Figura 4** – Sinalização de stresse da via SAPK em *Candida albicans*. As proteínas apresentadas a cinzento, estão envolvidas na ativação da via SPAK. Apenas as vias que demonstraram que regulam a fosforilação da SAPK são mostradas, com a exceção da segunda via de sinalização e sinalização oscilatória em *C. albicans*, que é indicada por uma linha tracejada (Adaptado de Smith *et al.*, 2010). 12
- Figura 5** – Reguladores de stresse em *C. albicans* e conservados até aos humanos. A azul encontram-se assinalados os fatores de transcrição e as moléculas de sinalização a vermelho. (Adaptado de Brown *et al.*, 2014) 12
- Figura 6** – Formação de $O_2^{\cdot-}$ pela reação entre o O_2 e eletrões que escapam da cadeia respiratória mitocondrial. Depois, ocorre um conjunto de reações que conduz à formação de outros radicais livres e ROS. Na parte superior do esquema demonstra a redução do oxigénio com formação de água. A parte inferior evidencia a sequência de reações que conduz à formação das ROS, nomeadamente $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$, terminando na redução a H_2O (Adaptado de Lushchak, 2011) 13
- Figura 7** – Estrutura química do BITC (Adaptado de Saavedra *et al.*, 2015) 18
- Figura 8** – ROS e mecanismos de defesa. AA – ácido ascórbico; APX – ascorbato peroxidase; CAT – catalase; DHA – desidroascorbato; DHAR – desidroascorbato redutase; SOD – superóxido dismutase; GPX – glutaciona peroxidase; GR – glutaciona redutase; GSH – glutaciona reduzida; GSSG – glutaciona oxidada; MDHA – monodesidroascorbato; MDHAR – monodesidroascorbato redutase (Adaptado de Gill e Tuteja, 2010) 19
- Figura 9** – Principio do kit de ensaio da SOD (Adaptado de Sigma-Aldrich – kit de determinação da SOD) 30

Figura 10 – Quantificação das ROS totais (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 11 – Quantificação dos TBARS no meio intracelular, em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 12 – Quantificação da enzima superóxido dismutase (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 13 – Quantificação da enzima catalase (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 14 – Quantificação do peróxido de hidrogénio (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos

para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 15 – Quantificação da razão GSH/GSSG (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 16 – Quantificação do ácido eritro-ascórbico (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 17 – Quantificação dos compostos fenólicos (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 18 – Quantificação da prolina (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0 M e a 0,03 M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Figura 19 – *C. albicans* ATCC® 90028™, *C. albicans* O51 e *C. albicans* O33, apresentando o meio extracelular e intracelular, para o controlo (0 M) e para o tratamento (0,03 M)

Índice de Tabelas

Tabela 1 – ANOVA two-way das ROS (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	36
Tabela 2 – ANOVA two-way dos TBARS (meio intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	37
Tabela 3 – ANOVA two-way da enzima SOD (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	39
Tabela 4 – ANOVA two-way da enzima CAT (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	41
Tabela 5 – ANOVA two-way do peróxido de hidrogénio (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	43
Tabela 6 – ANOVA two-way da razão GSH/GSSG (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	45
Tabela 7 – ANOVA two-way do ácido eritro-ascórbico (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	47
Tabela 8 – ANOVA two-way dos compostos fenólicos (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	49
Tabela 9 – ANOVA two-way da prolina (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de <i>C. albicans</i>	51
Tabela 10 – ANOVA-fatorial para o meio intracelular, englobado como fatores as diferentes estirpes (<i>C. albicans</i> ATCC® 90028™, <i>C. albicans</i> O51 e <i>C. albicans</i> O33), o tempo (0-24 horas) e o tratamento (0 M e 0,03 M)	53

Capítulo 1 - Introdução

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

1. Introdução

Candida albicans é um fungo comensal comum na microflora da pele e nos tratos gastrointestinal, anal e urogenital nos seres humanos saudáveis que, em determinadas condições, pode causar candidíases cutâneas, orais e vaginais (El Zawawy e Hafez, 2017). Quando as defesas imunológicas são afetadas, surgem infecções, sendo por isso considerado um agente oportunista patogénico, como por exemplo infecções orais (aftas) e infecções vaginais ou candidíases (Brown *et al.*, 2014; Dantas *et al.*, 2015), sendo considerado como um dos mais importantes fungos patogénicos para o ser humano (Brown *et al.*, 2014; Dantas *et al.*, 2015; Tillmann *et al.*, 2015). Este fungo pode ser também vulgarmente encontrado em infecções sistémicas em doentes hospitalizados, sendo responsável pela quarta infecção mais comum nos hospitais dos Estados Unidos da América (Chakravarti *et al.*, 2017; Lara *et al.*, 2015). *C. albicans* é responsável por cerca de 400.000 infecções sistémicas fatais, principalmente em pacientes imunodeprimidos, como doentes com SIDA, transplantados e doentes com cancro (Brown *et al.*, 2014; Dantas *et al.*, 2015; El Zawawy e Hafez, 2017).

1.1. *Candida albicans*

C. albicans é um fungo dimórfico, apresentando forma leveduriforme (blastocónídios) no estado saprofítico, forma em geral associada à colonização assintomática, ou ainda em forma filamentosa (pseudo-micélio e/ou micélio verdadeiro) (Fig. 1), associadas a processos patogénicos. Estas modificações morfológicas devem-se a fatores externos como a temperatura, os nutrientes disponíveis, a pressão parcial de CO₂ e potenciais de oxirredução (Ferreira *et al.*, 2010). Em condições de crescimento desfavoráveis pode ainda formar clamidósporos, esporos de resistência arredondados com uma parede celular espessa. Assim, este fungo adapta-se facilmente a diferentes nichos biológicos, sendo por isso considerado um organismo pleomórfico (Álvares *et al.*, 2007; Fradin *et al.*, 2005).

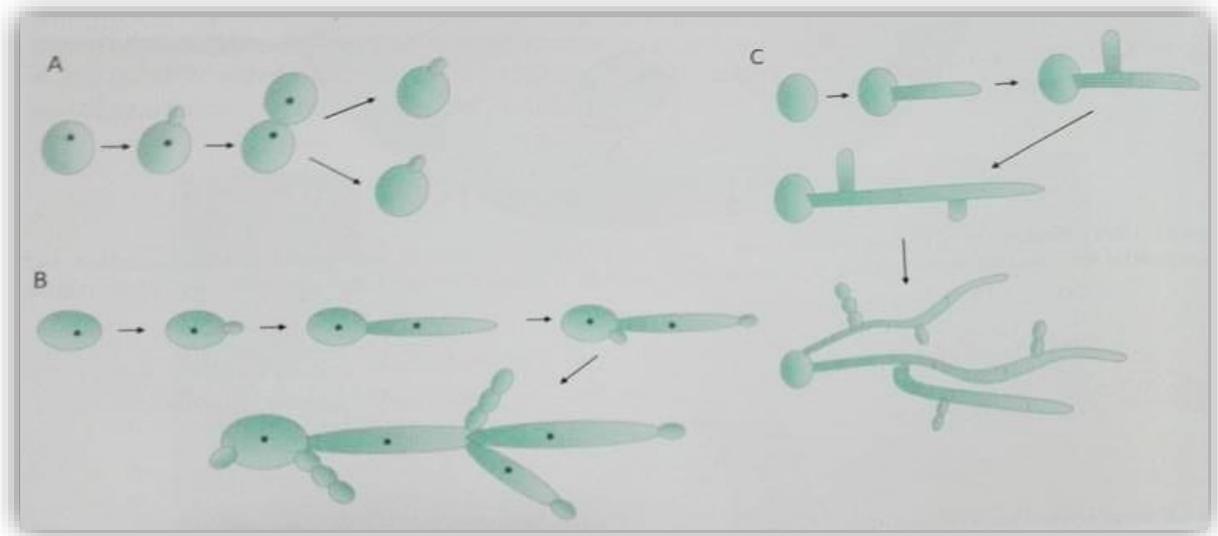


Figura 1 – Pleomorfismo em *Candida albicans*; A- Forma unicelular, B- Pseudo-micélio, C- Micélio verdadeiro (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

C. albicans adere facilmente a variadas superfícies independentemente da sua origem, tendo as células das mucosas como alvo principal, podendo formar biofilmes para melhor adesão às mucosas do hospedeiro. O hospedeiro para se defender deste fungo patogénico recorre a um mecanismo de defesa através dos macrófagos (mecanismo por explosão (“burst”) respiratória ou oxidativa) e posteriormente a processos de autofagia de modo a eliminar determinados componentes celulares, promovendo a eliminação deste agente patogénico.

1.1.1. Fatores de virulência

Os fatores de virulência de *C. albicans* são considerados poligénicos e podem envolver várias características bioquímicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas. A figura 2, apresenta mais detalhadamente estes fatores (Dantas *et al.*, 2016).

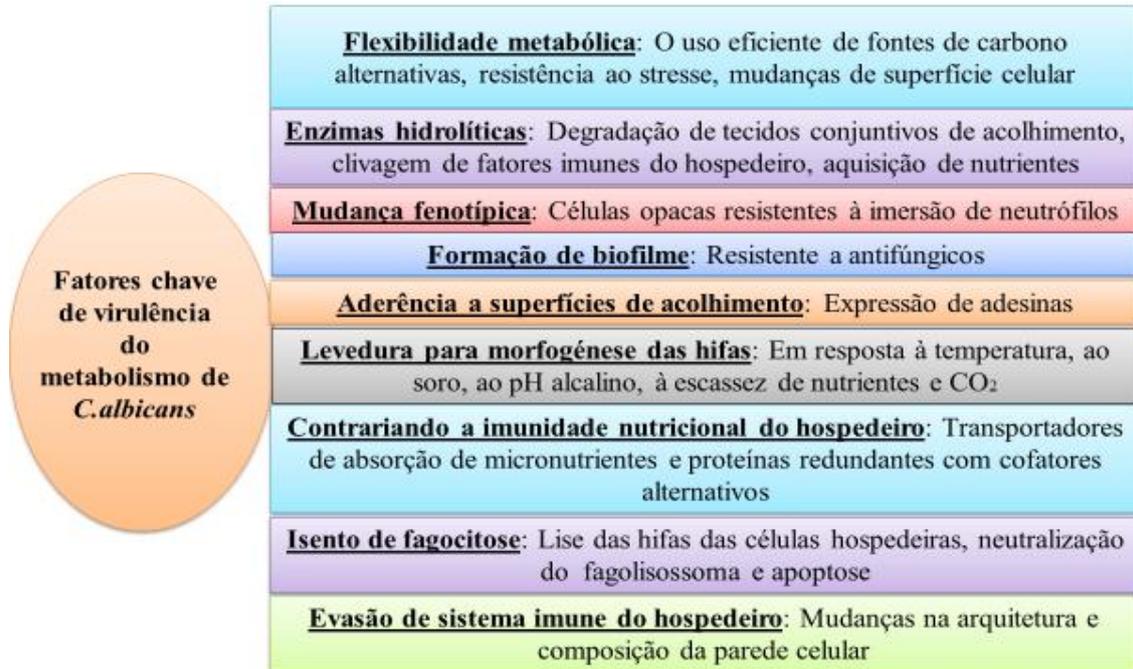


Figura 2 – Fatores de virulência em *C. albicans* (Adaptado de Dantas *et al.*, 2016)

1.1.2. Interação com o hospedeiro

As células epiteliais localizadas nas mucosas humanas têm um papel fundamental na prevenção da invasão de fungos nestes locais, sendo quase sempre a primeira célula hospedeira a contactar com *C. albicans*, devido à sua localização em zonas de interrupção da pele, onde o corpo está em contacto com o ambiente externo (Moyes *et al.*, 2015).

A capacidade de adesão a uma gama de materiais exibida por *C. albicans*, nomeadamente as superfícies mucosas de diferentes órgãos e materiais sintéticos, afeta a colonização deste fungo, que constitui a primeira fase da infeção. Na fase pós-adesão, segue-se a formação de formas filamentosas e dos biofilmes, importante no aumento da resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Modrzewska e Kurnatowski, 2015).

No caso de candidíases orais, ao impedir que as células fúngicas sejam levadas pela saliva para o interior do sistema gastrointestinal, a sua adesão às células é crucial para a sua sobrevivência e para o seu crescimento na cavidade oral. As células fúngicas para além de serem levadas pela saliva podem ser removidas durante a mastigação ou através da renovação das células epiteliais. Noutras mucosas existem processos comparáveis a este, como é o caso das secreções de muco na vagina e o escoamento de urina no sistema urinário (Modrzewska e Kurnatowski, 2015).

1.1.3. Fatores que afetam a adesão *C. albicans*/célula animal

Na parede celular fúngica existem proteínas específicas, conhecidas como as adesinas que aderem às proteínas ou aos hidratos de carbono da membrana da célula hospedeira. Existe também um gene importante envolvido nesta adesão, gene *HWPI* (“Hyphal wall protein 1”) que é expressado após contacto físico entre as células epiteliais e os fungos (leveduras). Este gene codifica uma proteína da parede das hifas, uma manoproteína da parede celular fúngica (Salerno *et al.*, 2011; Modrzewska e Kurnatowski, 2015).

A adesão de *C. albicans* à célula alvo é afetada por vários fatores ambientais como por exemplo:

- A temperatura, existindo melhor aderência a 25 °C do que a 37 °C;
- O pH, observa-se uma maior adesão a pH 3 (este pH é encontrado em próteses dentárias, por exemplo);
- O tipo de meio: níveis elevados de hidratos de carbono (por exemplo na saliva)

A presença de hidratos de carbono é muito importante na adesão de *C. albicans* às células epiteliais, que varia consoante o açúcar – mais adesão com a sacarose, glucose e frutose e menor na presença da maltose. Adicionalmente, verifica-se uma correlação entre a importância dos hidratos e do pH: quando o pH do meio diminui devido à degradação dos açúcares, *C. albicans* adere melhor às células (Salerno *et al.*, 2011).

1.1.4. Formação de biofilmes

C. albicans é dos fungos mais vulgarmente associados a episódios de doença (doença superficial ou sistémica) e, mesmo com a terapia antifúngica existente na atualidade, 40% de mortalidade é provocada por candidíase invasiva (Chandra *et al.*, 2001).

A capacidade em formar biofilmes apresentada por *C. albicans*, tanto em superfícies vivas (mucosas), como em superfícies inertes (cateteres, implantes dentários, válvulas cardíacas, enxertos de “bypass” vascular, lentes oculares, articulações artificiais) tem sido objeto de estudo uma vez que, quando as células deste fungo aderem à superfície, não há crescimento de hifas na parte superior do biofilme, levando ao desenvolvimento de um biofilme mais maduro, pois estas superfícies atuam como substratos para o seu crescimento e, conseqüentemente torna-se menos suscetível aos antifúngicos (Chandra *et al.*, 2001; MicrobeWiki. (2016). Consultado em 4 de outubro, 2016 em: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_\(Pathogenesis\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_(Pathogenesis))).

Os biofilmes são considerados o modo de crescimento mais comum a nível microbiano, sendo também estruturas importantes em infeções clínicas, especialmente devido ao facto dos microrganismos quando organizados em biofilmes apresentam maior resistência aos antimicrobianos (Chandra *et al.*, 2001).

C. albicans produz biofilmes altamente estruturados, compostos por vários tipos de células, que podem ser células redondas resultantes da gemulação de células em forma de levedura, células ovais, em forma de pseudo-hifa, ou células alongadas, em forma de hifas que se encontram encerradas numa matriz extracelular (Nobile e Jonhson, 2015).

Recentemente, estudos demonstraram que os biofilmes protegem a colonização de *C. albicans* dos neutrófilos, impedindo a formação das ROS (Johnson *et al.*, 2016; MicrobeWiki. (2016). Consultado em 4 de outubro, 2016 em: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_\(Pathogenesis\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_(Pathogenesis))).

1.1.5. Stresse oxidativo dos macrófagos

O stresse oxidativo em *C. albicans* desencadeia respostas que são críticas para a sua virulência. Estas respostas consistem na neutralização das ROS libertadas pelos macrófagos. É pois necessário conhecer os processos dinâmicos envolvidos na resposta de *C. albicans* ao stresse oxidativo para compreender a interação que existe entre o fungo e o hospedeiro (Komalapriya *et al.*, 2015).

Nos hospedeiros saudáveis existe uma linha de defesa contra *C. albicans* que consiste na fagocitose pelas células imunes inatas (macrófagos e neutrófilos) defesas de primeira linha contra agentes patogénicos invasores. Estes fagócitos desenvolvem um mecanismo de defesa antimicrobiana que consiste na produção das espécies reativas de oxigénio (ROS), como o ião superóxido, peróxidos e radicais hidroxilo, mecanismo designado por explosão (“burst”) respiratória ou oxidativa, aumentando a morte de *C. albicans* por este processo (Chakravarti *et al.*, 2017; Dantas *et al.*, 2015; Fradin *et al.*, 2005). Os macrófagos geram até 56 μM de óxido nítrico e até 14 μM de peróxido de hidrogénio, embora os níveis das ROS libertados durante a explosão oxidativa sejam um desafio constante (Tillmann *et al.*, 2015). No entanto, *C. albicans* defende-se contra este ataque químico, expressando uma série de enzimas antioxidantes, nomeadamente a superóxido dismutase, catalase, glutaredoxinas e tiorredoxinas (Chakravarti *et al.*, 2017; Dantas *et al.*, 2015). Assim sendo, nos últimos anos existe um particular interesse nas estratégias que *C. albicans* utiliza para escapar à morte oxidativa, e de que modo responde ao aumento das ROS (Dantas *et al.*, 2015).

1.1.6. Papel da Autofagia

Na manutenção da homeostasia celular a autofagia tem um papel importante (Saitoh e Akira, 2010), pois fornece nutrientes quando estes estão em falta e remove do citoplasma os organelos danificados.

A autofagia é um sistema de degradação intracelular em massa que engloba material do citoplasma da célula formando um autofagossoma, que se funde posteriormente com lisossomas (Fig. 3), sendo caracterizado pela formação de vesículas de membrana dupla a envolver os organelos danificados, agregados de proteínas, agentes patogénicos ou produtos de degradação. Este processo é iniciado quando a célula se encontra em stresse podendo ter várias origens, como a privação de determinados nutrientes, a acumulação de substâncias como proteínas e a invasão de agentes estranhos ao organismo (Saitoh e Akira, 2010; Tam *et al.*, 2016). Quando a célula está em stresse este é traduzido pela supressão da mTOR (“mechanistic target of rapamycin”), induzindo a criação de uma membrana de isolamento ou formação de um fagóforo, onde estão inseridos diferentes componentes, como por exemplo a ULK1 (“Serine/threonine-protein kinase ULK1”) (Fig. 3).

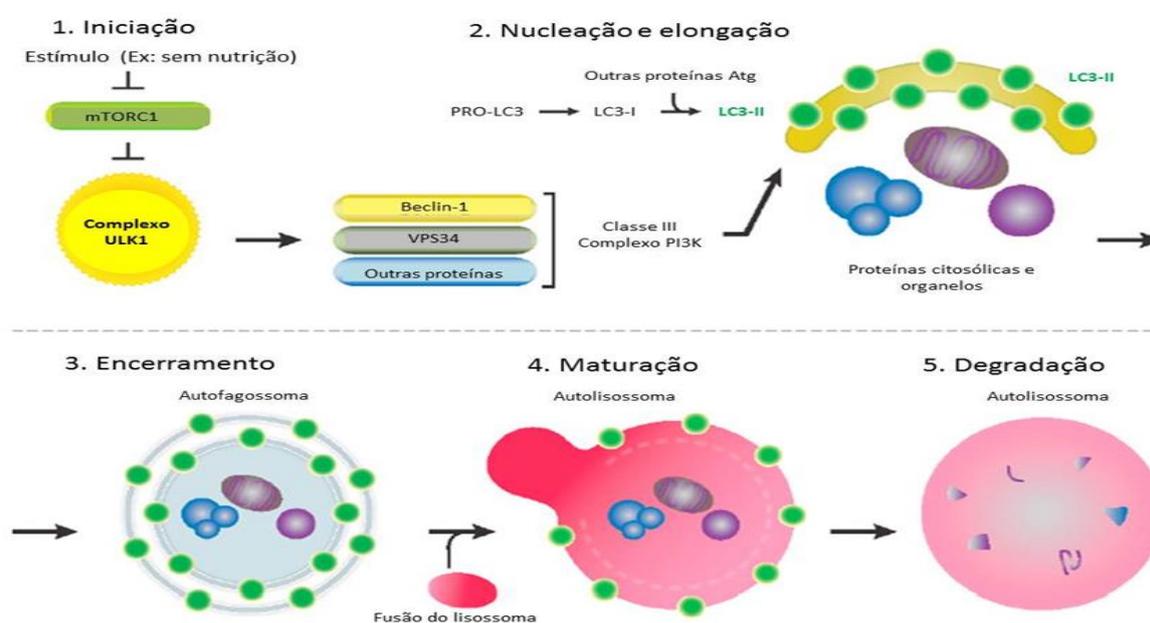


Figura 3 – Modelo simplificado de autofagia e degradação de componentes celulares (Adaptado de Tam *et al.*, 2016).

Segue-se a incorporação do complexo ULK1 na classe III, complexo fosfatidilinositol-3-OH-cinase, que engloba a beclin-1, a VPS34 e outras proteínas que promovem a formação de um autofagossoma. As proteínas, como Atg12-Atg5-Atg16L1 pertencem ao complexo de

proteínas ATG (“autophagy related”), que fazem parte da membrana exterior do autofagossoma e as conhecidas LC3-II (“microtúbulo associado à proteína 1 da cadeia leve 3” – MAP1 LC3), que estão presentes tanto na membrana interna como na externa do autofagossoma. LC3-II diz respeito à forma lipídica da LC3, sendo a proteína mais controlada neste processo (Tam *et al.*, 2016). Quando os componentes celulares a degradar se encontram no interior do autofagossoma, a membrana externa deste pode-se fundir com endossomas e lisossomas, levando à formação dos autolisossomas que degradam o conteúdo autofagolisossomal. Este processo tem sofrido uma valorização progressiva em casos de imunidade e inflamação, uma vez que a autofagia participa diretamente na defesa do hospedeiro e promove a eliminação dos agentes patogênicos e, indiretamente, na regulação das vias de sinalização de imunidade inata e adaptativa (Tam *et al.*, 2016). Recentemente, foi demonstrado um papel da LC3 (“microtubule-associated protein light chain 3”), um marcador da autofagia, na eliminação de bactérias e fungos patogênicos, como *C. albicans*, que se encontra na membrana de fagossomas de membrana simples. Este processo é distinto da autofagia e é designado por fagocitose associada ao LC3-LAP (“LC3-associated phagocytosis”) (Tam *et al.*, 2016).

1.2. Stresse oxidativo e *Candida albicans*

A adaptação aos vários tipos de stresse ambiental faz parte da vida de todos os organismos, entre eles os fungos. É importante haver um conhecimento mais aprofundado sobre a organização, regulação e evolução dos sistemas de resposta ao stresse, pois pode levar à descoberta de novos fármacos e ao desenvolvimento de estirpes industriais com tolerância a stresse elevado (Karányi *et al.*, 2013).

Analisando a maioria dos artigos publicados na última década sobre as respostas ao stresse em fungos, os tipos de stresse dominantes são o stresse osmótico, stresse por privação de nutrientes, choques térmicos, stresse oxidativo e danos no DNA (Karányi *et al.*, 2013). Por várias razões, a investigação do stresse oxidativo em leveduras e fungos filamentosos tem vindo a aumentar, entre elas, a sua capacidade de adaptação a este stresse (Karányi *et al.*, 2013).

O stresse oxidativo em *C. albicans* é um constante desafio (Enjalbert *et al.*, 2007). Um grande número de evidências, revelou que grande parte dos fungos tem sucesso em adaptarem-se a diferentes fatores de stresse ambiental, e que estes organismos podem adquirir resistência aos fatores geradores de stresse (Chaves e Silva, 2012).

Este fungo, quando comparado com outros, mostra ser notavelmente mais resistente ao stresse oxidativo do que, por exemplo, *Shizosaccharomyces pombe* ou *Saccharomyces*

cerevisiae. No entanto, esta resistência superior de *C. albicans* não parece ser devida a diferenças nas respostas da transcrição dos genes relacionados com o stresse oxidativo, uma vez que todas estas espécies transcrevem grupos de genes semelhantes envolvidos nas respostas antioxidantes após exposição ao H₂O₂, como os genes que codificam as enzimas Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX) e Superóxido Dismutase (SOD) (Dantas *et al.*, 2015).

Os genes envolvidos na resposta ao stresse oxidativo (OSR) são conservados entre os agentes fúngicos patogénicos e as leveduras de modelo benigno. *C. albicans*, possui apenas um gene que codifica a catalase (*CAT1*), codifica seis superóxido dismutases diferentes, como a *SOD2* homóloga à família Mn-SOD, a *SOD3* homóloga à família Fe-SOD, enquanto que a *SOD1*, *SOD4*, *SOD5* e *SOD6* são homólogas à família CuZn-SOD. Além destas enzimas, *C. albicans* codifica quatro genes putativos das glutaredoxinas, *GRX1*, *GRX2*, *GRX3* e *GRX5* e dois das tioredoxinas, *TRX1* e *TRX2*. Muito provavelmente a grande variedade de enzimas antioxidantes envolvidas na OSR apresentada por *C. albicans* está relacionada com a sobrevivência deste fungo em nichos do hospedeiro muito dinâmicos (Chakravarti *et al.* 2017).

Em estudos com estirpes de *C. albicans* transformadas com um promotor específico da proteína GFP (proteína verde fluorescente), que atua como um biossensor do stresse oxidativo ambiental ao nível de apenas uma célula, mostrou-se que as enzimas CAT, TRX1 (tioredoxina) e TTR1 (transtirretina)/ GRX2 (glutarredoxina)-GFP têm uma resposta particular no stresse oxidativo e não noutros fatores de stresse como o choque térmico, o stresse osmótico ou as espécies reativas de azoto (RNS). As enzimas anteriormente referidas ativam-se apenas em resposta ao stresse oxidativo, quando células de *C. albicans* foram fagocitadas por neutrófilos (Enjalbert *et al.*, 2007).

A resistência de *C. albicans* às ROS está dependente do AP-1 (“activating protein-1”) que atua como fator de transcrição Cap1 (“cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1”). Cap1 contém resíduos de cisteína redox, que são sensíveis no seu terminal carboxilo quando presentes num processo oxidativo. Como consequência há uma acumulação, no núcleo, de HOG1-independente de Cap1 resultando na ativação dos genes alvo nos seus promotores, através de Yap1- elementos responsivos (JRA) (Brown *et al.*, 2014). Os alvos de CAP1 incluem: (i) genes codificantes da catalase e da superóxido dismutase, enzimas envolvidas na desintoxicação do stresse oxidativo; (ii) síntese de glutathione – por exemplo, a síntese de GCS1 (gama-glutamilcisteína); (iii) homeostasia redox e oxidativa na reparação de danos, por exemplo pela ação da GLR1 (glutathione-disulfide reductase) e da TRX1 (Tioredoxina) (Brown

et al., 2014). Quando a Cap1 é desactivada a indução destes genes é atenuada, aumentando a suscetibilidade de *C. albicans* ao stresse oxidativo (Enjalbert *et al.*, 2007).

Em *S. cerevisiae*, considera-se que a GSH é um metabolito essencial para o seu crescimento, estando a GSH exógena envolvida na protecção contra o stresse causado por exemplo, por metais pesados. A GCS1 em *C. albicans*, homóloga da GSH1 de *S. cerevisiae*, faz uma regulação positiva dos marcadores apoptóticos, e a sua resistência à destruição por macrófagos diminui, reduzindo assim a sua virulência. Estes aspetos confirmam a importância da glutatona na patogenicidade de *C. albicans* (Tillmann *et al.*, 2015). Numerosas observações indicam que adaptação ao stresse oxidativo das células de *C. albicans* durante a infeção é essencial para a sua patogenicidade (Brown *et al.*, 2014).

Existem no entanto outros mecanismos envolvidos na resistência ao stresse oxidativo deste fungo como a via da “**Mitogen-Activated Protein Kinase - High-osmolarity glycerol response 1**” (MAPK-Hog1), uma vez que, quando Hog1 é inativado confere sensibilidade ao stresse oxidativo (Brown *et al.*, 2014).

À família das proteínas ativadas por mitogénio MAPs pertencem as proteínas cinase ativadas por stresse (“SAPKs”), sendo estas moléculas de sinalização de stresse importantes em todos os eucariotas. Cada via SAPK é constituída por três proteínas cinase diferentes: a própria SAPK, uma MAP cinase cinase (MAPKK) e uma MAPKK cinase (MAPKKK) (Fig. 4). Esta última é fosforilada e consequentemente ativa a MAPKK, que posteriormente fosforila a SAPK em dois resíduos, a treonina e a tirosina (Smith *et al.*, 2010).

Em *C. albicans*, a CaHog1 SAPK, responde a diversas condições de stresse, pois a CaHog1 é ativada em resposta a stresse osmóticos e oxidativo. Quando sob stresse oxidativo, a CaHog1 é fosforilada pelo regulador CaSsk1 (representado a azul na figura 4) (Smith *et al.*, 2010).

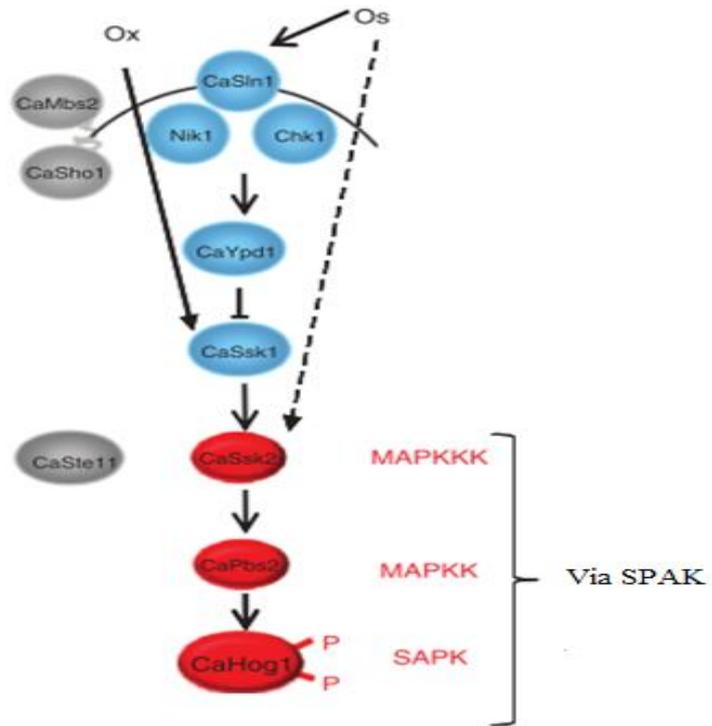


Figura 4 – Sinalização de stresse da via SAPK em *Candida albicans*. As proteínas apresentadas a cinzento, estão envolvidas na ativação da via SPAK. Apenas as vias que demonstraram que regulam a fosforilação da SAPK são mostradas, com a exceção da segunda via de sinalização e sinalização oscilatória em *C. albicans*, que é indicada por uma linha tracejada (Adaptado de Smith *et al.*, 2010).

A MAPK juntamente com os fatores de transcrição, assinalados a azul no esquema da figura 5, e as moléculas de sinalização marcadas a vermelho, contribuem para a regulação das funções de stresse deste fungo (Brown *et al.*, 2014).

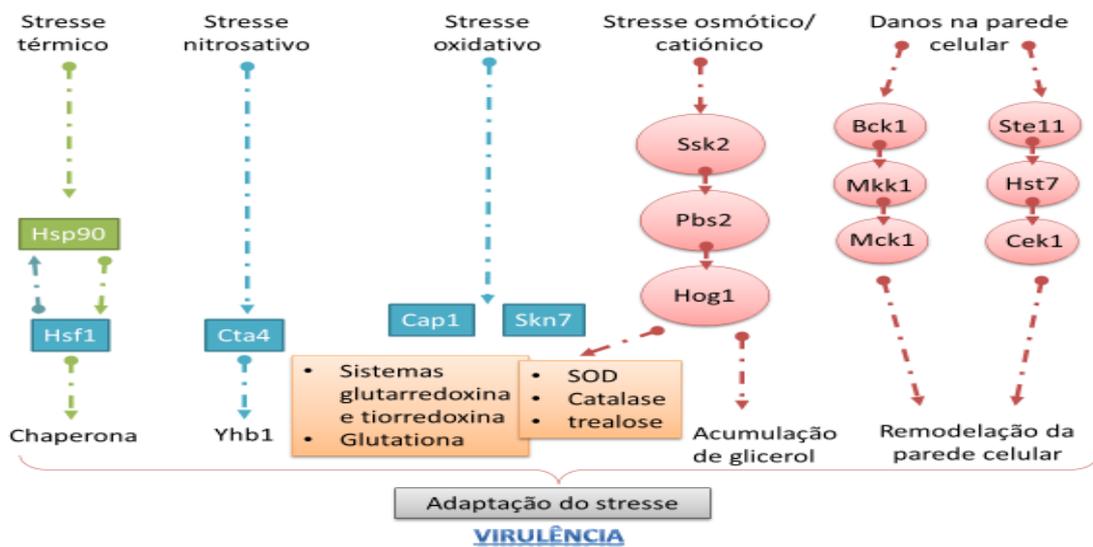


Figura 5 – Reguladores de stresse em *C. albicans* e conservados até aos humanos. A azul encontram-se assinalados os fatores de transcrição e as moléculas de sinalização a vermelho. (Adaptado de Brown *et al.*, 2014)

1.2.1. Stresse oxidativo

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são subprodutos do metabolismo aeróbio, e incluem o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), e radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Todas estas ROS, como são muito reativas têm como alvo diferentes moléculas biológicas, sendo produzidas continuamente a níveis baixos, principalmente nos cloroplastos, nos peroxissomas e nas mitocôndrias (Ozden *et al.*, 2009; Schieber e Chandel, 2014).

Uma das principais fontes de radicais livres é a cadeia respiratória mitocondrial. Os eletrões desemparelhados escapam dos complexos respiratórios, nomeadamente dos complexos I e II, podendo levar à formação do anião superóxido por interação com o O_2 (Fig. 6), sendo esta a primeira espécie reativa que a mitocôndria produz (Brookes *et al.*, 2004; Sas *et al.*, 2007).

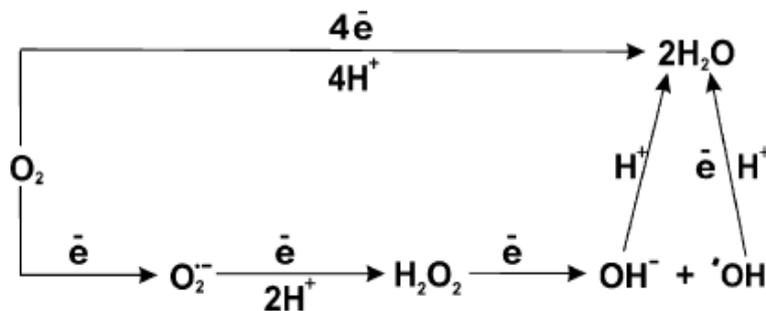


Figura 6 – Formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela reação entre o O_2 e eletrões que se formam da cadeia respiratória mitocondrial. Depois, ocorre um conjunto de reações que conduz à formação de outros radicais livres e ROS. Na parte superior do esquema demonstra a redução do oxigénio com formação de água. A parte inferior evidencia a sequência de reações que conduz à formação das ROS, nomeadamente $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$, terminando na redução a H_2O (Adaptado de Lushchak, 2011).

O $\cdot\text{OH}$ interage com os vários componentes celulares, particularmente com os lípidos provocando a sua peroxidação (Augustyniak, 2010). As ROS como o radical superóxido, o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio são considerados agentes citotóxicos, pois possuem a capacidade de induzir peroxidação lipídica nas membranas celulares (Chitra *et al.*, 2003).

O peróxido de hidrogénio é formado a partir do ião superóxido produzido nas mitocôndrias e pela NADPH oxidase. O ião superóxido é formado a partir da redução de um eletrão de oxigénio molecular (O_2) e, rapidamente, dentro da célula é convertido pela SOD em H_2O_2 . Normalmente, os radicais hidroxilo são formados a partir de H_2O_2 na presença de iões ferrosos. Assim, as células têm vários mecanismos para manter a homeostasia do ferro, podendo assim evitar a formação de radicais hidroxilo tóxicos (Schieber e Chandel, 2014). O H_2O_2 deve ser removido das células para evitar as reações de Fenton e Haber-Weiss que levam à formação de radicais hidroxilo altamente reativos (Morano *et al.*, 2012). O H_2O_2 é o hidroperóxido mais utilizado como modelo em condições de stresse oxidativo, sendo uma molécula ubíqua formada

como um subproduto da respiração aeróbia e após a exposição a diversos fatores biológicos e ambientais. Assim, a importância em estudar o peróxido de hidrogénio, entre outros, é enfatizada por induzir respostas diferentes na sinalização celular (Morano *et al.*, 2012). O equilíbrio existente entre a sua produção e a sua remoção é rigorosamente controlado pelos sistemas antioxidantes (Ozden *et al.*, 2009). As ROS associadas ao stresse oxidativo podem induzir patologias, danificando lípidos, proteínas e o DNA (Sas *et al.*, 2007; Schieber e Chandel, 2015). Estes danos podem ocorrer quando as ROS se encontram em concentrações elevadas na célula, embora a concentrações baixas a moderadas os processos celulares funcionem normalmente (Birben *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica (LPO) é um indicador de stresse oxidativo resultante da oxidação dos lípidos promovida pelas ROS (Lushchak e Semchyshyn, 2012). Considera-se que, quando os níveis de peroxidação lipídica se encontram elevados indicam alterações na fisiologia celular, ou seja, a célula apresenta variações na sua permeabilidade membranar, tanto a nível dos canais iónicos como da bicamada fosfolipídica (El-Bahr, 2013). Para a quantificação de danos provocados pela peroxidação lipídica, recorre-se à utilização de produtos desta reação através da deteção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (malondialdeído, MDA), provenientes de sucessivas oxidações dos fosfolípidos da membrana (El-Bahr, 2013; Lushchak e Semchyshyn, 2012).

Assim, de modo a neutralizar os radicais livres, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que serão descritos pormenorizadamente nos pontos a seguir.

1.2.2. Sistema enzimático de defesa antioxidante

1.2.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

A fim de reparar os danos celulares causados pelo stresse oxidativo a maioria das células sintetiza SOD, que é uma enzima que promove a dismutação do radical superóxido (“Protein data bank” (2017), consultado em 8 de fevereiro, 2017 em: <https://pdb101.rcsb.org/motm/94>). Assim sendo, a SOD é uma das principais enzimas antioxidantes envolvidas na degradação do superóxido. Existem três isoformas da SOD, baseadas nos iões metálicos usados como co-fatores, sendo elas: Cu/ZnSOD citoplasmático (SOD1 – SOD de cobre e zinco); MnSOD mitocondrial (SOD2 – SOD de manganês) e FeSOD extracelular (SOD3 – SOD de ferro) (Broxton e Culotta, 2016; Chang *et al.*, 2016).

A Cu/ZnSOD é sensível ao H₂O₂ e ao KCN, a FeSOD é sensível somente ao H₂O₂ e a MnSOD é resistente a ambos os inibidores anteriores. As enzimas FeSOD e MnSOD têm uma estrutura muito semelhante (Bowler *et al.*, 1992).

As leveduras contêm uma Cu/Zn-SOD (no citoplasma), e uma MnSOD (matriz mitocondrial), que parecem desempenhar papéis distintos durante as condições de stresse oxidativo (Morano *et al.*, 2012).

A reação geral catalisada por esta enzima é a seguinte:



O peróxido de hidrogénio, é também considerado um composto perigoso, que pode ser removido posteriormente pela enzima catalase, de modo a eliminar os efeitos tóxicos (Chaves e Silva, 2012).

1.2.2.2. Catalase (CAT)

A CAT encontra-se presente em todas as células com metabolismo aeróbio, sendo armazenada nos peroxissomas da célula na sua forma inativa. Promove a conversão do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular de forma eficiente (Sorg, 2004; Valko *et al.*, 2006). Esta enzima apresenta um número de renovação elevado, pois uma molécula de catalase pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio a cada minuto, segundo a seguinte equação (Valko *et al.*, 2006):



As mitocôndrias são fontes primárias das ROS sendo os alvos primários dos danos induzidos pelas mesmas. Uma das ROS mais prejudicial é o peróxido de hidrogénio, sendo este degradado naturalmente pela catalase nos peroxissomas ou pela glutathione peroxidase nas mitocôndrias (Dai *et al.*, 2017).

1.2.3. Sistema não enzimático de defesa antioxidante

1.2.3.1. Razão GSH/GSSG

A glutathione é encontrada em microrganismos, plantas e animais e possui várias funções na defesa contra o stresse oxidativo e na toxicidade aos xenobióticos (Izawa *et al.*, 1995).

A glutathione reduzida (GSH) é a principal forma encontrada, enquanto a glutathione oxidada (GSSG) encontra-se em pequena quantidade, desempenhando um papel importante em vários processos, incluindo a transdução de sinal, a resistência a patogénicos, a desintoxicação

de xenobióticos e a participação na regulação do ciclo celular. Esta enzima antioxidante também elimina O_2 , O_2^- , $\cdot OH$ e H_2O_2 , e determina a relação entre a GSH/GSSG, que representa um indicador do equilíbrio redox da célula. A GSH também é importante por participar na regeneração do ácido ascórbico como cofator da desidroascorbato redutase (DHAR), sendo reduzida a glutathione redutase (GR) (Foyer e Halliwell, 1976; Noctor *et al.*, 1998).

A GSH tem um papel importante de agente redutor e desintoxicante quando utilizado pela glutathione peroxidase. Por outro lado, a GSH é convertida em glutathione oxidada (GSSG) pela ação da glutathione peroxidase (GPx), ou quando envolvida na regeneração da vitamina E (Barbosa *et al.*, 2010).

1.2.3.2. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA) é antioxidante não enzimático com potencial não só na eliminação das ROS, como na modulação de um certo número de funções fundamentais, tanto sob condições de stresse como em condições normais (Akram *et al.*, 2017). Este composto antioxidante tem um papel importante no combate ao stresse celular, de origem biótica como abiótica, sendo por isso, valorizado mais recentemente como um participante na desintoxicação das ROS geradas por stresse abiótico (Dolatabadian e Jouneghani, 2009).

Existe um ciclo antioxidante designado como o ciclo do ascorbato-glutathione, existente em organelos redox ativos, como as mitocôndrias e os peroxissomas. O sistema ascorbato peroxidase-glutathione redutase (APX-GR) é bastante eficiente na destoxificação do H_2O_2 (Akram *et al.*, 2017).

A maioria dos organismos eucarióticos produzem ácido ascórbico, no entanto, as leveduras não possuem a capacidade de sintetizar ácido ascórbico (Branduardi *et al.*, 2007). Em *C. albicans*, ou noutras leveduras, encontra-se um análogo do ácido ascórbico de cinco carbonos, denominado ácido eritro-ascórbico. O ácido eritro-ascórbico é quase tão facilmente oxidado como o ácido ascórbico em sistema aquoso e tem um poder de redução muito semelhante, pois é um composto estrutural e quimicamente semelhante (Branduardi *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2001).

1.2.3.3. Prolina

A prolina é um aminoácido muito solúvel, não tóxico e de pequena massa molecular. Este aminoácido é principalmente estudado em plantas, quando estão submetidas a um stresse abiótico, sugerindo que a prolina tem um papel protetor nas plantas, que funciona com um

regulador osmótico celular entre o citoplasma e o vacúolo e que intervém na desintoxicação das ROS, protegendo a integridade da membrana plasmática e estabilizando as enzimas antioxidantes (Ozden et al., 2009). Nas plantas sob stresse hídrico a prolina aumenta mais rapidamente do que outros aminoácidos, sendo esse aumento proporcional ao nível de stresse (Bates *et al.*, 1973).

A capacidade da prolina em suprimir as ROS e a apoptose, foi testada por Krishnan *et al.* (2008), em células de mamíferos, através de manipulação dos níveis intracelulares de prolina, verificando-se que este aminoácido protege as células contra o H₂O₂, e outros indutores de stresse oxidativos.

1.2.3.4. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão bastante distribuídos na natureza, tendo sido detetados mais de 8000 compostos fenólicos em plantas, nomeadamente em frutas e vegetais. Estes compostos dão cor aos alimentos devido aos seus pigmentos e possuem atividade antioxidante devido às suas propriedades redox, podendo desempenhar um papel importante na adsorção e neutralização de radicais livres (Zheng e Wang, 2001) e impedindo a oxidação de alguns componentes dos alimentos como é o caso dos lípidos (Lordêlo *et al.*, 2010).

Sabe-se que os aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano, são precursores de metabolitos secundários, como os compostos fenólicos, importantes para o crescimento das plantas. Estes aminoácidos são sintetizados através da via do ácido chiquímico (Tzin e Galili, 2010). Nos fungos, estes aminoácidos são transformados após reações de descarboxilação, hidroxilação ou desaminação, e em alguns casos, podem ser conjugados com outras moléculas para formar produtos secundários mais complexos (Wat e Towers, 1979). Contudo, não existem estudos que demostrem a importância da biossíntese dos compostos fenólicos em fungos.

1.3. Glucosinolatos

Os glucosinolatos são compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas, em especial às pertencentes à família Brassicaceae (como por exemplo: couve-flor, espinafre, brócolos, nabo, rúcula, agrião). Estes metabolitos localizam-se dentro de vacúolos, sendo libertados quando a planta sofre danos mecânicos. Quando os glucosinolatos são libertados dos vacúolos para o citoplasma, são hidrolisados pela enzima mirosinase, podendo formar-se três tipos diferentes de compostos, os nitrilos, os tiocianatos e os isotiocianatos (ITCs). Os ITCs

contém vários compostos que possuem atividade antimicrobiana (Saladino *et al.*, 2016). Os ITCs são também fitoquímicos com potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico, tendo também uma grande capacidade de induzir a apoptose em células tumorais (tanto *in vitro* como *in vivo*) pois possuem um grupo funcional que lhe confere esta ação, sendo ele (N = C = S) (Xie *et al.*, 2017). Vulgarmente encontrados em vegetais crucíferos, as dietas ricas nestes vegetais estão associadas à diminuição do risco de cânceros humanos (Kasiappan *et al.*, 2016).

1.3.1. Isotiocianato de benzilo

O isotiocianato de benzilo (BITC) é considerado um agente quimiopreventivo potencial contra algumas células cancerígenas. No cancro oral alguns estudos revelam que o BITC induz a formação das ROS, promovendo danos no DNA que podem conduzir à morte celular por apoptose e consequentemente à paragem do ciclo celular (Wu *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2016). Além de induzir o stresse oxidativo e a depleção da GSH, o BITC pode também suprimir as metástases de células cancerígenas e ainda esgotar o sistema redox da célula através da inibição das atividades da tiorredoxina redutase, glutatona redutase e glutatona S-transferase (Yeh *et al.*, 2016).

O BITC (Fig. 7) é um ITC aromático, contendo um anel benzeno na sua estrutura e um grupo (N = C = S) que aumenta a sua reatividade, tornando-o assim um agente antimicrobiano mais eficaz comparativamente ao AITC (isotiocianato de alilo), pois este não possui o anel aromático na sua estrutura (Aires *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2015).

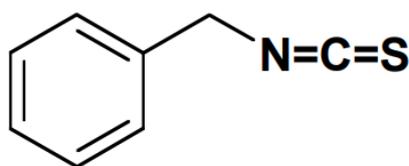


Figura 7 – Estrutura química do BITC.

Sendo um composto mais volátil que o AITC, o BITC apresenta uma menor concentração mínima inibitória (MIC) contra várias bactérias e fungos. O BITC mostra maior atividade antimicrobiana em relação as bactérias Gram-positivas, do que o AITC. Contudo, o BITC tem um efeito inibitório semelhante ao AITC contra bactérias Gram-negativas (Kamii e Isshiki, 2009).

1.4. ROS e mecanismos de defesa

Resumidamente, o stresse induzido, leva a uma produção aumentada das ROS, conduzindo a stresse oxidativo celular. Para combater este stresse, as células têm a capacidade de produzir antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como se observa na figura 8 (Gill e Tuteja, 2010).

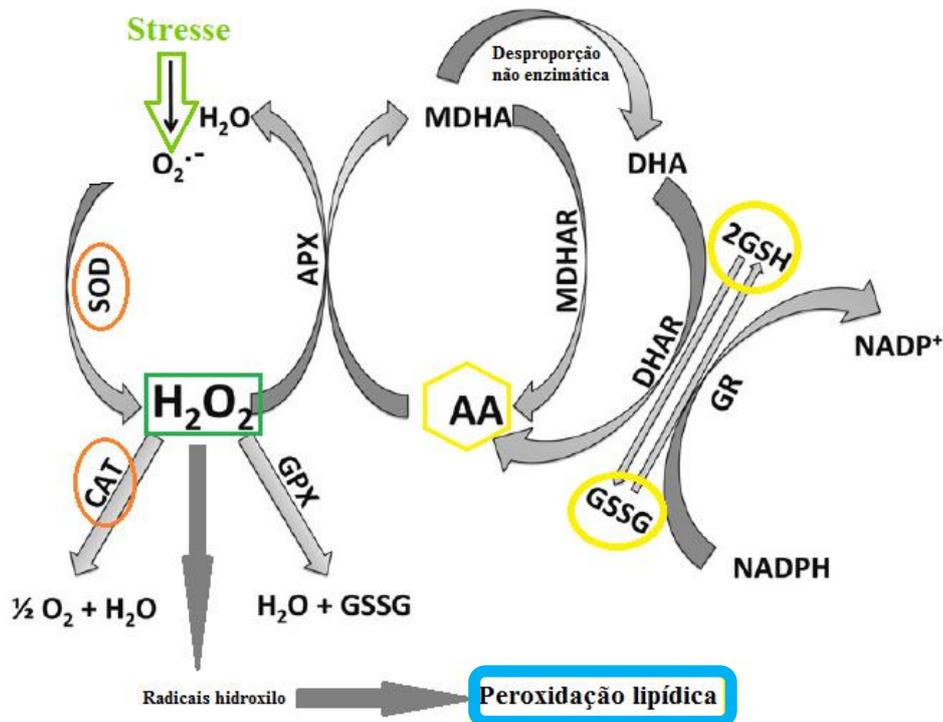


Figura 8 – ROS e mecanismos de defesa. AA – ácido ascórbico; APX – ascorbato peroxidase; CAT – catalase; DHA – desidroascorbato; DHAR – desidroascorbato redutase; SOD – superóxido dismutase; GPX – glutathione peroxidase; GR – glutathione redutase; GSH – glutathione reduzida; GSSG – glutathione oxidada; MDHA – monodesidroascorbato; MDHAR – monodesidroascorbato redutase (Adaptado de Gill e Tuteja, 2010).

No presente estudo iremos avaliar o stresse oxidativo quantificando o peróxido de hidrogénio (assinalado a verde), a peroxidação lipídica a partir do método de TBARS (assinalado a azul) e as ROS totais. Relativamente ao sistema de defesa antioxidante enzimático, iremos avaliar a atividade de enzimas envolvidas como SOD e CAT, assinaladas a laranja na figura 8, e ainda o sistema de defesa antioxidante por métodos não enzimáticos como a razão GSH/GSSG, o ácido ascórbico (AA) (assinalados a amarelo), a prolina, e os compostos fenólicos totais.

Capítulo 2 - Objetivos

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

2. Objetivos

Neste trabalho pretende-se estudar os efeitos do BITC em 2 isolados orais (*C. albicans* O51 e *C. albicans* O33) e uma estirpe de coleção (*Candida albicans* ATCC® 90028™). Para tal, temos como objetivo avaliar as respostas da levedura aos danos oxidativos causados pelo composto. Assim para os três isolados de *C. albicans* será:

- Avaliada a resposta antioxidante enzimática por quantificação das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT);
- Quantificada a presença de parâmetros não enzimáticos como o ácido ascórbico, os compostos fenólicos totais, a razão GSH/GSSG, bem como a quantificação total das ROS, de H₂O₂ e por fim a síntese de prolina;
- Medido os danos na membrana citoplasmática, através da peroxidação lipídica.

Capítulo 3 – Material e Métodos

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

3. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

Para este estudo, foram então utilizados 2 isolados orais de *C. albicans* (O33 e O51) e a estirpe de referência *Candida albicans* ATCC 90028, com base nas suas respostas diferenciais ao stresse induzido por isotiocianatos (Pereira, 2017). Os dois isolados orais de *C. albicans* foram selecionados de uma coleção de leveduras isoladas de portadores de aparelhos ortodônticos fixos (Jardim, 2008). As culturas puras foram identificadas como pertencentes putativamente à espécie *C. albicans* e crio-preservadas (-70 °C). A confirmação da identificação dos isolados envolveu vários testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Carvalhinho *et al.*, 2012).

3.2. Exposição ao Isotiocianato de Benzilo (BITC)

As diferentes estirpes utilizadas foram expostas ao BITC a uma concentração de 0M (controlo) e de 0,03M (tratamento).

Os ensaios efetuados em meio líquido, no meio “Yeast Malt Broth” (YMB), onde os isolados (O33, O51 e C90028) ficaram a crescer durante a noite (cerca de 12 horas) num agitador orbital a 35 °C. Após se ter verificado que as populações de leveduras tinham atingido a fase exponencial de crescimento, adicionámos o BITC 0,03 M na situação de tratamento. Depois da adição do BITC, o ensaio foi prolongado 24 horas, tendo sido recolhidas amostras a vários tempos de exposição ao BITC: i) logo após a adição do BITC, correspondendo ao tempo zero; ii) duas horas e meia; iii) cinco horas e, por último, iv) no termo do ensaio, após 24 horas.

Todos os parâmetros foram medidos no meio de crescimento (extracelular) e nas células (intracelular).

3.3. Tratamento das amostras para análise do meio extracelular e intracelular

Para a análise do meio extracelular as amostras recolhidas ao longo do tempo, foram centrifugadas a 2000 r.p.m. durante quatro minutos, tendo sido recolhido o sobrenadante para diferentes microtubos de centrífuga, congelados a -20 °C para posterior utilização.

Os sedimentos resultantes foram também guardados para serem usados na análise dos vários parâmetros na célula. Para tal, foi necessário destruir a parede celular, recorrendo a um banho de ultrassons durante 20 min. Por fim, a suspensão, foi dividida por vários microtubos e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise.

3.4. Avaliação do stresse oxidativo

3.4.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS totais)

A quantificação total das ROS foi analisada através do método adaptado de Kong *et al.* (2013). Numa placa de 96 poços, adicionou-se a amostra, tampão fosfato salino (PBS) (136 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 3 mM KCl e pH 7,4) e dicloro-hidro diacetato de fluoresceína (DCFH-DA) de uma solução “stock” a 25 mg mL^{-1} de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, a placa foi incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. A intensidade da fluorescência foi medida num leitor de microplacas Varian Cary Eclipse, com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm. A produção de ROS foi expressa em nmol diclorofluoresceína (DCF) mg^{-1} de proteína, com base numa reta-padrão de DCF entre 0 e 10000 nM.

3.4.2. Peróxido de hidrogénio

A quantificação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) foi feita segundo o método de Ozden *et al.* (2009). As amostras foram centrifugadas durante 15 min. a 15.000 g e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, juntamente com ácido tricloroacético (TCA) a 1% (p/v). Após a centrifugação, foi adicionado ao sobrenadante tampão fosfato 10 mM a pH 7,0 e KI 1M, tendo a seguir sido lida a absorvância a 350 nm. A concentração de H_2O_2 foi calculada a partir de uma reta-padrão, com padrões de 0 a $50\text{ }\mu\text{M}$ de H_2O_2 , e expressa em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.4.3. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica avaliada pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi analisada através dos métodos descritos por Heath e Packer (1968), Hodges *et al.* (1999) e Costa *et al.* (2002). As amostras foram centrifugadas com TCA a 20% (p/v) durante 20 min. a 4 000 rpm. A 1 mL de sobrenadante adicionou-se o reagente de TBARS a 0,5% (contem TCA a 20% e ácido tiobarbitúrico, TBA) e hidroxitolueno butilado (BHT) a 4% (p/v). Esta mistura foi aquecida num banho a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min., sendo de seguida arrefecida num banho de gelo. Depois das amostras arrefecidas, foram a centrifugar durante 20 min. a

3.500 rpm, a 4 °C e as absorvâncias lidas a 600 nm, 532 nm e 440 nm, sendo que os valores da absorvância a 600 nm (não específica), foram subtraídos aos obtidos nos outros dois comprimentos de onda. A concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi expressa em nmol/mg de proteína.

3.5. Proteína solúvel e extração de enzimas antioxidantes

A quantificação de proteína foi realizada de acordo com Bradford (1976). Resumidamente, adicionou-se o reagente de Bradford ao extrato da amostra, homogeneizando-se suavemente. Incubou-se na obscuridade 15 min., a absorvância foi lida no espectrofotômetro (CARY 100 Bio, Australia) a 595 nm. A quantificação das proteínas totais foi obtida através de uma reta-padrão com concentrações compreendidas entre 0 e 20 µg de albumina sérica bovina (BSA).

Para a determinação das atividades enzimáticas das amostras (nos ambientes intra e extracelular), usámos o método descrito por Papadakis *et al.* (2001). As amostras foram colocadas num tampão de extração contendo 0,2 M Tris HCl (pH 8,0), 2% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP), glicerol, 0,25% (p/v) Triton X-100, 5 mM ditioneitol (DTT), 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 12000 r.p.m., durante 30 min. Ao fim desse tempo, recolheu-se o sobrenadante por vários tubos Eppendorf que foram guardados a -80 °C, para posterior utilização.

3.6. Enzimas de defesa antioxidante

3.6.1. Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD), foi realizada usando o kit de SOD WST (19160-1KT-F, SIGMA), que é um método que se baseia na percentagem de inibição da formação de WST-1 (2-(4-iodofenil-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfonil)-2H-tetrazólio, sal monossódico) formazan (Fig. 9). Este ensaio mede a capacidade de inibição da enzima da redução fotoquímica do azul nitrotetrazólio (NBT), por espectrofotometria a 450 nm, medindo a diminuição do desenvolvimento de cor.

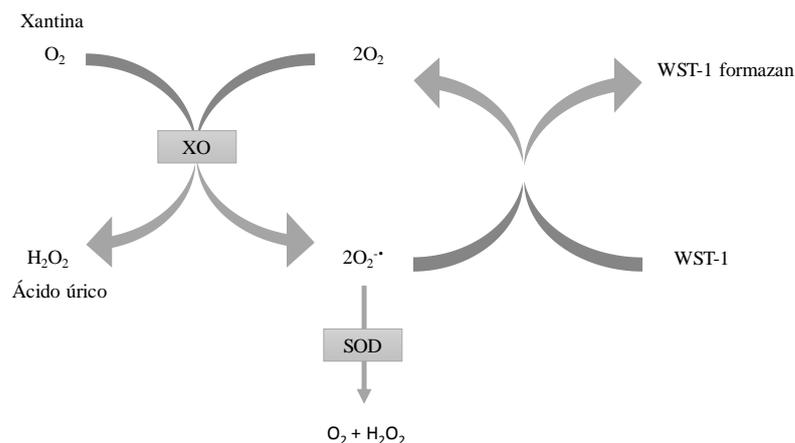


Figura 9 – Princípio do kit de ensaio da SOD (Adaptado de Sigma-Aldrich – kit de determinação da SOD).

3.6.2. Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi medida utilizando o método de Chance e Maehly (1954), onde foi avaliado o consumo de H₂O₂ (peróxido de hidrogénio), com um coeficiente de extinção molar de 0,0436 mM⁻¹ cm⁻¹, durante 2 min. a 240 nm. Numa célula espectrofotométrica de leitura, adicionou-se à amostra tampão fosfato 50 mM a pH 7,0 e H₂O₂ 10 mM. A atividade da CAT foi expressa em µmol/min/mg de proteína.

3.7. Sistema não enzimático de defesa antioxidante

3.7.1. Glutathiona reduzida/Glutathiona oxidada

A glutathiona reduzida (GSH) foi quantificada através do método de Gartaganis *et al.* (2007). Numa microplaca de 96 poços, foi adicionado às amostras ácido tricloroacético (TCA) a 25 %, tampão Tris HCl (50 mM a pH 7,5), NaOH (0,56 N) e o-ftalaldeído (OPT). A placa foi incubada à temperatura ambiente, na obscuridade, durante 15 min. Por fim, fez-se a leitura da fluorescência no Varian Cary Eclipse, a um comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão de 420 nm.

A glutathiona oxidada (GSSG) foi medida pelo mesmo método (Gartaganis *et al.*, 2007). Tal como na quantificação da GSH, foi utilizada uma microplaca de 96 poços. Adicionou-se à amostra TCA 25 % e N-etilmaleimida (NEM) 40 mM, seguindo-se a incubação à temperatura ambiente, na obscuridade, durante 30 min. Após este tempo de incubação foi acrescentado o tampão fosfato (50 mM a pH 7,5), NaOH (0,71 N) e OPT. Seguiu-se nova incubação nas condições atrás descritas e, por fim, foi feita a leitura da fluorescência como anteriormente descrita.

Para a obtenção dos resultados de ambas, recorreu-se a uma reta-padrão de concentração de 0 a 70 μM para a GSH e 0 a 120 μM para a GSSG.

3.7.2. Ácido Ascórbico*

O ácido ascórbico, mais conhecido como vitamina C, foi quantificado pelo método de Klein e Perry (1982). Em primeiro lugar, as amostras foram expostas a um método de extração pelo ácido metafosfórico 1%, durante 45 min. De seguida, foi retirado apenas o sobrenadante (pois ocorreu separação de fases por gravidade) para se proceder ao método de quantificação do ácido ascórbico. Assim, ao sobrenadante foi adicionado o 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), permanecendo 30 min. na obscuridade. Por fim, a sua absorvância foi lida a 515 nm.

Neste método, foram realizados simultaneamente três brancos. O branco do aparelho que tinha apenas água bidestilada, o branco do reagente que continha ácido metafosfórico e DCIP e o branco da amostra que continha o sobrenadante da amostra e água bidestilada.

A concentração desta vitamina foi expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, recorrendo a uma reta-padrão de 0,010 a 0,1 mg de ácido ascórbico.

* O ácido eritro-ascórbico foi quantificado por este método, devido às suas semelhanças químicas e estruturais com o ácido ascórbico.

3.7.3. Compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método descrito por Singleton e Rossi (1965). Juntamente à amostra colocou-se reagente de Folin-Ciocalteu e Na_2CO_3 , ficando à temperatura ambiente durante 30 min. Após este tempo, todas as amostras foram convenientemente homogeneizadas no vórtex antes de se proceder à leitura das absorvâncias a 765 nm.

A concentração de compostos fenólicos foi calculada a partir de uma reta-padrão, tendo-se usado padrões de ácido gálico entre 0 e 25 μg e expressou-se em μg equivalentes de ácido gálico/mg de proteína.

3.8. Prolina

A prolina foi quantificada de acordo Bates *et al.* (1973). As amostras foram homogeneizadas em ácido sulfosalicílico a 3% (p/v), ficando 20 min. na obscuridade. De seguida, a esta mistura adicionou-se ácido acético glacial e uma solução de ácido ninhidrina

(8670 $\mu\text{mol/ml}$) previamente preparada e incubada num banho-Maria a 100 °C, durante 60 min. Após este período, as amostras foram arrefecidas em gelo tendo-se adicionado tolueno, seguindo-se a homogeneização ao vórtex durante 15 segundos.

Para ocorrer a separação do tolueno da fase aquosa, as amostras foram a incubar à temperatura ambiente, na obscuridade, durante 20 min. Finalmente, a fase do tolueno foi recolhida e a sua absorvância medida a 520 nm num espectrofotómetro. O branco é realizado nas mesmas condições, contento todos os compostos, exceto a amostra. A concentração de prolina foi calculada a partir de uma reta-padrão, tendo-se usado padrões de prolina entre 0 e 1 μM . A concentração deste aminoácido foi expressa em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.9. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos na avaliação dos efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados de *C. albicans* foi realizada no programa SigmaPlot 12.0. Após testada a homogeneidade das variâncias com o teste de *Levene's* e a normalidade com o teste *Kolmogorov-Smirnov*, a diferença estatística entre o tratamento ao longo do tempo foi feita recorrendo a uma ANOVA Two-way baseada no teste de Tukey. Os valores do tratamento foram comparados com um grupo controlo, sendo apresentados como médias e com o desvio padrão (SD) correspondente. São consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

De modo a verificar se existiam diferenças nos parâmetros em estudo, todos os dados formam englobados e submetidos a uma ANOVA-fatorial, sendo os fatores: i) estirpe; ii) tempo, iii) concentração de BITC (0M e 0,03M). O programa utilizado foi o STATISTICA 9 (da StatSoft).

Capítulo 4 – Resultados

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

4. Resultados

4.1. ROS totais

Foram determinados os níveis das ROS totais para cada estirpe de *C. albicans*, no meio extra e intracelular (Fig. 10). Em geral, verificamos que existe maior abundância das ROS no meio intracelular do que no extracelular, em todas as estirpes ($p < 0,05$) sem ter em conta o tratamento.

No meio extracelular (Fig. 10A), *C. albicans* O51 foi a estirpe que apresentou um comportamento diferente das outras duas, pois na presença do BITC aumentou as ROS. A estirpe *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O33 não apresentaram diferenças significativas entre o ensaio controlo e o tratamento. Quanto à análise do meio intracelular (Fig. 10B), pode-se observar que as três estirpes se comportaram de modo semelhante, quer no controlo, onde os níveis das ROS aumentaram com o decorrer do tempo, quer no tratamento onde a concentração das ROS se manteve praticamente constante.

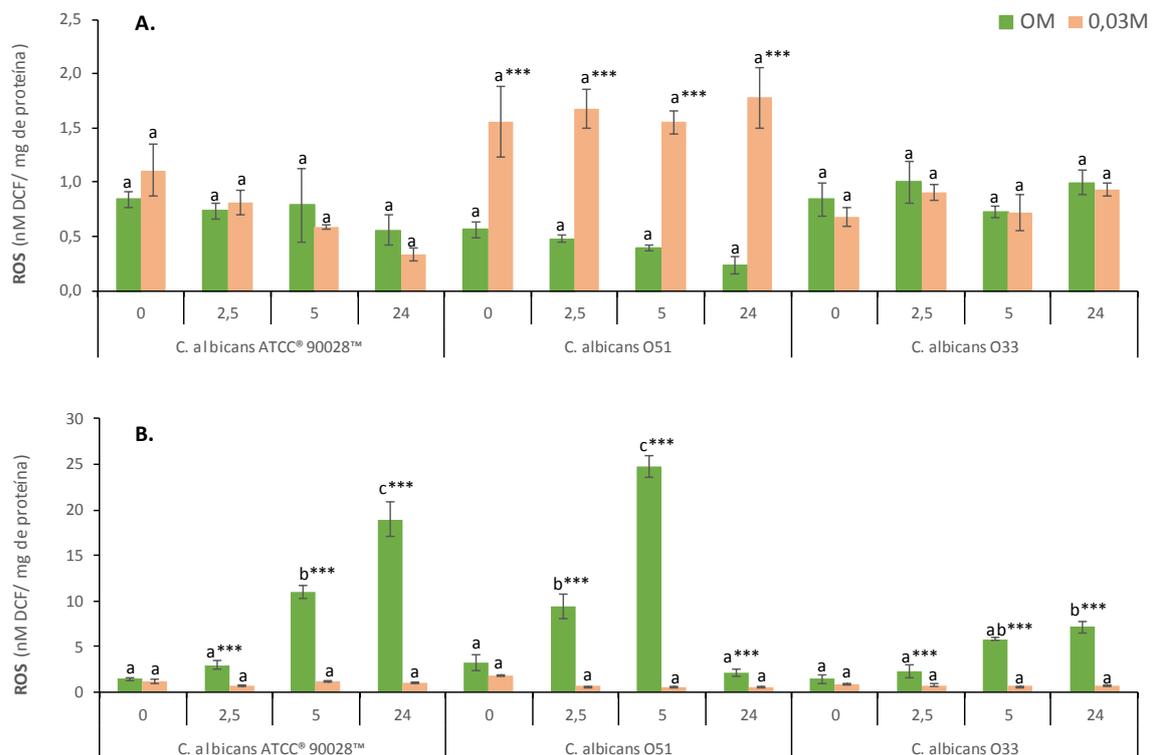


Figura 10 – Quantificação das ROS totais (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Na tabela 1, que representa a análise da variância (teste ANOVA two-way) para o meio extracelular de *C. albicans* ATCC 90028 mostra diferenças significativas para o fator tempo ($p < 0,001$) e, na estirpe *C. albicans* O51, para o fator tratamento (0 M e 0,03 M). As ROS em *C. albicans* O33 também variam significativamente no tempo ($p = 0,004$). Nas células (meio intracelular), todos os fatores (tempo, tratamento), para as três estirpes estudadas, mostraram diferenças significativas ($p < 0,001$).

A interação entre os dois fatores em estudo (tempo x tratamento), no meio intracelular apresenta um valor p altamente significativo ($p < 0,001$) para todas as estirpes (Tab. 1), porém no meio extracelular as diferenças observadas não são significativas ($p > 0,05$) para as três estirpes estudadas.

Tabela 1 – ANOVA two-way das ROS (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	10,66	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	0,080	0,781
		Tempo x Tratamento	3,12	0,055
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	0,479	0,702
		Tratamento (0M e 0,03M)	297,81	<0,001
		Tempo x Tratamento	2,67	0,083
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	6,758	0,004
		Tratamento (0M e 0,03M)	2,664	0,122
		Tempo x Tratamento	0,452	0,719
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	190,44	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	662,63	<0,001
		Tempo x Tratamento	186,63	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	312,22	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	976,55	<0,001
		Tempo x Tratamento	343,10	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	63,15	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	407,56	<0,001
		Tempo x Tratamento	70,82	<0,001

4.2. Peroxidação lipídica (TBARS)

Observando na generalidade o gráfico (Fig. 11), conclui-se que a peroxidação lipídica no controlo (OM) foi superior em *C. albicans* ATCC 90028 e foi aumentando ao longo do tempo, atingindo o pico às 24 horas. Em geral, quando as estirpes foram expostas ao BITC ocorreu um decréscimo do nível da peroxidação lipídica, embora *C. albicans* O51 tenha apresentado um valor de TBARS mais elevado após a adição do BITC e *C. albicans* ATCC 90028 após 24 horas ($p < 0,001$).

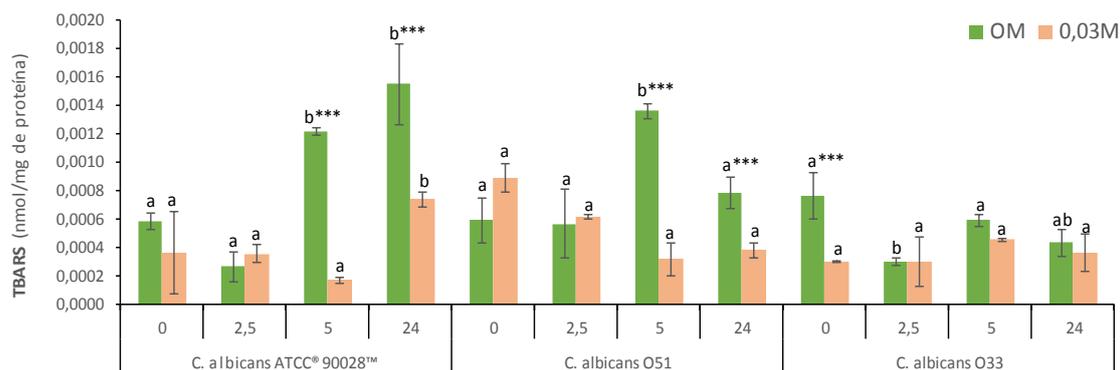


Figura 11 – Quantificação dos TBARS no meio intracelular, em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Relativamente à análise de variância da tabela 2 (teste ANOVA two-way), verificamos que os dois fatores em estudo (tempo e tratamento), assim como a sua combinação, mostram diferenças significativas ($p < 0,001$) nas três estirpes.

Tabela 2 – ANOVA two-way dos TBARS (meio intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	33,68	<0,001
	Tratamento (0M e 0,03M)	63,47	<0,001
	Tempo x Tratamento	17,63	<0,001
<i>C. albicans</i> O51	Tempo	155,50	<0,001
	Tratamento (0M e 0,03M)	161,11	<0,001
	Tempo x Tratamento	157,38	<0,001
<i>C. albicans</i> O33	Tempo	6,869	0,003
	Tratamento (0M e 0,03M)	15,01	0,001
	Tempo x Tratamento	5,732	0,007

4.3. Sistema enzimático de defesa antioxidante

4.3.1. Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) também foi determinada no meio extra e intracelular para as três estirpes em estudo.

No meio extracelular (Fig. 12A), verificaram-se comportamentos variados nas diferentes estirpes, em ambos os tratamentos. *C. albicans* ATCC 90028 apenas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos passadas 24 horas, *C. albicans* O51 mostrou uma diminuição acentuada ($p < 0,001$) quando sujeita ao BITC. Por último, *C. albicans* O33

comportou-se de modo inverso à estirpe anterior, pois a concentração desta enzima aumentou com o BITC.

No meio intracelular (Fig. 12B), as três estirpes têm um comportamento similar, pois, observou-se que no ensaio controlo existiu uma diminuição significativa após as 5 horas, aumentado posteriormente até as 24 horas. Com o tratamento, verificou-se que o nível desta enzima em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O51 praticamente não variou ao longo do tempo, enquanto em *C. albicans* O33 sofreu oscilações com decorrer do tempo.

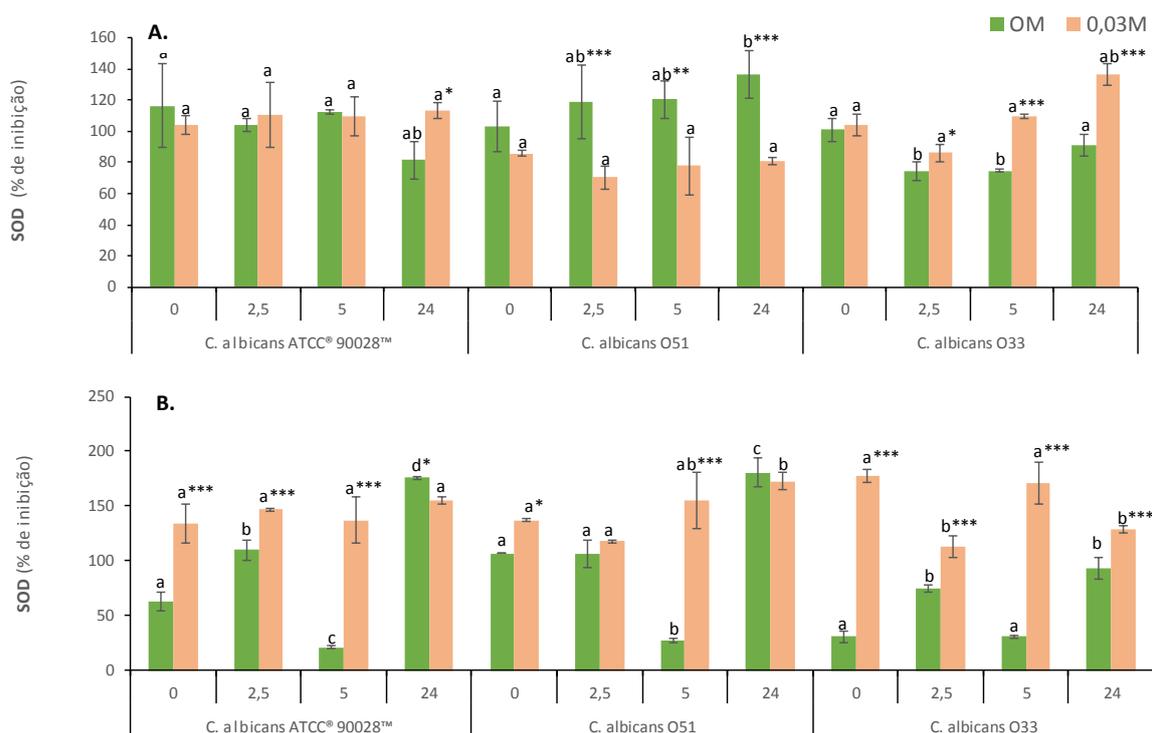


Figura 12 – Quantificação da enzima superóxido dismutase (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$

Recorrendo à ANOVA two-way relativa à enzima SOD (Tab. 3), podemos verificar que, a nível extracelular, *C. albicans* ATCC 90028 não apresenta diferenças significativas, no fator tempo ($p = 0,339$), no fator tratamento ($p = 0,323$) e na interação dos dois fatores ($p = 0,075$). *C. albicans* O51, apenas apresenta diferenças significativas no fator tratamento ($p < 0,001$) e *C. albicans* O33 apresenta diferenças para todos os fatores. O mesmo se verifica no meio intracelular, independentemente da estirpe e do fator em questão.

Tabela 3 – ANOVA two-way da enzima SOD (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	1,208	0,339
		Tratamento (0M e 0,03M)	1,039	0,323
		Tempo x Tratamento	2,782	0,075
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	1,375	0,286
		Tratamento (0M e 0,03M)	49,93	<0,001
		Tempo x Tratamento	2,064	0,145
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	31,00	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	86,40	<0,001
		Tempo x Tratamento	15,18	<0,001
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	72,96	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	133,04	<0,001
		Tempo x Tratamento	43,01	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	59,52	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	72,81	<0,001
		Tempo x Tratamento	40,54	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	3,971	0,027
		Tratamento (0M e 0,03M)	602,51	<0,001
		Tempo x Tratamento	70,07	<0,001

4.3.2. Catalase

Foi determinada a CAT, tanto a nível extra como intracelular e verificou-se que as três estripes apresentaram comportamentos diferentes (Fig. 13).

No meio extracelular (Fig. 13A), a concentração desta enzima na estirpe *C. albicans* ATCC 90028 foi mais elevada às 0 horas, quando exposta ao BITC, e às 5 horas no ensaio controlo, representando assim diferenças significativas entre tratamentos nestes períodos de tempo específicos. *C. albicans* O51 e *C. albicans* O33 apresentaram concentrações menores de CAT comparativamente à estirpe anterior, sendo que em *C. albicans* O33 existiram menos diferenças significativas entre o controlo e o tratamento.

No meio intracelular (Fig. 13B), na estirpe *C. albicans* ATCC 90028, deu-se um aumento da enzima CAT ao longo do tempo, com a presença de BITC, em contrapartida, em *C. albicans* O51 apresentou níveis de CAT mais elevados no controlo, embora com o BITC os níveis desta enzima tenham diminuído. Em *C. albicans* O33, só se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos após 24 horas.

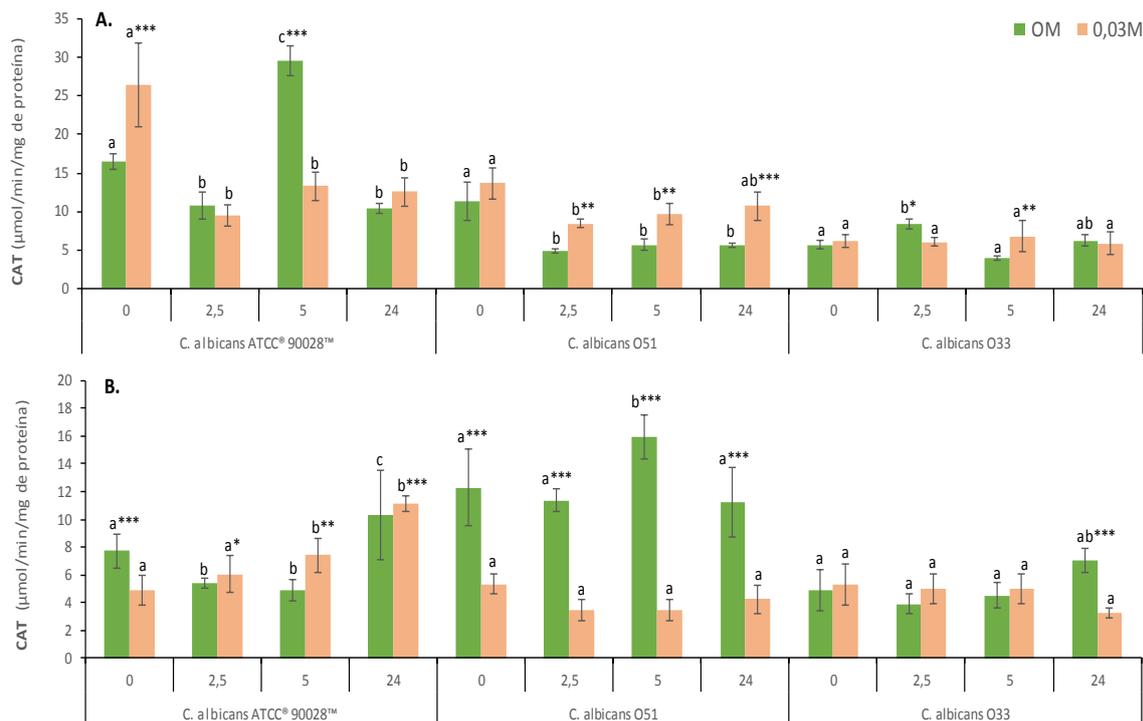


Figura 13 – Quantificação da enzima catalase (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05)

Apesar de haver variação de comportamento entre as três estirpes, podemos observar, através da ANOVA two-way apresentada na tabela 4, que, em cada uma das estirpes existe sempre um fator que não é estatisticamente significativo, ou seja, apresentam um valor p superior a 0,05. A combinação dos dois fatores (tempo x tratamento) diz-nos que existem diferenças significativas para todas as estirpes (tanto no meio extracelular como intracelular) à exceção da *C. albicans* O51 no meio extracelular (p = 0,460).

Tabela 4 – ANOVA two-way da enzima CAT (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	39,38	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	1,85	0,192
		Tempo x Tratamento	31,08	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	19,79	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	41,89	<0,001
		Tempo x Tratamento	0,906	0,460
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	3,218	0,051
		Tratamento (0M e 0,03M)	0,123	0,730
		Tempo x Tratamento	6,341	0,005
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	15,29	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	0,222	0,644
		Tempo x Tratamento	3,613	0,036
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	2,633	0,085
		Tratamento (0M e 0,03M)	179,71	<0,001
		Tempo x Tratamento	4,201	0,023
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	0,558	0,651
		Tratamento (0M e 0,03M)	1,154	0,299
		Tempo x Tratamento	6,817	0,004

4.4. Peróxido de hidrogénio

Quantificámos o peróxido de hidrogénio nas estirpes em estudo e nos diferentes meios. Observando a figura 14, verificou-se que existe uma concentração mais elevada de H₂O₂ no meio extracelular.

No meio extracelular, apesar das três estirpes terem o mesmo comportamento ao longo do tempo, ou seja, demonstraram uma quantidade de H₂O₂ maior no ensaio com 0,03M de BITC, a estirpe *C. albicans* ATCC 90028, destacou-se por ter a concentração mais elevada deste composto.

Quanto ao meio intracelular, *C. albicans* O33 apresentou a concentração de H₂O₂ mais elevada, sendo notoriamente mais elevada no ensaio controlo, enquanto nas outras duas estirpes não foi observado um padrão consistente, apresentando variações ao longo do tempo.

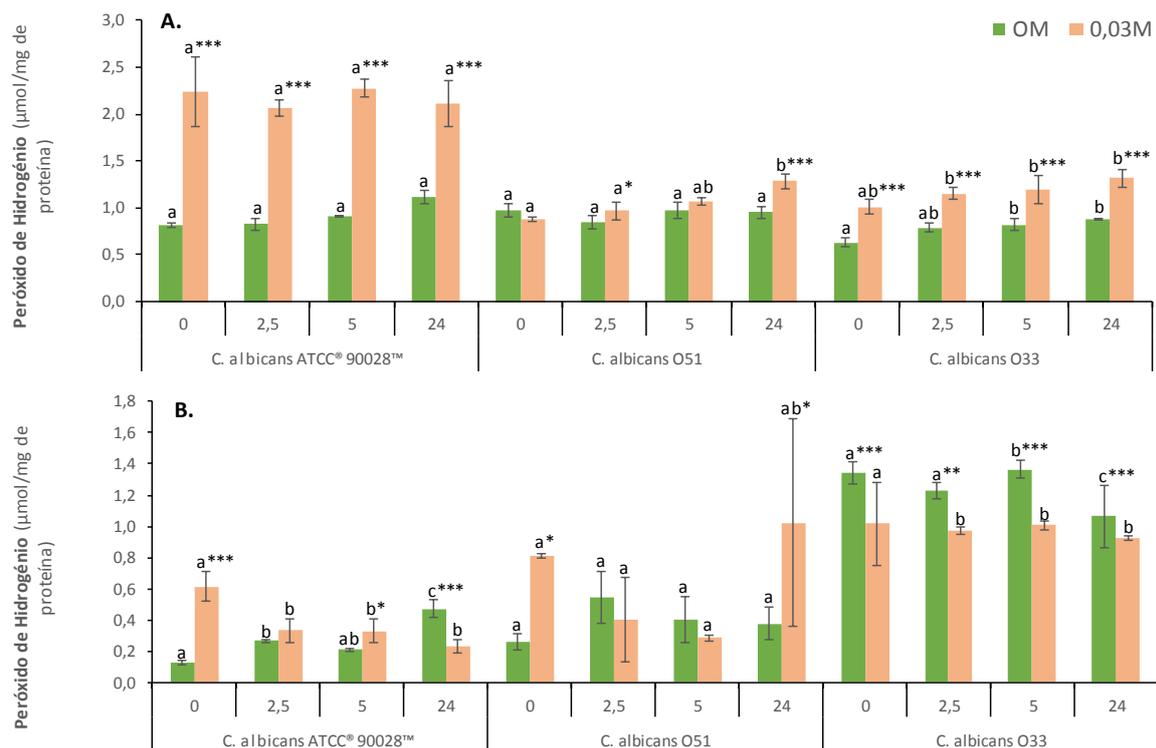


Figura 14 – Quantificação do peróxido de hidrogênio (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$

Analisando a ANOVA two-way para este parâmetro (Tab. 5), apenas *C. albicans* O33 mostra diferenças estatisticamente significativas no fator tempo, em ambos os meios ($p < 0,001$). Intracelularmente, as três estirpes apresentam diferenças significativas para o fator tempo x tratamento ($p < 0,05$). Contudo, no meio extracelular tal só se verifica em *C. albicans* O51.

Tabela 5 – ANOVA two-way do peróxido de hidrogénio (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	1,206	0,340
		Tratamento (0M e 0,03M)	336,41	<0,001
		Tempo x Tratamento	1,904	0,170
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	11,92	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	16,38	<0,001
		Tempo x Tratamento	9,339	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	12,42	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	142,36	<0,001
		Tempo x Tratamento	0,273	0,844
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	3,821	0,031
		Tratamento (0M e 0,03M)	21,50	<0,001
		Tempo x Tratamento	40,20	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	0,867	0,478
		Tratamento (0M e 0,03M)	2,058	0,171
		Tempo x Tratamento	5,807	0,007
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	87,99	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	168,57	<0,001
		Tempo x Tratamento	190,60	<0,001

4.5. Razão GSH/GSSG

Realizou-se a quantificação de GSH e da GSSG, para posteriormente analisar-se a razão entre ambas. Como todos os outros parâmetros determinados, este também se obteve nas três estirpes e no meio extra e intracelular.

Analisando a figura 15, podemos dizer que existe uma razão menor entre a glutathione reduzida e oxidada no meio intracelular.

C. albicans ATCC 90028 e *C. albicans* O51 apresentaram nos meios extracelular (Fig. 15A) e intracelular (Fig. 15B), um padrão similar de comportamento no decorrer do tempo, ao contrário de *C. albicans* O33 que exibiu um comportamento diferente entre os dois meios. Contudo, e em geral, não existiram diferenças significativas quer entre o controlo e o tratamento, quer entre os diferentes tempos (salvo alguns casos pontuais).

Capítulo 4 - Resultados

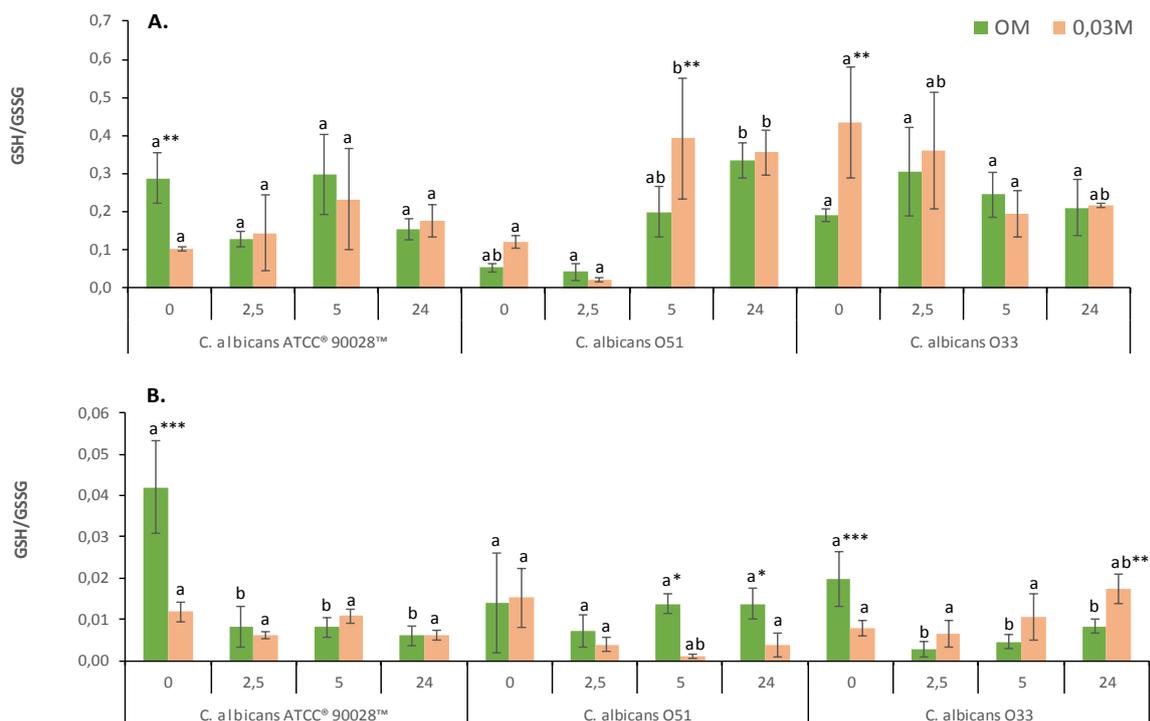


Figura 15 – Quantificação da razão GSH/GSSG (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$)

Como foi descrito anteriormente, praticamente não existem diferenças entre os fatores de estudo, como podemos verificar no teste de ANOVA apresentado na tabela 6. Na combinação tempo x tratamento apenas se observam diferenças significativas no meio intracelular para em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O33 ($p < 0,001$).

Tabela 6 – ANOVA two-way da razão GSH/GSSG (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	3,138	0,055
		Tratamento (0M e 0,03M)	2,974	0,104
		Tempo x Tratamento	2,438	0,102
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	31,36	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	5,665	0,030
		Tempo x Tratamento	2,823	0,072
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	2,574	0,090
		Tratamento (0M e 0,03M)	2,743	0,117
		Tempo x Tratamento	2,771	0,075
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	26,38	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	14,86	0,001
		Tempo x Tratamento	16,50	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	3,059	0,058
		Tratamento (0M e 0,03M)	7,608	0,014
		Tempo x Tratamento	1,952	0,162
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	8,183	0,002
		Tratamento (0M e 0,03M)	1,281	0,274
		Tempo x Tratamento	9,308	<0,001

4.6. Ácido eritro-ascórbico

Na figura 16 está representada a determinação do ácido eritro-ascórbico, realizada em ambos os meios (extra e intracelular), nas três estirpes de *C. albicans*. É notoriamente visível a maior concentração de ácido eritro-ascórbico no interior das células (Fig. 16B). A estirpe *C. albicans* ATCC 90028 apresentou, tanto no meio extra como no intracelular, uma maior concentração de ácido eritro-ascórbico no ensaio BITC até às 5 horas. Pelo contrário, em *C. albicans* O51, observou-se uma concentração mais elevada no controlo, sendo esta mais elevada às 5 e às 24 horas (meio intracelular). Em *C. albicans* O33 não existem diferenças significativas entre os tratamentos (excetuando às 2,5 horas).

No meio extracelular, por norma, não existem diferenças significativas entes os tratamentos ($p > 0,05$).

Capítulo 4 - Resultados

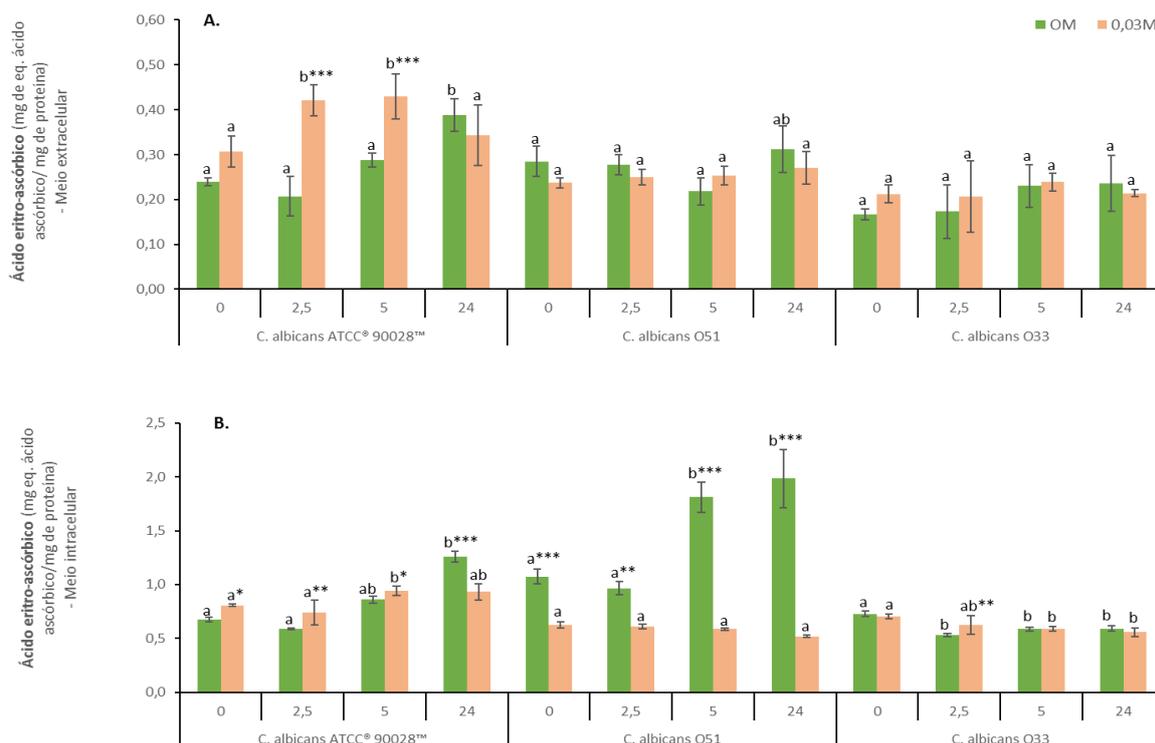


Figura 16 – Quantificação do ácido eritro-ascórbico (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$

Analisando a ANOVA two-way para a quantificação do ácido eritro-ascórbico (Tab. 7), apenas em *C. albicans* ATCC 90028, no meio extracelular, de verificaram diferenças significativas para os três fatores ($p \leq 0,003$), e em *C. albicans* O51 apenas no fator tempo ($p = 0,048$).

Intracelularmente, somente no fator tratamento e em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O33 não existiram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabela 7 – ANOVA two-way do ácido eritro-ascórbico (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	6,913	0,003
		Tratamento (0M e 0,03M)	33,132	<0,001
		Tempo x Tratamento	11,340	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	3,281	0,048
		Tratamento (0M e 0,03M)	2,663	0,122
		Tempo x Tratamento	2,266	0,120
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	2,404	0,106
		Tratamento (0M e 0,03M)	1,156	0,298
		Tempo x Tratamento	0,938	0,446
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	70,221	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	0,164	0,691
		Tempo x Tratamento	24,147	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	26,144	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	356,020	<0,001
		Tempo x Tratamento	35,994	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	18,556	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	0,400	0,536
		Tempo x Tratamento	3,476	0,041

4.7. Compostos fenólicos

Foram quantificados os níveis de compostos fenólicos para cada estirpe de *C. albicans*, no meio extra e intracelular (Fig. 17), verificando-se que no meio intracelular (Fig. 17B), existe uma concentração de compostos fenólicos mais elevada.

As estirpes *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O33, comportaram-se de modo semelhante em ambos os meios, pois apresentaram maior concentração destes compostos com a adição do BITC, à exceção das 24 horas no meio intracelular que se observou maior concentração no controlo ($p < 0,05$).

Em *C. albicans* O51, a concentração dos compostos fenólicos foi mais elevada na situação de controlo, para ambos os meios.

Capítulo 4 - Resultados

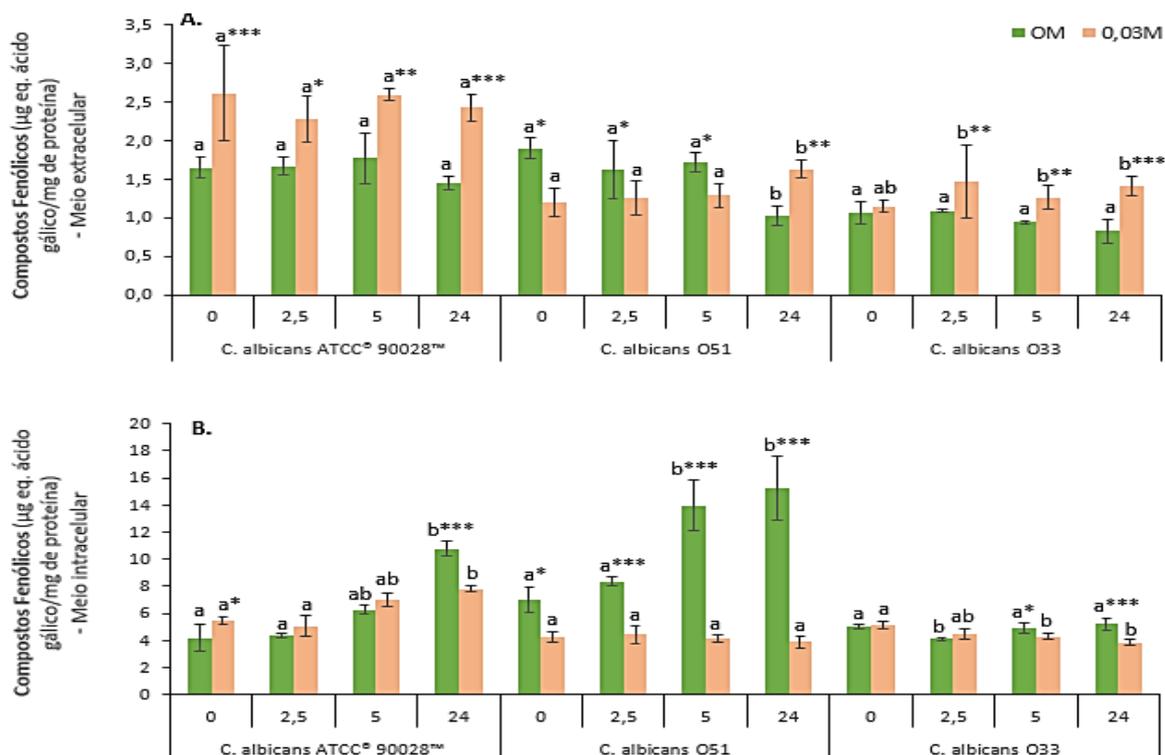


Figura 17 – Quantificação dos compostos fenólicos (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$

Analisando a ANOVA two-way para a quantificação dos compostos fenólicos (Tab. 8), é de salientar que no meio extracelular o fator tempo não foi significativo, ou seja, apresentou um valor de $p > 0,05$.

No meio intracelular, todos os fatores apresentaram diferenças significativas nas diferentes estirpes ($p < 0,05$), à exceção do fator tratamento para a estirpe *C. albicans* ATCC 90028.

Tabela 8 – ANOVA two-way dos compostos fenólicos (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p	
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	1,007	0,415	
		Tratamento (0M e 0,03M)	51,404	<0,001	
		Tempo x Tratamento	0,521	0,674	
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	1,448	0,266	
		Tratamento (0M e 0,03M)	8,073	0,012	
		Tempo x Tratamento	13,044	<0,001	
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	2,705	0,080	
		Tratamento (0M e 0,03M)	43,086	<0,001	
		Tempo x Tratamento	3,691	0,034	
	Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	87,318	<0,001
			Tratamento (0M e 0,03M)	0,0580	0,813
			Tempo x Tratamento	18,717	<0,001
<i>C. albicans</i> O51		Tempo	16,282	<0,001	
		Tratamento (0M e 0,03M)	212,673	<0,001	
		Tempo x Tratamento	19,784	<0,001	
<i>C. albicans</i> O33		Tempo	6,444	0,005	
		Tratamento (0M e 0,03M)	8,638	0,010	
		Tempo x Tratamento	9,422	<0,001	

4.8. Prolina

Foi determinada a prolina igualmente no meio extracelular e intracelular, nas três estirpes em estudo.

Neste caso, e analisando a figura 18, observamos que as estirpes *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O33 têm um comportamento similar, tanto nos meios extra (Fig. 18A) como no intracelular (Fig. 18B), contudo existiram diferenças significativas entre os tratamentos e ao longo do tempo, para todas as estirpes.

No meio extracelular observou-se uma particularidade nas três estirpes, pois a concentração de prolina no grupo controlo diminuiu drasticamente ao fim de 24 horas.

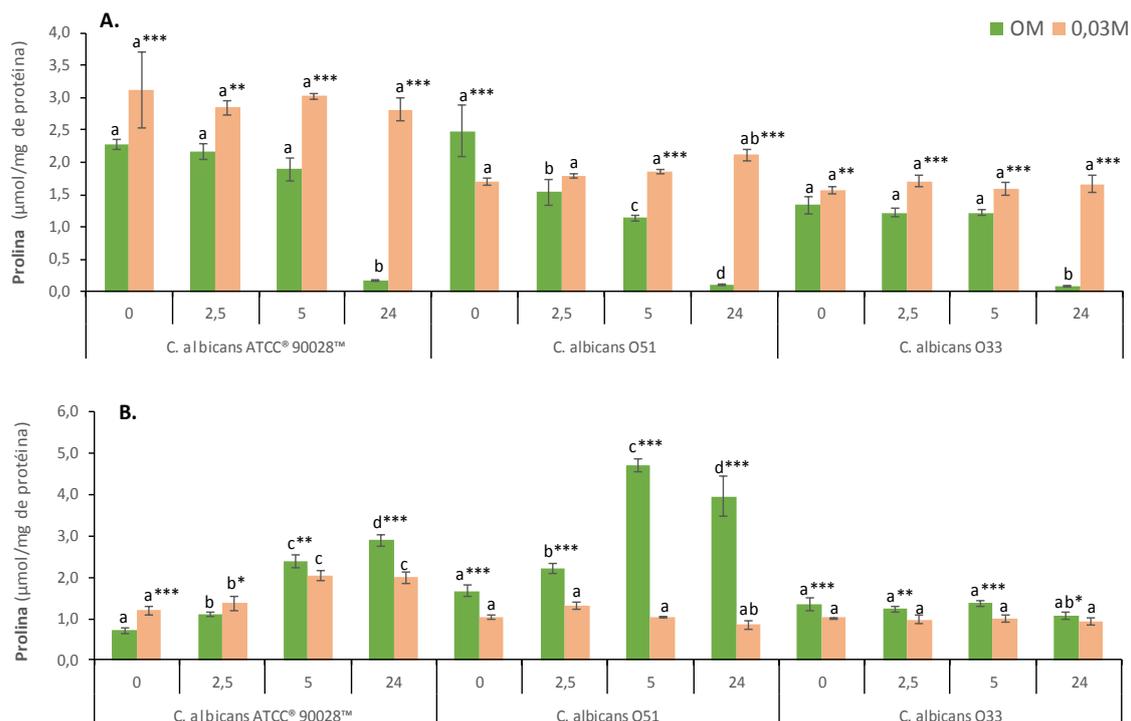


Figura 18 – Quantificação da prolina (A. meio extracelular; B. meio intracelular) em diferentes estirpes de *C. albicans*, a 0M e a 0,03M de BITC ao longo do tempo (0 – 24 horas). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os períodos de exposição para o mesmo tratamento, na mesma estirpe. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, na mesma estirpe (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Para complementar a figura anterior, podemos comprovar através do teste ANOVA two-way (Tab. 9) que a maioria dos fatores em estudo apresentou diferenças estatisticamente significativas, pois apresentou um valor de p muito baixo ($p < 0,001$). Apenas em *C. albicans* O33 se observou um valor de p superior a 0,05 ($p = 0,181$).

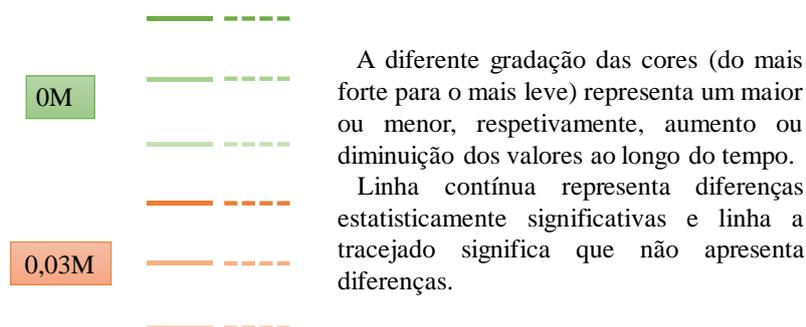
Tabela 9 – ANOVA two-way da prolina (meio extracelular e intracelular) para cada estirpe de *C. albicans*

Meio	Estirpe	Fator	Valor F	Valor p
Extracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	31,13	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	187,16	<0,001
		Tempo x Tratamento	21,39	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	37,42	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	68,28	<0,001
		Tempo x Tratamento	77,25	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	61,19	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	329,97	<0,001
		Tempo x Tratamento	71,84	<0,001
Intracelular	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Tempo	192,87	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	5,440	0,033
		Tempo x Tratamento	35,48	<0,001
	<i>C. albicans</i> O51	Tempo	69,06	<0,001
		Tratamento (0M e 0,03M)	660,00	<0,001
		Tempo x Tratamento	90,34	<0,001
	<i>C. albicans</i> O33	Tempo	6,037	0,006
		Tratamento (0M e 0,03M)	53,90	<0,001
		Tempo x Tratamento	1,839	0,181

4.9. Integração simplificada do observado para cada estirpe de *C. albicans* em estudo

As figuras a baixo apresentadas dizem respeito às três estirpes estudadas, nas duas diferentes situações, controlo (0M) e tratamento com BITC (0,03M). Foram baseadas nos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos quantificados e descritos anteriormente, considerando um aumento ou diminuição com base da comparação entre as 0 horas e as 24 horas, para uma melhor compreensão do que acontece dentro e fora da célula.

Para uma melhor compreensão das seguintes imagens, segue o seguinte esquema de análise:



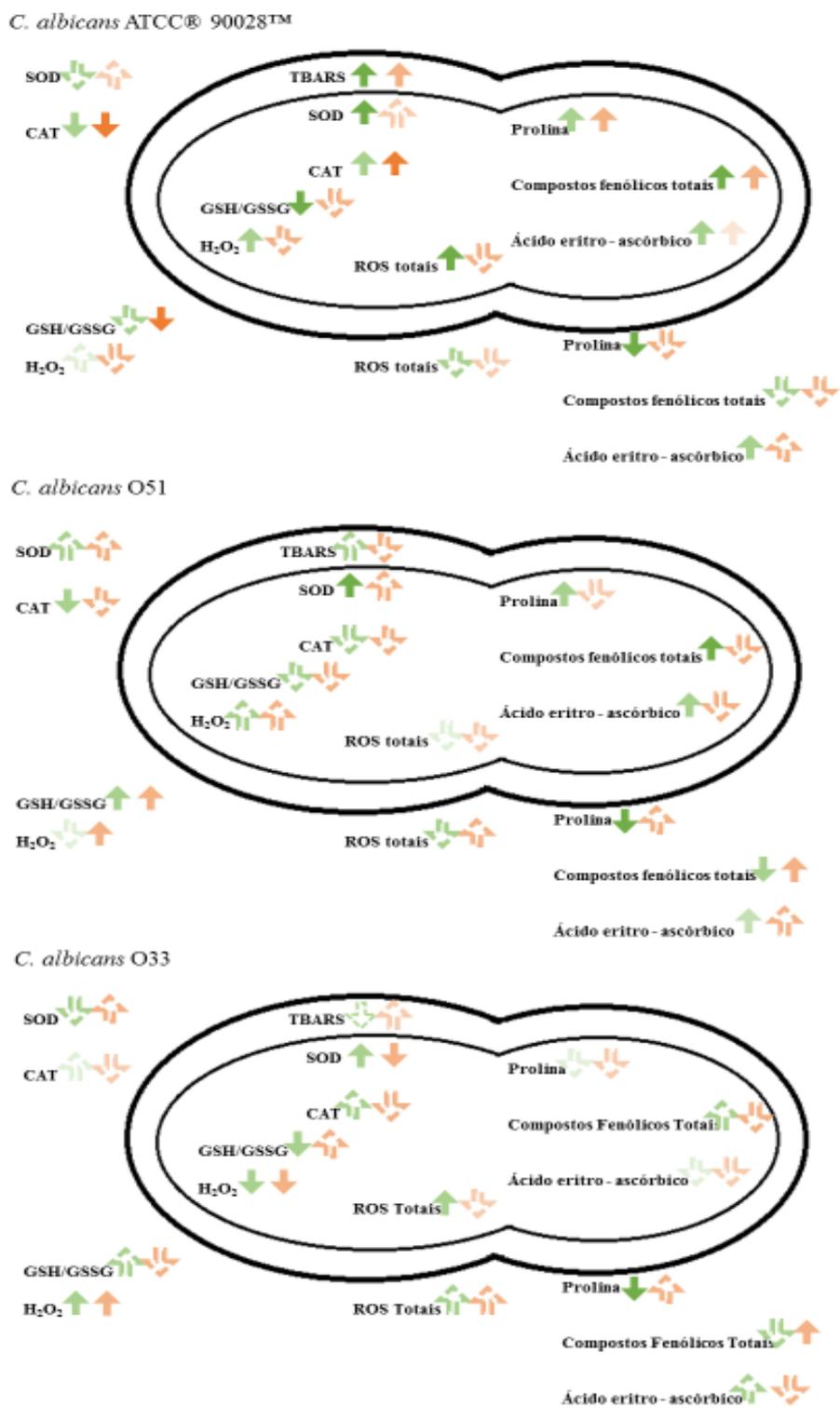


Figura 19 – *C. albicans* ATCC® 90028™, *C. albicans* O51 e *C. albicans* O33, apresentando o meio extracelular e intracelular, para o controle (0M) e para o tratamento (0,03M).

Depois de se efetuar uma ANOVA-fatorial com a finalidade de testar o efeito dos fatores “estirpes utilizadas”, “tempo” e “tratamento” nos parâmetros analisados, podemos afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros (Tab. 10).

Tabela 10 – ANOVA-fatorial para o meio intracelular, combinado com os fatores “estirpe” (*C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* O51 e *C. albicans* O33, “tempo” (0 a 24 horas) e “tratamento” (0 M e 0,03 M).

	<u>Meio intracelular</u>		<u>Meio extracelular</u>	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
CAT	6,35	<0,001	24,22	<0,001
SOD	8,84	<0,001	4,36	<0,001
GSH/GSSG	8,13	<0,001	3,97	0,003
TBARS	156,43	<0,001	20,84	<0,001
Peroxido hidrogénio	33,54	<0,001	3,76	0,004
Ácido ascórbico	20,38	<0,0001	4,10	0,0021
Compostos fenólicos	10,15	<0,0001	2,91	0,017
ROS	190,69	<0,001	3,414	0,007
Prolina	46,932	<0,001	7,57	<0,001

Podemos assim concluir que existem diferenças significativas para todos os parâmetros em estudo quando combinamos os fatores testados (estirpe x concentração de BITC x tempo de exposição ao BITC) quer no meio intra como no extracelular.

Capítulo 5 – Discussão

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

5. Discussão

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm sido uma das principais causas de doença em pacientes imunocomprometidos, tendo por isso aumentado o uso de antifúngicos, prática que pode resultar no aumento da resistência dos fungos a estes compostos. A levedura patogénica mais frequente é *C. albicans*, capaz de superar as defesas do hospedeiro, permitindo assim que ocorra infecção e colonização (Calderone *et al.*, 2001). Embora existam estudos que mostram que os ITCs têm atividade antifúngica (Meca, 2015; Vig *et al.*, 2009), o seu modo de ação é desconhecido. Recentemente, Pereira (2017) mostrou que um dos efeitos era o aumento das ROS. Neste contexto o presente estudo testou em isolados orais de *C. albicans*, o efeito do BITC, a fim de compreender a sua influência no stresse oxidativo.

Nos fungos, a produção das ROS ocorre no decurso da atividade metabólica (respiração aeróbia), podendo ser potenciada/influenciada por outros agentes de stresse como a falta de nutrientes, radiação, danos ultra estruturais ou interações com outros organismos vivos (Barbaneagra *et al.*, 2010). Assim, a regulação do nível das ROS parece ser importante para o desenvolvimento dos fungos (Barbaneagra *et al.*, 2010).

O ensaio controlo para as três estirpes, mostrou que a concentração das ROS totais nas células aumentou ao longo do ensaio, muito provavelmente devido à escassez em nutrientes (o crescimento foi feito em sistema fechado) e à acumulação de produtos de excreção. Após a adição do BITC, verificou-se a diminuição das ROS totais para as três estirpes. No trabalho desenvolvido por Pereira (2017), estes três isolados apresentaram elevados níveis de stresse oxidativo, por observação ao microscópio de fluorescência, a uma concentração de BITC 0,05 M, principalmente entre as 5 e 24 horas de exposição ao BITC, causando a morte das células. No presente trabalho foi utilizada uma concentração mais baixa de BITC (0,03 M), de modo a termos biomassa suficiente para avaliar o seu efeito ao longo de 24 horas, no stresse oxidativo da célula.

As ROS são compostos que afetam uma grande variedade de componentes celulares levando, por exemplo, à peroxidação lipídica. Estima-se que o stresse oxidativo ocorra quando os mecanismos de sobrevivência antioxidante são incapazes de lidar com as ROS ou com os danos que estas podem causar (Morano *et al.*, 2012). Assim, pode-se dizer que quanto maior a produção de ROS, maior será a peroxidação lipídica, o que se verificou para as três estirpes estudadas na situação controlo e com o BITC em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O51. Pelo contrário, na estirpe *C. albicans* O33 verificou-se o inverso (a peroxidação lipídica

diminuiu enquanto as ROS totais aumentaram). Por outro lado, quando os isolados estão em contato com o BITC, verificamos uma diminuição da produção de ROS intracelulares, e conseqüentemente uma diminuição da peroxidação lipídica, sugerindo que na presença do BITC e a esta concentração, a membrana foi menos afetada. Os glucosinolatos e os seus produtos de hidrólise, como o BITC, são considerados antioxidantes indiretos não sendo capazes de neutralizar os radicais livres, mas modulando a atividade das enzimas do metabolismo xenobiótico (enzimas de fase I e fase II), o que desencadeia uma atividade antioxidante de longa duração (Vig *et al.*, 2009), que protege a célula da produção das ROS.

Relativamente ao sistema de enzimas de defesa antioxidante, *C. albicans*, contém seis enzimas SOD distribuídas entre diferentes compartimentos celulares. As SOD1-3 são enzimas intracelulares, enquanto as SOD4-6 estão associadas à parede celular. As SOD extracelulares têm um papel vital na desintoxicação de radicais superóxido gerados pelos fagócitos (Dantas *et al.*, 2015). Assim, e de uma maneira geral, a nível extracelular quando há um aumento da quantidade/atividade de SOD dá-se uma diminuição das ROS, enquanto a diminuição da quantidade/atividade desta enzima resulta no aumento das ROS. Está descrito que foram encontradas duas peroxidases na superfície celular (parede celular) de *C. albicans*, uma peroxidase específica de tiol (Tsa1) e a catalase (Cat1). Podemos então considerar que estes mecanismos extracelulares, usados para eliminar as ROS, provavelmente terão sido ativados, por ação do BITC, nos isolados *C. albicans* O51 e *C. albicans* O33, diminuindo o nível das ROS no interior das células ao longo do tempo. Tal, provavelmente pode refletir a adaptação deste fungo patogénico na prevenção da acumulação intracelular de níveis tóxicos das ROS (Dantas *et al.*, 2015).

Estudos realizados em *Arabidopsis*, utilizando a adição exógena de dois isotiocianatos diferentes, como o PEITC (isotiocianato de fenilo) e o AITC, mostraram que ambos aumentaram a tolerância da planta ao calor, aumentando o nível de expressão de proteínas de choque térmico e a acumulação de H₂O₂ (Martínez-ballesta *et al.*, 2013). A acumulação do peróxido de hidrogénio era devida à inibição da atividade da catalase (Martínez-ballesta *et al.*, 2013). O mesmo parece estar a acontecer com o isolado de *C. albicans* O51 onde, na presença do BITC, quer no meio intra como no extracelular, houve uma diminuição da atividade da CAT, o que resultou na acumulação de peróxido de hidrogénio. Contrariamente, e para as mesmas condições, na estirpe *C. albicans* ATCC 90028 houve um aumento significativo na atividade da CAT, resultando numa diminuição de H₂O₂ no interior da célula.

Em geral, observou-se, com o BITC, um aumento do H₂O₂ e a diminuição das ROS. Visto que o H₂O₂ é apenas uma das espécies reativas de oxigênio e é destoxificado pela CAT, APx e GPx, quando por algum motivo a suas atividades são comprometidas ocorre um aumento na concentração do H₂O₂.

As ROS também funcionam em processos de sinalização e possuem características importantes, nomeadamente a sua capacidade em se deslocarem entre compartimentos diferentes e ainda a sua passagem pela membrana. Assim, Bienert et al., 2007, apresentou evidências de que o H₂O₂ pode ser transportado através da membrana por aquaporinas em cinco estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. Com este facto, podemos justificar a maior concentração de H₂O₂ no exterior da célula, pois estando a célula em stresse, provoca um aumento de H₂O₂, e este, possivelmente, estará a ser exportado para o exterior da célula através de aquaporinas.

A GSH intervém em vários processos celulares, incluindo o transporte de aminoácidos, a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, a modulação da atividade enzimática e o metabolismo de substâncias carcinogénicas, xenobióticas e das ROS (Morano *et al.*, 2012). A GSH é um metabolito essencial em leveduras, pois parece ser necessário, em condições normais de crescimento, no equilíbrio NADPH/NADP⁺ e, aquando do stresse oxidativo converte-se em glutatona oxidada (GSSG) (Morano *et al.*, 2012). Por norma, com o BITC, a razão GSH/GSSG diminui ao longo do tempo, no meio intracelular, possivelmente porque a célula produz mais GSSG, diminuindo a razão entre as duas glutatonas, como se verificou em *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O51. Por outro lado, Yeh *et al.*, 2016, afirmam que o BITC pode inibir a atividade da glutatona redutase, ou seja, a conversão de GSSG em GSH será menor, acumulando-se mais GSSG. Este aumento pode também ser devido ao aumento da atividade da enzima glutatona peroxidase, não quantificada neste trabalho.

A maior parte da glutamina é metabolizada pela via do glutamato, que por sua vez pode ser usado para a síntese de glutatonas e de aminoácidos (como por exemplo a prolina), ou sofrer oxidação, total ou parcial, em CO₂ ou glucose (Watford, 2008). Assim, *C. albicans* pode utilizar o glutamato, de modo a sintetizar glutatonas ou prolina. Com base nos resultados, podemos especular que este fungo pode optar por diferentes vias de utilização do glutamato, pois, em geral quando a razão das glutatonas (GSH/GSSG) diminui, aumenta o nível de prolina e vice-versa, quer na situação de controlo quer com o BITC.

O ácido ascórbico é um antioxidante que geralmente atua em junção redox com a glutatona em muitos eucariotas. As leveduras não sintetizam este composto, mas contêm um análogo do ascorbato, o eritroascorbato, que tem uma importância limitada como antioxidante

(Morano *et al.*, 2012). O *alo-1*, que codifica a D-arabinono-1,4-lactona oxidase, enzima que catalisa o passo final na biossíntese de eritroascorbato, é sensível ao peróxido de hidrogénio e ao anião superóxido (Morano *et al.*, 2012). No entanto, os níveis extremamente baixos de eritroascorbato detetados em leveduras tornam o seu papel funcional como um antioxidante questionável (Morano *et al.*, 2012). Neste estudo, podemos verificar que as três estirpes se comportaram de modo diferente relativamente a este antioxidante. Intracelularmente, *C. albicans* ATCC 90028 apresenta uma maior concentração quando sujeita ao BITC enquanto *C. albicans* O33 apresentou maior concentração no controlo, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. O mesmo não acontece com *C. albicans* O51 pois não existe diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$). Com isto, podemos dizer que na estirpe *C. albicans* ATCC 90028, o BITC pode ter potenciado a síntese deste antioxidante.

Em geral, os compostos fenólicos são considerados antioxidantes devido às suas propriedades químicas (Zheng e Wang, 2001), mas não existem estudos realizados sobre o seu efeito ao nível do stresse oxidativo nos fungos. Nos isolados estudados, verificámos que no controlo, a concentração de compostos fenólicos aumentou no meio intracelular e diminuiu no extracelular, sugerindo que as células produziram compostos fenólicos ao longo do tempo. Por outro lado, na presença do BITC, a sua concentração dentro das células variou com a estirpe, pois em *C. albicans* ATCC 90028, a concentração de compostos fenólicos aumentou, em *C. albicans* O51 manteve-se e em *C. albicans* O33 diminuiu. De um modo geral, parece haver um paralelismo entre a concentração de compostos fenólicos e de prolina, tanto no meio extracelular como intracelular.

Muitas espécies de plantas reagem a diferentes stresses abióticos acumulando solutos orgânicos, como a prolina (Ozden *et al.*, 2009). Com esta afirmação podemos dizer que quanto maior for o nível stresse, maior será a concentração de prolina existente. Em geral, no presente estudo, observamos que as três estirpes sujeitas ao BITC, apresentaram menor concentração de prolina no meio intracelular e maior no meio extracelular, quando comparadas com o grupo controlo, sugerindo que este aminoácido não esteja a ser transportado para o interior das células. Tal poderá ser devido ao menor crescimento observado na situação do tratamento, ou a alterações na permeabilidade membranar.

A exposição de *C. albicans* a antifúngicos induz respostas de stresse que dependem da concentração e da natureza do composto. Fungicidas como as equinocandinas e os polienos em concentrações acima da concentração mínima inibitória (MIC), induzem respostas que

conduzem à morte celular. Com os fungistáticos, como os azoles, à MIC o crescimento é inibido, mas as células não são mortas (Cannon *et al.*, 2017).

No decorrer da análise das estirpes utilizadas verifica-se que as três se comportaram de maneira diferente quando submetidas às mesmas condições. Sabe-se que a maioria dos mecanismos de resistência aos antifúngicos estabelecidos são devidos a mutações genéticas - geralmente modificações pontuais em genes que codificam alvos de medicamentos ou enzimas nas vias metabólicas, ou ainda fatores de transcrição que levam à sobreexpressão genética (Cannon *et al.*, 2017). Assim as diferentes respostas das estirpes, podem ser justificadas devido à existência de diferentes genótipos.

Capítulo 6 – Conclusões e Perspetivas Futuras

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

6.1. Conclusões

Com a realização deste trabalho podemos concluir que, em geral, o BITC induziu stresse oxidativo logo após a sua adição (tempo 0), ativando os mecanismos de defesa antioxidante. Adicionalmente, houve diferenças significativas na resposta ao stresse induzido pelo BITC entre as três estirpes. Apesar do número de estirpes estudadas não ser elevado, podemos concluir que estas respostas são estirpe-dependentes.

Seguem-se as conclusões mais importantes por cada parâmetro medido:

- No ensaio controlo, dentro das células observou-se um aumento das ROS, havendo uma diminuição significativa destas quando expostas ao BITC, o que não se verificou no meio extracelular (apenas houve uma pequena diminuição com o tratamento);
- O nível de peroxidação lipídica (TBARS) foi também mais elevado no controlo, e diminuiu com a adição do BITC;
- A SOD apresentou maior atividade no meio intracelular e com o tratamento. A nível extracelular, apenas no meio onde *C. albicans* O51 cresceu se observou a diminuição da atividade SOD com o BITC;
- Para a CAT, a estirpe *C. albicans* ATCC 90028 foi a que apresentou maior atividade no meio extracelular; contudo, as três estirpes apresentaram um comportamento distinto na atividade desta enzima, em relação aos dois tratamentos (controlo *versus* BITC). A nível intracelular apenas em *C. albicans* O51 a atividade da CAT foi superior no controlo;
- Na célula o H₂O₂ aumentou logo após a adição do BITC nas estirpes *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* O51, enquanto em *C. albicans* O33 diminuiu. Extracelularmente a quantidade de H₂O₂ foi mais baixa no controlo, para as três estirpes;
- A razão GSH/GSSG foi superior no meio extracelular. Dentro da célula esta razão demonstrou-se mais baixa e, apesar da variação ao longo das 24 horas, esta não foi significativa;
- O ácido eritro-ascórbico e os compostos fenólicos apresentaram uma concentração mais elevada no meio intracelular do que no extracelular e o seu comportamento variou com as diferentes estirpes;
- A prolina aumentou no meio extracelular para as três estirpes e na situação de tratamento, enquanto no meio intracelular aconteceu o oposto. O aumento da prolina no

meio extracelular e na presença do BITC poderá significar: ou i) inibição do crescimento celular – a diminuição do crescimento resulta no menor consumo de nutrientes, entre eles os aminoácidos; ou (ii) afetar a absorção e/ou a assimilação da prolina.

6.2. Perspetivas futuras

No futuro, são necessários mais estudos sobre o modo de ação do BITC no stresse oxidativo em *C. albicans*, nomeadamente:

- Como as respostas celulares das leveduras ao stresse oxidativo provavelmente estão relacionadas com a expressão dos genes que codificam os mecanismos de defesa antioxidante; assim, seria interessante pesquisar nas três estirpes a expressão dos genes envolvidos nestes mecanismos na presença/ausência de BITC;
- Testar se as atividades das enzimas SOD e CAT podem ser diretamente afetadas pelo BITC;
- Incluir as atividades das enzimas GR e GPX de modo a clarificar a causa da redução da relação GSH/GSSG;
- Clarificar a diminuição intracelular da prolina na presença do BITC.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

7. Referências Bibliográficas

- Aires, A., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N., 2009. Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria 106, 2096–2105.
- Akram, N.A., Shafiq, F., Ashraf, M., 2017. Ascorbic acid-A potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 8.
- Álvares, C.A., Svidzinski, T.I.E., Consolaro, M.E.L., 2007. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 43, 319–327.
- Augustyniak, A., 2010. The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats 381–389.
- Klein, B.P., Perry, A.K., 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J. Food Sci.* 47, 941–945.
- Barbaneagra, T., Manoliu, A., Cristica, M., Ciornea, E., Tutu, E., 2010. Researches regarding catalase and peroxidase activity in fungus *Rhizopus nigricans* grown on medium with diferent concentration of grinded wheat caryopsis. *Universitatea de Științe Agricole și Medinină Veterinară Iași*, 44–49.
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., C, D.-F., 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes 282, 1183–1192.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S., 2004. Calcium, ATP , and ROS : a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C817–833

- Brown, A.J.P., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M.D., Yin, Z., Ene, I. V, Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E.R., Childers, D.S., Shahana, S., Leach, M.D., 2014. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J. Exp. Biol.* 217, 144–55.
- Broxton, C.N., Culotta, V.C., 2016. An adaptation to low copper in *Candida albicans* involving SOD enzymes and the alternative oxidase. *PLoS One* 11, 1–16.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A., Fonzi, W.A., 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327–335.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., Monk, B.C., 2017. Mini-review *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiol.* 153, 3211–3217.
- Carvalhinho, S., Costa, A.M., Coelho, A.C., Martins, E., Sampaio, A., 2012. Susceptibilities of *Candida albicans* mouth isolates to antifungal agents, essential oils and mouth rinses. *Mycopathologia* 174, 69–76.
- Chakravarti, A., Camp, K., McNabb, D.S., Pinto, I., 2017. The iron-dependent regulation of the *Candida albicans* oxidative stress response by the CCAAT-binding factor. *PLoS One* 12, 1–24.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1954. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1, 357–424
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., Cormick, T.M.C., Ghannoum, M.A., 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development , architecture , and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385–5394.
- Chang, C.-C., Chang, Y.-C., Hu, W.-L., Hung, Y.-C., 2016. Oxidative stress and *Salvia miltiorrhiza* in aging-associated cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–11.
- Chaves, G.M., Silva, W.P., 2012. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 998–1005.
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185, 119–127.
- Costa, H., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Sci.* 162, 939–945.
- Dai, D.F., Chiao, Y.A., Marcinek, D.J., Quarles, E.K., Rabinovitch, P.S., 2017. Mitochondrial-

- targeted catalase: Extended longevity and the roles in various disease models. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 146, 203–241.
- Dantas, A.S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., Quinn, J., 2015. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* 5, 142–65.
- Dantas, A.S., Lee, K.K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., Gow, N.A., 2016. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 34, 111–118.
- Dolatabadian, A., Jouneghani, R.S., 2009. Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 37, 165–172.
- El-Bahr, S.M., 2013. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Sci. Int.* 1, 111–117.
- El Zawawy, N.A., Hafez, E.E., 2017. Efficacy of *Pluchea dioscoridis* leaf extract against pathogenic *Candida albicans*. *J. Infect. Dev. Countries* 11, 334–342.
- Enjalbert, B., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Brown, A.J.P., 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 75, 2143–2151.
- Ferreira, W., Sousa, J., Lima, N., 2010. *Microbiologia*, LIDEL. ed.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21–25.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C., Hube, B., 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 56, 397–415.
- Gartaganis, S.P., Patsoukis, N.E., Nikolopoulos, D.K., Georgiou, C.D., 2007. Evidence for oxidative stress in lens epithelial cells in pseudoexfoliation syndrome. *Eye* 21, 1406–1411.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Plant physiology and biochemistry reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds 1, 604–611.
- Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A., 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 368,

73–76.

- Jardim, A., 2008. Pesquisa de leveduras na cavidade oral de indivíduos portadores e não portadores de aparelho ortodôntico fixo. Relatório de Estágio. Licenciatura em Biologia. UTAD.
- Johnson, C.J., Cabezas-olcoz, J., Kernien, J.F., Wang, S.X., Beebe, J., Huttenlocher, A., Ansari, H., Nett, J.E., 2016. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. PLoS Pathog. 12, e1005884.
- Kamii, E., Isshiki, K., 2009. Antimicrobial efficacy of benzyl isothiocyanate. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 50,311–314.
- Karányi, Z., Holb, I., Hornok, L., Pócsi, I., Miskei, M., 2013. FSRD: Fungal stress response database. Database 2013, 1–6.
- Kasiappan, R., Jutooru, I., Karki, K., Hedrick, E., Safe, S., 2016. Benzyl isothiocyanate (BITC) induces reactive oxygen species-dependent repression of STAT3 protein by down-regulation of specificity proteins in pancreatic cancer. J. Biol. Chem. 291, 27122–27133.
- Komalapriya, C., Kaloriti, D., Tillmann, A.T., Yin, Z., Herrero-De-Dios, C., Jacobsen, M.D., Belmonte, R.C., Cameron, G., Haynes, K., Grebogi, C., De Moura, A.P.S., Gow, N.A.R., Thiel, M., Quinn, J., Brown, A.J.P., Romano, M.C., 2015. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. PLoS One 10, 1–32.
- Kong, L., Wang, F., Si, J., Feng, B., Zhang, B., Li, S., Wang, Z., Kong, L., Wang, F., Si, J., Feng, B., Zhang, B., 2013. Increasing in ROS levels and callose deposition in peduncle vascular bundles of wheat (*Triticum aestivum* L .) grown under nitrogen deficiency. J. Plant Interactions 8, 109–116.
- Krishnan, N., Dickman, M.B., Becker, D.F., 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 44, 671–681.
- Lara, H.H., Romero-Urbina, D.G., Pierce, C., Lopez-Ribot, J.L., Arellano-Jiménez, M.J., Jose-Yacaman, M., 2015. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. J. Nanobiotechnology 13, 91.
- Lordêlo, M., Silva, C., Silva Costa, R., Dos, A., Santana, S., Gabriela, M., Koblitz, B., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. Semin. Ciências Agrárias 31, 669–682.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat.

- Toxicol. 101, 13–30.
- Lushchak, V.I., Semchyshyn, H.M., 2012. Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects. In Biochemistry, Genetics and molecular Biology. V. Lushchak, H. M. Semchyshyn. InTech. ISBN 978-953-51-0554-1.
- Martínez-Ballesta, M.C., Moreno, D.A., Carvajal, M., 2013. The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. Int. J. Mol. Sci. 14, 11607–11625.
- Meca, G., 2015. *In vitro* antifungal activity of allyl isothiocyanate (AITC) against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum* and evaluation of the AITC estimated daily intake. Food Chem. Toxicol. 83, 293–299.
- Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-rowley, W.S., 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 190, 1157–1195.
- Nobile, C.J., Jonhson, A.D., 2015. *Candida albicans* biofilms and human disease. Ann. Rev. Microbiol. 69, 71–92.
- Noctor, G., Arisi, A.-C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H., 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. J. Exp. Bot. 49, 623–647.
- Ozden, M., Demİrel, U., Kahraman, A., 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera L.*) exposed to oxidative stress by H₂O₂. Sci. Hortic. 119, 163–168.
- Papadakis, K., Siminis, C.I., Roubelakis-Angelakis, K., 2001. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. Plant Physiol. 126, 434–444.
- Pereira, C., 2017. Effect of isothiocyanates on growth, morphology, and ultrastructure in *Candida albicans* isolates. Dissertação de Mestrado em Biologia. UTAD.
- Saavedra, M., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R.N., Rosa, E.S., Simões, M., 2015. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with Streptomycin against pathogenic bacteria. Med. Chem. 6, 174–183.
- Saladino, F., Quiles, J.M., Luciano, F.B., Mañes, J., Fernández-Franzón, M., Meca, G., 2016. Shelf life improvement of the loaf bread using allyl, phenyl and benzyl isothiocyanates against *Aspergillus parasiticus*. LWT - Food Sci. Technol. 78, 208–214.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. J.

- Neurol. Sci. 257, 221–239.
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–462.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Smith, D.A., Morgan, B.A., Quinn, J., 2010. Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 1–8.
- Sorg, O., 2004. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus - Biol.* 327, 649–662.
- Tillmann, A.T., Strijbis, K., Cameron, G., Radmaneshfar, E., Thiel, M., Munro, C.A., MacCallum, D.M., Distel, B., Gow, N.A.R., Brown, A.J.P., 2015. Contribution of Fdh3 and Glr1 to glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. *PLoS One* 10, 1–24.
- Tzin, V., Galili, G., 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *In Arabidopsis Book*. 8:e0132
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Vig, A.P., Rampal, G., Thind, T.S., Arora, S., 2009. Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 1561–1572.
- Wat, C., Towers, G.H.N., 1979. Metabolism of the aromatic amino acids by fungi. *In. Biochemistry of Plant Phenolics*. Springer. Pp: 371–372.
- Watford, M., 2008. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation 2003-2007. *J. Nutr.* 138, 2003S–2007S.
- Wu, C.L., Huang, A.C., Yang, J.S., Liao, C.L., Lu, H.F., Chou, S.T., Ma, C.Y., Hsia, T.C., Ko, Y.C., Chung, J.G., 2011. Benzyl isothiocyanate (BITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC)-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of caspase-3, mitochondria dysfunction and nitric oxide (NO) in human osteogenic. *J. Orthop. Res.* 29, 1199–1209.
- Xie, B., Nagalingam, A., Kuppusamy, P., Muniraj, N., Langford, P., Györfy, B., Saxena, N.K., Sharma, D., 2017. Benzyl isothiocyanate potentiates p53 signaling and antitumor effects against breast cancer through activation of p53-LKB1 and p73-LKB1 axes. *Sci. Rep.* 7, 40070.
- Yeh, Y.T., Hsu, Y.N., Huang, S.Y., Lin, J.S., Chen, Z.F., Chow, N.H., Su, S.H., Shyu, H.W.,

Lin, C.C., Huang, W.T., Yeh, H., chih, Y. chia, Huang, Y.H., Su, S.J., 2016. Benzyl isothiocyanate promotes apoptosis of oral cancer cells via an acute redox stress-mediated DNA damage response. *Food Chem. Toxicol.* 97, 336–345.

Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected Herbs. *J Agric Food Chem.* 49, 5165–5170.

Sites:

MicrobeWiki. (2016). Consultado em 4 de outubro, 2016 em:
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_\(Pathogenesis\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_(Pathogenesis))

Protein data bank (2017). Consultado em 8 de fevereiro, 2017 em:
<https://pdb101.rcsb.org/motm/94>

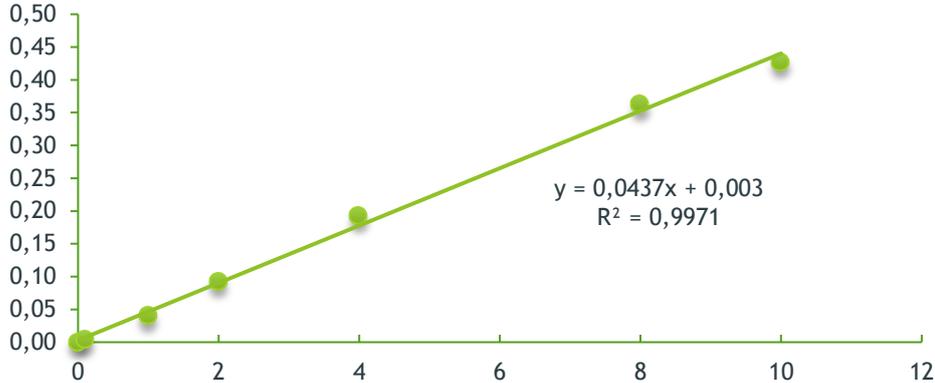
Anexos

**Efeitos dos glucosinolatos no stresse oxidativo em isolados
de *Candida albicans***

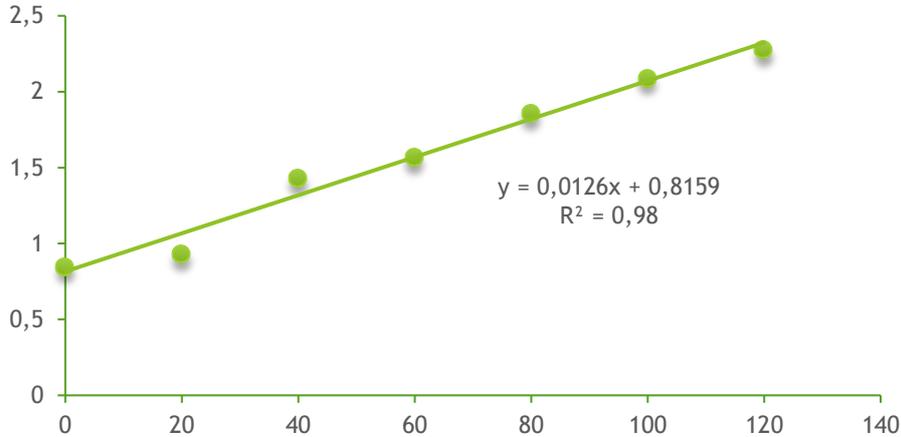
Anexos

1. Retas-padrão

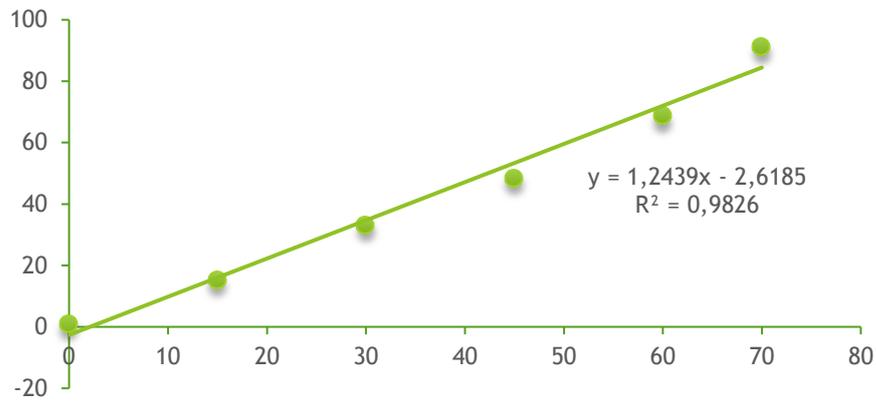
1.1. BSA



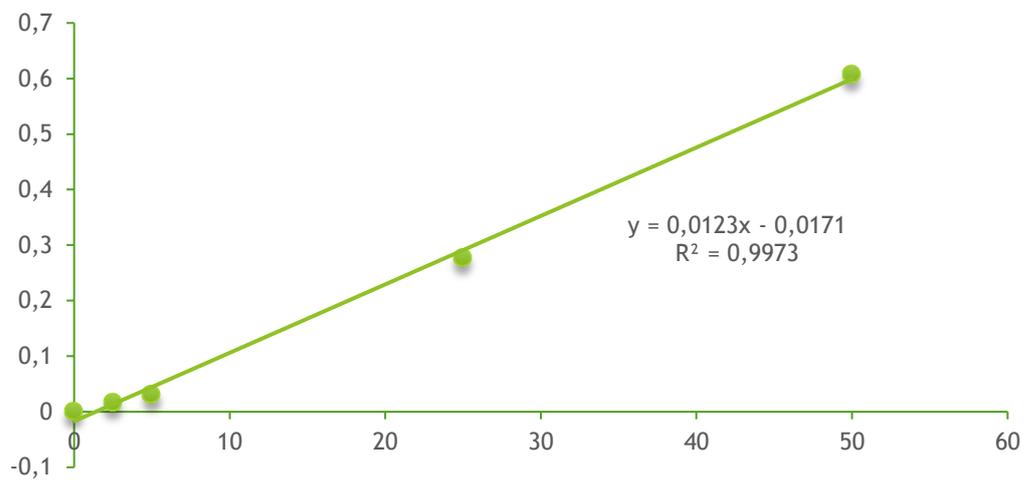
1.2. GSH



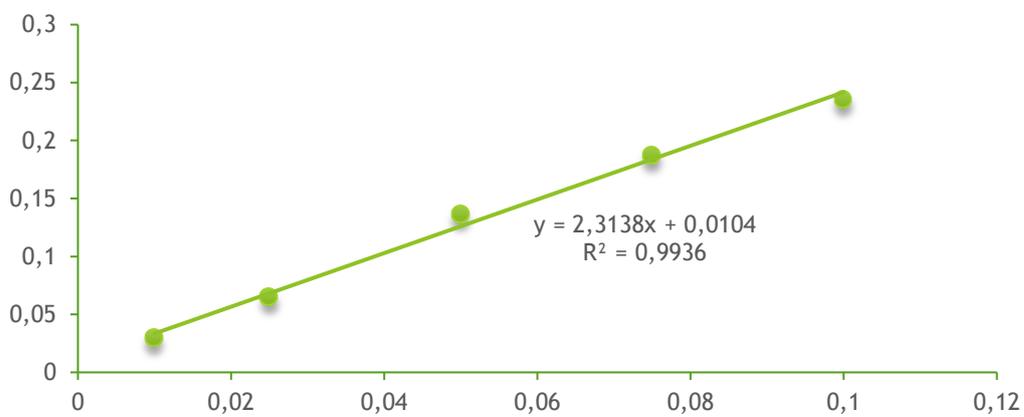
1.3. GSSG



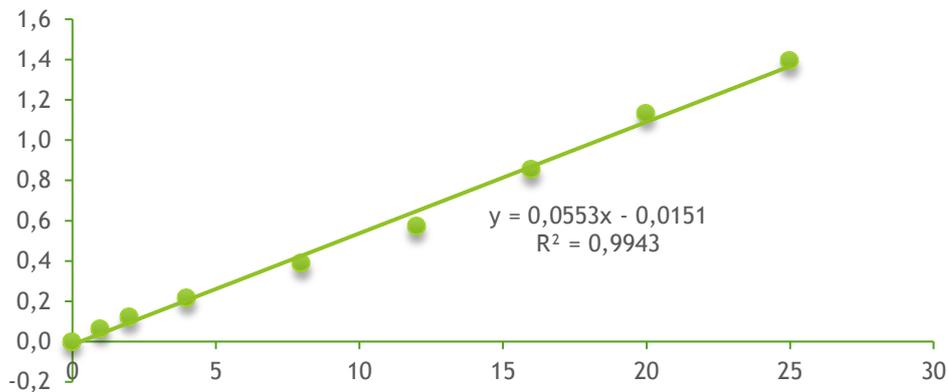
1.4. Peróxido de hidrogénio



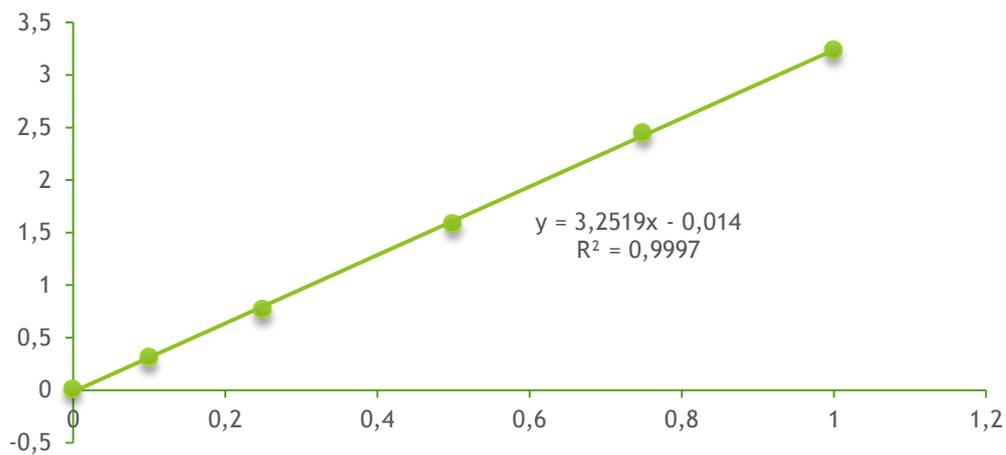
1.5. Ácido ascórbico



1.6. Ácido gálico



1.7. Prolina



1.8. ROS

