

# **Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante de Levaduras Expuestas a Antifúngicos**

## **Oxidative Stress and Antioxidant Response of Yeasts Exposed to Antifungal Agents**

Trabajo de Fin de Grado

**Sara Castellano Barroso**

Tutores: Dr. Mario Díaz González y David Quinto Alemany

Grado en Biología

Marzo 2017

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| ABREVIATURAS.....  | 2  |
| RESUMEN .....  | 3  |
| ABSTRACT.....  | 3  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 4  |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....   | 8  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 9  |
| 1.- Cepas de levaduras y medios.....   | 9  |
| 2.- Tratamiento con antifúngicos y obtención de extractos celulares .....                        | 9  |
| 3.- Ensayos enzimáticos de actividad SOD .....   | 10 |
| 4.- Ensayos enzimáticos de actividad CAT.....  | 10 |
| 5.- Cuantificación de la cantidad de proteína en muestra .....                                   | 11 |
| 6.- Análisis estadístico .....   | 11 |
| RESULTADOS .....   | 12 |
| 1. Actividad superóxido dismutasa en una misma cepa inducida por los diferentes antifúngicos ... | 12 |
| 2. Actividad catalasa en una misma cepa inducida por los diferentes antifúngicos .....           | 15 |
| DISCUSIÓN .....  | 20 |
| CONCLUSIONES .....   | 23 |
| CONCLUSIONS.....   | 24 |
| AGRADECIMIENTOS .....  | 25 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 26 |

# ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| <b>5-FC</b>   | 5-fluorocitosina   |
| <b>CA48</b>   | Cepa de aislado clínico de <i>Candida albicans</i>                           |
| <b>CAT</b>    | Catalasa   |
| <b>CG57</b>   | Cepa de aislado clínico de <i>Candida glabrata</i>                           |
| <b>CMI</b>    | Concentración mínima inhibitoria   |
| <b>CSP</b>    | Caspofungina   |
| <b>DTPA</b>   | Ácido dietilentriaminopentaacético   |
| <b>EROs</b>   | Especies reactivas del oxígeno   |
| <b>FLU</b>    | Fluconazol   |
| <b>SC</b>     | Medio mínimo o sintético completo ( <i>Synthetic Complete</i> )              |
| <b>SC5314</b> | Cepa de laboratorio de <i>Candida albicans</i>                               |
| <b>SIH</b>    | Septicemia intrahospitalaria   |
| <b>SOD</b>    | Superóxido dismutasa   |
| <b>YPD</b>    | Medio completo de crecimiento de levaduras ( <i>Yeast Peptone Dextrose</i> ) |

# RESUMEN

Las levaduras del género *Candida* son uno de los microorganismos de mayor impacto en la salud de animales y seres humanos, a pesar de formar parte de su flora microbiana. Debido a su naturaleza eucariota aeróbica se encuentran constantemente expuestas a especies reactivas del oxígeno (EROs), cuya elevación puede dar lugar a estrés oxidativo. La respuesta a este estrés viene regulada por la acción conjunta de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La respuesta antioxidante de las levaduras frente a antifúngicos ha sido vagamente estudiada, sin embargo algunos autores indican que su exposición induce la activación de dicho sistema antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta antioxidante de las cepas *Candida albicans* y *Candida glabrata* expuestas a diferentes antifúngicos. Para ello se ha determinado mediante técnicas espectrofotométricas las actividades SOD y CAT en extractos celulares de: una cepa de laboratorio de *C. albicans* (SC5314); y dos aislados clínicos, uno de *C. albicans* (CA48) y otro de *C. glabrata* (CG57), expuestas a tres antifúngicos: fluconazol, 5-fluorocitosina y caspofungina. Los resultados obtenidos sugieren que en alguna de las combinaciones cepa-antifúngico se induce la generación de EROs dado el aumento observado en las actividades SOD y CAT.

**Palabras Clave:** *Candida*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, superóxido dismutasa, catalasa, antifúngicos, 5-fluorocitosina, caspofungina, fluconazol, estrés oxidativo.

# ABSTRACT

Yeasts of the genus *Candida* are one of the microorganisms with the major impact on the health of animals and humans, despite being part of its microbial flora. Due to their eukaryotic aerobic nature they are constantly exposed to reactive oxygen species (ROS), the elevation of which can give rise to oxidative stress. The response to this stress is regulated by the joint action of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The antioxidant response of yeasts to antifungals has been loosely studied, however some authors indicate that their exposure induces the activation of that antioxidant system. The objective of the present study was to study the antioxidant response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains exposed to different antifungal agents. For this purpose, SOD and CAT activities have been determined by spectrophotometric techniques in cell extracts of: a *C. albicans* laboratory strain (SC5314); and two clinical isolates, one of *C. albicans* (CA48) and one of *C. glabrata* (CG57), exposed to three antifungal agents: fluconazole, 5-fluorocytosine and caspofungin. The results obtained suggest that in some of the strain-antifungal combinations the generation of ROS given the observed increase in SOD and CAT activities.

**Keywords:** *Candida*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, superoxide dismutase, catalase, antifungal agents, 5-fluorocytosine, caspofungin, fluconazol, oxidative stress.

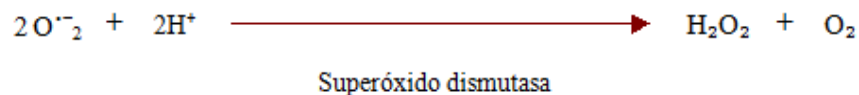
# INTRODUCCIÓN

Desde inicio de los años 80, los hongos han sido una de las mayores causas de infección en humanos (Pfaller y Diekema, 2007). Del conjunto de organismos que componen el Reino Fungi, las levaduras patógenas poseen un gran impacto en la salud de animales y seres humanos, siendo las más importantes las pertenecientes al género *Candida*, concretamente *Candida albicans* y *Candida glabrata*, que representan la cuarta causa de septicemia intrahospitalaria (SIH), suponiendo del 8% al 10% de estas complicaciones (Concia *et al.*, 2009). Estas levaduras aeróbicas forman parte de la flora microbiana natural de los seres humanos, de modo que una alteración debida a causas de origen tanto externo como interno (por ejemplo la desregulación o depresión del sistema inmunológico), provoca un desequilibrio de la microbiota que puede dar lugar a una candidiasis, ya sea de piel o mucosas, incluyendo éstas la cavidad oral, faringe, esófago, aparato digestivo y genitales (vagina, pene).

La patogénesis de *C. albicans* está influenciada, por una parte, por las diferentes formas en su morfología de transición: pueden proliferar de manera levaduriforme, y también generando hifas y pseudohifas. Estas últimas formaciones pueden ser inducidas por altas temperaturas, pH básico, y por el contacto con suero (Brown y Gow, 1999). Por otra parte, la patogenicidad de las levaduras depende de su capacidad para lidiar eficazmente con las defensas del huésped, en particular, con el bombardeo oxidativo por parte de las células fagocíticas (Enjalbert *et al.*, 2007). Además, tratándose *C. albicans* y *C. glabrata* de organismos eucariotas aeróbicos, están constantemente expuestos a especies reactivas del oxígeno (EROs) que son generados como productos normales del metabolismo respiratorio o por algún tipo de estrés al que se vean sometidos. Las EROs poseen un papel crucial en la regulación de procesos celulares por fosforilación y desfosforilación de enzimas y de factores de transcripción (regulación REDOX), y en la señalización que afecta directamente a las quinasas (Halliwell, 2006). Por otra parte, una elevación de EROs puede dar lugar a estrés oxidativo, que provoca la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, oxidación de aminoácidos en las proteínas y daño en el ADN, generando una alteración de las estructuras celulares (Halliwell y Gutteridge, 1990, 1999). La generación de EROs parece ser dependiente de la especie, lo que es comprensible ya que los microorganismos difieren en su sensibilidad y respuesta al estrés oxidativo (Missall *et al.*, 2004).

Para combatir las EROs, las células contienen un sistema antioxidante genérico capaz de hacer frente a estas sustancias que producen daño oxidativo. En este sistema intervienen las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), que representan la primera línea de defensa antioxidante.

La enzima SOD cataliza la conversión del anión superóxido ( $O^{\cdot-}_2$ ) peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Halliwell, 1982).



Su actividad requiere de iones metálicos y en levaduras del género *Candida* se han llegado a describir tres isoformas diferentes: una SOD citoplasmática (Cu/Zn-SOD) codificada por el gen SOD1, una SOD mitocondrial (Mn-SOD) codificada por el gen SOD2, (Hwang *et al.*, 1999; Rhie *et al.*, 1999), y, además, *C. albicans* posee también una Mn-SOD citoplasmática (codificada por el gen SOD3) recientemente identificada (Lamarre *et al.*, 2001).

El  $H_2O_2$ , producto resultante de la actividad SOD, sigue siendo un agente oxidante, aunque en menor grado que el  $O^{\cdot-}_2$ . La enzima CAT, localizada en las mitocondrias y los peroxisomas, interviene transformando el  $H_2O_2$  en agua ( $H_2O$ ) y  $O_2$  (Chance *et al.*, 1979; Claiborne, 1985).



De esta manera, es necesario que ambas enzimas antioxidantes, SOD y CAT, actúen de manera sinérgica para proteger a la célula del daño oxidativo. Algunos autores han sugerido que la inactivación coordinada de las EROs, por la acción secuencial de las enzimas SOD y CAT, es esencial para la protección efectiva de las células contra la toxicidad de EROs (Lortz *et al.*, 2003). En este sentido, se ha descrito que durante el crecimiento de hifas, y en fase exponencial, se produce un aumento de la producción de la enzima Cu/Zn-SOD debido a una alta productividad de EROs durante esas etapas (Schröter *et al.*, 2000).

Frente a determinados antifúngicos como el fluconazol (FLU), existen ensayos que revelan que los productos de los genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo están

relacionados con la resistencia al fármaco (Rogers y Barker, 2002; Rogers *et al.*, 2006). Tras la exposición, el crecimiento y la virulencia del organismo se ven afectadas, y la respuesta dependerá tanto del antifúngico como de la especie de levadura (Cannon *et al.*, 2007).

En general, los antifúngicos afectan a la composición e integridad de las levaduras, induciendo en ellas una respuesta al estrés. Los antifúngicos más comúnmente utilizados son: 5-fluorocitosina (5-FC), caspofungina (CSP) y el ya mencionado fluconazol, actuando sobre diferentes dianas: el análogo de citosina fluorado 5-FC se incorpora al ADN fúngico eliminando el terminal 3' al que se agregan los nucleósidos por lo que impide la síntesis de ácidos nucleicos durante el proceso de replicación celular; la equinocandina CSP inhibe la enzima (1→3)-β-D-glucano sintetasa, perturbando la integridad de la pared celular de la levadura; y el azol FLU inhibe el citocromo P450 fúngico de la enzima 14α-demetilasa evitando la conversión de un lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana citoplasmática.

Con el paso del tiempo y el abuso indiscriminado de fármacos, las levaduras han llegado a desarrollar tolerancia o, incluso, resistencia adaptativa (de origen metabólico o genético) a los antifúngicos (Cannon *et al.*, 2007), ocasionando un serio problema de salud pública. La mayoría de estos mecanismos de resistencia a antifúngicos establecidos son debido a mutaciones genéticas, normalmente mutaciones puntuales en genes que codifican dianas farmacológicas o enzimas en rutas metabólicas, o a factores de transcripción que incrementan la expresión de determinados genes (Cannon *et al.*, 2007). El cambio fenotípico y la formación de biofilms son otras respuestas que pueden incrementar la resistencia a los fármacos (Akins, 2005). La aclaración de posibles asociaciones entre mecanismos de acción antifúngicos, resistencia antifúngica, y respuestas al estrés oxidativo es importante para la identificación de nuevas dianas para nuevos agentes antifúngicos y el desarrollo de fármacos antifúngicos (Mahl *et al.*, 2015).

Los antifúngicos del tipo azoles, tal como el triazol FLU, son normalmente utilizados frente a candidiasis de manera efectiva, afectando principalmente a la composición de la membrana, y por tanto a la integridad celular e inducen respuestas a este estrés. Hay múltiples mecanismos que pueden dar lugar a resistencia a azoles en *C. albicans*, entre ellos, el hecho de que los azoles son fungistáticos y pueden ser tolerados en cierto grado. Si la actividad de la calcineurina (una enzima importante en el control de eventos intracelulares en células eucariotas) en *C. albicans* es inhibida, entonces los azoles actúan como fungicidas (Cannon *et*

*al.*, 2007). Este tipo de antifúngico está asociado al incremento de la actividad SOD y de la actividad CAT en *C. albicans*. Esto se debe a que la levadura es capaz de protegerse frente al estrés oxidativo inducido por FLU. Respecto a *C. glabrata*, existen estudios epidemiológicos que la revelan como un importante patógeno emergente en las infecciones nosocomiales, y debido al uso generalizado del FLU en la clínica las infecciones causadas por cepas resistentes al antifúngico han aumentado (Colombo *et al.*, 2013; Tortorano *et al.*, 2006). De este modo, se ha hecho necesario el estudio de las defensas antioxidantes de *C. glabrata* contra diversos generadores de estrés oxidativo.

Así, además del FLU, hemos seleccionado para este estudio la 5-FC a causa de su alto grado de adquisición resistencia secundaria, descrita en pacientes que requieren de la administración combinada de medicamentos (anfotericina B o FLU), y del cual existen estudios que sugieren una resistencia de tipo genético (Quinto-Aleman *et al.*, 2012); y la CSP debido a su relevancia como una de los antifúngicos más novedosos. Los antifúngicos del tipo equinocandina, como es la CSP, funcionan como fuertes fungicidas frente a *C. albicans* y *C. glabrata*, resultando un avance en tratamientos para la candidiasis. La introducción de compuestos de equinocandina fue un avance importante en el tratamiento de la infección fúngica invasiva, proporcionando una alternativa bien tolerada y eficaz a los azoles y polienos (Gafer-Gvili *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2009).



# HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Bajo la hipótesis de que el tratamiento con determinados antifúngicos como los azoles induce una generación de EROs en levaduras, que la respuesta celular a este estrés incluye la activación de los sistemas antioxidantes celulares, que dicha respuesta participa en los procesos de adquisición de resistencia de los microorganismos, y que probablemente se dé este fenómeno frente a otro tipo de antifúngicos, el objetivo principal de este trabajo es:

- Estudiar el sistema antioxidante genérico, analizando la actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, en extractos celulares de una cepa de laboratorio de *C. albicans* y en dos aislados clínicos de las especies *C. albicans* y *C. glabrata*, expuestas a los antifúngicos FLU, 5-FC y CSP.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1.- Cepas de levaduras y medios

Para este estudio se empleó una cepa de laboratorio de *C. albicans* (SC5314) y dos aislados clínicos: uno de *C. albicans* (CA48) y otro de *C. glabrata* (CG57). Dichas cepas fueron inicialmente crecidas con agitación a 37°C en medio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*, 1% de extracto de levaduras, 2% agua de peptona y 2% de dextrosa) durante 24 h. Posteriormente, de cara a la obtención de los extractos, serían inoculadas en medio mínimo o SC (*Synthetic Complete Medium*, 0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosa) suplementado con aminoácidos según Burke *et al.* (2000), y en presencia de los antifúngicos según correspondiera.

## 2.- Tratamiento con antifúngicos y obtención de extractos celulares

Para cada uno de los tres tratamientos con los antifúngicos, se tomó 1 ml de los cultivos crecidos 24 h. en YPD líquido (a una densidad de  $2 \times 10^8$  células/mililitro), se centrifugó a 800 g durante 5 minutos para poder retirar el medio YPD, y se resuspendió el pellet de células en 3 ml de medio SC líquido con antifúngico. Como control, se llevó a cabo el mismo proceso resuspendiendo en este caso en 3 ml de medio SC líquido sin antifúngico alguno.

Las concentraciones de antifúngicos empleadas fueron de 100 µg/ml para 5-FC (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Alemania) y 0,75 µg/ml para CSP (Merck Sharp & Dohme Ltd., Reino Unido), correspondientes a concentraciones 4 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) estimada para la cepa SC5314 de *C. albicans* (Quinto-Aleman *et al.*, 2012); y de 16 µg/ml de FLU (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Alemania), correspondiente a 4 veces la CMI para cepas de *C. glabrata* no resistentes a FLU según Mahl *et al.* (2015).

Para la obtención de los extractos celulares se tomó 1 ml del inóculo inicial de YPD a tiempo 0 h. y posteriormente 1 ml de cada tubo con cada tratamiento a 3 y 6 horas. Tras centrifugar a 800 g durante 5 minutos para retirar el medio, se procedió a la obtención del contenido celular por ruptura mecánica con microperlas de vidrio en tampón de homogenización hipotónico en frío (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4) conteniendo 1x del cocktail inhibidor de proteasas *Complete* (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Los extractos se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

### **3.- Ensayos enzimáticos de actividad SOD**

Para determinación de la actividad de la SOD se empleó una adaptación del método de Marklund y Marklund (1974), un ensayo rápido, con alto grado de reproducibilidad y que requiere de poca cantidad de muestra.

Este método se basa en la autooxidación del pirogalol (1,2,3-bencenotriol o ácido pirogálico), un compuesto que en soluciones alcalinas se autooxida rápidamente generando la formación de purpurogalina, un compuesto amarillo-marrón con el pico de absorbancia de luz a  $\lambda = 420$  nm y un coeficiente de extinción molar de  $2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . En presencia de SOD en el medio, esta enzima compite con el pirogalol por el radical  $\text{O}^{\cdot-}_2$  inhibiendo la reacción de autooxidación, por lo que se produce una menor formación de purpurogalina. La formación de purpurogalina es sensible a ser medida espectrofotométricamente en el tiempo de modo que este fenómeno permite la cuantificación de la actividad SOD de una muestra, midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto de un control.

Este ensayo se realizó en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU800, utilizando cubetas de plástico, a  $37^\circ\text{C}$  con luz visible,  $\lambda = 420$  nm, durante 5 minutos, en intervalos de 20 segundos.

Para un volumen total de 1 ml de reacción, la mezcla contuvo: buffer de reacción Tris-ácido cacodílico (50mM) ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA) (1mM), pH=8,2; la muestra y pirogalol (30 mM). Este último fue añadido al final ya que es el que inicia la reacción. Para el blanco y el control, la muestra fue sustituida Tris-HCl (1x Complete) (20 mM), pH= 7,4.

La actividad SOD se expresó en U/mg proteína (unidad de actividad enzimática), la cual se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener el 50% de inhibición de autooxidación del pirogalol.

### **4.- Ensayos enzimáticos de actividad CAT**

Para la determinación de la actividad CAT se empleó el método descrito por Clairborne (1985). Éste se basa en la capacidad de la propia enzima en transformar  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . La desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es susceptible a ser medida en el tiempo, observando los cambios de absorbancia en el tiempo a  $\lambda = 240$  nm.

Para un volumen total de 2 ml de reacción, se utilizó buffer de reacción fosfato potásico,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ , (10mM), pH=7,0; la muestra, sustituida por el buffer de muestra Tris-HCl (1x Complete) (20 mM), pH= 7,4 en el caso del blanco y el control; y peróxido de hidrógeno

(485 mM). Este último fue añadido al final ya que es el que inicia la reacción. En el blanco, éste fue sustituido por agua bidestilada. Los cambios de absorbancia en el tiempo a  $\lambda = 240$  nm, en cubetas de cuarzo, a 37° C, durante 10 minutos, en intervalos de 15 segundos en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU800.

El coeficiente de extinción molar utilizado fue de  $42,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad CAT se expresó en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

## **5.- Cuantificación de la cantidad de proteína en muestra**

Para la determinación de la cantidad de proteína en muestra se utilizó el método descrito por Bradford (1976), empleando concentraciones de 0 a 6 mg/ml de albúmina de suero bovino como proteína estándar para la recta patrón.

Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, a  $\lambda = 595$  nm, en un Appliskan multiplate reader (Thermo Scientific, Madrid).

## **6.- Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido del test de Kruskal-Wallis (test de t-Student) o test de Levene (Mann-Whitney) en función de si los datos eran normales y homocedásticos. Las diferencias se consideraron significativas si  $p \leq 0,05$  (con excepciones indicadas). El software empleado para llevar a cabo los análisis fue el paquete estadístico SPSS versión 20.0.

# RESULTADOS

## 1. Actividad superóxido dismutasa en una misma cepa inducida por los diferentes antifúngicos

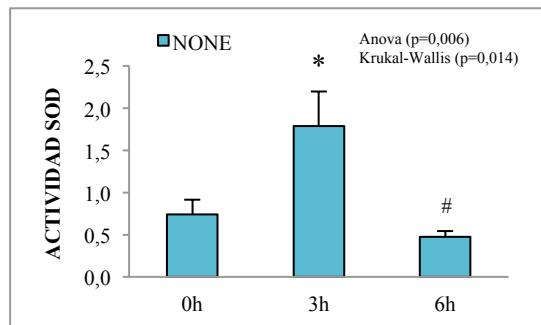
Se llevó a cabo la determinación de la actividad SOD para cada tratamiento en todas las cepas a los diferentes tiempos: 0, 3 y 6 h. (Tabla 1)

| SOD       |           |             |                                |               |
|-----------|-----------|-------------|--------------------------------|---------------|
| CEPA      | TIEMPO    | TRATAMIENTO | MEDIA±ERROR<br>(U/mg proteína) |               |
| SC5314    | 0 h.      | NONE (n=6)  | 0,727 ± 0,174                  |               |
|           | 3 h.      | NONE (n=6)  | 1,787 ± 0,406                  |               |
|           |           | 5-FC (n=6)  | 2,691 ± 0,518                  |               |
|           |           | CSP (n=6)   | 1,421 ± 0,258                  |               |
|           |           | FLU (n=6)   | 2,276 ± 0,534                  |               |
|           | 6 h.      | NONE (n=6)  | 0,478 ± 0,066                  |               |
|           |           | 5-FC (n=6)  | 0,663 ± 0,286                  |               |
|           |           | CSP (n=5)   | 0,757 ± 0,142                  |               |
|           |           | FLU (n=6)   | 0,935 ± 0,243                  |               |
|           | CA48      | 0 h.        | NONE (n=5)                     | 0,883 ± 0,291 |
|           |           | 3 h.        | NONE (n=5)                     | 0,550 ± 0,114 |
|           |           |             | 5-FC (n=5)                     | 2,253 ± 1,167 |
| CSP (n=5) |           |             | 1,003 ± 0,236                  |               |
| FLU (n=6) |           |             | 2,270 ± 1,078                  |               |
| 6 h.      |           | NONE (n=6)  | 0,569 ± 0,129                  |               |
|           |           | 5-FC (n=6)  | 0,289 ± 0,046                  |               |
|           |           | CSP (n=6)   | 0,383 ± 0,058                  |               |
|           |           | FLU (n=6)   | 0,544 ± 0,077                  |               |
| CG57      |           | 0 h.        | NONE (n=6)                     | 0,716 ± 0,123 |
|           |           | 3 h.        | NONE (n=6)                     | 1,427 ± 0,110 |
|           |           |             | 5-FC (n=5)                     | 3,075 ± 0,473 |
|           | CSP(n=4)  |             | 2,556 ± 1163                   |               |
|           | FLU (n=6) |             | 1,105 ± 0,244                  |               |
|           | 6 h.      | NONE (n=6)  | 1,283 ± 0,316                  |               |
|           |           | 5-FC (n=5)  | 0,510 ± 0,083                  |               |
|           |           | CSP (n=5)   | 0,652 ± 0,052                  |               |
|           |           | FLU (n=6)   | 1,419 ± 0,270                  |               |

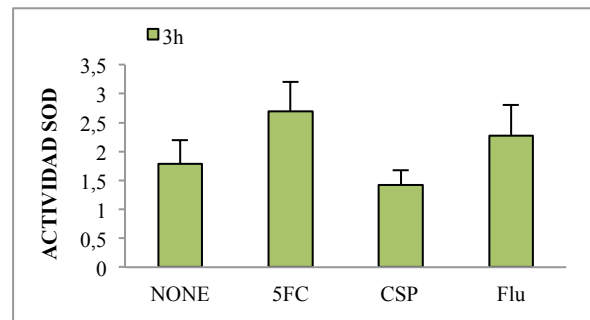
**TABLA 1.** Actividades SOD (U/mg proteína) de la cepa de laboratorio de *C. albicans*, SC5314, de la cepa de aislado clínico de *C. albicans*, CA48, y de la cepa de aislado clínico de *C. glabrata*, CG57, para los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos.

Al estudiar la actividad de la superóxido dismutasa inducida por los diferentes tratamientos, se observó que en el caso de la cepa de laboratorio de *C. albicans* SC5314, cuando a ésta no se le ha aplicado ningún antifúngico existe un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) de la actividad SOD a 3 h. respecto de 0 h. y sin embargo se observó una disminución a 6 h. respecto de 3 h. (Figura 1A). Para el caso de la misma cepa, a 3 h. y 6 h. no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 1B y 1C).

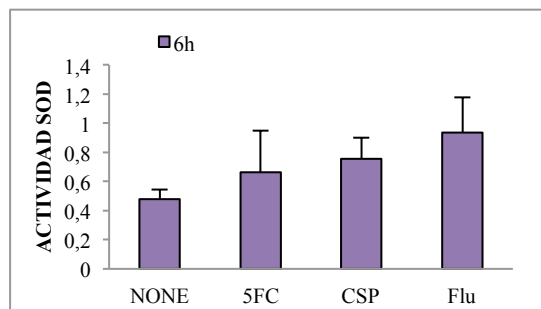
1A



1B



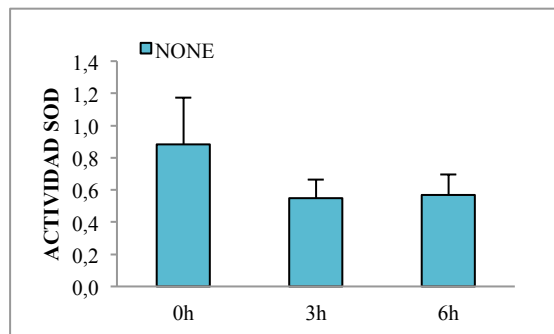
1C



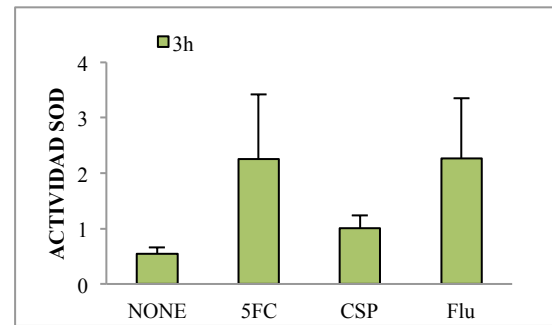
**Figura 1.** Actividad SOD (U/mg proteína) de la cepa de laboratorio de *C. albicans*, SC5314. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad SOD a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad SOD a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. (\*) valor significativo ( $p \leq 0,005$ ) respecto de 0 h.; (#) valor significativo ( $p \leq 0,005$ ) respecto de 3 h.

Cuando realizamos el estudio con el aislado clínico de la misma especie *C. albicans*, CA48, sin antifúngico se observa que no hay diferencia significativa de la actividad SOD entre los tiempos 0 h., 3 h. y 6 h. (Figura 2A). Tampoco se observaron diferencias para las actividades SOD de CA48 cuando fue tratada con los diferentes antifúngicos a 3 h. (Figura 2B). Para el caso de 6 h. tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de las actividades SOD cuando se le aplicó los diferentes tratamiento antifúngicos respecto al control, sin embargo, sí existen diferencias significativas entre la actividades SOD respecto a los antifúngicos 5-FC y FLU, siendo mayor la actividad de FLU respecto a 5-FC (Figura 2C).

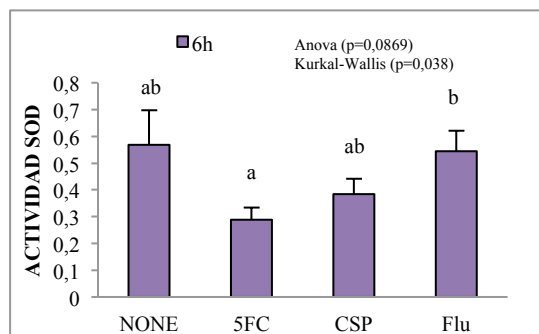
2A



2B



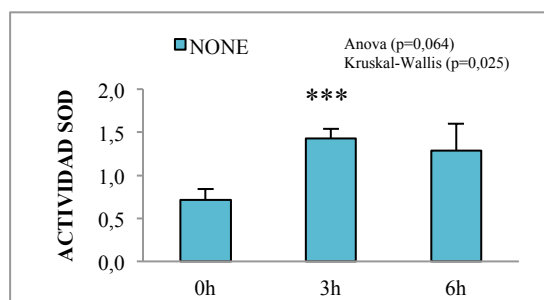
2C



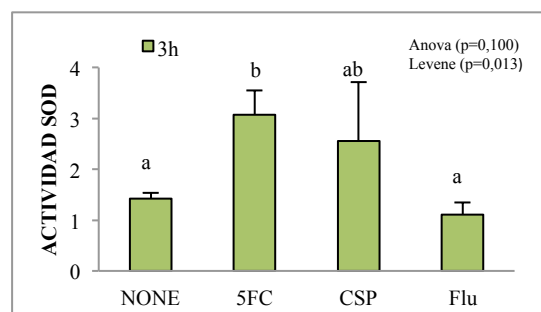
**Figura 2.** Actividad SOD (U/mg proteína) de la cepa de aislado clínico de *C. albicans*, CA48. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad SOD a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad SOD a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. Letras distintas implican diferencias significativas.

Cuando se estudió el aislado clínico de la especie *C. glabrata* CG57, se obtuvo que sin antifúngico existe un aumento significativo de la actividad SOD ( $p < 0,005$ ) entre 0 h. y 3 h.; sin embargo no existen diferencias entre 6 h. con los otros tiempos estudiados (Figura 3A). Al comparar la actividad SOD en presencia de las diferentes antifúngicos, a 3 h. se observó que existe diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) de la actividad SOD cuando *C. glabrata* fue tratada con 5-FC respecto a cuándo no recibió tratamiento (NONE). Además se ha observado una diferencia entre las actividades SOD cuando se le aplican diferentes antifúngicos, viéndose un aumento de actividad de 5-FC respecto a FLU (Figura 3B). Al realizarse la misma comparativa pero a 6 h., se observó que la actividad SOD es significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) cuando se trata con 5-FC y FLU respecto a los no tratados (NONE). Así mismo, la actividad varía entre los tratamientos con los diferentes antifúngicos, observándose un aumento de la actividad ( $p < 0,05$ ) cuando es tratado con FLU (Figura 3C).

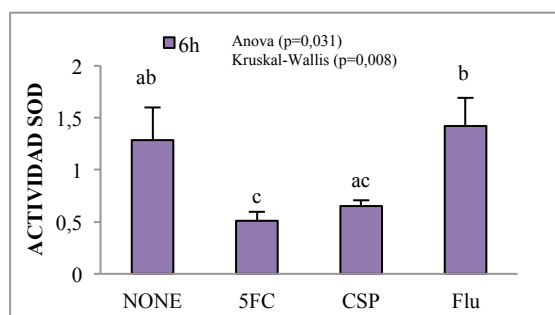
3A



3B



3C



**Figura 3.** Actividad SOD (U/mg proteína) de la cepa de aislado clínico de *C. glabrata*, CG57. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad SOD a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad SOD a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. (\*\*\*) valor muy significativos ( $p \leq 0,005$ ) respecto a 0 h. Letras distintas implican diferencias significativas.

## 2. Actividad catalasa en una misma cepa inducida por los diferentes antifúngicos

Se llevó a cabo la determinación de la actividad CAT para cada tratamiento en todas las cepas a los diferentes tiempos: 0, 3 y 6 h. (Tabla 2).

| CAT    |        |             |   |
|--------|--------|-------------|---|
| CEPA   | TIEMPO | TRATAMIENTO | MEDIA±ERROR<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) |
| SC5314 | 0 h.   | NONE (n=6)  | 21,835 ± 3,183  |
|        | 3H     | NONE (n=5)  | 13,484 ± 3,304  |
|        |        | 5-FC (n=4)  | 44,797 ± 5,068  |
|        |        | CSP (n=6)   | 14,418 ± 2,450  |
|        |        | FLU (n=4)   | 29,045 ± 6,089  |
|        |        | NONE (n=4)  | 5,749 ± 0,491   |
|        | 6H     | 5-FC (n=6)  | 9,992 ± 3,740   |
|        |        | CSP (n=6)   | 3,671 ± 1,383   |
|        |        | FLU (n=6)   | 8,964 ± 2,261   |

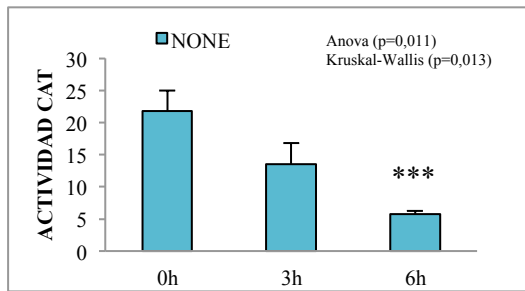


|           |      |               |                |
|-----------|------|---------------|----------------|
| CA48      | 0 h. | NONE (n=4)    | 18,036 ± 4,955 |
|           | 3 h. | NONE (n=4)    | 4,002 ± 0,809  |
|           |      | 5-FC (n=4)    | 11,617 ± 6,292 |
|           |      | CSP (n=5)     | 13,906 ± 4,840 |
|           |      | FLU (n=4)     | 4,277 ± 0,581  |
|           | 6 h. | NONE (n=4)    | 6,058 ± 0,299  |
|           |      | 5-FC (n=5)    | 5,792 ± 1,834  |
|           |      | CSP (n=6)     | 1,529 ± 0,470  |
| FLU (n=5) |      | 7,431 ± 1,482 |                |
| CG57      | 0 h. | NONE (n=6)    | 10,102 ± 2,567 |
|           | 3 h. | NONE (n=5)    | 10,645 ± 4,118 |
|           |      | 5-FC (n=5)    | 19,826 ± 4,501 |
|           |      | CSP (n=6)     | 4,697 ± 2,165  |
|           |      | FLU (n=6)     | 12,828 ± 2,433 |
|           | 6 h. | NONE (n=4)    | 7,757 ± 0,142  |
|           |      | 5-FC (n=5)    | 2,569 ± 0,492  |
|           |      | CSP (n=6)     | 2,089 ± 1,427  |
| FLU (n=4) |      | 4,526 ± 1,139 |                |

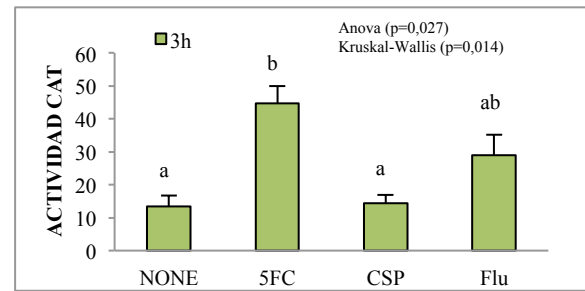
**TABLA 2.** Actividades CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) de la cepa de laboratorio de *C. albicans*, SC5314; de la cepa de aislado clínico de *C. albicans*, CA48; y de la cepa de aislado clínico de *C. glabrata*, CG57, para los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos.

Para la cepa de laboratorio de *C. albicans* SC5314, sin antifúngico se observa que hay un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,005$ ) de la actividad CAT a 6 h. respecto a 0 h. y, sin embargo, no hay diferencias de actividad a 3 h. respecto a los otros tiempos estudiados (Figura 4A). Respecto a las actividades CAT cuando SC5314 fue tratada con diferentes antifúngicos, a 3 h. se observaron un aumento de actividad cuando fue tratado con 5-FC respecto a cuándo no se le aplicó tratamiento (NONE) ( $p < 0,005$ ). Así mismo, si comparamos los diferentes tratamientos a la misma hora, se observó mayor actividad SOD ( $p = 0,001$ ) cuando *C. albicans* fue tratado con CSP que con 5-FC (Figura 4B). A 6 h., no se observan diferencias de la actividad CAT cuando es tratada con los diferentes antifúngicos respecto a sin tratamiento. Sin embargo, se observa una tendencia de disminución de la actividad CAT cuando *C. albicans* es tratada con CSP respecto al tratamiento con FLU ( $p = 0,065$ ) la (Figura 4C).

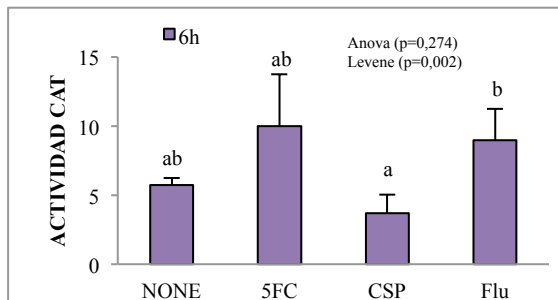
4A



4B



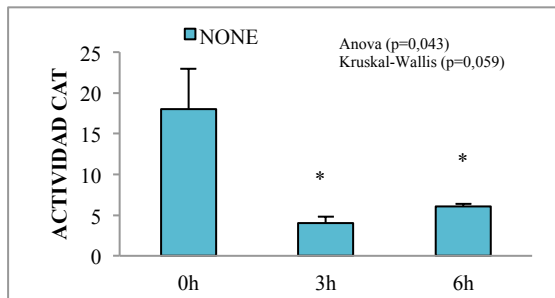
4C



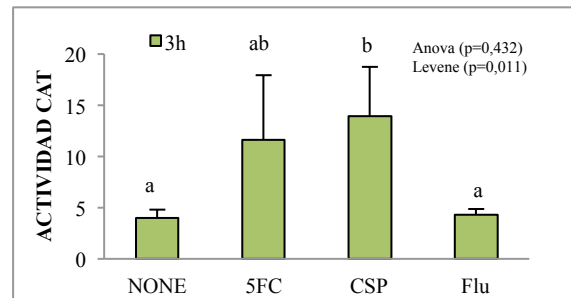
**Figura 4.** Actividad CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  prot.) de la cepa de laboratorio de *C. albicans*, SC5314. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad CAT a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad CAT a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. (\*\*\*) valor muy significativo ( $p \leq 0,005$ ) con respecto al sin tratamiento. Letras distintas implican diferencias significativas.

Para el aislado clínico de *C. albicans*, CA48, observamos que cuando no se ha aplicado tratamiento, la actividad CAT posee una tendencia a disminuir estadísticamente ( $p=0,063$ ) de 0 h. a 3 h. para aumentar a las 6 h. ( $p=0,096$ ) (Figura 5A). Cuando *C. albicans* fue tratada con los diferentes antifúngicos a 3 h., se observó que hay un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad CAT en presencia de CSP. Así mismo, cuando se analizó la variación de actividad CAT cuando CA48 fue tratada con los diferentes tratamientos, observamos una disminución ( $p < 0,05$ ) de actividad cuando fue tratada con FLU respecto al tratamiento con CSP. No se observó diferencia entre los tratamientos con 5-FC. A 6 h. hubo una disminución ( $p=0$ ) de la actividad CAT cuando *C. albicans* fue tratado con CSP respecto a sin tratamiento (NONE); sin embargo, no se observó modificación de la actividad CAT cuando fue tratado con 5-FC ni con FLU. Así mismo, al comparar la actividad CAT con los diferentes tratamientos se observa una diferencia ( $p \leq 0,05$ ) de la actividad cuando se trata con CSP respecto a 5-FC y FLU para ese tiempo.

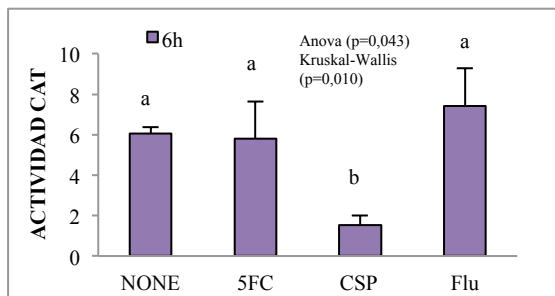
5A



5B



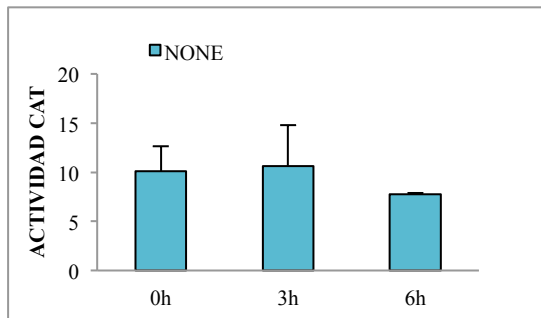
5C



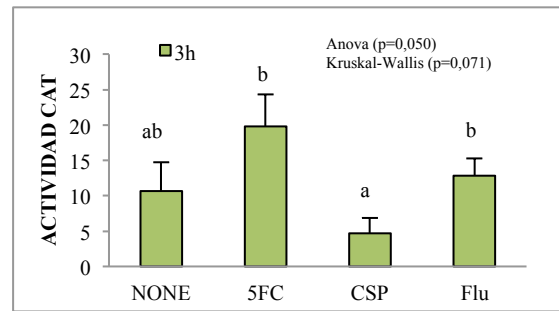
**Figura 5.** Actividad CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  prot.) de la cepa de aislado clínico de *C. albicans*, CA48. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad CAT a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad CAT a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. (\*) valor significativo ( $p \leq 0,05$ ) respecto de 0 h. Letras distintas implican diferencias significativas.

En el aislado clínico CG57 de la especie *C. glabrata* observamos que no hay diferencias cuando se no se le ha añadido tratamiento a 0 h., 3 h. y 6 h. (Figura 6A). Cuando *C. glabrata* fue expuesta a los diferentes tratamientos, a las 3 h. se observó que no hay diferencia entre los antifúngicos con respecto a sin antifúngico (NONE); sin embargo, existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al ser comparados entre sí los antifúngicos, se observa que hay un aumento de la actividad CAT en los tratamientos con 5-FC y FLU respecto al tratamiento con CSP. Así mismo, hay un aumento de la actividad CAT ante FLU con respecto de CSP (Figura 6B). Para el caso de 6 h., la actividad CAT de los antifúngicos respecto al control (NONE), refleja que si hay diferencia estadísticamente significativa con 5-FC ( $p=0$ ) y con CSP ( $p < 0,05$ ). Para el resto de comparaciones no se observaron diferencias (Figura 6C).

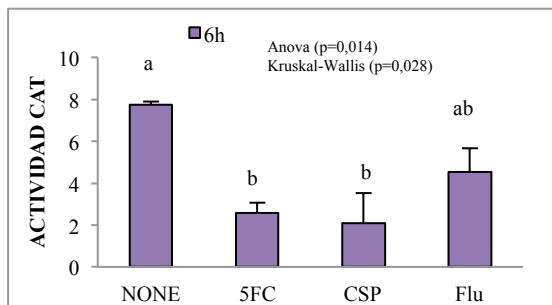
6A



6B



6C



**Figura 6.** Actividad CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  prot.) de la cepa de aislado clínico de *C. glabrata*, CG57. **A)** para 0 h., 3 h., 6 h. sin tratamiento (NONE). **B)** Actividad CAT a 3 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento (NONE). **C)** Actividad CAT a 6 h. con los tratamientos (5-FC, CSP, FLU) en comparación a sin tratamiento. Letras distintas implican diferencias significativas.

# DISCUSIÓN

Las levaduras del género *Candida*, a pesar de formar parte de manera natural en la flora microbiana, son una de las mayores causas de infección en humanos (Pfaller y Diekema, 2007) provocando un gran impacto en la salud de éstos y animales. Debido a su naturaleza eucariota aeróbica, se encuentran constantemente expuestas a especies reactivas del oxígeno, resultado del metabolismo celular, y al bombardeo oxidativo por parte de las células fagocíticas (Enjalbert *et al.*, 2007). La respuesta de las levaduras a estas condiciones de estrés viene regulada por la acción conjunta de diferentes enzimas antioxidantes, siendo el sistema antioxidante genérico, compuesto por las enzimas SOD y CAT, la primera línea de defensa celular. La respuesta antioxidante por parte de las levaduras frente al uso de antifúngicos ha sido vagamente estudiada, haciéndose importante la profundización en el estudio para la identificación de posibles nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo racional de fármacos antifúngicos (Mahl *et al.*, 2015).

Tras la exposición a agentes antifúngicos, el crecimiento y la virulencia del organismo se ven afectadas, induciendo una respuesta al estrés que va a depender tanto del tratamiento como de la especie de levadura (Cannon *et al.*, 2007). Con el tiempo, la exposición de levaduras a antifúngicos ha desembocado en la aparición de resistentes, incluso se ha observado en nuevos modelos de estudio que el fenómeno podría darse por mecanismos de mutagénesis adaptativa (Quinto-Aleman *et al.*, 2012). Estudios previos han concluido que cuando las enzimas encargadas de llevar a cabo la respuesta antioxidante se inactivan, aumenta la patogenicidad de *C. albicans* (Enjalbert *et al.*, 2007), sin embargo se desconocen con exactitud los procesos que median en la respuesta celular.

Hasta que Linares *et al.* (2013) determinaron las actividades SOD y CAT en la respuesta de resistencia a FLU y anfotericina B, el efecto oxidativo inducido por estrés por FLU en *Candida* no había sido estudiado. Concluyeron que estas enzimas juegan un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo cuando son tratadas con FLU. La actividad SOD está relacionada con la detoxificación de los radicales libres superóxido, tales como los radicales producidos por los fagocitos e inducidos por la exposición al antifúngico como se ha descrito en otros estudios (Bink *et al.*, 2011), describiendo así la importancia del papel de esta enzimas en la generación de resistencia a la tolerancia de otros antifúngicos, como el miconazol. Por consiguiente, si FLU induce la actividad SOD, entonces la respuesta causada por la exposición al antifúngico podría contribuir al incremento de la resistencia de *Candida* al

ataque de las células fagocíticas. De forma similar, en *Candida* la actividad CAT aumenta en exposición a FLU y se sugiere que esta enzima está involucrada en la resistencia y en la formación de hifas frente a FLU y anfotericina B (Linares *et al.*, 2013).

Inicialmente, en nuestro estudio, hemos observado que, en ausencia de antifúngicos, el cambio de medio en sí podría ser causa de un incremento de  $O_2^-$  dada una activación inicial de SOD en alguna de las cepas. Las actividades SOD de la cepa de laboratorio de *C. albicans* (SC5314) y del aislado clínico de *C. glabrata* (CG57) aumentan a 3 h. de forma significativa, no habiendo diferencias a las 6 h. En cambio, en ninguno de los casos existe aumento de actividad CAT, hayándose incluso diferencias significativas en cuanto a reducción de dicha actividad en las cepas SC5314 y CA48. Este fenómeno de estrés inicial, por aumento de actividad SOD, en SC5314 y CG57 al pasar de un medio a otro, podría relacionarse con la diferente composición de los medios: el medio SC se corresponde con un medio mínimo, con una suplementación muy concreta de aminoácidos (Burke *et al.*, 2000), y posee menos cantidad de nutrientes que el YPD donde fueron crecidas previamente, que es un medio rico.

En cuanto a los resultados de exposición a los antifúngicos empleados respecto a los controles, observamos que cuando las levaduras de las tres cepas son expuestas a FLU no hay diferencias significativas en las actividades de SOD ni de CAT, siendo generalmente similares. Para el tratamiento con CSP no se hayaron diferencias en las actividades SOD. En cuanto a las actividades CAT frente a CSP, la respuesta a 3 h. aumenta de forma significativa en el caso de CA48, pero no en las otras dos cepas. En cambio, a 6 h. existe una disminución significativa de actividad en CA48 y CG57. Al tratar con 5-FC, de forma significativa sólo observamos un aumento de la actividad SOD de CG57 a las 3 h., y de la actividad CAT de SC5314 también a 3 h. Sin embargo, la tendencia generalizada en todas las cepas expuestas a 5-FC parece ser el aumento de las actividades SOD y CAT a 3 h. para disminuir posteriormente a las 6 h.

Al comparar los efectos de los diferentes antifúngicos entre sí, si bien a las 3 h. existen resultados muy variables, sí se observa como a las 6 h. hay una tendencia a ser mayores las actividades de ambas enzimas para el tratamiento con FLU respecto a 5-FC y CSP, llegando a ser estas diferencias significativas en algunos casos.

Analizando los resultados en conjunto, éstos podrían indicarnos que las cepas de estudio no son sensibles a las concentraciones empleadas de FLU, o que dado a lo descrito en estudios previos (Linares *et al.*, 2013) y vista la tendencia a aumentar las actividades enzimáticas a 6 h.

de exposición a FLU, el tiempo debería ser mayor para poder encontrar diferencias significativas de actividades SOD y/o CAT. En el caso de CSP los resultados podrían deberse a que siendo la CSP un potente fungicida existe un alto índice de mortalidad celular y a las 6 h. no somos apenas capaces de determinar las actividades, con lo cual habría que reducir la concentración del antifúngico o realizar los ensayos a tiempos más cortos. En el caso de 5-FC, los resultados de actividad de ambas enzimas en las tres cepas parecen indicar que existe un aumento inicial de estrés oxidativo inducido por 5-FC en torno a la franja de 3 h., que se reduce a las 6 h. Siendo la tendencia frente a 5-FC común en las tres cepas, debemos ajustar los tiempos de los ensayos en torno a la franja de 3 h.

# CONCLUSIONES

1. Cuando las cepas SC5314 y CG57 son crecidas en un medio rico, como es el YPD, y posteriormente son resembradas en un medio mínimo, como es el SC, se induce un aumento inicial de estrés oxidativo, determinado por el aumento de la actividad SOD. En cambio, la cepa CA48 no es sensible al cambio de medio.
2. A 6 h. existe una tendencia, sin diferencias significativas, a aumentar la actividad del sistema antioxidante genérico en ambas cepas de *Candida albicans* expuestas a FLU. Para estas cepas los ensayos han de realizarse a mayores tiempos de exposición, o la concentración de FLU debe ser aumentada. CG57 parece no ser sensible a la concentración de FLU empleada.
3. Los ensayos de actividad enzimática con CSP han de realizarse a menor tiempo de exposición, o la concentración de CSP ha de ser reducida.
4. 5-FC parece inducir un aumento inicial de estrés oxidativo que las levaduras son capaces de tamponar. Ha de ajustarse el tiempo de los ensayos en torno a la franja de 3 h.



# CONCLUSIONS

5. When SC5314 and CG57 strains are grown in a rich medium, such as YPD, and are subsequently re-grown in a minimal medium, such as SC, an initial increase in oxidative stress is induced, as determined by the increase of SOD activity. In contrast, CA48 strain is not sensitive to the change of medium.
6. At 6 h. there is a tendency, without significant differences, to increase the activity of the generic antioxidant system in both strains of *Candida albicans* exposed to FLU. For these strains the tests have to be performed at longer times of exposure, or the FLU concentration should be increased. CG57 appears to be not sensitive to the FLU concentration employed.
7. The enzyme activity assays with CSP have to be performed at earlier exposure times, or CSP concentration should be reduced.
8. 5-FC seems to induce an initial increase in oxidative stress which yeasts are capable to buffer. The time zone of the assays should be adjusted before or after 3 h.

# AGRADECIMIENTOS

Se hace necesario darle las gracias a David Quinto y a Fátima Mesa, por aguantar mis desvaríos y ayudarme en cada una de las palabras que componen este trabajo. A mi tutor Mario Díaz, gracias por resolverme siempre todas las incesantes dudas con las que lo abordaba.

Hacer una breve mención a alguien que me ayudo por los pasillos siempre que pudo, Pilar Badía, gracias.

A mis padres por haberme dado esos pequeños empujones para no decaer y tirarlo todo por la ventana. También a los que ya no están, que me hubiese encantado que pudieran verme hoy. Sin ellos no hubiese llegado tan lejos.

Por último, a toda esa gente que nunca dejó de creer que podría conseguirlo, acabar y graduarme, a pesar de mis pesadas quejas y de mi largo periodo en la carrera.

Gracias a todos.

# BIBLIOGRAFÍA

- Akins, R. A.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **43**:285-318.
- Bink, A., Berkefeld, J., Kraus, L., Senft, C., Ziemann, U. y du Mesnil de Rochemont, R.** 2011. Long-term outcome in patients treated for benign dural arteriovenous fistulas of the posterior fossa. *Neuroradiology.* **53**:493-500.
- 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.
- Brown, A. J. P. y Gow, A. R.** 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**:333- 338.
- Burke, D., Dawson, D. y Stearns, T.** 2000. *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbor, NY. Cold spring Harbor Laboratory Press.
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M. y Monk, B. C.** 2007. *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology.* **153**:3211-3217.
- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A.** 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**:527-605.
- Claiborne, A.** 1985. Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research.* Ed. Greenwald, R.A. 283-284. Florida, USA.
- Chait, R., Craney, A. y Kishony, R.** 2007. Antibiotic interactions that against resistance. *Nature.* **446**:668-671.
- Colombo, A., Garnica, M., Camargo, L., Da Cunha, C., Bandeira, A., et al.** 2013. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med. Mycol.* **51**:38-44.
- Concia, E., Azzini, A. y Conti, M.** 2009. Epidemiology, incidence and risk Factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs.* **69**:5-14.
- Enjalbert, B., MacCallum, D. M., Odds, F. C. y Brown, A. J. P.** 2007. Niche-specific activation of oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **75**:2143-2151.
- Gafter-Gvili, A., Vidal, L., Goldberg, E., Leibovici, L., Paul, M.** 2008. Treatment of invasive candidal infections: Systematic review and Meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **83**:1011-1021.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. y Cabisco, E.** 2007. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *BBA.* **1780**:1217-1235.
- Halliwell, B.** 1982. Production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals by phagocytic cells, a cause of chronic inflammatory disease. *Cell Biol. Int. Rep.* **6**:529-542.
- Halliwell, B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**:312-322.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.** 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* **186**:1-85.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.** 1999. Free radicals in biology and medicine. Ed. Oxford: Oxford Science Publications. 105-245.
- Hwang, C. S., Rhie, G., Oh, J., Huh, W., Yim, H. y Kang, S.** 2002. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expressions of its full virulence. *Microbiology.* **148**:3705-3713.

- Lamarre, C., LeMay, J. D., Deslauriers, N. y Bourbonnais, Y.** 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 Gene Product) upon the entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* **276**:43784-43791.
- Linares, C. E. B., Giacomelli, S. R., Altenhofen, D., Alves, S. H., Morsch, V. M. y Schetinger, M. R. C.** 2013. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev. Bras. Med.* **46**:752-758.
- Lortz, S. y Tiedge, M.** 2003. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic. Biol. Med.* **34**:683-688.
- Mahl, C. D., Saul-Behling, C., Hackenhaar, F. S., Carvalho-Silva, M. N., Putti, J., et al.** 2015. Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **82**:203-208.
- Marklund, S. y Marklund, G.** 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**:469-474.
- Martchenko, M., Alarco, A. M., Harcus, D. y Whiteway, M.** 2004. Superoxide dismutase in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol. Biol. Cell.* **15**:456-467.
- Missall, T., Lodge, J. y McEwen, J.** 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell.* **3**:835-846.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K. Jr., Calandra, T. F., et al.** 2009. Clinical Practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infection Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**:503-535.
- Pfaller M. A. y Diekema D. J.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-163.
- Quinto-Aleman, D., Canerina-Amaro, A., Hernández-Abad, L.G., Machín, F., Romesberg, F. E. y Gil-Lamaignere, C.** 2012. Yeasts acquire resistance secondary to antifungal drug treatment by adaptive mutagenesis. *PLoS ONE.* **7**:e42279.
- Rhie, G., Hwang, C. S., Brady, M. J., Kim, S. T., Kim, Y. R., et al.** 1999. Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *BBA.* **1426**:409-419.
- Schröter, C., Hipler, U. C., Wilmer, A., Kunkel, W. y Wollina, U.** 2000. Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Arch. Dermatol. Res.* **292**:260-264.
- Vandeputte, P., Ferrari, S. y Coste, A. T.** 2011. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *J. Microbiol.* **2012**:1-26.
- Venereo-Gutiérrez, J. R.** 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Millit.* **31**:126-133.